

Universität Ulm
Institut für Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. Walther Vogel

**Bestimmung der Heritabilität der DNA-Reparaturkapazität mit Hilfe
zellbiologischer Tests**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Madeleine Kim Stuber
Ludwigsburg
2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Walther Vogel

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Julia Stingl

Tag der Promotion: 08.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Definition

1.1.2 Hereditäres Mammakarzinom und BRCA1/2

1.1.3 Tumorentstehung und DNA-Reparatur

1.2 Bestimmung der Reparaturkapazität bei Zwillingen

1.2.1 Eineiige und zweieiige Zwillinge

1.2.2 Der G₀-Mikronukleustest

1.2.3 Der Schwesterchromatid-Austausch Test

1.2.4 Der Mitotic Delay

1.3 Fragestellung der Arbeit

2. Material und Methoden

2.1. Probanden

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien

2.2.2. Lösungen und Kulturmedien

2.2.3. Laborgeräte

2.2.4. Software

2.3. Methoden

2.3.1. Der G₀-Mikronukleus Test

2.3.2. Der Schwesterchromatid-Austausch Test

2.3.3. Der Mitotic Delay Test

2.3.4. Statistische Auswertung

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Mikronukleus Tests

3.1.1 MN-Raten

3.1.2 Zusammenhang der MN-Raten mit und ohne Bestrahlung

3.1.3 Korrelation zwischen den Zwillingen

3.1.4 Intrapaarvarianzen und Heritabilität

3.2 Ergebnisse des Schwesterchromatid-Austausch Tests

3.2.1 SCE-Raten

3.2.2 Zusammenhang der SCE-Raten mit und ohne Mutagenbehandlung

3.2.3 Korrelation zwischen den Zwillingen

3.2.4 Intrapaarvarianzen und Heritabilität

3.3 Ergebnisse des Mitotic Delay

3.3.1 MD-Werte

3.3.2 Korrelation zwischen den Zwillingen

3.3.3 Intrapaarvarianzen und Heritabilität

3.4 Korrelation der MD-Werte, MN- und SCE-Raten

3.5 Ergebnisse des Varianzvergleichs und der Heritabilität

4. Diskussion

4.1 Periphere Blutlymphozyten

4.2 Heritabilität

4.3 MN-Raten und Heritabilität

4.3.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die MN-Raten

4.3.2 Heritabilität

4.4 SCE-Raten und Heritabilität

4.4.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die SCE-Raten

4.4.2 Heritabilität

4.5 MD-Werte und Heritabilität

4.5.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die MD-Werte

4.5.2 Heritabilität

4.6 Korrelation der MD-Werte, MN- und SCE-Raten

4.7 Bedeutung für die Zukunft

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

7.1 Classifier H21

7.2 Flow-Zytometer Einstellungen

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bidest.	bidestilliert
BNC	binukleäre Zellen
BRCA	breast cancer
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin
ca.	circa
Cyt B	Cytochalasin-B
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DCIS	Duktale Carcinoma in situ
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribunucleic acid
DR	direkte Reparatur
DSB	Doppelstrangbruch
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EE	eineiig
FCS	Fetales Kälberserum
FPG	Fluoreszenz plus Giemsa
g	Gramm
G 0/1/2	Gap-Phase 0/1/2
Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HR	Homologe Rekombination
IDC	invasive duktale Karzinom
ILC	invasive lobuläre Karzinom
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LCIS	Lobuläre Carcinoma in situ
μ	mikro-
m	milli-

Abkürzungsverzeichnis

M	Molar
min	Minuten
MMR	Mismatchreparatur
M-Phase	Mitosephase
MN	Mikronukleus, Mikronuklei
n	nano-
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NHEV	Nichthomologe Endverknüpfung
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PHA	Phythämagglutinin
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCE	Sister chromatid exchange
SSC	Saline sodium citrate
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
ZE	zweieiig

1. Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Definition

Brustkrebs ist in Deutschland, wie auch weltweit, die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Durchschnittlich erkrankt jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren.

Nach Schätzungen der Dachdokumentation Krebs am Robert Koch-Institut erkranken in Deutschland jährlich 57.000 Frauen neu am Mammakarzinom (MCa). Damit ist das Mammakarzinom für 27,8% aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen verantwortlich. Als Erkrankung der Milchgänge (duktales MCa) oder der Drüsenläppchen (lobuläres MCa) des Brustgewebes, ist in den industrialisierten Ländern Brustkrebs die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt zurzeit über alle Stadien betrachtet bei 81%.

Der häufigste benigne Tumor der Brust ist das Fibroadenom.

Die Einteilung der malignen Tumore erfolgt laut WHO (World Health Organisation) in invasive und nicht invasive in situ Karzinome.

Der häufigste invasive Tumor der Brustdrüse ist das invasive duktales Karzinom (IDC), ein Adenokarzinom, das ca. 80% aller Mammakarzinome ausmacht. Ca. 15% der malignen Brusttumore sind invasiv lobuläre Karzinome (ILC). Außerdem gibt es noch invasiv tubuläre, muzinöse, papilläre und medulläre Karzinome.

Das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) gehören zu zweiter Gruppe, wie auch der Morbus Paget, eine nicht invasive Tumorausbreitung in der Mamillenhaut.

Als Risikofaktoren werden eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Kinderlosigkeit und ein hohes Alter bei der Geburt des ersten Kindes angegeben. Außerdem scheint das Risiko auch durch Übergewicht, Bewegungsmangel und regelmäßigen Alkoholkonsum gesteigert zu sein.

Etwa 5% der Brustkrebserkrankungen sind durch Mutationen in den Genen BRCA1 oder 2 bedingt und folgen einem autosomal dominanten Erbgang.

Hinweise auf eine erblich bedingte Form sind Häufungen von Brustkrebs und

1. Einleitung

Eierstockkrebs in der Familie, Erkrankung eines Mannes der Familie, bilateraler Befall und ein frühes Erkrankungsalter.

1.1.2 Hereditäres Mammakarzinom und BRCA1/2

Hereditäre Mammakarzinome, die früh auftreten, werden mit zwei Suszeptibilitäts-genen für Brustkrebs in Verbindung gebracht.

BRCA1 (Breast Cancer 1) ist auf der Chromosomenregion 17q21 lokalisiert (Miki *et al.*, 1994). BRCA2 (Breast Cancer 2) als weiteres krankheitsursächliches Gen wurde in der Region 13q12-13 gefunden (Wooster *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995).

Bei 43% aller Familien mit einem hereditären Auftreten von Brust- oder Ovarialkarzinomen wurde eine Keimbahnmutation in BRCA1 gefunden, bei 10% in BRCA2. Bei Familien, in denen mindestens zwei Fälle von Brustkrebs noch vor der Menopause der Frauen auftreten, konnte in 24% eine BRCA1, in 13% eine BRCA2-Keimbahnmutation nachgewiesen werden (Meindl, 2002).

Die BRCA-Gene gehören zu den Tumorsuppressorgenen. BRCA1 wird bei Säugetieren in den Zellen fast aller Gewebe exprimiert (Durocher *et al.*, 1997; Blackshear *et al.*, 1998). Durch die Induktion bzw. Repression der Expression von BRCA1 in Brustkrebszelllinien wird das Expressionslevel vieler Gene beeinflusst (Welch *et al.*, 2002).

Sie spielen vor allem eine große Rolle in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch Homologe Rekombination (HR) und bei dem Zellzyklus-Arrest nach DNA-Schäden. Für die Erkennung von DNA-Schäden, die in der Folge über die HR repariert werden, ist der BASC-Komplex (Brca1-associated genome surveillance complex) von Bedeutung (Wang *et al.*, 2000). Ein Teil dieses Komplexes ist der Mre11/Rad50/Nbs1-Proteinkomplex mit dem das BRCA1-Protein interagiert (Zhong *et al.*, 1999).

Außerdem bindet sowohl BRCA1 als auch BRCA2 *in vivo* an das Protein Rad51, das ebenso an der HR beteiligt ist (Scully *et al.*, 1997).

Im Bereich der Zellzykluskontrolle arretiert die BRCA1-abhängige Chk1-Kinase die Zelle am Übergang von der G₂ zur M-Phase (Yarden *et al.*, 2002). BRCA2 nimmt ebenfalls Einfluss auf die Zellzyklusregulation in dem es an p53 und Rad51 bindet (Marmorstein *et al.*, 1998).

1. Einleitung

1.1.3 Tumorentstehung und DNA-Reparatur

Bei Tumorzellen ist die Abstimmung von Wachstum, Teilung und Apoptose im Zellverband außer Kraft gesetzt. Unter vielen anderen Mechanismen, haben vor allem die Aktivierung von Onkogenen und der Ausfall von Tumorsuppressorgenen, zu denen auch die BRCA-Gene gehören, große Bedeutung. Die oben genannten Gene überwachen die DNA nach jeder Replikation, entscheiden über die Notwendigkeit von Reparaturvorgängen, halten den Zellzyklus an, bis die Reparaturen ausgeführt sind und induzieren gegebenenfalls die Apoptose, falls die Reparatur nicht zum Erfolg führt.

Tumorsuppressorgene fallen in zwei Klassen: Die primäre Wachstumsregulation der Zellen (Typ Rb) und alternativ Kontrolle der Genomintegrität (Gene der DNA-Reparatur), von Kinzler und Vogelstein als gatekeeper und caretaker bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit ist die letztere Gruppe von Bedeutung.

Neben Keimbahnmutationen in den BRCA1/2-Genen bei hereditären Brustkrebsfällen wurde auch bei 45% der sporadischen Brusttumoren ein BRCA1-Kopie-Verlust beobachtet, der mit einer verminderten Expression der BRCA1-mRNA einher geht (Staff *et al.*, 2003).

Dies ist assoziiert mit der Entwicklung eines duktales *in situ*-Karzinoms zu einem invasiven Karzinom (Thompson *et al.*, 1995).

Außerdem besitzen Zellen mit verkürztem BRCA2-Protein eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und mutagenen Agenzien (Patel *et al.*, 1998). Ausfälle in allen bekannten Reparaturwegen führen zu Tumoren. Änderungen der DNA wie Basen-Schäden, Schäden am Z-P₁ Rückrat, Strangbrüche oder Crosslinks können über die Direkte Reparatur (DR), Basenexcisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und Doppelstrangbruchreparatur repariert werden. Die Mismatchreparatur (MMR) ist hier nicht mit eingeschlossen, da sie nichtkovalente Fehlpaarungen von Nukleotiden repariert.

Reparaturwege für Doppelstrangbrüche sind die Nichthomologe Endverknüpfung (NHEV) und die Homologe Rekombination (HR). Die HR ist im Gegensatz zur NHEV frei von Informationsverlust, da das homologe Chromosom als Matrize benutzt wird.

Die HR und die NHEV sind besonders wichtig für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen und somit das Verhindern der Entstehung von Tumoren, da bei Doppelstrangbrüchen bei einer nachfolgenden Zellteilung große

1. Einleitung

Chromosomenfragmente verloren gehen könnten. Übersichten über die Reparatursysteme sind bei Sancar *et al.* 2004 und Wood *et al.* 2005 zu finden.

1.2 Bestimmung der Reparaturkapazität bei Zwillingen

1.2.1 Eineiige und zweieiige Zwillinge

Zwillinge kann man in monozygote eineiige, und dizygote zweieiige Zwillinge unterteilen. In der Bevölkerung sind 2/3 aller Zwillinge zweieiig. Nur 1/3 der Zwillinge sind eineiig. Genetisch identische Veranlagungen bestehen nur bei monozygoten Zwillingen, zweieiige Zwillinge sind wie normale Geschwister anzusehen. Insgesamt geht man davon aus, dass bei einer von 85 Schwangerschaften eine Zwillingsschwangerschaft besteht.

Dizygote Feten entstehen, wenn zwei Spermien zwei Eizellen befruchten, sich beide im Uterus einnisten und Embryonen heranwachsen. Diese Zwillinge sind immer dichorial – es bestehen zwei Plazenten und diamnial – es entstehen zwei Fruchthöhlen.

Monozygote Zwillinge entstehen aus einer Eizelle und einem Spermium. Kommt es zu einer Zellteilung in zwei Teile vor dem dritten Tag post conceptionem so entstehen dichoriale und diamniale monozygote Zwillinge (35% der eineiigen Zwillinge). Bei einer Zweiteilung im späteren Stadium zwischen dem dritten und siebten Tag wachsen monochoriale diamniale Zwillinge heran (65%). Bei einer Teilung zwischen dem siebten und dreizehnten Tag geht man von einer monochorial monoamnialen Zwillingsschwangerschaft aus (<1% der monozygoten Zwillinge). Sollte sich die Embryonalanlage noch nach dem dreizehnten Tag nach Konzeption teilen, so entstehen siamesische Zwillinge.

In der Gynäkologie ist jede Zwillingsschwangerschaft eine Risikoschwangerschaft. Allein durch eine Sonographie kann niemals zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen unterschieden werden. Bis zur 24. SSW ist eventuell ein Lambdazeichen im Ultraschall vorhanden, das auf dichoriale Verhältnisse schließen lässt, ein T-Zeichen jedoch eher auf Monochoriale. Diese Unterscheidung ist oftmals wichtig, da v.a. bei monochorial-monoamnialen Zwillingen gefürchtete Komplikationen entstehen können wie z.B. ein Austauschtransfusionssyndrom.

1. Einleitung

Eineiige Zwillinge haben ein identisches Erbgut, zweieiige Zwillinge haben ungefähr 50% des Genoms gemeinsam. Diese Tatsache macht man sich in der Zwillingsforschung zur Untersuchung genetischer Anteile eines Merkmals zum Vorteil.

Die Untersuchung eineiiger und zweieiiger Zwillinge ist hilfreich, um festzustellen, ob die Reparaturkapazität genetisch determiniert ist. Wenn ein Merkmal von Zellen genetisch bedingt ist, muss die Varianz des betrachteten Merkmals innerhalb eineiiger Zwillingspaare niedriger sein, als die Varianz bei zweieiigen. Eine Eigenschaft ist nur dann rein genetisch bedingt, wenn die Umwelt darauf keine Einwirkung hat.

1.2.2 Der G_0 -Mikronukleustest

Der G_0 -Mikronukleustest ist ein ursprünglich als Mutagenitätstest angewandter zellbiologischer Test, der schon sehr lange bekannt ist (Garcia-Sagredo, 2008). In meiner Arbeit habe ich peripheren Blutlymphozyten mit ionisierender Strahlung DNA-Schäden zugefügt. Die Zellen versuchen diese Schäden zu reparieren. Geschieht dies nicht korrekt, so bleiben diejenigen Chromosomen und Chromosomenfragmente als Mikronuklei bei der Zellteilung liegen, die vom Spindelapparat nicht erfasst werden.

Als Mikronuklei bezeichnet man diejenigen chromatinhaltigen Fragmente, die umgeben von einer eigenen Kernmembran im Cytoplasma außerhalb der eigentlichen Zellkerne vorhanden sind.

Um Werte zu erhalten, die zwischen Personen und zwischen unbehandelten und behandelten Kulturen vergleichbar sind, werden allein solche Zellen gezählt, die eine Mitose durchlaufen haben, aber keine Zellteilung. Dies geschieht durch die Verhinderung der Zellteilung, jedoch nicht der Kernteilung, durch Cytochalasin-B, das den Kulturen zugegeben wird, sodass binukleäre Zellen entstehen. D.h. man geht davon aus, dass die Zellen in der G_0 -Phase bestrahlt worden sind und zählt nur die Mikronuklei der binukleären Zellen. Dabei hat Cyt B alleine keinen Einfluss auf die Bildung von Mikronuklei (Fenech and Morley, 1985).

Es wurden mit dieser Methode bei den eineiigen und zweieiigen Zwillingen die MN-Raten mit und ohne Bestrahlung pro 1000 binukleärer Zellen errechnet.

Man hat in vielen Studien eine erhöhte Mikronukleusrate bei Brustkrebspatienten, unabhängig von BRCA1/2 Mutationen (Baeyens *et al.*, 2004) und bei Patienten mit

1. Einleitung

angeborenen Gendefekten wie Ataxia teleangiectasia nachweisen können (Ban *et al.*, 2004; Gutierrez-Enriquez *et al.*, 2004). Je höher die Mikronukleusrate ist, desto niedriger ist die Reparaturkapazität der Person.

In der Mikronukleusrate der nicht bestrahlten Kulturen spielen sowohl genetische Faktoren wie Alter und Geschlecht als auch Umwelteinflüsse wie körperliche Betätigung oder Rauchen eine Rolle (Ishikawa *et al.*, 2003). Außerdem haben andere Faktoren, wie die Lagerungsbedingung des Blutes vor Kulturansatz, Einfluss auf die MN-Rate ohne Bestrahlung (Lee *et al.*, 1999). Die MN-Raten mit Bestrahlung sind weitgehend unabhängig von Einflussfaktoren wie Rauchen (Varga *et al.*, 2006). Durch ein automatisches Auszählungssystem können Faktoren minimiert werden, die durch das visuelle Auszählen durch unterschiedliche Personen entstehen (Varga *et al.*, 2004).

Bei den bestrahlten Kulturen ist ein hoher genetischer Zusammenhang zu erwarten und die Intrapaarvarianzen bei eineiigen Zwillingspaaren müssten geringer sein als die Varianz bei zweieiigen Paaren.

1.2.3 Der Schwesterchromatid-Austausch Test

Als zellbiologischer Test, der die Mutagenität verschiedener Substanzen auf die Zellen erfasst, wird der Schwesterchromatid-Austausch Test schon seit vielen Jahren benutzt (Speit and Vogel, 1986). Bei diesem Test können über ein chemisches Reagenz DNA-Schäden induziert werden. Nach einer gewissen Zeit, die der Zelle die Reparatur der primären Läsionen der DNA erlaubt, werden über bestimmte Färbemethoden Schwesterchromatid-Austausche sichtbar.

Durch im Rahmen der Reparatur ablaufenden Prozesse kommt es zu einer intrachromosomalen Rekombination zwischen den Chromatiden. Es ist eine erhöhte Rate von SCE bei Krebspatienten und deren Verwandten 1. Grades mit Brustkrebs nachgewiesen (Adhvaryu *et al.*, 1988; Cefle *et al.*, 2006). Anhand der SCE-Rate mit Mutagenbehandlung kann man auf die Sensitivität der Zelle gegenüber dem Mutagen bzw. die Reparaturkapazität rückschließen (Speit *et al.*, 1985). Bei diesem Test stehen erhöhte SCE-Raten mit und ohne Mutagenbehandlung mit einer erniedrigten Reparaturkapazität in Korrelation (Shiraishi *et al.*, 1983). Durch ionisierende Strahlung, die im Mikronukleustest angewendet wurde, werden die SCE-Raten allerdings kaum beeinflusst (Morgan and Crossen, 1980).

1. Einleitung

1.2.4 Der Mitotic Delay Test

Der Mitotic Delay gibt Auskunft über die Funktionstüchtigkeit der Kontrollpunkte im Zellzyklus (Leeper and Hagemann, 1973). Wird an einem der Kontrollpunkte ein DNA-Schaden detektiert, so können durch Arretierung des Zellzyklus die DNA-Reparaturvorgänge oder die Apoptose der Zelle eingeleitet werden (Branzei and Foiani, 2008). In Abhängigkeit vom Schaden und der Reparaturfähigkeit kann dieser Zellzyklusarrest zeitlich variieren (Hu *et al.*, 2001). Dies kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst werden. Je nach Verzögerung der Mitose findet eine Anhäufung der Zellen in der G₂-Phase statt. Diese Zellen sind dabei einen detektierten Schaden zu reparieren. Sie werden am Übergang der G₂- zur M-Phase angehalten, an dem eine Weitergabe des geschädigten Erbguts an die Tochterzelle verhindert wird.

Der Mitotic Delay beschreibt das Verhältnis der Zellen, die sich in der G₂ zu S Phase, im Vergleich von bestrahlten zu unbestrahlten Kulturen, befinden. Je langsamer die Reparatur in der vorgegebenen Zeit erfolgt, desto stärker sind zu einem bestimmten Zeitpunkt diese Zellen in der G₂ Phase angereichert. Somit ist auch dieser zellbiologische Test eine Methode die Reparaturkapazität einer Person festzustellen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei verschiedenen genetisch bedingten Defekten der DNA-Reparatur der Mitotic Delay verändert ist, so ist er z.B. bei Ataxie Telangiektasia-Patienten kleiner als bei Gesunden (Scott and Zampetti-Bosseler, 1982), da der Schaden nicht erkannt und der Kontrollpunkt nicht aktiviert wird. Beim Down Syndrom erhält man höhere Werte für den Mitotic Delay (Major, 1994), was bei einer Chromosomenaberration schwer verständlich ist.

Wie im G₀-Mikronukleus-Test und im Schwesterchromatid-Austausch Test sollte auch hier bei eineiigen Zwillingspaaren eine geringere Varianz anzutreffen sein als bei zweieiigen, wenn die Varianz der Reparaturkapazität stark durch genetische Faktoren beeinflusst ist.

1. Einleitung

1.3 Fragestellung der Arbeit

Der Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und dem Auftreten maligner Tumoren ist seit langem bekannt und gut untersucht. Dies gilt für die beiden wesentlichen Faktoren von denen die Anzahl nicht oder falsch reparierter DNA-Schäden abhängt. Einerseits deren Induktion durch mutagene Umwelteinflüsse und andererseits ihre Elimination durch DNA-Reparatur.

Die zuvor besprochenen Tests auf DNA-Reparatur messen grundsätzlich immer das Ergebnis aus beiden Einflussfaktoren, exogenen und genetischen. Dies gilt natürlich auch für den Unterschied zwischen Kontrollen und Patientinnen mit Brustkrebs oder Trägerinnen von BRCA 1/2 Mutationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, den genetisch bedingten Anteil der interindividuellen Variation der Testergebnisse für DNA-Reparaturkapazität zu bestimmen. Das hierfür gebräuchliche Maß ist die Heritabilität, wie sie sich in Zwillingsstudien ermitteln lässt. Ich habe deshalb Blutproben von ein- und zweieiigen Zwillingen gesammelt und parallel – aus derselben Blutprobe – die drei am häufigsten verwendeten Tests, den Mikronukleustest (MNT), den Schwesterchromatid-Austauschtest (SCE) und den Mitotic Delay Test (MD) durchgeführt. Für MNT und SCE existiert der Test in zwei Varianten, nämlich mit und ohne initiale Induktion von DNA-Schäden zu Beginn der Kultur. Die Variante ohne Induktion von DNA-Schäden ist identisch mit dem im Biomonitoring zur Aufdeckung einer Exposition gegenüber exogenen Noxen verwendeten Tests. Bei den Tests nach Induktion von DNA-Schäden wird davon ausgegangen, dass die Schäden die bereits vorhandenen exogenen Schäden überdecken, sodass die Testergebnisse sehr viel deutlicher von genetischen Faktoren abhängen und dementsprechend höhere Heritabilität aufweisen sollten. Überprüft wurde diese Annahme bislang noch nicht, zumindest gibt es keine publizierten Daten, weshalb diese Frage einen wesentlichen zweiten Aspekt meiner Arbeit darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Probanden

Für die vorliegende Studie wurden Blutproben von ein- und zweieiigen gesunden Zwillingspaaren untersucht.

Die Planung des Gesamtprojektes wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm begutachtet und der entsprechende Antrag genehmigt (Votum Nr. 08/2004 – zytologische und molekulare Untersuchungen zum zellulären Phänotyp der Radiosensitivität bei Brustkrebs).

Es wurden sowohl eineiige, als auch zweieiige, gleichgeschlechtliche Zwillingspaare untersucht. Der Zwillingsstatus wurde erst nach Vorliegen erster Ergebnisse ermittelt um eine unbeeinflusste Durchführung zu ermöglichen.

Den Auflagen folgend wurde jeder Proband im Vorfeld über unsere Studie aufgeklärt und gab sein schriftliches Einverständnis zur Blutspende.

Von jedem Probanden wurde 30 ml Blut in Monovetten mit Lithium-Heparin als Gerinnungshemmer, abgenommen.

Zusätzlich zu peripherem Vollblut wurden die Tests auch mit EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt, die im Institut für Virologie der Universität Ulm aus dem Vollblut der Zwillinge angelegt wurden.

Insgesamt wurden 19 Zwillingspaare, zehn eineiige – zwei männlichen und acht weiblichen Geschlechts, und neun zweieiige – fünf männlichen und vier weiblichen Geschlechts, untersucht. Die Probanden waren zwischen 21 und 48 Jahre alt. Das Kollektiv der eineiigen Zwillingspaare besteht zu 80% aus Frauen, das Durchschnittsalter liegt bei 27,7 Jahren, das der Männer liegt bei 27 Jahren, das der Frauen bei 27,8 Jahren.

Das Kollektiv der zweieiigen Zwillingspaare hat fünf männliche Zwillingspaare mit dem Durchschnittsalter 24,6 Jahren und vier weibliche Zwillingspaare mit dem Durchschnittsalter von 47,3 Jahren. Das Gesamtdurchschnittsalter liegt bei 34,6 Jahren.

Vier zweieiige Zwillingspaare wurden nach Abschluss meiner experimentellen Arbeit von der Arbeitsgruppe untersucht, deren Ergebnisse ich nun verwende. Dies geschah aufgrund der schleppenden Rekrutierung zweieiiger Zwillingspaare. Bei

2. Material und Methoden

einem eineiigen Probandenpaar entwickelte sich im 2. Lebensjahr bei beiden Schwestern ein unilateraler Wilmstumor. Die Frauen gelten jedoch heute nach operativer Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie als geheilt. Durch die Chemotherapie bei beiden Zwillingen verursachte DNA-Schäden könnten theoretisch langlebig sein und die, jetzt erhobenen Daten für die DNA-Reparaturkapazität beeinflussen. Die einzige Beobachtung, die sich fraglich mit dieser Anamnese in Verbindung bringen lässt, war eine verminderte Proliferation der Lymphozyten in Kultur. Es konnte deshalb nur der MD und der MN-Test durchgeführt werden. Sämtliche dieser Einzelwerte des Zwillingspaars liegen in der Nähe des Mittelwerts des Gesamtkollektivs und auch die Differenz zwischen den Zwillingen liegt im Mittelfeld der hier beobachteten Ergebnisse.

2. Material und Methoden

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien

5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Seelze
Benzo(a)pyrene Diolepidoxid (BPDE)	BIU, Großhansdorf
Colcemid (Demecolcin), 10 µg/ml	Biochrom, Berlin
Cytochalasin-B from <i>Helminthosporium dermatioideum</i>	Sigma-Aldrich, Seelze
4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Partec, Münster
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) pro analysi	Sigma-Aldrich, Seelze
Eukitt	Kindler, Freiburg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Giemsa	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol purissima	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	AppliChem, Darmstadt
Phytohemagglutinin (PHA)	Invitrogen, Karlsbad
RPMI 1640 + GlutaMAX+ HEPES	Invitrogen, Karlsbad
RPMI 1640 + GlutaMAX	Invitrogen, Karlsbad
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	Vector Lab., Burlingame
Xylol Isomerengemisch	Sigma-Aldrich, Seelze

2.2.2. Lösungen und Kulturmedien

Cytochalasin B-Lösung	5 mg	Cytochalasin B
	10 ml	DMSO
DAPI-Färbelösung	100 ml	4xSSC
	15 µl	DAPI 1 mg/ml

2. Material und Methoden

Fixativ 1	1 Teil	Essigsäure
	5 Teile	Methanol
	6 Teile	NaCl 0,9 % aq.
Fixativ 2	1 Teil	Essigsäure
	5 Teile	Methanol
Fixativ S	1 Teil	Essigsäure
	3 Teile	Methanol
Giemsa-Färbelösung (7%)	93 ml	Sörensen-Puffer
	7 ml	Giemsa
Ibraimov-Lösung	92ml	H ₂ O
	5 ml	Essigsäure
	3 ml	Methanol
Medium für Lymphozytenkultur aus peripherem Blut	100 ml	RPMI1640 + GlutaMAX + HEPES
	20 ml	FCS
	1,25 ml	PHA
	1,25 ml	Gentamycin
Medium für Lymphozytenkultur aus EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien	100 ml	RPMI1640 + GlutaMAX
	10 ml	FCS
	1,2 ml	Gentamycin
Saturiertes NaCl	35,06 g	NaCl
	100 ml	Aqua bidest.
SSC-Puffer, 20x	175,32 g	NaCl
	88,2 g	Na-Citrat-Dihydrat
	ad 1 l	Aqua bidest.

2. Material und Methoden

Sörensen-Puffer	5 ml 1/3 M KH_2PO_4
	5 ml 1/3 M Na_2HPO_4
	90 ml Aqua bidest.

2.2.3. Laborgeräte

Brutschrank, 37 °C	Heraeus Instruments, Osterode
Brutschrank, 37 °C, 5 % CO_2	Heraeus Instruments, Osterode
Blutkulturröhrchen (Flachboden) 12 ml	nunc, Roskilde Denmark
Cell Counter Analyzer	partec, Münster
Deckgläser (24x60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmal-Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Pipetten, 2-25 ml	costar, New York, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Oberkochen
Immersionsöl	Carl Zeiss, Oberkochen
Durchlichtmikroskop Okular 12,5 Objektiv 16x	Carl Zeiss, Oberkochen
Monovetten mit Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Osterode
Objektträger (26x76 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	National Can, Greenwich, UK
Pasteurpipetten Glas	Brand, Wertheim
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetboy Accujet	Brand, Wertheim
Probenröhrchen 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.2.4 Software

Ikaros v. 3.0.4 1996	Meta Systems, Altlußheim
Metafer 4 – Msearch v. 3.1.2 206	Meta Systems, Altlußheim
MS Office Excel 2003	Microsoft, Redmont, USA
MS Office Word 2003	Microsoft, Redmont, USA
WinMDI v. 2.9 2000	Joseph Trotter, The Scripps Research Institute
StatView v. 5.0.1 1998	SAS Institute, USA

2. Material und Methoden

2.3 Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden drei zellbiologische Tests verwendet, der G₀-Mikronukleustest, der Schwesterchromatid-Austausch-Test und der Mitotic Delay. Diese Tests wurden verwendet um Lymphozyten aus peripherem Blut von Zwillingen zu untersuchen.

2.3.1 Der G₀-Mikronukleus Test

2.3.1.1 Theorie

Um nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche, die bis in die nachfolgende Mitose erhalten bleiben, nachweisen zu können, bedient man sich des MN-Tests. Durch solche DNA-Schäden entstehen azentrische Chromosomenfragmente, die vom Spindelapparat nicht erfasst werden und im Cytoplasma liegen bleiben. Bei der Neuausbildung der Tochterkerne werden auch sie von einer Kernmembran umhüllt. Diese somit zusätzlich vorhandenen Kerne, die Mikronuklei, kann man im Fluoreszenzmikroskop visuell darstellen.

Die sich im Vollblut befindenden Lymphozyten werden zunächst in ein geeignetes Nährmedium mit FCS gegeben und mit PHA zum Wachsen stimuliert.

Um DNA-Schäden, vor allem Doppelstrangbrüche zu induzieren, bestrahlt man die Kulturen mit ionisierender Strahlung. Eine Vergleichskultur aus demselben Blut wird ebenfalls angelegt, jedoch nicht bestrahlt und liefert somit die Mikronuklei-Rate ohne Bestrahlung.

Je nach individueller Reparaturkapazität werden die DNA-Schäden unterschiedlich schnell repariert. Menschen mit verminderter Kapazität haben eine erhöhte Rate an Mikronuklei.

Somit kann die Mikronukleirate als Maß für die Reparaturkapazität herangezogen werden.

Nachdem die Zellen 44 h Zeit haben die Schäden zu reparieren, gibt man zu den Kulturen CYT B, das die Zellteilung, jedoch nicht die Teilung des Zellkerns unterdrückt. Somit erscheinen alle Zellen als binukleäre Zellen, die innerhalb der 24 h Kulturdauer nach Cyt B Zugabe, eine Mitose durchlaufen haben.

2. Material und Methoden

Darauf folgt die Präparation, bei der die Zellen in einer hypotonen Lösung aufquellen und mehrmals mit Fixativ gewaschen werden.

Abschließend tropft man die Zellsuspension auf Objektträger, färbt die DNA der Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI und weist die BNC mit den MN im Fluoreszenzmikroskop nach.

Abschließend berechnet man die MN-Rate auf 1000 BNC.

2.3.1.2 Vorbereitung der Blutkulturröhrchen

Als Standardmedium wurden 100ml RPMI-1640 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES mit 20 ml FCS, 1,2 ml PHA und 1,2 ml Gentamycin verwendet.

Das Medium für die Lymphozytenkulturen aus peripherem Blut wurde auf einer sterilen Werkbank vorbereitet, zu je 5 ml in Flachbodenröhrchen abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

2.3.1.3 Ansatz und Wachstum der Kultur

Nach Blutabnahme in Lithium-Heparin-Monovetten wurde 500 µl peripheres Vollblut in ein vorbereitetes Blutkulturröhrchen mit 5 ml Medium überführt, das auf 37 °C erwärmt wurde. Die Zeit von der Blutentnahme bis zum Kulturansatz der Blutproben betrug max. 2 Tage, wobei darauf geachtet wurde, dass die Liegezeit innerhalb eines Zwillingspaars gleich blieb.

Es wurden von jedem Zwillingssprobanden 4 Lymphozytenkulturen angelegt, zwei zur Bestimmung der Rate ohne Bestrahlung und zwei, aus denen die mit Bestrahlung behandelten Kulturen hergestellt wurden. Die unbehandelten Kulturen werden im Folgenden MNT(s) genannt.

Die Kulturen wurden sofort nach Ansetzen mit 2 Gy ionisierender Strahlung für 2 min bestrahlt und werden im Folgenden MNT(i) genannt. Die Flachbodenröhrchen wurden entsprechend beschriftet.

Anschließend wurden die Röhrchen stehend in einem Brutschrank bei 37 °C gelagert.

Nach 44 h wurde 15 µl Cytochalasin B zugegeben um die Bildung binukleärer Zellen zu induzieren. Die Endkonzentration lag somit bei 5,5 µg/ml.

Weitere 24 h später brach man die Kulturen ab.

2. Material und Methoden

2.3.1.4 Abbruch der Kultur

68 h nach Ansatz der Kultur, zentrifugierte man die Röhrcchen bei 2000 rpm für 4 min.

Der Überstand über dem Zellpellett wurde bis zu einem Rest von 500 µl mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette aus Glas abgesaugt. Mit Einmalpasteurpipetten wurde das Zellpellett im Rest resuspendiert und im Reservoir der Pipetten aufgenommen um es im Anschluss in 5 ml 0,56 % KCl, das auf 4 °C im Kühlschrank gekühlt wurde, zu resuspendieren. In dieser hypotonen Lösung quollen die Zellen auf. Anschließend kamen die Röhrcchen erneut für 4 min bei 2000 rpm in die Zentrifuge. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5 ml Fixativ 1 bei -20 °C suspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Erneutes Zentrifugieren und viermaliges Waschen nach derselben Methode in je 5 ml Fixativ 2, ebenfalls auf -20 °C gekühlt, erfolgte abschließend. Die Fixativ-Lösungen wurden dafür immer frisch hergestellt nach der Anleitung unter 2.2.2. Die resuspendierten Zellen blieben im Fixativ 2 über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank stehen.

2.3.1.5 Präparation der Objektträger

Die Objektträger für den MNT wurden nach Säuberung mit Ethanol für die Zeit der Vorbereitung der Flachbodenröhrcchen in Aqua bidest gestellt. Es wurden für jede Kultur MNT(s) und jede Kultur MNT(i) zwei Objektträger hergestellt.

Die Kulturen aus dem Kühlschrank wurden bei 2000 rpm für 4 min zentrifugiert. Je nach Menge des Zellpelletts wurde der Überstand bis auf 500-600 µl abgesaugt. Das Zellpellett wurde im verbliebenen Fixativ resuspendiert um die Zellen zu vereinzeln.

Nun wischte man das Wasser auf den Objektträgern mit der Kante eines gefalteten Einmalpapiers so ab, dass auf der Oberfläche ein leichter Wasserfilm zurückblieb. Anschließend wurden je nach Zellmenge 80-120 µl Zellsuspension mit einer Pipette in Schlangenlinien vorsichtig auf die Objektträger aufgebracht. Sofort wurden die Objektträger mit Bleistift beschriftet und zum Trocknen auf Papier ausgelegt.

Die Kontrolle auf binukleäre Zellen erfolgte im Lichtmikroskop.

2. Material und Methoden

Sollte die Dichte der Zellen zu niedrig oder zu hoch sein, wurde mit Fixativ 2 das Volumen der Zellsuspension entsprechend korrigiert.

Das Röhrchen mit dem restlichen Zellpellet wurde mit Fixativ 2 aufgefüllt und für eventuelle Herstellung weiterer Präparate im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

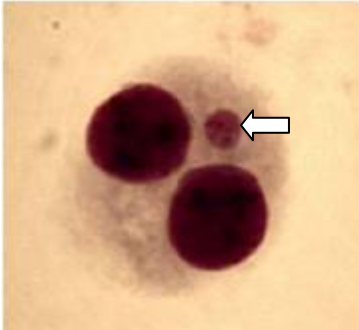


Abb. 1: Binukleäre Zelle mit Mikronukleus im Lichtmikroskop. Speziell für die Abbildung wurde eine Giemsa-Färbung vorgenommen, die jedoch zur Beurteilung der Zelldichte nicht nötig war. Der Pfeil deutet auf einen Mikronukleus.

2.3.1.6 Färbung mit DAPI

Die DAPI-Lösung wurde aus 100 ml 4xSSC und 15 µl aus 1 mg/ml DAPI hergestellt.

Unmittelbar nachdem die Präparate getrocknet sind, wurden sie für 10 min in der zum Lichtschutz mit Aluminiumfolie umwickelten Küvette mit der DAPI-Farbelösung bei RT inkubiert.

Das Trocknen der Objektträger erfolgte in einem lichtgeschützten Schrank in Präparateständern.

Abschließend wurden auf die getrockneten Objektträger je 1 Tropfen Vectashield getropft und mit Deckgläsern eingedeckt. Durch das Vectashield wurde das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verhindert. Die Objektträger wurden in einer Mappe gelagert.

2. Material und Methoden

2.3.1.7 Auszählung der binukleären Zellen und der MN

Für die automatische Auszählung der Zellen und der Mikronuklei wurde die Software Metafer 4 Version 3.1.2 benutzt. Die Bildanalyse zählte, wie durch einige Vorversuche nachgewiesen, sehr genau die Anzahl der binukleären Zellen und der MN. Bei einer Dichte von über 1000 BNC pro Objektträger stellte sich heraus, dass die Mikronukleusrate konstant blieb für einen Versuch. Bei über 4000 BNC wurde die Rate jedoch ungenau.

Für die Auszählung wurde der classifier „H21“ benutzt.

Darin sind die Kriterien für die Größe und Form der BNC und MN gespeichert, sowie die Distanz zwischen zwei Zellkernen. Bei BNC mit zwei oder mehr MN erfolgte eine zusätzliche visuelle Kontrolle.

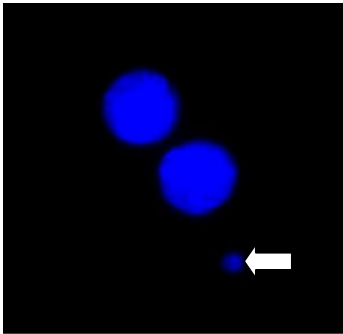


Abb. 2.: Binukleäre Zelle mit Mikronukleus im Fluoreszenzmikroskop. Das DAPI fluoresziert unter UV-Licht blau. Der Pfeil deutet auf einen Mikronukleus.

2.3.2. Der Schwesterchromatid-Austausch Test

2.3.2.1 Theorie

Schwesterchromatid-Austausche können entstehen, wenn die Zelle in der S- oder G₂-Phase DNA-Schäden repariert. Im Zuge dieser Reparatur können DNA-Doppelstrangbrüche entstehen und ein Austausch von Chromosomenstücken unter den Schwesterchromatiden ist möglich.

Im Versuch wird eine Kultur mit BPDE behandelt, einem Mutagen, das DNA-Addukte bildet – DNA-Schäden werden induziert. Die Kultur wird im Folgenden SCE(i) genannt. Als Vergleich wird eine Kultur SCE(s) ohne Mutagenbehandlung mitgeführt, welche die Rate der unbehandelten Kulturen liefert.

2. Material und Methoden

Um diese Austausche sichtbar zu machen, wird beiden Kulturen SCE(s) und SCE(i) BrdU, ein Thymin-Analogon, hinzugegeben. Dieses wird unter UV-Licht leichter gespalten als Thymin und die veränderte Chromatinstruktur bewirkt eine weniger starke Anfärbung mit Giemsa.

Zusätzlich werden die Kulturen 2 h vor Abbruch mit Colcemid behandelt, das die Ausbildung des Spindelapparats hemmt, sodass sich die Zellen in der Metaphase ansammeln.

Gibt man den Zellen nun nach Ansetzen 66 h Zeit zum Wachstum und somit Reparatur, bricht dann die Kulturen ab, tropft die Zellen auf Objektträger, bestrahlt sie mit UV-Licht und färbt sie mit Giemsa an, erscheinen die Chromatiden der 1. Mitose noch beide dunkel.

In der Metaphase der 2. Mitose ist jedoch nur noch eine Chromatide dunkel, diejenige mit Thymin des ursprünglichen DNA Stranges, und die vollständig mit BRDU substituierte Schwesterchromatide hell. In der 3. Metaphase können dann Chromosomen entstehen, deren Chromatiden teilweise beide hell sind.

Schwesterchromatidaustausche sind somit in der 2. Metaphase sehr gut unter dem Mikroskop sichtbar und können gezählt und verglichen werden.

2.3.2.2 Ansatz und Wachstum der Kultur

Die Blutkulturröhrchen wurden wie in 2.3.1.2 vorbereitet und im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt. Es wurden pro Proband vier passend beschriftete Blutkulturröhrchen angelegt, 2 unbehandelte Kulturen SCE(s) und 2 behandelte Kulturen SCE(i). In je 5 ml Medium wurde 500 µl peripheres Blut gegeben. Während die Kulturen SCE(s) 30 min im 37 °C Brutschrank lagen, gab man zu den Röhrchen SCE(i) 2,5 µl BPDE (Endkonzentration 0,5 µmol), das erst kurz vor Gebrauch aus dem Tiefkühlschrank mit -20 °C aufgetaut wurde. Bei einer Endkonzentration von 0,5 µM induzierte das BPDE DNA-Schäden, vor allem Addukte. Diese beiden Flachbodenröhrchen wurden nun ebenfalls für 30 min im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle angelegten Kulturröhrchen SCE(i) bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und das verbleibende Zellpellet resuspendiert in ein neues Flachbodenröhrchen mit 5 ml Medium gegeben. Den Kulturen SCE(s) und SCE(i) wurde jeweils 22 µl BrdU (5 mg/ml) als Basenanalogen zugegeben. Die Röhrchen

2. Material und Methoden

wurden anschließend für 66 h im Brutschrank bei 37 °C mit der Flachbodenseite nach unten zeigend inkubiert. 2 h vor Abbruch der Kulturen gab man 50 µl Colcemid (10 µg/ml) zu allen Kulturen ein Spindelgift, das die Zellen in der Metaphase arretiert und uns erlaubte, Zellen in ihrer Metaphase zu präparieren.

2.3.2.3 Abbruch der Kultur

Der Abbruch erfolgte nach 68 h Inkubation. Die Röhrchen wurden bei 2000 rpm für 4 min zentrifugiert, der Überstand bis auf 500 µl mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette aus Glas abgesaugt und das Zellpellett in Einmalpasteurpipetten aufgenommen. Die Resuspension fand in 5 ml 0,4 % KCl statt, das auf 37 °C im Wasserbad erhitzt wurde. 20 min Inkubationszeit im Brutschrank mit 37 °C folgte, während die Zellen quellen konnten, bevor erneut bei 2000 rpm für 4 min zentrifugiert wurde. Das Verfahren wurde mit der Ibrahimov-Lösung, die direkt aus dem 4 °C Kühlschrank kam und reinem -20 °C kaltem Methanol wiederholt, allerdings jedoch ohne Inkubationszeit.

Abschließend wurde mit Fixativ S mit einer Temperatur von -20 °C nach derselben Methode zweimal gewaschen. Die Lösungen wurden hierfür immer frisch zwei bis 3 h vor Abbruch, wie unter 2.2.2 beschrieben, hergestellt. Über Nacht blieben die Zellen im Fixativ S bei 4 °C im Kühlschrank stehen.

2.3.2.4 Präparation der Objektträger

Um Chromosomenpräparate zur Analyse von SCEs anzufertigen, musste man im Voraus die Objektträger mit Ethanol säubern und in einer Küvette mit Aqua bidest bei 4 °C lagern. Es wurden für jede Kultur SCE(s) und jede Kultur SCE(i) vier Objektträger hergestellt. Die über Nacht im Kühlschrank stehenden Röhrchen wurden bei 2000 rpm für 4 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 500 µl abgesaugt. Die Zellen wurden mit Pasteurpipetten aus Glas im verbliebenen Fix S resuspendiert um einzeln zu werden. 4-5 Tropfen tropfte man davon auf die mit Wasser angefeuchteten Objektträger. Dabei verdrängte das Methanol-Eisessig-Gemisch das H₂O, die Zellen wurden gespreitet und die Metaphasen trockneten auf. Zum schnelleren Trocknen wurden die Objektträger schräg aufgestellt. Eine

2. Material und Methoden

abschließende Kontrolle auf Metaphasen erfolgte im Lichtmikroskop bevor die Objektträger, im Ständer über Nacht bei 37 °C lagerten.

2.3.2.5 Färbung mit Giemsa

Für die FPG-Färbung wurde der Sörensen-Puffer und die Giemsa-Färbelösung wie unter 2.2.2 beschrieben im Voraus hergestellt. Eine Küvette mit 2xSSC wurde im Wasserbad auf 68 °C erhitzt. Zunächst wurden die Objektträger aus dem Brutschrank so in eine Wanne mit 100 ml Sörensenpuffer gegeben, dass sie vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Eine 30 min UV-Bestrahlung bei 254 nm erfolgte. Im Anschluss inkubierten die bestrahlten Objektträger für 60 min im 2xSSC bei 68 °C, bevor 1x mit Aqua dest. gespült wurde. Die anschließende Färbung in der Giemsa-Färbelösung dauerte 15 min. Abschließend wurden die Objektträger 3x mit Aqua dest. gespült und im Objektständer zum trocknen aufgestellt. Um eine lange Haltbarkeit der Objektträger mit ihren Metaphasen zu gewährleisten, tauchte man sie kurz in eine Xylol-Küvette, tropfte 1 Tropfen Eukitt auf, legte das Deckglas auf und entfernte mit einer Pinzette eventuelle Luftblasen. Die getrockneten Objektträger wurden in einer Mappe gelagert.

2.3.2.6 Auszählung der Mitosen und Schwesterchromatid-Austausche

Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger mit einem 16x Objektiv nach Metaphasen abgesucht. Diejenigen Metaphasen, die bei allen Chromosomen eine helle und eine dunkle Chromatide aufwiesen, befanden sich in der 2. Mitose und waren deshalb für die Auszählung der SCE geeignet. Über die Software Ikaros Version 3.0.4 wurden die Metaphasen mit 100x Vergrößerung mit einer Kamera am Mikroskop aufgenommen, sodass ein einfacheres Auszählen und gleichzeitiges Speichern der Metaphasenbilder möglich war. Pro Proband wurden Schwesterchromatidaustausche aus je 20 Metaphasen SCE(s) und SCE(i) ausgezählt und der Durchschnitt pro Metaphase, die SCE-Rate, ermittelt.

2. Material und Methoden

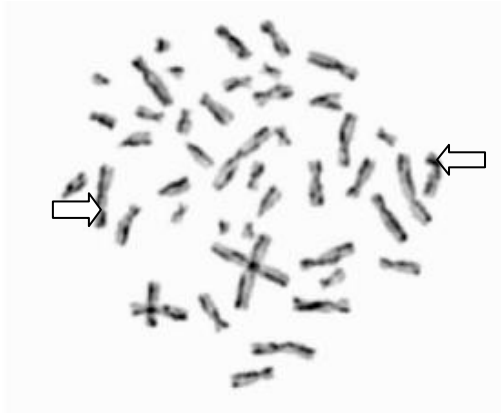


Abb. 3.: Metaphase mit differentieller Chromatidanfärbung und SCE nach Induktion. Die Chromatiden, in denen beide Stränge mit BrdU substituiert sind, erscheinen in der FPG-Färbung heller. Farbwechsel zwischen Chromatiden sind SCE. Einige Beispiele sind mit Pfeilen hervorgehoben.

2.3.3. Der Mitotic Delay Test

2.3.3.1 Theorie

Zellen mit DNA Schäden werden in der G_2 -Phase angehalten und reichern sich da an. Je langsamer die DNA Reparatur erfolgt, desto stärker ist diese Anreicherung. Dieses Phänomen kann man mit dem Mitotic Delay quantifizieren, der das Mengenverhältnis der Zellen angibt, die sich im Vergleich von behandelten Kulturen, MD(i) genannt, zu unbehandelten Kulturen, MD(s) genannt, in der G_2 - zur S-Phase befinden. Bestrahlt man Lymphozytenkulturen mit 2 Gy ionisierender Strahlung, so entstehen DNA-Schäden.

Den Zellen wird 18 h Zeit gegeben, DNA-Schäden zu reparieren. An den Zellzykluskontrollpunkten wird der Zellzyklus unterbrochen, damit die Reparatur erfolgen kann. Da dies hauptsächlich in der G_2 -Phase stattfindet, akkumulieren die Zellen in dieser Phase.

Über das DNA-Histogramm lässt sich die Anzahl der Zellen in G_1 , S und G_2 -Phase ermitteln. Daraus errechnet man den Mitotic Delay: $G_2/S(i) : G_2/S(s)$.

In der Anzahl der Zellen in der G_1 -Phase sind nicht nur Lymphozyten enthalten sondern auch Granulozyten, die sich nicht weiter teilen. Deshalb kann man die Zahl der Zellen in G_1 bei Kulturen aus Vollblut nicht als Referenz heranziehen.

2. Material und Methoden

2.3.3.2 Ansatz und Wachstum der Kultur

Wie unter 2.3.1.2 beschrieben wurden die Kulturröhrchen vorbereitet, beschriftet und auf 37 °C im Wasserbad aufgewärmt. Es wurden pro Proband je 2 Kulturen MD(s) und 2 Kulturen MD(i) mit 500 µl peripherem Blut unter der sterilen Flow angesetzt. Die Röhrchen wurden mit der Flachbodenseite nach unten zeigend für 50 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, bevor die Lymphozytenkulturen MD(i) mit 2 Gy für 1min bestrahlt wurden. 18h nach Bestrahlung erfolgte der Abbruch der Kulturen.

2.3.3.3 Abbruch der Kultur

Für den Abbruch wurden pro Kultur ein 3,5 ml Probenröhrchen aus Plastik mit 1,5ml DAPI als Fluoreszenzfarbstoff, der rasch in die Zellen eindringt, vorbereitet und beschriftet. Aus den seit 68h gewachsenen Lymphozytenkulturen wurden je 400 µl in die DAPI-Lösung hinzu gegeben und gut gemischt. Die mit Parafilm bedeckten Probenröhrchen wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank stehend gelagert, bevor gemessen wurde.

2.3.3.4 Messung des Mitotic Delay

92 h nach Ansetzen der Kultur wurde der Mitotic Delay aus den unbehandelten Kulturen und den mit ionisierter Strahlung behandelten Kulturen über ein DNA-Histogramm bestimmt. Die Daten wurden anhand des Partec Flow Cytometer ermittelt, das über eine HBO 50-Lampe mit einer durchschnittlichen Rate von 100 Zellen/s die Zellen über einen dünnen Flüssigkeitsstrom einzog und deren DNA-Gehalt maß. Je nach Phase, ob G₁, S oder G₂-Phase, unterschied sich die DNA-Menge pro Zelle. Es wurden insgesamt 20.000 Zellen gezählt, nachdem man die Flüssigkeit in den Röhren vorher gut gemischt hatte, um eine Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Nach jeder Messung erfolgte mit einer Waschlösung die Reinigung des Gerätes. Das sich ergebende DNA-Histogramm, bei dem Fluoreszenzintensität versus Zellzahl aufgetragen war, zeigte die Verteilung der Zellen in G₁, S und G₂-Phase an. Die Daten wurden auf einer Diskette gespeichert um sie anschließend auszuwerten.

2. Material und Methoden

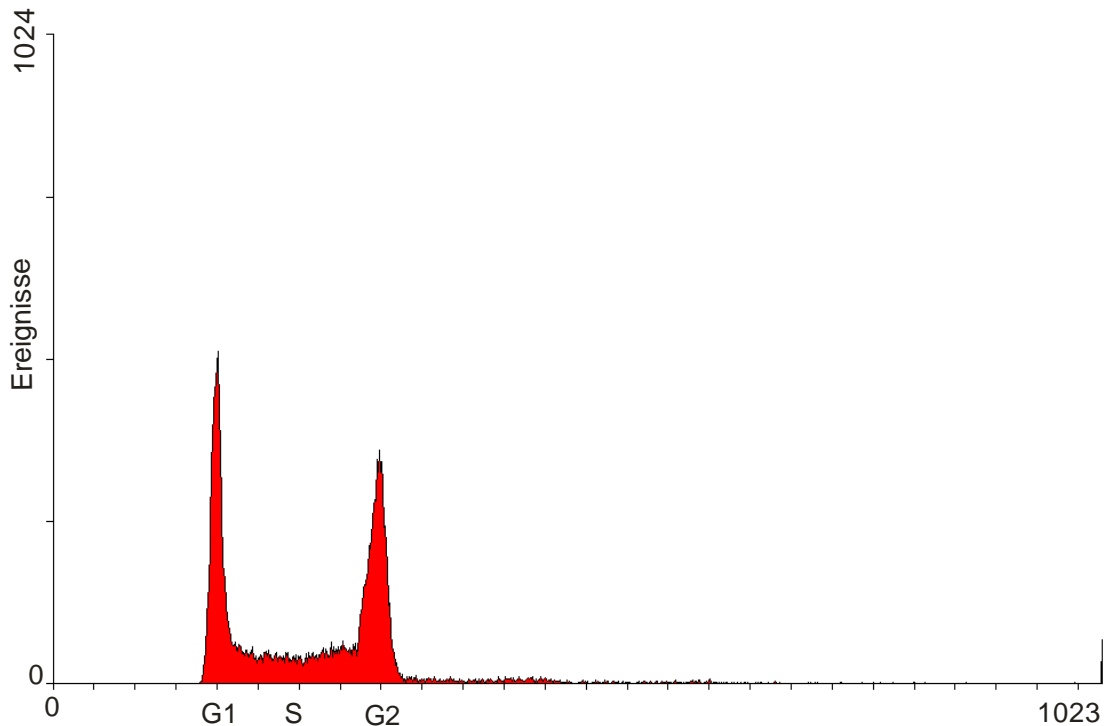


Abb. 4: DNA-Histogramm einer bestrahlten Blutkultur mit G₁, S und G₂-Phase

2.3.3.5 Auswertung der Histogramme

Die Daten auf der Diskette sind Textdokumente, die über die WinMDI Software 2.9 geöffnet und im ASCII Plain-Textformat gespeichert wurden. Über MS Office Word 2003 wurden die Zahlen, die den Zellzahlen der 1024 Fluoreszenzkanäle entsprachen, in einer Spalte angeordnet und in ein vorbereitetes MS Office Excel Sheet kopiert.

Über dieses Arbeitsblatt konnte man nun die Zellzahlen der Phasen G₁, S und G₂ ermitteln und somit das Verhältnis G₂/S. Der Quotient aus G₂/S von MD(i) zu MD(s) ergab den Mitotic Delay. Er wurde aus je 2 Parallelkulturen ermittelt. Hohe MD-Werte bedeuten, dass viele Zellen in der G₂-Phase akkumulieren.

2. Material und Methoden

2.3.4 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Programms StatView v.5.0.1 wurden die erhaltenen Daten des MN-, Mitotic Delay und des SCE-Tests statistisch ausgewertet, nachdem sie im Programm Microsoft Excel 2003 aufgearbeitet wurden.

Es wurde für jeden Test eine deskriptive Statistik erstellt und in Tabellen dargestellt.

Des Weiteren wurde bei dem MN- und dem SCE-Test ein Regressionsplot erstellt, der die Ergebnisse der behandelten Kulturen gegen die Ergebnisse der unbehandelten Kulturen aufträgt. Diese wurden auf Signifikanz geprüft.

Um herauszufinden ob die Werte des einen Zwillings mit den Werten des anderen Zwillings korrelieren, wurden ebenfalls lineare Regressionsanalysen für sämtliche Tests durchgeführt und als Regressionsplots dargestellt. Die Regression wurde auf Signifikanz ($p < 0,05$) untersucht. Um die Werte übersichtlich im Zwillingspaarvergleich darzustellen, wurde die Darstellung als bivariate Punktwolke gewählt, getrennt nach Zwillingstatus.

Außerdem wurden für jeden Test die Intrapaarvarianzen errechnet und die Varianzen der eineiigen Zwillinge in Korrelation zu den Varianzen der zweieiigen Zwillinge gesetzt. Dies ist als Boxplot dargestellt.

Zusätzlich wurde für den MN-, den SCE- und den MD-Test die Heritabilität aus den Gesamtvarianzen der ein- und zweieiigen Zwillinge berechnet.

Schließlich wurden lineare Regressionsanalysen verwendet und deren Signifikanz bestimmt um die Abhängigkeit der Tests untereinander zu untersuchen. In den Regressionsanalysen werden außerdem die 95% Konfidenzintervalle dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Mikronukleus Tests

3.1.1 MN-Raten

Die Ergebnisse des Mikronukleus Tests entstanden durch die Berechnung der Mikronuklei auf 1000 binukleäre Zellen. Bei einer Zellzahl zwischen 1000 und 2500 Zellen pro Objektträger konnte das standardisierte Auszählungsprogramm eine optimale Auswertung leisten. Zur Kontrolle wurden stets je Kultur MNT(s) und MNT(i) zwei Objektträger angefertigt.

Die Darstellung der Daten erfolgt als deskriptive Statistik in Tabellen.

3.1.1.1 Ergebnisse der Kulturen ohne Bestrahlung MNT(s)

Die Ergebnisse wurden in Tabelle eins zusammengefasst:

Tab. 1: MN(s)-Rate (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen (BNC) aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach eineiig und zweieiig

	MN(s)-Rate/ 1000 BNC, Kollektiv	MN(s)-Rate/ 1000 BNC, eineiig	MN(s)-Rate/ 1000 BNC, zweieiig
Mittelwert	47,66	53,75	40,89
Standardabweichung	20,85	23,49	15,39
Standardfehler	3,38	5,25	3,63
Probenzahl	38	20	18
Minimalwert	18	27	18
Maximalwert	105	105	81

3. Ergebnisse

3.1.1.2 Ergebnisse der Kulturen mit Bestrahlung MNT(i)

Die Mikronukleusraten aus den Kulturen nach Bestrahlung werden in Tabelle zwei ebenfalls als deskriptive Statistik dargestellt:

Tab. 2: MN(i)-Rate (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen (BNC) aus bestrahlten (i) Blutkulturen) von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach eineiig und zweieiig

	MN(i)-Rate/ 1000 BNC, Kollektiv	MN(i)-Rate/ 1000 BNC, eineiig	MN(i)-Rate/ 1000 BNC, zweieiig
Mittelwert	231,61	242,95	219
Standardabweichung	54,47	58,05	48,7
Standardfehler	8,84	12,98	11,48
Probenzahl	38	20	18
Minimalwert	124	154	124
Maximalwert	339	339	310

Festzustellen ist in dieser Aufführung der Daten, dass die Raten der behandelten Kulturen, entsprechend der Erwartung, sehr viel höher liegen, als die der unbehandelten Kulturen.

3.1.2 Zusammenhang der MN-Raten mit und ohne Bestrahlung

Um ein Verhältnis der Raten ohne Bestrahlung zu den Raten mit Bestrahlung zu bekommen, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und in einem Regressionsplot dargestellt (Abb. 5). Dies soll die Frage klären, ob bei Probanden mit erhöhten Mikronukleusraten in den unbehandelten Kulturen auch erhöhte Mikronukleusraten in den bestrahlten Kulturen zu erwarten sind.

Auf die Raten ohne Bestrahlung erwartet man einen höheren Einfluss der Umwelt als auf die Bestrahlten. Bei den bestrahlten Kulturen dürften Einflüsse wie körperliche Betätigung, Rauchen oder auch Lagerungsbedingungen der Blutprobe keine Rolle spielen, da sie von den induzierten Schäden überdeckt werden.

3. Ergebnisse

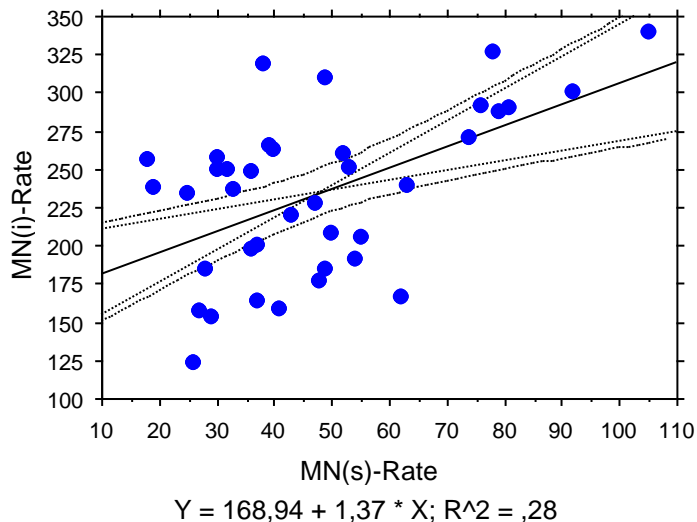


Abb. 5: Korrelation der MN(i)-Rate (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus bestrahlten (i) Blutkulturen) zu der MN(s)-Rate (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden Zwillingen.

Wie in Abbildung fünf zu sehen, ist mit ansteigender MN-Rate unbehandelter Kulturen auch von einer höheren Mikronukleusrate bei behandelten Kulturen auszugehen. Mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0,28$ und einer Signifikanz von $p<0,0006$ lässt sich eine sichere Abhängigkeit der Werte voneinander feststellen, die allerdings sehr schwach ist.

3.1.3 Korrelation zwischen den Zwillingen

Um einen Hinweis auf die Unterschiede der Reparaturfähigkeit innerhalb eines Zwillingspaars zu erhalten, war es interessant, die Abhängigkeit der Mikronukleusrate eines Zwillinges von Derjenigen des Zwillingspartners zu untersuchen. Sollte hier eine Korrelation bestehen, die bei eineiigen höher ist, als bei zweieiigen, so wäre ein erster Hinweis auf eine hohe Heritabilität gegeben. Die Auswertung erfolgte über das Programm StatView 5.0.1. Mit Hilfe linearer Regressionsanalysen ist die Korrelation innerhalb der Zwillingspaare bestimmt worden. Die Ergebnisse werden im Regressionsplot statusgetrennt dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1.3.1 Ergebnisse der Kulturen ohne Bestrahlung MNT(s)

In folgender Abbildung werden die Ergebnisse innerhalb der eineiigen Zwillingspaare dargestellt:

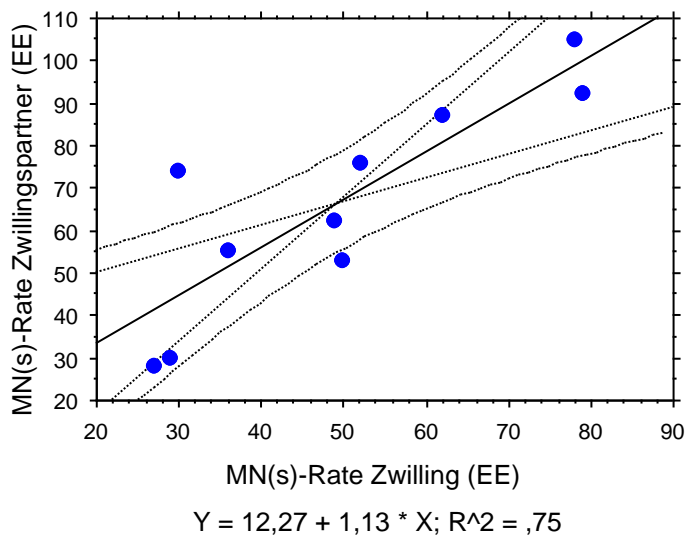


Abb. 6: Korrelation der MN(s)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus unbehandelten (s) Blutkulturen) zwischen gesunden eineiigen (EE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von zehn Paaren.

Zum Vergleich ist in Abbildung sieben der Regressionsplot der Korrelationen der zweieiigen Zwillingspaare dargestellt:

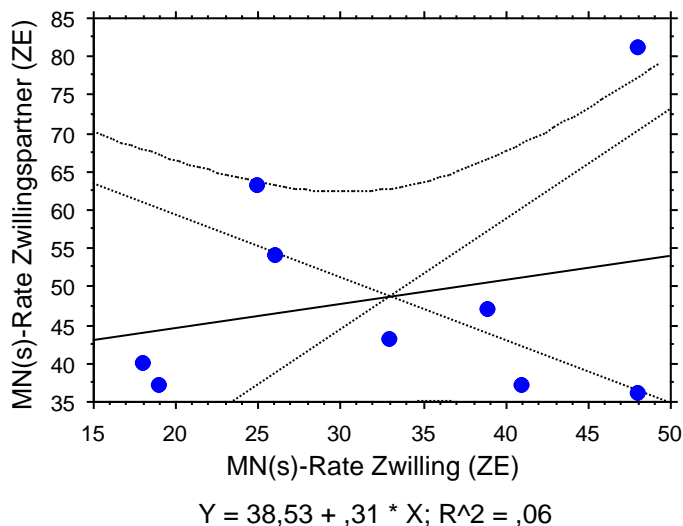


Abb. 7: Korrelation der MN(s)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus unbehandelten (s) Blutkulturen) zwischen gesunden zweieiigen (ZE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von neun Paaren.

Es lässt sich mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0,75$ und mit einer Signifikanz von $p<0,002$ bei den eineiigen Zwillingspaaren eine deutliche und sichere Korrelation aufzeigen. Bei den zweieiigen Zwillingspaaren lässt sich kein Zusammenhang ($R^2=0,06$) darstellen. Dies ist nicht signifikant ($p>0,54$).

3. Ergebnisse

Trotz dieser Unsicherheit deutet dies auf eine stärkere Korrelation der Werte bei eineiigen Zwillingspaaren als bei zweieiigen Zwillingspaaren hin.

3.1.3.2 Ergebnisse der Kulturen mit Bestrahlung MNT(i)

In Abbildung acht wird durch ein Regressionsplot die Abhängigkeit der MNT(i) Raten eines eineiigen Zwilling auf den Zwillingpartner dargestellt:

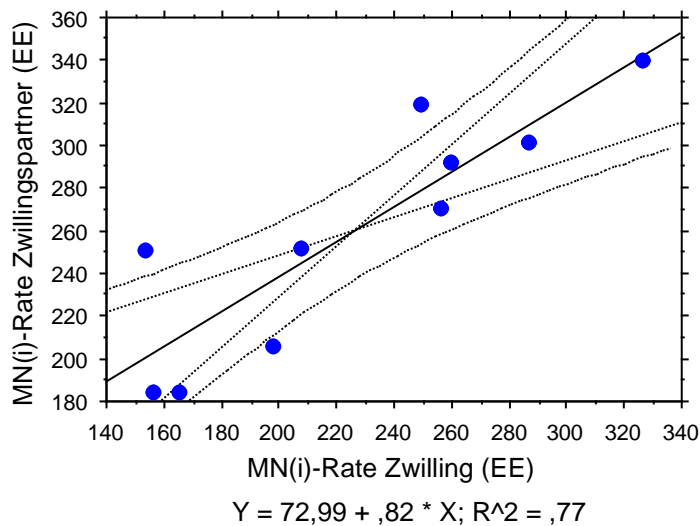


Abb. 8: Korrelation der MN(i)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus bestrahlten (i) Blutkulturen) zwischen gesunden eineiigen (EE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von zehn Paaren.

In folgender Abbildung wird die Korrelation der MN- Raten für die zweieiigen Zwillingspaare aufgeführt:

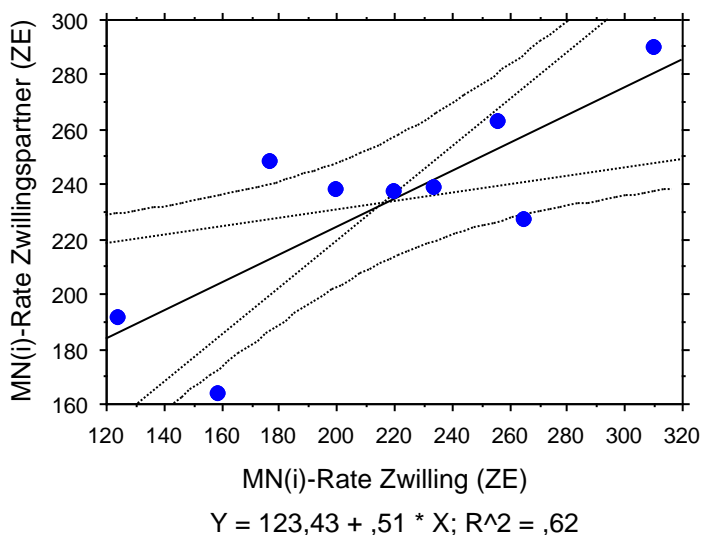


Abb. 9: Korrelation der MN(i)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus bestrahlten (i) Blutkulturen) zwischen gesunden zweieiigen (ZE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von neun Paaren.

3. Ergebnisse

Wie aus den Abbildungen acht und neun ersichtlich ist, lassen sich die Korrelationen der MN-Raten nach Bestrahlung bei den eineiigen und zweieiigen Zwillingen deutlich mit einem Koeffizienten von $R^2=0,77$ bei den eineiigen und mit $R^2=0,62$ bei den zweieiigen Zwillingspaaren nachweisen. Diese Analysen sind mit $p<0,001$ (EE) und $p<0,012$ (ZE) statistisch signifikant.

Theoretisch müsste bei den bestrahlten Kulturen MNT(i) der Einfluss von Umweltfaktoren weitgehend durch die hohe Anzahl induzierter Schäden überdeckt sein. Bei einer hohen Heritabilität der Reparaturkapazität müssten sich die Raten der Kulturen mit Bestrahlung innerhalb eines eineiigen Zwillingspaars, im Vergleich zu den zweieiigen Zwillingspaaren, noch mehr ähneln als in den unbestrahlten Kulturen MNT(s). Dies konnte hier dargestellt werden, wenn auch im Bereich der MNT(s) der zweieiigen Zwillingspaare keine Signifikanz erreicht wurde. Somit sind größere Probandenkollektive notwendig um diese Aussage zu bestätigen.

3.1.4 Intrapaarvarianzen und Heritabilität

Um eine Schlussfolgerung über die Höhe der Heritabilität der Reparaturkapazität treffen zu können, sind vor allem die Intrapaarvarianzen von Bedeutung.

Denn die Heritabilität h^2 errechnet sich aus der Formel:

$$h^2 = (\text{Gesamtvarianz}_{ZE} - \text{Gesamtvarianz}_{EE}) / \text{Gesamtvarianz}_{ZE}$$

Bei einer hohen Heritabilität müssten die Intrapaarvarianzen der monozygoten Zwillinge also sehr viel geringer sein, als die Varianzen der Dizygoten.

Um das errechnete Ergebnis zu veranschaulichen, wurden die einzelnen MNT Ergebnisse zunächst, nach Zwillingstatus getrennt, als bivariate Punktwolke dargestellt. In dieser Darstellung werden die Ergebnisse paarweise aufgeführt. Außerdem wurden für die unbestrahlten Kulturen MNT(s) und für die bestrahlten Kulturen MNT(i) die Varianzen als Boxplot dargestellt, getrennt nach Zwillingstatus. Dabei ist die obere und untere Begrenzung der Box die 25er bzw. 75er Perzentile, während der Median als Linie in der Box dargestellt ist. Die Linien oberhalb und unterhalb kennzeichnen die 10er und 90er Perzentile. Einzelne Punkte liegen außerhalb der 10er bzw. 90er Perzentile.

In beiden Darstellungen geben die blauen Punkte die Ergebnisse der eineiigen wieder, die roten die der zweieiigen Zwillinge.

3. Ergebnisse

3.1.4.1 Ergebnisse der Kulturen ohne Bestrahlung MNT(s)

In Abbildung zehn erscheint die Darstellung der MN- Raten als bivariate Punktwolke, farbig aufgetrennt nach Zwillingsstatus:

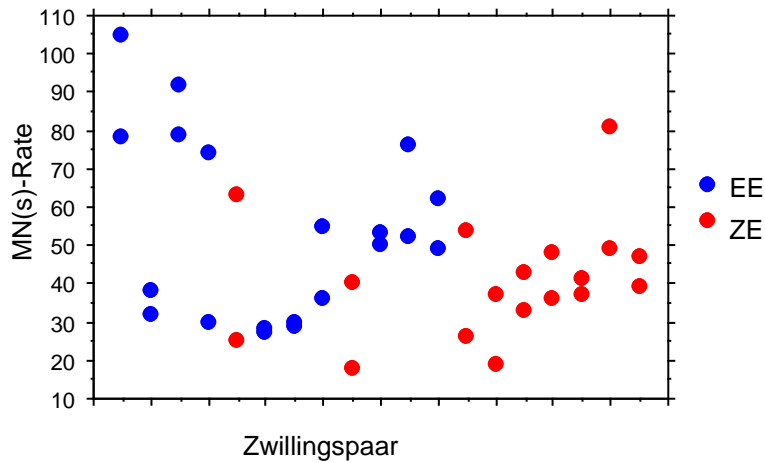


Abb. 10: MN(s)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren, paarweise dargestellt. Die Raten der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Zur Übersicht findet sich in Abbildung 11 die Darstellung der Intrapaarvarianzen als Boxplot:

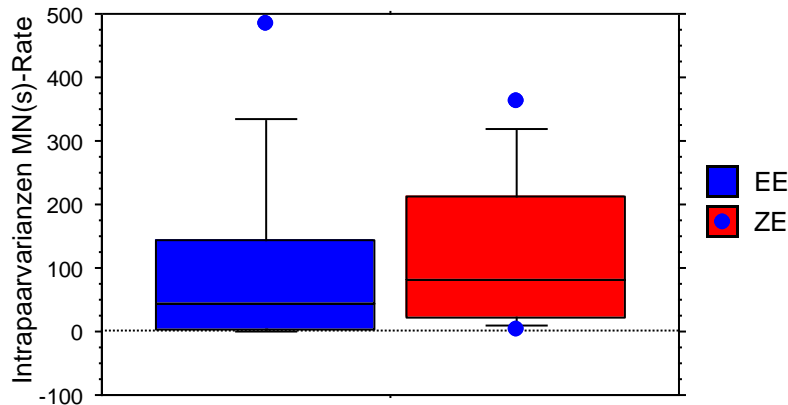


Abb. 11: Intrapaarvarianzen der MN(s)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Wie aus den Abbildungen zehn und elf ersichtlich ist, sind die Intrapaarvarianzen innerhalb der monozygoten Zwillinge geringer, als innerhalb der Dizygoten. Die Gesamtvarianz der Monozygoten liegt bei 110,75, die Gesamtvarianz der Dizygoten bei 137. Diese Werte sind jeweils auf die Probandenzahl der eineiigen und zweieiigen Zwillinge normiert.

Errechnet man für MNT(s) die Heritabilität, so erhält man den Wert:

$$h^2=0,192.$$

3. Ergebnisse

3.1.4.2 Ergebnisse der Kulturen mit Bestrahlung MNT(i)

In Abbildung 12 und 13 wurden nun ebenfalls die Intrapaarvarianzen der Kulturen MNT(i) als bivariate Punktwolke und als Boxplot verdeutlicht. Während in Abbildung 12 die Ergebnisse des MNT(i) paarweise veranschaulicht werden, werden in Abbildung 13 die Intrapaarvarianzen farblich getrennt nach Zwillingsstatus als Boxplot dargestellt.

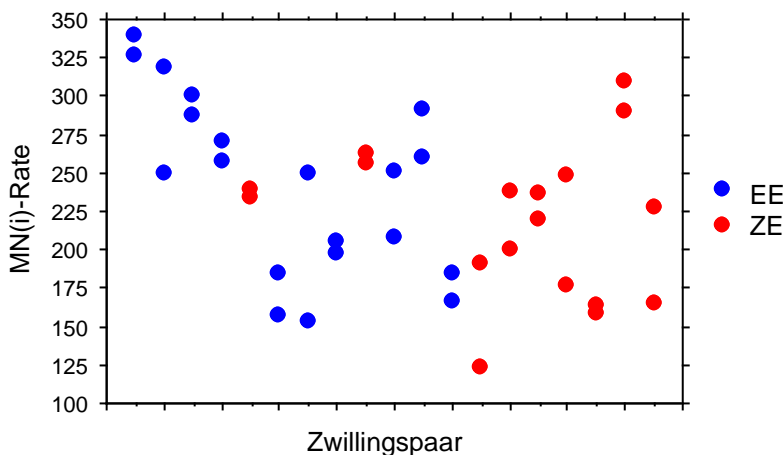


Abb. 12: MN(i)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus bestrahlten (i) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren, paarweise dargestellt. Die Raten der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot.

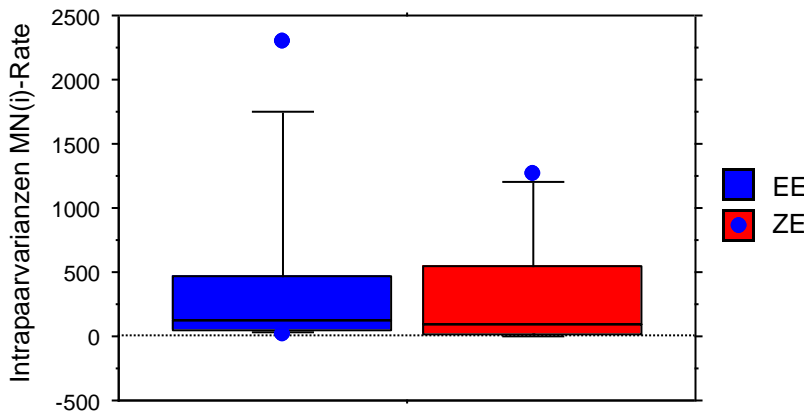


Abb. 13: Intrapaarvarianzen der MN(i)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus bestrahlten (i) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Aus Abbildung 12 und 13 ist ersichtlich, dass die Intrapaarvarianzen bei eineiigen Zwillingen nicht geringer ist als bei zweieiigen. Normiert auf die Probandenzahl liegt die Gesamtvarianz bei den EE bei 512,81, die Gesamtvarianz der zweieiigen Zwillinge beträgt 412,69.

Die Heritabilität lässt sich in diesem Fall nicht berechnen. Denn hier ist die Varianz bei den eineiigen Zwillingspaaren größer als bei den zweieiigen.

3. Ergebnisse

Damit kann nicht von einem rein genetisch bedingten Merkmal ausgegangen werden und die Berechnung wird hinfällig. Dies ist durch zwei Extremwerte bedingt, die der eineiigen Zwillingspaare zwei und sieben.

Vernachlässigt man die Extremwerte in der Wertung, sieht die Abbildung wie folgt aus (Abb. 14):

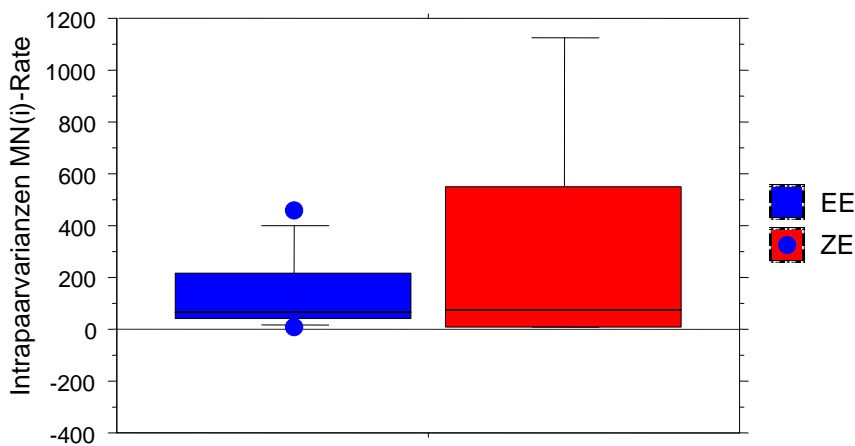


Abb. 14: Intrapaarvarianzen der MN(i)-Raten (Mikronuklei pro 1000 binukleärer Zellen aus bestrahlten (i) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren ohne die eineiigen Paare zwei und sieben. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Mit diesen bereinigten Daten käme man nach Normierung auf die Probandenzahl auf eine Gesamtvarianz der eineiigen Zwillinge von 124,56 und auf eine Gesamtvarianz der zweieiigen von 412,69.

Das würde einer Heritabilität von $h^2=0,69$ entsprechen. Dies ist ein hoher Wert, der die Schlussfolgerung auf einen hohen genetischen Einfluss auf die Variation der Reparaturfähigkeit zulassen würde, gemessen mit dem Mikronukleus Test.

3. Ergebnisse

3.2 Ergebnisse des Schwesterchromatid-Austausch Tests

3.2.1 SCE-Raten

Die Ergebnisse des Schwesterchromatid-Austausch Tests entstanden durch das Auszählen der Austausche auf 20 Metaphasen. Der Durchschnitt pro Metaphase ergibt die SCE-Rate. Dafür wurden pro Kultur vier Objektträger hergestellt auf denen genügend zweite Metaphasen zu finden waren. Leider konnten von Paar sieben, zehn, 15 und 16 trotz mehrmaligem Versuch keine Ergebnisse erzielt werden. So gehen jeweils zwei Paare bei den eineiigen Zwillingen wie auch zwei Paare bei den zweieiigen Zwillingen nicht in die Bewertung mit ein.

Aufgrund der schleppenden Rekrutierung zweieiiger Zwillinge, verwende ich Probandenergebnisse von vier zweieiigen Zwillingspaaren, die von der Arbeitsgruppe untersucht wurden.

Für die Darstellung wurde mit dem Programm StatView v.5.0.1 eine deskriptive Statistik angelegt. Darin sind alle Proben im Kollektiv aufgelistet und die Ergebnisse getrennt nach Zwillingsstatus.

3.2.1.1 Ergebnisse der Kulturen ohne Mutagenbehandlung SCE(s)

Die Ergebnisse der Kulturen ohne Mutagenbehandlung sind in Tabelle drei dargestellt:

Tab. 3: SCE(s)-Rate (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach ein- und zweieiig

	SCE(s)-Rate/ Metaphase, Kollektiv	SCE(s)-Rate/ Metaphase, eineiig	SCE(s)-Rate / Metaphase, zweieiig
Mittelwert	6,81	6,61	7,01
Standardabweichung	2,12	1,82	2,42
Standardfehler	0,38	0,47	0,61
Probenzahl	31	15	16
Minimalwert	2,74	2,74	3
Maximalwert	12,7	8,8	12,7

3. Ergebnisse

3.2.1.2 Ergebnisse der Kulturen mit Mutagenbehandlung SCE(i)

Die SCE-Raten der behandelten Kulturen sind in Tabelle vier ebenfalls als deskriptive Statistik dargestellt:

Tab. 4: SCE(i)-Rate (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus behandelten (i) Blutkulturen) von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach eineiig und zweieiig

	SCE(i)-Rate/ Metaphase, Kollektiv	SCE(i)-Rate/ Metaphase, eineiig	SCE(i)-Rate / Metaphase, zweieiig
Mittelwert	12,54	12,27	12,81
Standardabweichung	3,35	3,57	3,20
Standardfehler	0,59	0,89	0,80
Probenzahl	32	16	16
Minimalwert	5	5	6,11
Maximalwert	18,75	18,75	17,6

3.2.2 Zusammenhang der SCE-Raten mit und ohne Mutagenbehandlung

Um die SCE Raten der behandelten und unbehandelten Kulturen in ein Verhältnis setzen zu können, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (Abb. 15). Die Ergebnisse sind als Regressionsplot dargestellt. Durch die Korrelation möchte man herausfinden, ob erhöhte Raten der Kulturen SCE(s) eines Zwillinges auch mit erhöhten Raten der Kulturen SCE(i) einhergehen.

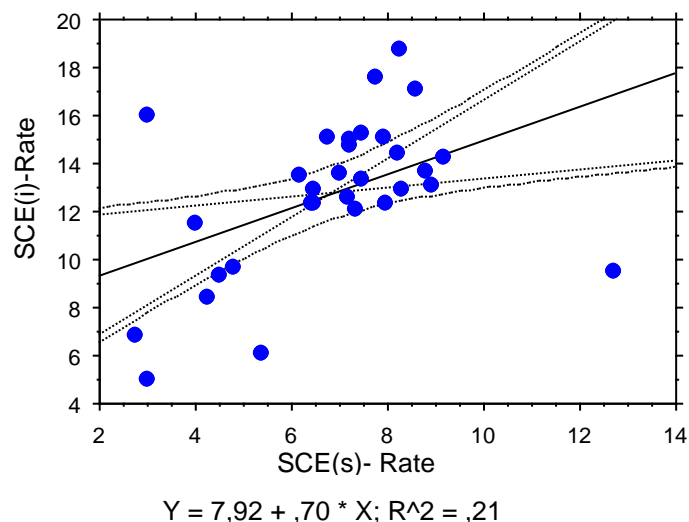


Abb.15: Korrelation der SCE(s)-Rate (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) zu der SCE(i)-Rate (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus behandelten (i) Blutkulturen) von gesunden Zwillingen.

3. Ergebnisse

Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, sind die Raten der Kulturen SCE(i) mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0,21$ von den Raten der Kulturen SCE(s) abhängig. Dies ist mit $p<0,009$ eine signifikante, jedoch geringe Korrelation.

3.2.3 Korrelation zwischen den Zwillingen

Möchte man die Höhe der Heritabilität der SCE-Testergebnisse bestimmen, so geht man davon aus, dass die Korrelation der Raten bei eineiigen Zwillingen größer ist als es bei zweieiigen Zwillingen. Dies wurde in folgenden Abbildungen als Regressionsplot veranschaulicht. Getrennt nach Zwillingsstatus wurde neben dem Regressionskoeffizienten auch dessen Signifikanz bestimmt.

3.2.3.1 Ergebnisse der Kulturen ohne Mutagenbehandlung SCE(s)

In Abbildung 16 wurde bei eineiigen Zwillingspaaren die Korrelation der Raten ohne Mutagenbehandlung bestimmt:

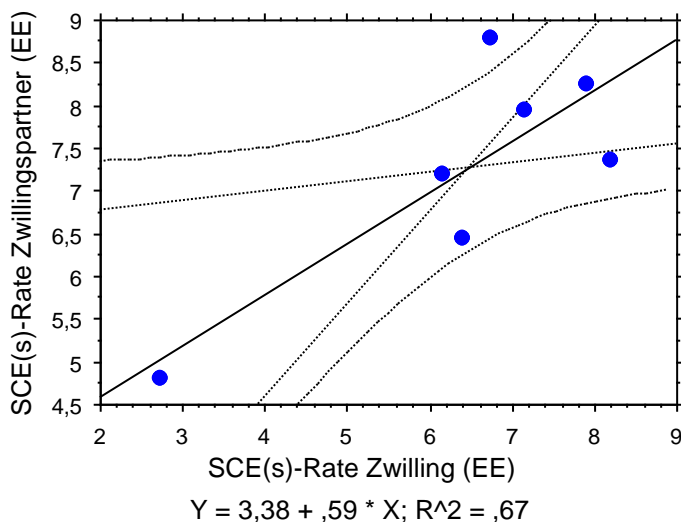


Abb.16: Korrelation der SCE(s)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) zwischen gesunden eineiigen (EE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von sieben Paaren.

Aus dieser Abbildung geht hervor, dass mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0,67$ eine Korrelation vorliegt. Dies ist mit einem Signifikanzniveau von $p<0,03$ statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

Zum Vergleich wurde dieselbe Analyse in Abbildung 17 für zweieiige Zwillinge dargestellt:

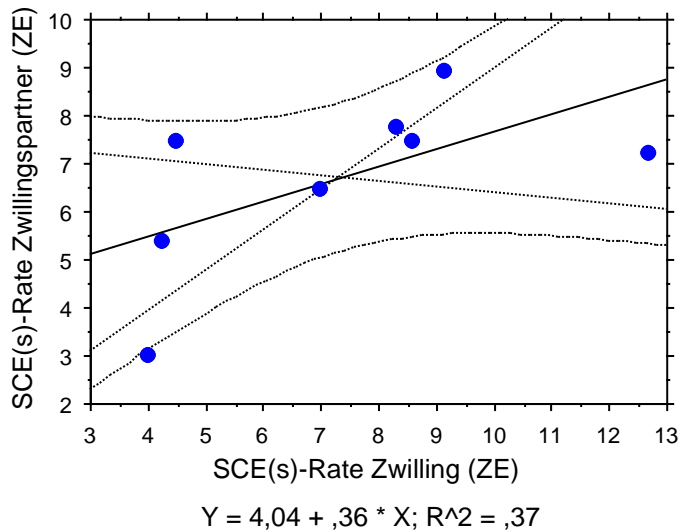


Abb.17: Korrelation der SCE(s)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) zwischen gesunden zweieiigen (ZE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von acht Paaren.

Bei den zweieiigen Zwillingspaaren konnte mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2=0,37$ ein deutliche aber nicht signifikante ($p>0,11$) Korrelation erfasst werden.

Wie aus den Abbildungen 16 und 17 ersichtlich ist, besteht eine höhere Korrelation der Raten der Kulturen SCE(s) bei eineiigen Zwillingen als bei den zweieiigen Zwillingspaaren.

3.2.3.2 Ergebnisse der Kulturen mit Mutagenbehandlung SCE(i)

Bei den SCE-Raten nach Mutagenbehandlung ist davon auszugehen, dass die Umwelt einen geringeren Einfluss auf sie hat, als es die Umwelt auf die Raten ohne Mutagenbehandlung hat. Die induzierten DNA-Schäden sollten diesen exogenen Einfluss überdecken.

Um einen Hinweis auf die Höhe der Heritabilität zu bekommen, wurde in Abbildung 18 und 19, aufgetrennt nach Zwillingstatus, eine lineare Regression der Ergebnisse behandelter Kulturen innerhalb eines Zwillingspaars durchgeführt und die Signifikanz bestimmt. Damit wird ermittelt, ob die Rate nach Mutagenbehandlung eines Zwilling und die Rate nach Mutagenbehandlung des Zwillingsgeschwisters korrelieren.

3. Ergebnisse

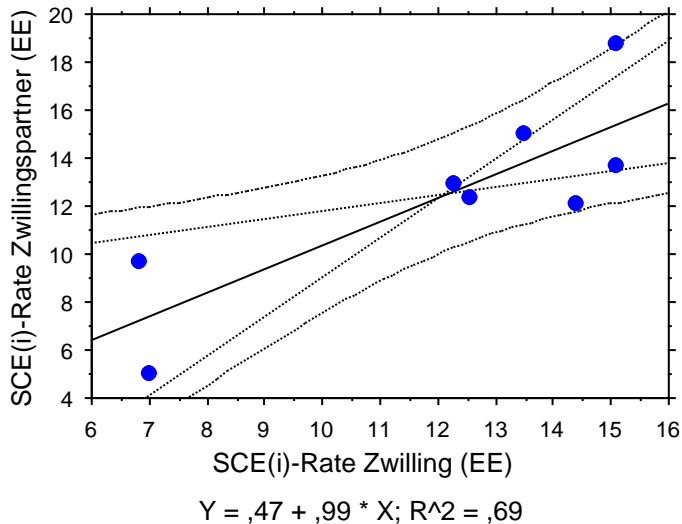


Abb. 18: Korrelation der SCE(i)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus behandelten (i) Blutkulturen) zwischen gesunden eineiigen (EE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von acht Paaren.

Statistisch signifikant ($p < 0,01$) konnte in den Raten nach Mutagenbehandlung der eineiigen Zwillingspaare eine deutliche Korrelation ($R^2 = 0,69$) aufgezeigt werden. Zum Vergleich wird in Abbildung 19 die Analyse für zweieiige Zwillinge dargestellt:

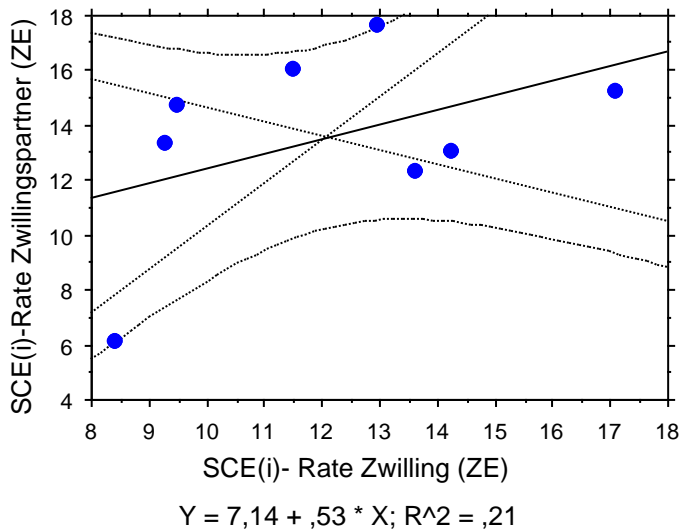


Abb. 19: Korrelation der SCE(i)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus behandelten (i) Blutkulturen) zwischen gesunden zweieiigen (ZE) Zwillingspartnern. Abgebildet sind die Korrelationen von acht Paaren.

Aus der Analyse ergibt sich, dass bei zweieiigen Zwillingen mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,21$ die Rate nach Mutagenbehandlung eines Zwillings von der Rate seines Zwillingsgeschwister abhängt. Dies ist eine geringere Korrelation als bei den eineiigen Zwillingspaaren.

Allerdings ist bei den zweieiigen Zwillingen die Korrelation statistisch nicht ausreichend signifikant ($p > 0,26$).

3. Ergebnisse

3.2.4 Intrapaarvarianzen und Heritabilität

Für die Bestimmung der Höhe der Heritabilität, gemessen am SCE Test, mussten die Intrapaarvarianzen ermittelt werden. Denn die Heritabilität errechnet sich aus:

$$h^2 = (\text{Gesamtvarianz}_{ZE} - \text{Gesamtvarianz}_{EE}) / \text{Gesamtvarianz}_{ZE}$$

Anhand einer bivariaten Punktwolke, getrennt für behandelte und unbehandelte Kulturen, wurden die Ergebnisse des SCE Tests zunächst paarweise dargestellt. Dabei entsprechen die blauen Punkte den Ergebnissen der eineiigen Zwillinge, die roten Punkte repräsentieren die zweieiigen.

Zusätzlich wurden die Intrapaarvarianzen jeweils getrennt für die Kulturen mit und ohne Mutagenbehandlung als Box Plot dargestellt. Dabei entsprechen die obere und die untere Grenze der 25er bzw. 75er Perzentile und die Linie in der Box dem Median. Die Linien oberhalb und unterhalb stellen die 10er bzw. 90er Perzentile da.

3.2.4.1 Ergebnisse der Kulturen ohne Mutagenbehandlung SCE(s)

In Abbildung 20 wurden die Ergebnisse der Kulturen ohne Mutagenbehandlung als bivariate Punktwolke, farblich aufgetrennt nach Zwillingsstatus, dargestellt:

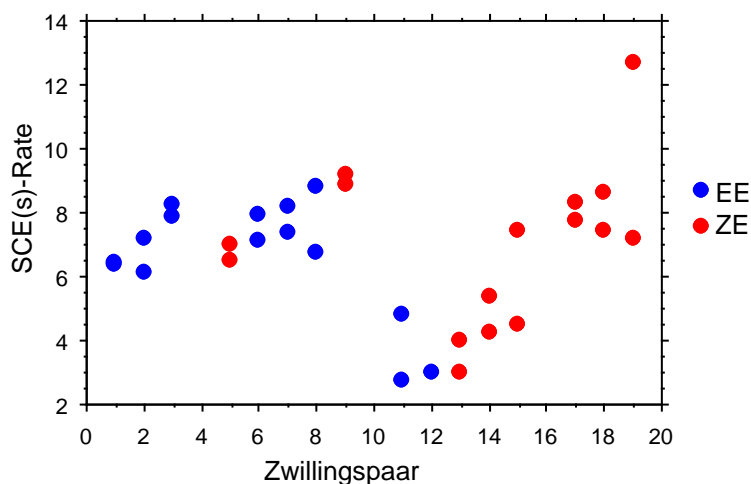


Abb.20: SCE(s)- Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren, paarweise dargestellt. Die Raten der Zwillingspartner eins sind identisch. Bei Paar 12 konnte die Rate des Zwillingspartners nicht ermittelt werden. Die Raten der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot.

3. Ergebnisse

Um die Intrapaarvarianzen als Gesamtes zu veranschaulichen, wurde in Abbildung 21 ein Boxplot erstellt, farblich aufgetrennt nach Zwillingsstatus:

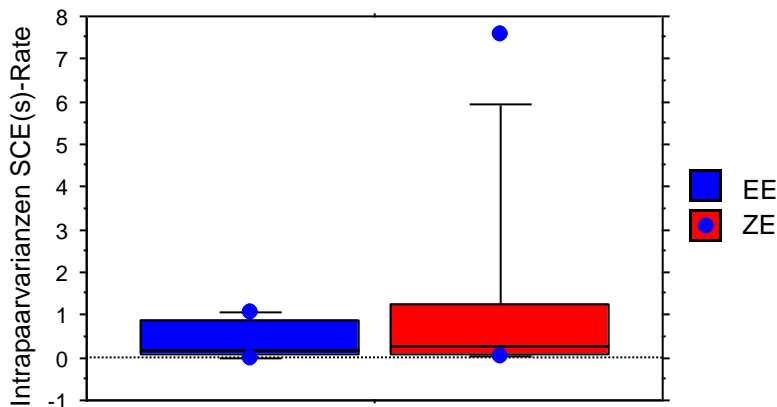


Abb. 21: Intrapaarvarianzen der SCE(s)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Wie aus den Abbildungen 20 und 21 ersichtlich ist, ist eine größere Spannbreite der Varianzen bei den zweieiigen Zwillingen im Vergleich zu den eineiigen Zwillingen, vorhanden. Die Gesamtvarianz der eineiigen Zwillinge betrug 0,46 während die Gesamtvarianz bei den zweieiigen bei 1,54 lag. Dabei sind die Intrapaarvarianzen auf die Anzahl der Probanden normiert.

Die Heritabilität berechnet sich hiermit auf $h^2=0,70$.

Damit ergibt sich, gemessen am Schwesterchromatid-Austausch Test, ein hoher Wert für den genetisch bedingten Anteil der Reparaturkapazität.

3. Ergebnisse

Dieses Ergebnis vor allem durch einen Extremwert der zweieiigen Zwillinge, Paar 19, beeinflusst. Vernachlässigt man den Wert in der Auswertung, so ergibt sich folgender Boxplot (Abb. 22):

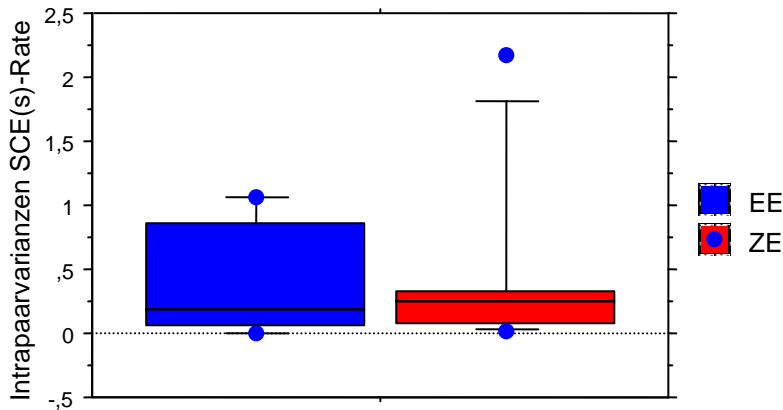


Abb. 22: Intrapaarvarianzen der SCE(s)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus unbehandelten (s) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren ohne das zweieiige Paar 19. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Nach Bereinigung der Daten ergibt sich nach Normierung auf die Probandenzahl eine Gesamtvarianz der zweieiigen Zwillinge von 0,46. Die Heritabilität würde sich hiermit auf $h^2=0,01$ berechnen.

Dies erlaubt keine Schlussfolgerung auf eine starke genetische Abhängigkeit der Varianz der Reparaturkapazität gemessen am SCE-Test mit unbehandelten Kulturen.

3.2.4.2 Ergebnisse der Kulturen mit Mutagenbehandlung SCE(i)

Für die Heritabilität sind die Intrapaarvarianzen der behandelten Kulturen noch bedeutender als die Ergebnisse der unbehandelten Kulturen, da hier die Umwelteinflüsse von den behandelten Schäden überlagert werden müssten. Es wurde für die Werte der Kulturen mit Mutagenbehandlung eine bivariate Punktwolke in Abbildung 23 erstellt, die die Ergebnisse der Paare farblich getrennt nach Zwillingsstatus aufzeigt:

3. Ergebnisse

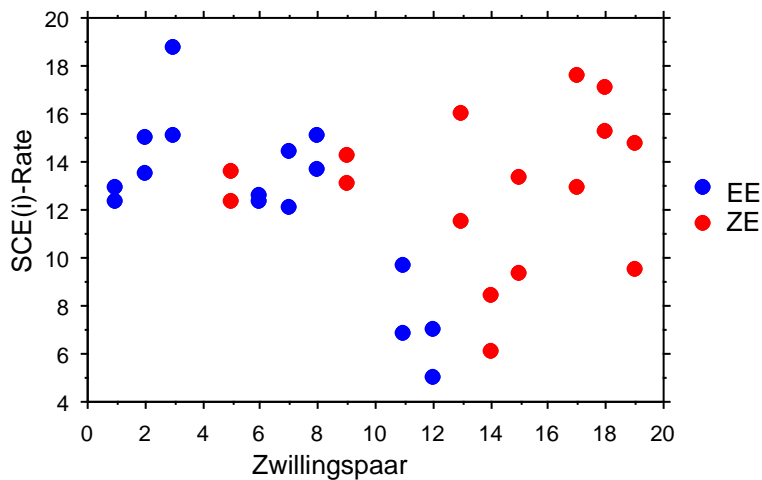


Abb. 23: SCE(i)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus behandelten (i) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren, paarweise dargestellt. Die Raten der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Desweiteren wurden die Intrapaarvarianzen farblich getrennt nach Zwillingstatus in einem Box Plot dargestellt (Abbildung 24):

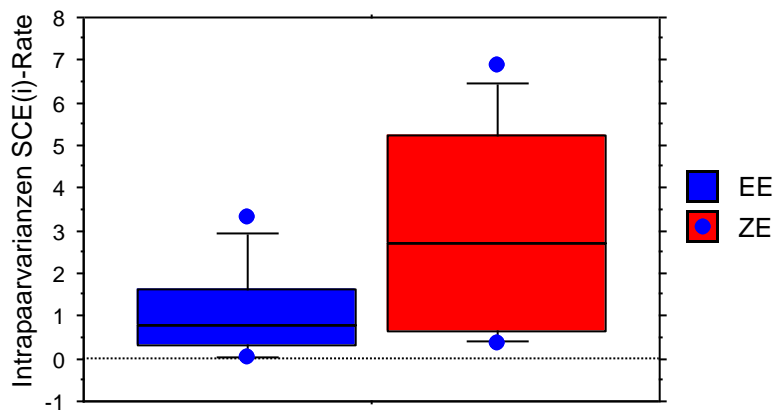


Abb. 24: Intrapaarvarianzen der SCE(i)-Raten (Schwesterchromatid-Austausche pro Metaphase aus behandelten (i) Blutkulturen) von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Aus Abbildung 23 und 24 geht hervor, dass die Varianzen innerhalb der zweieiigen Zwillingspaare höher sind, als innerhalb der eineiigen. Die Gesamtvarianz der monozygoten Zwillinge liegt, normiert auf die Probandenzahl, bei 1,25, die der Dizygoten bei 3,48. Dies entspricht laut Formel einer Heritabilität von $h^2=0,64$. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Variation der Reparaturfähigkeit, gemessen an den SCE, hohen genetischen Einfluss aufweist. Jedoch ist dieses Ergebnis mit einer extrem geringen Probandenzahl ermittelt worden, sodass weitere Untersuchungen nötig sind.

3. Ergebnisse

3.3 Ergebnisse des Mitotic Delay

3.3.1 MD-Werte

Die Ergebnisse des Mitotic Delay ergaben sich durch die Berechnung des Mengenverhältnisses an Zellen, die sich im Vergleich von behandelten Kulturen MD(i) zu unbehandelten Kulturen MD(s), in der G₂ zur S-Phase befinden. Dazu wurden jeweils immer zwei Kulturen MD(s) und zwei Kulturen MD(i) gemessen, ein DNA-Histogramm erstellt und die Zellzahl in den jeweiligen Zellzyklusphasen erfasst. Mit Microsoft Excel wurden anschließend Tabellen erstellt, die von jedem Zwillingsgeschwister den Mitotic Delay berechneten.

Um die Heritabilität zu bestimmen, mussten erneut die Intrapaarvarianzen berechnet werden.

Zunächst folgt jedoch in Tabelle fünf eine Darstellung der MD Ergebnisse, zusammen und getrennt nach Zwillingstatus, als deskriptive Statistik.

Tab. 5: Mitotic Delay (MD)-Werte aus dem Verhältnis bestrahlter zu unbehandelter Blutkulturen von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach eineiig und zweieiig

	MD-Rate, Kollektiv	MD-Rate, eineiig	MD-Rate, zweieiig
Mittelwert	3,31	3,29	3,34
Standardabweichung	0,64	0,65	0,66
Standardfehler	0,11	0,15	0,19
Probenzahl	32	20	12
Minimalwert	2,39	2,48	2,39
Maximalwert	4,93	4,93	4,51

3.3.2 Korrelation zwischen den Zwillingen

Um einen Hinweis auf die Heritabilität der Reparaturfähigkeit zu erhalten, wurde die Abhängigkeit eines MD Wertes eines Zwilling vom Wert seines Zwillingsgeschwisters untersucht. Bei großer Heritabilität müssten die Werte eineiiger Zwillinge stärker korrelieren, als die Werte der zweieiigen.

Für die eineiigen Zwillinge wurde dies in Abbildung 25 als Regressionsplot dargestellt. Zusätzlich zur Regressionanalyse wurden der Regressionskoeffizient und dessen Signifikanz berechnet:

3. Ergebnisse

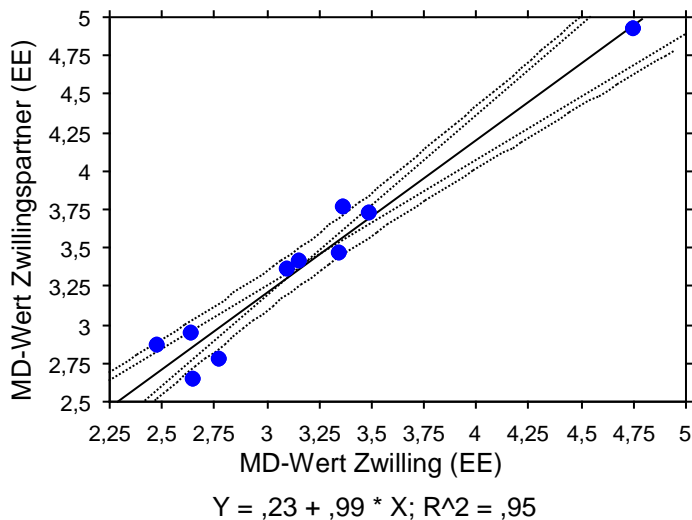


Abb. 25: Korrelation der MD-Werte (Mitotic Delay) aus Blutkulturen zwischen gesunden eineiigen (EE) Zwillingen. Abgebildet sind die Korrelationen von zehn Paaren.

Wie dargestellt, ist eine deutliche Korrelation der MD-Werte bei eineiigen Zwillingen zu sehen. Mit einem Regressionskoeffizienten von 0,95 und einer Signifikanz von $p < 0,0001$, ist eine deutliche und sichere Abhängigkeit der Werte festzustellen.

Zum Vergleich ist eine ebensolche Regressionsanalyse als Plot in Abbildung 26 für zweieiige Zwillinge veranschaulicht:

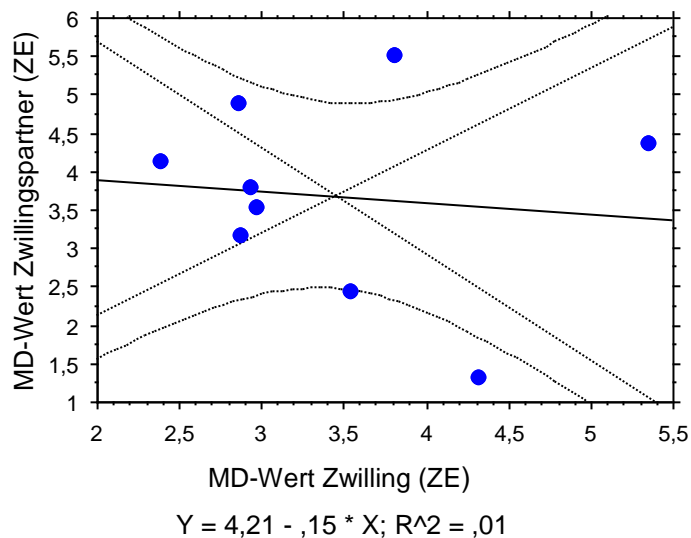


Abb. 26: Korrelation der MD-Werte (Mitotic Delay) aus Blutkulturen zwischen gesunden zweieiigen (ZE) Zwillingen. Abgebildet sind die Korrelationen von neun Paaren.

Aus Abbildung 26 geht hervor, dass mit einem Regressionskoeffizienten von 0,01 keine statistisch signifikante ($p > 0,77$) Korrelation nachgewiesen werden konnte.

3. Ergebnisse

Im Vergleich der resultierenden Ergebnisse aus den Analysen 25 und 26 ergibt sich ein Hinweis auf die hohe Heritabilität der Reparaturkapazität, gemessen mit dem Mitotic Delay.

3.3.3 Intrapaarvarianzen und Heritabilität

Nach den Ergebnissen aus 3.3.2 wurde eine Intrapaarvarianzanalyse durchgeführt. Aus den Gesamtvarianzen der eineiigen und zweieiigen Zwillinge lässt sich die Heritabilität errechnen:

$$h^2 = (\text{Gesamtvarianz}_{ZE} - \text{Gesamtvarianz}_{EE}) / \text{Gesamtvarianz}_{ZE}$$

Zunächst wurde zur Übersicht eine Darstellung der MD Werte im Paarvergleich, d.h. als bivariate Punktwolke, getrennt nach Zwillingsstatus, erstellt. Dabei entsprechen die blauen Punkte den eineiigen Zwillingspaaren, die roten den zweieiigen.

Anschließend wurden die Varianzen in einem Boxplot veranschaulicht. Dabei entspricht der obere und untere Rand der Box der 25er bzw. 75er Perzentile, die Linie innerhalb der Box dem Median. Die Linien oberhalb und unterhalb markieren die 10er bzw. 90er Perzentile.

Weiterhin erfolgte aus den Analysen die Berechnung der Heritabilität.

In Abbildung 27 sind die MD Werte als bivariate Punktwolke aufgezeigt:

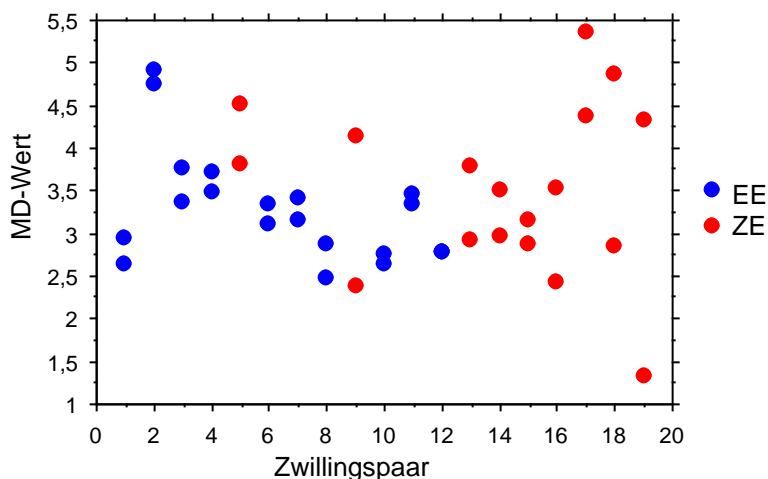


Abb. 27: MD-Werte (Mitotic Delay) aus Blutkulturen von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren, paarweise dargestellt. Die Werte der Zwillingspartner 12 sind identisch. Die Werte der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot.

Wie schon an dieser Darstellung ersichtlich ist, liegen die Wertepaare innerhalb eines eineiigen Zwillingspaars dicht beieinander. Die roten Punkte, d.h. die MD

3. Ergebnisse

Werte der zweieiigen Zwillingspaare, scheinen einen dazu im Vergleich größeren Abstand innerhalb eines Zwillingspaars zu haben.

Zur Verdeutlichung der Intrapaarvarianzen erfolgte eine Auswertung als Boxplot in Abbildung 28, farblich getrennt nach Zwillingstatus:

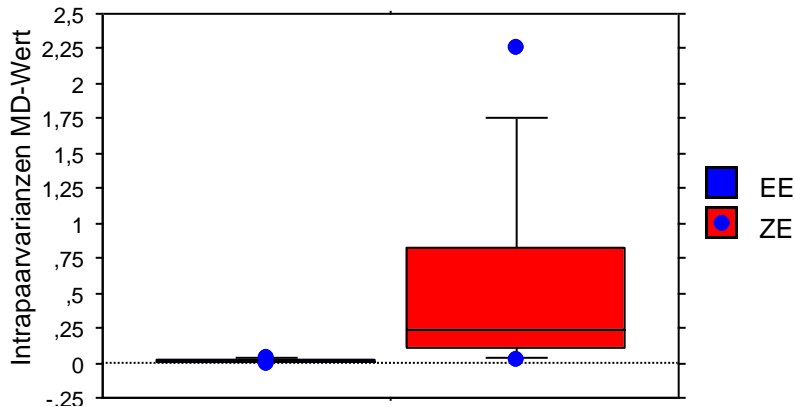


Abb. 28: Intrapaarvarianzen der MD-Werte (Mitotic Delay) aus Blutkulturen von gesunden eineiigen (EE) und zweieiigen (ZE) Zwillingspaaren. Die Intrapaarvarianzen der eineiigen Zwillinge sind blau dargestellt, die der zweieiigen rot. Einzelne blaue Punkte sind Extremwerte.

Aus dieser Darstellung geht eindeutig hervor, dass die Intrapaarvarianzen eineiiger Zwillinge geringer sind, als diejenigen der zweieiigen. Außerdem zeigen die Varianzen der Dizygoten eine sehr viel größere Streuung.

Die Gesamtvarianz der eineiigen Zwillinge, normiert auf die Probandenzahl, beträgt: 0,02, die Gesamtvarianz der zweieiigen: 0,62. Dies entspricht einer Heritabilität von $h^2=0,97$.

Dies ist ein sehr eindeutiges Ergebnis. Es erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden, nachgewiesen mit dem Mitotic Delay, einen sehr hohen genetischen Anteil hat.

3. Ergebnisse

3.4 Korrelation der MD-Werte, MN- und SCE-Raten

Um eventuelle Korrelationen zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Tests bei einem Probanden zu finden, wurden mit dem Programm StatView 5.0.1 lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Regressionsplots dargestellt, die Regressionskoeffizienten berechnet und es wurde auf Signifikanz geprüft.

Dabei wurden sämtliche Raten behandelter und unbehandelter Kulturen gegeneinander aufgetragen.

D.h. MD gegen MN(s), MN(i), SCE(s) und SCE(i); MN(s) gegen SCE(s), SCE(i); und MN(i) gegen SCE(s) und SCE(i). Dabei ist zu erwähnen, dass nur die Zwillingspaare dafür herangezogen wurden, von denen sowohl ein MN, ein SCE und ein MD Ergebnis vorgelegen hat. Die Ergebnisse der vier zweieiigen Zwillingspaare, die im SCE-Test berücksichtigt wurden, gehen in diese Analyse nicht mit ein. Zusätzlich wurden die Korrelationen getrennt nach Zwillingsstatus betrachtet.

Zur Übersicht sind in Tabelle sechs die Regressionskoeffizienten mit Signifikanzniveau aus den jeweiligen Analysen aufgeführt.

Tab. 6: Korrelationen zwischen dem Mikronukleus (MN)-, Schwesterchromatid- Austausch (SCE)- und Mitotic Delay (MD)-Test aus unbehandelten (s) und behandelten (i) Blutkulturen von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach eineiig und zweieiig (Signifikanzniveau)

Tests	Regressionskoeffizient, Kollektiv	Regressionskoeffizient, eineiig	Regressionskoeffizient, zweieiig
MD - MN(s)	0,02 (p>0,42)	0,05 (p>0,33)	0,05 (p>0,58)
MD - MN(i)	0,06 (p>0,19)	0,09 (p>0,20)	0,04 (p>0,60)
MD - SCE(s)	0,0004 (p>0,93)	0,00009 (p>0,97)	0,001 (p>0,95)
MD - SCE(i)	0,07(p>0,22)	0,09 (p>0,27)	0,05 (p>0,60)
MN(s) - SCE(s)	0,01 (p>0,61)	0,04 (p>0,46)	0,03 (p>0,70)
MN(s) - SCE(i)	0,01 (p>0,67)	0,003 (p>0,95)	0,09 (p>0,47)
MN(i) - SCE(s)	0,04 (p>0,39)	0,01 (p>0,77)	0,53 (p>0,04)
MN(i) - SCE(i)	0,06 (p>0,25)	0,07 (p>0,31)	0,02 (p>0,74)

Wie aus der Tabelle sechs ersichtlich ist, wurde bis auf eine Korrelation, die fett gedruckt ist, keine Signifikanz für die Regressionskoeffizienten erreicht. Ohnehin hat eine Korrelation von $R^2 < 0,1$ keinerlei Bedeutung. Die fett gedruckte Korrelation ist aufgrund der wenigen Probandenwerte bedeutungslos.

3. Ergebnisse

Eventuell sind die niedrigen Probandenzahlen für die nicht vorhandenen Korrelationen verantwortlich, bzw. für die fehlende Signifikanz der Regressionskoeffizienten.

Für die Überprüfung der Abhängigkeit der Tests untereinander werden weitere Analysen erforderlich sein.

3.5 Ergebnisse des Varianzvergleichs und der Heritabilität

Aus den vorhergegangenen Heritabilitätsberechnungen und Varianzanalysen (3.1.4, 3.2.4, 3.3.3) gingen folgende Werte hervor:

Tab.7: Intrapaarvarianz und Heritabilität, berechnet anhand der Raten des MN (Mikronukleus)-, SCE (Schwesterchromatid- Austausch)- und Mitotic Delay (MD)-Tests aus unbehandelten (s) und behandelten (i) Blutkulturen von gesunden Zwillingen, im Kollektiv sowie getrennt nach eineiig und zweieiig

	Intrapaarvarianz, Kollektiv	Intrapaarvarianz eineiig	Intrapaarvarianz zweieiig	Heritabilität h^2
MN(s)	127,20	110,75	196	0,19
MN(i)	442,09	512,81	393,5	-
SCE(s)	2,00	0,46	1,54	0,70
SCE(i)	4,74	1,25	3,48	0,64
MD	0,09	0,02	0,29	0,97

Die Intrapaarvarianzen waren in den Ergebnissen der Kulturen SCE(s), SCE(i) und MD eindeutig in den eineiigen Zwillingen geringer als in den zweieiigen. Bei den unbehandelten Kulturen aus dem MN-Test war dieselbe Tendenz ersichtlich. In den Ergebnissen der bestrahlten Kulturen des MN-Tests war jedoch eine geringere Gesamtintrapaarvarianz bei den zweieiigen Zwillingen im Vergleich zu den eineiigen feststellbar.

Die berechneten Heritabilitäten zeigen einen deutlichen Hinweis auf einen hohen genetischen Anteil an der Variation der Reparaturfähigkeit. Von hoher Heritabilität spricht man von Werten über $h^2=0,45$, von mittlerer bei $h^2=0,2$ bis $0,4$.

Bei $h^2=0,1-0,15$ geht man von geringer Heritabilität aus.

4. Diskussion

Ziel meiner Arbeit war es den genetisch bedingten Anteil der interindividuellen Variation der Ergebnisse von drei verschiedenen zellbiologischen Tests für DNA-Reparaturkapazität zu bestimmen. Als Maß für die Heritabilität diente im G₀-Mikronukleustest, Schwesterchromatid-Austausch Test und im Mitotic Delay die Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden.

Die Tests wurden mit peripheren Blutlymphozyten von eineiigen und zweieiigen Zwillingspaaren durchgeführt.

Es wurde neben der Erstellung einer deskriptiven Statistik für die erhaltenen Werte, die Korrelation der Raten mit und ohne Bestrahlung bzw. Mutagenbehandlung ermittelt.

Um einen Hinweis auf die Höhe der Heritabilität zu erhalten, wurden die einzelne Werte innerhalb der Zwillingspaare miteinander verglichen. Somit wurde, nach Zwillingsstatus getrennt, die Korrelation der Werte innerhalb der Zwillingspaare untersucht.

Gleichzeitig wurden die Intrapaarvarianzen bei allen Ergebnissen der drei Tests ermittelt, um die der Eineiigen mit denen der Zweieiigen zu vergleichen.

Aus den Gesamtvarianzen, d.h. der, auf die Anzahl der Probanden normierten, Summe der Intrapaarvarianzen der monozygoten und dizygoten Zwillinge, wurde anschließend die Heritabilität berechnet. Die Diskussion soll nun einerseits den ermittelten genetisch bedingten Anteil der interindividuellen Varianz der Reparaturkapazität erörtern und andererseits überprüfen, ob die Testergebnisse der behandelten Kulturen eine höhere Heritabilität aufweisen als die Testergebnisse der unbehandelten Kulturen. Sollte dies der Fall sein, könnte die Annahme bestätigt werden, dass induzierte Schäden die schon vorhandenen Schäden bei unbehandelten Kulturen überdecken und die Raten nach Mutagenbehandlung stärker von genetischen Faktoren abhängen.

4. Diskussion

4.1 Periphere Blutlymphozyten

Periphere Blutlymphozyten sind Zellen unseres Immunsystems und sind für die körpereigene Immunantwort verantwortlich. Die Zellen haben einen geringen Zytoplasmaanteil und einen großen, chromatindichten Kern. Ihr Volumen liegt bei $170 \mu\text{m}^3$ und ihr Durchmesser liegt bei $6 \mu\text{m}$. Lymphozyten stammen von pluri- bzw. unipotenten lymphoiden Stammzellen im Knochenmark ab

Die Bildung erfolgt im Knochenmark, in den Lymphknoten, im Thymus und der Milz. Sie gelangen hauptsächlich über die Lymphbahnen ins Blut. 70% der Lymphozyten befinden sich in den lymphatischen Organen, 10% im Knochenmark, 2% im peripheren Blut. Außerdem kommen sie auch in allen anderen Organen des Menschen vor. Man kann neben den natürlichen Killerzellen zwei verschiedene Arten von Lymphozyten unterscheiden:

Die T-Lymphozyten sind für die zelluläre adaptive Immunantwort verantwortlich. Sie werden im Knochenmark gebildet, reifen im Thymus heran und machen 70-80 % der Gesamtzahl an Lymphozyten aus.

Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sie werden ebenfalls im Knochenmark gebildet, sind im Blutplasma enthalten und machen 20-30 % der Gesamtzahl an Lymphozyten aus. Sie sind für die Bildung spezifischer Antikörper zuständig, nachdem sie mit körperfremden Antigenen in Kontakt gebracht wurden.

Normalerweise befinden sich die B- und T-Lymphozyten in der Ruhephase, in der G_0 -Phase. Nach Stimulierung durch spezifische Antigene werden sie zur Proliferation angeregt. Bei in vitro Experimenten übernehmen diese Stimulation spezielle Mitogene im Zellkulturmedium, z.B. Phythämagglutinin (Weksler and Kuntz, 1976). Es handelt sich hierbei um ein Protein aus der Bohnenpflanze *Phaseolus vulgaris*, welches vor allem T-Lymphozyten stimuliert. Erst einige Tage nach der Stimulation der T-Lymphozyten werden auch die B-Lymphozyten zur Proliferation angeregt (Han and Dadey, 1978). Somit werden in vorliegender Arbeit überwiegend T-Lymphozyten analysiert, da die Untersuchung von Chromosomenschäden der mitotischen Zellen innerhalb von 96h erfolgte.

Dass sich der Hauptteil der Lymphozyten bei Experimentbeginn in der G_0 -Phase befindet, ist von Vorteil, da die Strahlenempfindlichkeit vom Zellzyklusstadium abhängt (Bedford *et al.*, 1978; Hei *et al.*, 1985). Patientinnen mit Brustkrebs zeigen

4. Diskussion

erhöhte Strahlensensitivität, wenn sie in der G₀-Phase bestrahlt werden (Scott, 2004). 40% der Brustkrebspatientinnen zeigen außerdem eine erhöhte Strahlensensitivität, wenn die Zellen in der G₂-Phase bestrahlt werden (Scott, 2004). Des Weiteren stellt die einfache Entnahme der Zellen einen Vorteil dar. Die peripheren Blutlymphozyten können aus Blutproben durch unkomplizierte Verfahren isoliert und für in vitro Experimente verwendet werden. Im Bereich der Mutagenitätsforschung werden periphere Blutlymphozyten schon lange erfolgreich verwendet. In zahlreichen Studien wurde die erhöhte Sensitivität der peripheren Blutlymphozyten für Mutagene und ionisierende Strahlung bei Krebspatienten unterschiedlicher Genese (Wu *et al.*, 2006; Blasiak *et al.*, 2004; Speit and Trenz, 2004; Buchholz and Wu, 2001; Berwick *et al.*, 2001; Shao *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1998) mit niedriger Reparaturkapazität in Verbindung gebracht (Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005).

Noch einfacher zu handhaben wären immortalisierte Zelllinien, wie lymphoblastoide Zelllinien.

4.2 Heritabilität

Die Erblichkeit entspricht dem Anteil der genetisch bedingten Varianz an der Gesamt-(Phänotyp-) Varianz eines Merkmals. In diesem Fall wird die Reparaturkapazität als Merkmal betrachtet und anhand dreier zellbiologischer Tests untersucht. Dabei geht man davon aus, dass die Varianz eines Merkmals Summe der genetisch bedingten Varianz und der Umweltvarianz ist.

Die Berechnung ist vor allem bei Merkmalen mit komplexen Erbgängen sinnvoll und wird im engeren Sinne häufig als Maß für die Übertragung phänotypischer Unterschiede von Eltern auf die Nachkommen im Bereich der Selektionsforschung (Züchtung von Tieren) angewandt. Hier definiert sich die Heritabilität aus dem Quotienten von Selektionserfolg und Selektionsdifferenz.

Die Heritabilitätsberechnung ist nicht konsistent über einen Zeitverlauf sondern trifft immer nur zu einem bestimmten Zeitpunkt, in einer bestimmten Population Aussagen. Denn die Heritabilität stellt immer Verhältnisse dar, die auf Umwelt- und genetischer Diversität beruhen. Sollte zu einem gemessenen Zeitpunkt einer Heritabilitätsberechnung die Umweltvarianz geringer sein als zu einem anderen, so würde die Heritabilität des Merkmals zum gemessenen Zeitpunkt höher sein als

4. Diskussion

zum anderen Zeitpunkt, obwohl es sich um das gleiche Merkmal handelt und der absolute Beitrag genetischer Faktoren zu Merkmalsunterschieden gleich bleibt. Somit hängt die Heritabilität nicht nur von der genetischen Varianz ab, sondern auch von der Summe der Umweltvarianz.

In der Humanmedizin werden die Heritabilitätsberechnungen vor allem zur Abschätzung des Anteils genetischer Ätiologie an der Gesamtätiologie herangezogen. Dazu wird häufig auf die Möglichkeit der Zwillingsforschung zurückgegriffen.

Zwillingsstudien bieten nun eine gute Möglichkeit, den Einfluss genetischer Faktoren auf die Entwicklung multifaktorieller Krankheiten relativ unabhängig von Umweltfaktoren zu ermitteln. Sie beruhen auf der Tatsache, dass im Fall einer genetischen Prädisposition monozygote Zwillinge häufiger gemeinsam erkranken als dizygote Zwillinge. Aus den Daten einer Zwillingsstudie kann die Abschätzung der Heritabilität nach folgender Formel erfolgen:

$h^2 = (\text{Diskordanz ZE} - \text{Diskordanz EE}) / \text{Diskordanz ZE}$, wobei die Diskordanz dem Anteil der Zwillingspaare mit nur einem erkrankten Geschwister von allen Zwillingspaaren, die die Krankheit zeigen, entspricht. Überträgt man dies auf das quantitative Merkmal der Reparaturkapazität, so ergibt sich die Formel:

$h^2 = (\text{Gesamtvarianz}_{ZE} - \text{Gesamtvarianz}_{EE}) / \text{Gesamtvarianz}_{ZE}$.

In vorliegender Arbeit wurden 19 Zwillingspaare, davon 10 monozygote und 9 dizygote Paare, untersucht. Der Gesamterschnitt der eineiigen Zwillingspaare liegt bei 27,7 Jahren (männlich: 27 Jahre, weiblich: 27,8 Jahre), wobei 2 männliche und 8 weibliche Paare untersucht wurden. Bei den dizygoten Zwillingspaaren liegt der Gesamterschnitt bei 34,6 Jahren (männlich: 24,6 Jahre, weiblich: 47,3 Jahre). Es wurden 5 männliche und 4 weibliche zweieiige Zwillingspaare untersucht.

Die Untersuchung des peripheren Blutes und Ansetzen der Blutkulturen wurde bei allen Zwillingspaaren innerhalb von 48 Stunden gewährleistet.

In Zusammenarbeit mit Frau Anna Wecker und dem Institut für Virologie an der Universität Ulm wurden aus dem Blut von 13 Zwillingspaaren lymphozytäre Blutkulturen angelegt, indem die Zellen mit EBV transformiert wurden.

Die Ergebnisse der Tests an der lymphozytären Zellreihe werden in Frau Anna Weckers Doktorarbeit diskutiert.

4.3 MN-Raten und Heritabilität

4.3.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die MN-Raten

In zahlreichen Studien wurde belegt, dass sowohl die Umwelt, als auch Alter, Geschlecht oder körperliche Betätigung (Schiffel *et al.*, 1997) einen Einfluss auf die MN-Rate ohne Bestrahlung haben (Bonassi *et al.*, 2003; Fenech *et al.*, 1994), jedoch nicht auf die MN-Rate mit Bestrahlung (Varga *et al.*, 2006). Außerdem scheinen Rauchen (Bonassi *et al.*, 2003) und Ernährungsverhalten ebenso eine Rolle zu spielen (Fenech and Rinaldi, 1995), wie die Lagerungsbedingungen der Blutprobe (Lee *et al.*, 1999). Erhöhte Mikronukleusraten der unbehandelten Kulturen können ebenfalls bei Probanden mit Brustkrebs vorkommen (Mozdarani *et al.*, 2005). Dies kann bei Brustkrebspatientinnen unabhängig von einer BRCA1/2 Mutation nachgewiesen werden (Rothfuss *et al.*, 2000) und bei unbehandelten Brustkrebspatientinnen (Lou *et al.*, 2008). Sowohl bei Brustkrebspatientinnen mit Radiotherapie ist die MN-Rate signifikant erhöht (Aristei *et al.*, 2009) als auch bei Patientinnen, die mit Zytostatika behandelt wurden (Speit and Trenz, 2004). Des Weiteren werden erhöhte MN-Raten bei Personen mit unterschiedlichen erblichen Syndromen nachgewiesen, denen Mutationen in DNA-Reparaturwegen zu Grunde liegen. Dies ist z.B. bei der Fanconi-Anämie (Zunino *et al.*, 2001) oder der Ataxia telangiectasia der Fall (Gutierrez-Enriquez *et al.*, 2004). Bei der Fanconi-Anämie sind bisher 12 FANC-Gene bekannt, in denen biallelische Mutationen zu Zellzyklusdefekten und erhöhter Chromosomenbrüchigkeit führen, darunter auch BRCA2. Bei der Ataxia telangiectasia ist eine Mutation im ATM-Gen (Chr. 11, 11q23), das eine Proteinkinase kodiert, die für Apoptose und DNA-Reparaturvorgänge zuständig ist, ursächlich.

Unabhängig von Mutationen in Genen der DNA-Reparaturwege, werden Veränderungen von Proteinen und Enzymen des Fremdkörperstoffwechsels und von Enzymen des Folatstoffwechsels in Verbindung mit erhöhten Mikronukleusraten gebracht (Iarmarcovai *et al.*, 2008). Dabei scheinen Mutationen im Folatstoffwechsel einen höheren Einfluss auf die Chromosomeninstabilität zu haben, als es durch Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2 der Fall ist (Beetstra *et al.*, 2006).

4. Diskussion

Die unterschiedlichen MN-Werte der unbehandelten Kulturen der Zwillinge sind also auf interindividuelle Unterschiede der Umwelteinflüsse und der genetischen Faktoren zurückzuführen.

Bei den MN-Raten nach Bestrahlung sollten exogene Faktoren weitgehend ausgeschlossen sein, da die induzierten Schäden diese überdecken sollten (Baeyens *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2006). Eine Erhöhung der MN-Rate mit zunehmendem Alter bei den behandelten Kulturen wurde festgestellt (Joksic *et al.*, 2004). In mehreren Untersuchungen bei Brustkrebspatientinnen konnte dies allerdings nicht gezeigt werden (Baeyens *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1998). Genauso wenig scheint das Alter bei Auftreten des Brustkrebses eine Rolle zu spielen (Baeyens *et al.*, 2005).

In Fibroblastenzelllinien und Brustkrebszelllinien konnte die Variation der Mikronukleusrate abhängig vom Zellzyklusstadium (Larsson *et al.*, 2007) nachgewiesen werden. Die Temperatur bei Bestrahlung scheint dabei kein Einfluss auf die MN-Rate zu haben (Larsson *et al.*, 2007).

Dies sollte keinen Einfluss auf vorliegende Ergebnisse haben, da nur die Zellen ausgewertet wurden, die in der G₀-Phase bestrahlt wurden und in Kultur eine Mitose durchlaufen haben.

Bei Brustkrebspatientinnen ist die Rate nach ionisierender Strahlung höher als bei Kontrollpersonen (Patino-Garcia *et al.*, 2006; Baeyens *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2008). Außerdem konnten erhöhte MN-Raten nach Bestrahlung bei Brustkrebspatientinnen mit einer BRCA1 Mutation nachgewiesen werden (Rothfuss *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2006), die jedoch nicht zu unterscheiden waren von Brustkrebspatientinnen ohne BRCA1 oder BRCA2 Mutationen (Baeyens *et al.*, 2004). Dabei können Trägerinnen von BRCA1 Mutationen von BRCA2 Mutationsträgerinnen nicht unterschieden werden (Trenz *et al.*, 2002).

Heterozygote gesunde Trägerinnen der Mutationen in einem der beiden Gene zeigten keine erhöhten MN-Raten nach Bestrahlung (Baeyens *et al.*, 2004). Dies wirft die Frage auf, ob Mutationen in diesen Genen tatsächlich eine so große Rolle bei der chromosomalen Radiosensitivität spielen, wie gedacht.

Brustkrebspatientinnen mit BRCA1 Mutationen zeigen nicht nur erhöhte MN-Raten durch ionisierende Strahlung sondern auch durch die Behandlung mit H₂O₂, Bleomycin, Cisplatin, Cyclophosphamid und Bischloroethylnitrosurea (BCNU). Dies

4. Diskussion

könnte bedeuten, dass Trägerinnen mit BRCA1 Mutationen sensibler für das Auftreten von Zweitmalignomen nach einer Standardkrebstherapie sind. Erhöhte MN-Raten mit Bestrahlung sind außerdem Patientinnen mit Mutationen im Aktin-bindenden Protein Filamin-A (ABP-280), das mit BRCA2 interagiert, zu erwarten (Yue *et al.*, 2009). Des Weiteren weisen Brustkrebspatientinnen, die mit Radiotherapie behandelt wurden, erhöhte MN-Raten auf (Banerjee *et al.*, 2008; Djuzenova *et al.*, 2006). Vor allem bei Patientinnen, die nach einer Radiotherapie ungünstige Hautreaktionen zeigten, konnten erhöhte MN-Raten mit Bestrahlung gefunden werden (Djuzenova *et al.*, 2006). Dabei scheinen Patientinnen mit frühzeitigen Reaktionen eine erhöhte MN-Rate und erniedrigte Apoptoserate gegenüber Patientinnen mit Spätreaktionen und einer niedrigeren MN-Rate und erhöhten Apoptoserate zu haben (Taghavi-Dehaghani *et al.*, 2005). Dies könnte bedeuten, dass eine Bestrahlung, bei vorhandenen DNA-Schäden, die noch nicht vollständig repariert sind, den Zellen so schwere Schäden zufügt, dass bei den Zellen Apoptose eingeleitet wird, anstatt die Bildung von Mikronuklei. Am stärksten sensitiv auf ionisierende Strahlung scheinen junge Brustkrebspatientinnen ohne familiäre Belastung zu sein (Baeyens *et al.*, 2002).

Oben genannte Literaturrecherche deutet darauf hin, dass auf die behandelten Kulturen Umweltfaktoren einen geringeren Einfluss haben als auf die Unbehandelten. Beziehungsweise diese Umweltfaktoren sollten weitgehend überdeckt sein durch das hohe Ausmaß an induzierten Schäden. Heritabilität der Reparaturkapazität sollte somit in den bestrahlten Kulturen noch stärker sichtbar werden als in den Unbestrahlten.

Die folgende Ausarbeitung diskutiert nun meine Ergebnisse im Hinblick auf vorangehende Literaturergebnisse.

Die Ergebnisse sind bis auf die Korrelation der MN-Raten ohne Bestrahlung der zweieiigen Zwillinge statistisch signifikant. Der Grund für die Unsicherheit könnte ein zu kleines Kollektiv sein oder ein Zwillingskollektiv, dessen Zwillingsgeschwister zu unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Für die Bestätigung der Daten werden weitere Untersuchungen nötig sein.

4. Diskussion

In meinem Kollektiv der Zwillingspaare wurde ermittelt, dass erhöhte Raten ohne Bestrahlung auch mit erhöhten Mikronukleusraten mit Bestrahlung einhergehen ($R^2=0,28$).

In einer früheren Doktorarbeit von Frau Maren-Andrea Höhne (Höhne, 2006) konnte im MN-Test durch Blutproben von 150 Frauen, davon 84 mit sporadischem Brustkrebs, 60 ohne Karzinom, 6 BRCA1 Mutationsträgerinnen und 45 gesunden Männern, eine Korrelation zwischen den Raten MN(s) und MN(i) mit $R^2=0,21$, $p<0,0001$, nachgewiesen werden.

Der den beiden Varianten des Tests gemeinsame Einfluss ist der endogene Faktor der Reparaturfähigkeit. Hohe Mikronukleusraten nach Bestrahlung entstehen bei einer geringen Reparaturkapazität, so weisen entsprechend die Raten ohne Behandlung ebenso eine erhöhte Mikronukleusrate auf. Die relativ schwache Korrelation ist dadurch zu erklären, dass die Varianz der Reparaturkapazität in den unbehandelten Kulturen durch Umwelteinflüsse beeinflusst wird, die in den behandelten Kulturen durch die große Anzahl an DNA-Schäden überdeckt werden. Der Einfluss der individuellen Umweltbedingungen ist in der Rate der behandelten Kulturen nicht mehr ersichtlich, wohingegen in den unbehandelten Kulturen deren Einfluss deutlich sichtbar wird.

Eine Korrelation der MN-Raten zwischen den Zwillingspaaren besteht bei den eineiigen Zwillingen, sowohl in den unbehandelten ($R^2=0,75$), als auch in den behandelten Kulturen ($R^2=0,77$). Während bei den unbehandelten MN-Raten bei den zweieiigen Zwillingen ($R^2=0,056$) keine Tendenz zu beobachten war, so wurde bei den behandelten MN-Raten der zweieiigen Zwillingspaare ($R^2=0,662$) eine starke Korrelation beschrieben.

Die Regressionskoeffizienten der behandelten Kulturen übertreffen sowohl bei den monozygoten, als auch bei den dizygoten Zwillingspaaren die Regressionskoeffizienten der unbehandelten Kulturen.

Damit bestätigen meine Ergebnisse, dass in den behandelten Kulturen ein eventuell stärkerer Zusammenhang sichtbar wird als in den unbehandelten Kulturen. Allerdings ist der Unterschied, der bei den monozygoten Zwillingen sichtbar wird, sehr gering. Das liegt unter anderem daran, dass die eineiigen Zwillingspaare 2 und 7 im Intrapaarvergleich der behandelten Kulturen sehr viel

4. Diskussion

stärker voneinander abweichende MN-Raten haben, als es bei allen anderen eineiigen Zwillingspaaren der Fall ist.

Im Bezug auf die zweieiigen Zwillingspaare wird deutlich, dass bei den behandelten Kulturen eine stärkere Korrelation besteht als bei den Unbehandelten. Der Einfluss von körperlicher Betätigung, Rauchen oder Ernährungsverhalten ist jedoch nicht untersucht worden. Eventuell sind diese Faktoren im Kollektiv der zweieiigen Zwillingspaare innerhalb der Zwillingsgeschwister sehr viel verschiedener, als es im Kollektiv der eineiigen Zwillingspaare der Fall ist. Das würde die sehr niedrige Korrelation der unbehandelten Kulturen der zweieiigen Zwillinge erklären.

Die Regressionskoeffizienten bei den eineiigen Zwillingspaaren zeigen starke Korrelationen, die sowohl in den unbehandelten, als auch in den behandelten Kulturen, die Regressionskoeffizienten der zweieiigen Zwillingspaare übertreffen. Der Unterschied der Korrelation der behandelten Kulturen ist nicht sehr groß. Keinesfalls ist hier von einer eindeutig stärkeren Beeinflussung der MN-Raten innerhalb eines Zwillingspaars bei den eineiigen Zwillingen gegenüber den zweieiigen Zwillingen auszugehen, eine Tendenz ist jedoch ersichtlich. Die Korrelationen bei den unbehandelten Kulturen lassen auf einen zumindest geringen genetischen Anteil der Varianz der Reparaturfähigkeit schließen. Bei den bestrahlten Kulturen ist der Unterschied zwischen den Regressionskoeffizienten der eineiigen und zweieiigen Zwillingspaare allerdings sehr gering. Dies ist vor allem durch die eineiigen Probandenpaare 2 und 7 bedingt, deren MN-Raten in den behandelten Kulturen stark voneinander abweichen.

4.3.2 Heritabilität

Wie beschrieben (4.3.1) deutet die Korrelation zwischen den Zwillingen bei bestrahlten und unbehandelten Kulturen auf unterschiedlich hohe Heritabilitäten hin.

Bei der Berechnung der Heritabilität aus unbehandelten Kulturen wurde ein h^2 von $h^2=0,192$ ermittelt. Die Intrapaarvarianzen (Gesamtvarianz_{EE}=110,75, Gesamtvarianz_{ZE}=137) waren bei der Berechnung auf die Probandenzahl normiert. Hier kann man von einem geringen genetischen Anteil der Varianz der

4. Diskussion

Reparaturkapazität sprechen. 19,2% der Varianz der Reparaturfähigkeit ist durch genetische Varianz bedingt.

Bei den bestrahlten Kulturen konnte die Höhe der Heritabilität nicht berechnet werden, da die Intrapaarvarianzen der zweieiigen Zwillingspaare (Gesamtvarianz_{ZE}=412,69) geringer waren als die der eineiigen (Gesamtvarianz_{EE}=512,81). Die Berechnung wurde hinfällig.

Schaut man sich jedoch genau den Intrapaarvarianzvergleich an (3.1.4.2) an, so stellt sich heraus, dass die eineiigen Zwillingspaare 2 und 7 extreme Intrapaarvarianzen aufweisen und so das Ergebnis im Wesentlichen bestimmen. Nimmt man diese Paare aus der Wertung heraus, so ermittelt man eine Heritabilität von $h^2=0,68$ bei den Kulturen mit Bestrahlung. Dabei sind die Gesamtintrapaarvarianzen (Gesamtvarianz_{EE}=124,56, Gesamtvarianz_{ZE}=412,69) auf die Probandenzahl normiert.

Damit könnte eine hohe Abhängigkeit der Varianz der Reparaturfähigkeit von genetischer Varianz anhand des Mikronukleustests aufgezeigt werden.

Außerdem könnte damit die Vermutung bestätigt werden, dass in den behandelten Kulturen die Heritabilität der Reparaturkapazität stärker darzustellen ist als in den Unbehandelten ($h^2_{\text{(behandelt)}}=0,68$, $h^2_{\text{(unbehandelt)}}=0,192$).

Für diese Bestätigung werden weitere Kollektive benötigt, die größer sind und hinsichtlich Einflüsse wie Rauchen, körperliche Betätigung oder Ernährungsverhalten befragt werden.

Eine Beeinflussung der Werte der Heritabilität durch sich ähnliche oder unähnliche Umwelteinflüsse innerhalb eines Zwillingspaars wurde in vorliegender Arbeit nicht mitberechnet. Vermeintlich ähnliche Reparaturkapazitäten in den unbehandelten Kulturen innerhalb eines zweieiigen Zwillingspaars könnten nur deshalb ähnlich sein, weil die Zwillingsgeschwister gleicher Umweltbedingungen ausgesetzt waren. Voneinander stark abweichende Werte könnten in den Raten ohne Bestrahlung jedoch auch bei eineiigen Zwillingen durch stark differierende Umwelteinflüsse bedingt sein.

Mutationen in Genen, die Reparaturkapazität beeinflussen, wie z.B. BRCA1/2, wurden nicht untersucht.

Die Varianz der Reparaturfähigkeit hat eine hohe Abhängigkeit von der genetischen Varianz, gemessen an der Sensitivität für ionisierende Strahlung. Dies

4. Diskussion

gibt die Zukunftsperspektive, dass eine erhöhte Radiosensitivität als Marker für die Prädisposition von Brustkrebs mit erblichem Charakter eingesetzt werden könnte (Burrill *et al.*, 2000).

Untersuchungen zur Karzinogenese durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, fanden eine Assoziation zwischen Mutagensensitivität und genetischen Polymorphismen. Anhand des Mikronukleustest bei 173 Personen, die beruflich polyzyklischen aromatischen Wasserstoffen ausgesetzt waren, fand man eine erhöhte Mutagensensitivität bei Personen mit Polymorphismen in den Genen GSTM1 und NQO1 (Leng *et al.*, 2004). GSTM1 ist eine wichtige Komponente des Fremdstoffmetabolismus, NQO1 ist an der Stabilisation des Tumorsuppressorgens p53 beteiligt.

Bei Polymorphismen in den Genen GSTT1, das am Fremdstoffmetabolismus beteiligt ist, und XPD, das als Reparaturgen für eine ATP-abhängige Helikase kodiert, findet man erhöhte Mikronukleiraten bei unbehandelten und bestrahlten Kulturen. Dies könnte unter anderem genetische Variation der Reparaturkapazität erklären (Angelini *et al.*, 2008).

Eine andere Arbeitsgruppe aus Ulm beschreibt ebenfalls eine wahrscheinlich hohe Erblichkeit der Mutagensensitivität, gemessen am Mikronukleustest, durch Analysen von Familien mit Brustkrebspatientinnen (Speit and Trenz, 2004).

In einer Zwillingsstudie mit 9 monozygoten und 10 dizygoten männlichen Zwillingspaaren im Alter zwischen 70 und 78 Jahren wurde die Mutagensensitivität gegenüber Bleiomycin, Aphidocolin und Bleimoycin+Aphidocolin mit dem MNT untersucht. Dabei wurde eine hohe genetische Komponente der Mutagensensitivität nachgewiesen (Tedeschi *et al.*, 2004).

Vorliegende Arbeit bestätigt die Tendenz der Literatur, dass die Varianz der Reparaturkapazität stark genetisch determiniert ist.

4.4 SCE-Raten und Heritabilität

4.4.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die SCE-Raten

Die SCE-Raten unbehandelter Kulturen sind abhängig von Kaffee- und Nikotinkonsum (Barale *et al.*, 1998;Major *et al.*, 1998;Vijayalaxmi and Evans, 1982). Dabei ist die SCE-Rate bei Nikotinkonsum erhöht (Livingston *et al.*, 1983). Einen deutlichen Einfluss auf die SCE-Rate scheint außerdem das Geschlecht und das Blutbild zu haben (Hirsch *et al.*, 1992;Major *et al.*, 1998). Des Weiteren scheint eine Abhängigkeit zwischen dem Alter der Probanden und einer Erhöhung der SCE-Rate zu bestehen (Schmidt and Sanger, 1981).

Eine Beeinflussung der SCE-Rate durch ionisierende Strahlung ist minimal, jedoch Crosslinking Agents scheinen die Rate zu beeinflussen (Morgan and Crossen, 1980). BrdU hat dabei keinen Einfluss auf die Entstehung von SCEs (Ardito *et al.*, 1981).

Weiterhin ist bei Personen, die chronisch Arsen im Trinkwasser ausgesetzt sind, eine erhöhte SCE-Rate zu beobachten (Lerda, 1994). Probanden, die Asbest ausgesetzt sind, zeigen ebenfalls erhöhte SCE-Raten, obwohl Asbestfasern keine direkte DNA-Schäden bewirken (Kelsey *et al.*, 1986;Hei *et al.*, 1985).

Viele chemische Mutagene führen bei einer Exposition der Zellen im Experiment oder in vivo zu DNA-Schäden und einer erhöhten SCE-Rate. Nachgewiesen ist dies z.B. für geheilte Hodgkin's Lymphom-Patienten, Patienten mit atopischer Dermatitis oder Epilepsie (Strom *et al.*, 1998).

Bei Brustkrebspatientinnen (Aristei *et al.*, 2009;Roy *et al.*, 2000) und Cervixkarzinompatientinnen (Yokota *et al.*, 1987) kann bei unbehandelten und behandelten Kulturen eine erhöhte SCE-Rate nachgewiesen werden.

Brustkrebspatientinnen, die mit Chemotherapie behandelt wurden, weisen erhöhte SCE-Raten auf (Aristei *et al.*, 2009;Kopjar *et al.*, 2007). Erhöhte SCE-Raten sind auch bei Verwandten 1. Grades von Brustkrebspatientinnen zu beobachten (Cefle *et al.*, 2006;Roy *et al.*, 2000). Außerdem scheint es ein Zusammenhang zwischen der Höhe der SCE-Rate und des Stadiums des Brustkrebses zu geben (Husain *et al.*, 1992). Nach einer Mastektomie nimmt die unbehandelte SCE-Rate signifikant ab (Adhvaryu *et al.*, 1988). Heterozygote Trägerinnen einer BRCA2 Mutation mit Brustkrebs weisen ebenfalls erhöhte SCE-Raten als Trägerinnen von BRCA2 Wildtypen (Kim *et al.*, 2004). Wie auch im MNT kann bei der Fanconi-Anämie, bei

4. Diskussion

Ausfall des FANCM-Gens, eine erhöhte SCE-Rate festgestellt werden (Rosado *et al.*, 2009). Bei Erbkrankheiten wie dem Bloom Syndrom ist eine erhöhte SCE-Rate ohne Mutagenbehandlung nachgewiesen (Walpita *et al.*, 1999). Bei dieser Krankheit liegt eine Mutation im BLM-Gen vor, einer Helikase, die an der Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Weitere Erbkrankheiten, die mit einer Erhöhung der SCE-Rate einhergehen, sind Xeroderma pigmentosum, das Down Syndrom oder auch die Ataxia telangiectasia (Morimoto, 1987). Erhöhte SCE-Raten mit Mutagenbehandlung sind auch bei Personen, die genetische Polymorphismen in Enzymen des Fremdstoffmetabolismus, wie GSTT1, tragen, beschrieben (Schlade-Bartusiak *et al.*, 2004; Bernardini *et al.*, 2002; Norppa, 1997).

Nachfolgende Diskussion erörtert nun meine Ergebnisse im Hinblick auf vorangehende Literaturrecherche.

Die Ergebnisse sind bis auf die Korrelation der SCE-Raten der zweieiigen Zwillinge statistisch signifikant. Der Grund für die Unsicherheit könnte ein zu kleines Kollektiv sein. Für die Bestätigung der Daten werden weitere Untersuchungen nötig sein.

Im Vergleich der Werte mit und ohne Mutagenbehandlung des SCE Tests wurde eine signifikante Korrelation gefunden ($R^2=0,212$). Erhöhte Raten ohne Mutagenbehandlung gehen mit erhöhten Raten mit Mutagenbehandlung einher. Die Korrelation spiegelt den gemeinsamen Faktor der individuellen Mutagensensitivität wieder, bedingt durch die endogene Reparaturfähigkeit. Somit müssen hohe SCE-Raten der behandelten Kulturen mit hohen SCE-Raten der unbehandelten Kulturen einhergehen. Auf die unbehandelten Kulturen wirken Umwelteinflüsse und Lebensstilverhalten der Probanden, die in den behandelten Kulturen durch die hohe Anzahl an DNA-Schäden überdeckt werden. Dadurch ist die geringe Korrelation zu erklären.

Die Korrelation der SCE-Raten zwischen den Zwillingen bei behandelten und unbehandelten Kulturen wurde in 3.2.3 untersucht. Bei den Kulturen ohne Mutagenbehandlung besteht bei den eineiigen Zwillingen eine starke Korrelation

4. Diskussion

($R^2=0,665$), bei den zweieiigen Zwillingen wurde ebenfalls eine Abhängigkeit der Testergebnisse ($R^2=0,367$) festgestellt.

In den SCE-Raten nach Mutagenbehandlung findet sich eine signifikante Abhängigkeit des Wertes eines eineiigen Zwilling von dem des Zwillingspartners ($R^2=0,693$), ebenso bei den zweieiigen Zwillingen ($R^2=0,205$).

Innerhalb der eineiigen Zwillingspaare konnte bei den behandelten Kulturen mit einer größeren Korrelation die Abhängigkeit vom Zwillingspartner veranschaulicht werden, als es bei den unbehandelten Kulturen der Fall war.

Dies bestätigt die Tendenz, dass sich bei den behandelten Kulturen eine höhere Heritabilität findet, als in den unbehandelten Kulturen. Geht man davon aus, dass in den unbehandelten Kulturen die Lebensstilfaktoren der Probanden die SCE-Rate mit bedingen, so müssten diese Einflussfaktoren in den behandelten Kulturen durch die große Anzahl an DNA-Schäden überdeckt werden.

Die Korrelation zwischen den Zwillingen ist bei den behandelten Kulturen nicht sehr viel höher als bei den unbehandelten Kulturen. Eine eventuell falsch hohe Korrelation der unbehandelten Kulturen könnte durch sehr ähnliche Lebensstile innerhalb eines Zwillingspaars entstehen. Die Faktoren Raucherstatus und Kaffeekonsum wurden nicht erfasst, sollten sich aber nicht auf die SCE-Rate mit Mutagenbehandlung auswirken. Da die Probanden Zwillinge sind, dürfte das Alter keinen Einfluss auf unterschiedliche SCE-Raten innerhalb eines Zwillingspaars gehabt haben.

Da das Durchschnittsalter bei den zweieiigen Zwillingspaaren höher ist (34,6 Jahre) als bei den eineiigen Zwillingspaaren (27,7 Jahre), ist eher unterschiedliches Verhalten im Bezug auf den Lebensstil, innerhalb eines Zwillingspaars zu erwarten. Dies könnte zu einer geringeren Korrelation der unbehandelten Raten der zweieiigen Zwillinge geführt haben. Andererseits haben alle Zwillingspaare zum Zeitpunkt der Blutentnahme getrennt gelebt, zumeist seit mehr als einem Jahr. Die Werte der zweieiigen Zwillinge zeigen zudem eine größere Streuung als die der eineiigen Zwillinge. Dies und die Tatsache, dass die Untersuchungen an einem sehr kleinen Kollektiv erfolgten, könnte erklären, warum keine Signifikanz vorliegt. Das Kollektiv muss vergrößert werden um diese Frage zu klären.

Die Regressionskoeffizienten der eineiigen Zwillingspaare sind, sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Kulturen, größer, als die der

4. Diskussion

zweieiigen Zwillingspaare. Dies gibt einen ersten Hinweis auf eine hohe Heritabilität. Da die SCE-Raten der eineiigen Zwillinge eher korrelieren als die der zweieiigen Zwillingspaare, ist davon auszugehen, dass die Varianz der Reparaturfähigkeit zu einem großen Teil durch genetische Varianz erklärt werden kann.

4.4.2 Heritabilität

Die Heritabilität der Reparaturfähigkeit ist aus den Raten ohne Mutagenbehandlung auf $h^2=0,702$ berechnet worden. Damit ergibt sich eine sehr hohe genetische Komponente für die Varianz der Reparaturkapazität, gemessen mit dem Schwesterchromatid-Austausch Test.

Bei der Bestimmung der Heritabilität der Kulturen mit Mutagenbehandlung wurde eine Heritabilität von $h^2=0,640$ errechnet. Damit ergibt sich eine niedrigere Heritabilität ($h^2_{(\text{behandelt})}=0,640$, $h^2_{(\text{unbehandelt})}=0,702$) als für die Kulturen ohne Mutagenbehandlung. Eigentlich dürfte durch die Überlagerung der DNA-Schäden durch Mutagenbehandlung die Heritabilität der behandelten Kulturen noch höher sein als in den unbehandelten Kulturen. Dies ist in meiner Arbeit nicht der Fall. Da die Heritabilität der unbehandelten Kulturen im Wesentlichen durch das Paar 19 der zweieiigen Zwillinge beeinflusst ist, wurde eine erneute Heritabilitätsberechnung in 3.2.4 vorgenommen. Nach Bereinigung der Daten berechnet sich die Heritabilität der unbehandelten Kulturen auf $h^2=0,01$. Damit kann von einem geringen Einfluss der genetischen Faktoren auf die Varianz der Reparaturfähigkeit ausgegangen werden, gemessen an den Kulturen SCE(s). Ebenso kann man dann von einer stärkeren Darstellung der Heritabilität in den Kulturen nach Mutagenbehandlung sprechen als in den unbehandelten Kulturen. Für die Bestätigung der Daten sind Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig.

Die einzige mit meiner Arbeit vergleichbare Studie ist ein Vergleich der Heritabilitäten für SCE-Raten nach Mutagenbehandlung mit vier verschiedenen Noxen (Wu *et al.*, 2006).

Anhand 63 Zwillingspaaren konnte eine Heritabilität mit $h^2=0,48$ für BPDE signifikant ($p<0,01$) dargestellt werden. Die Heritabilitäten lagen bei $h^2=0,407$ für Bleiomycin, $h^2=0,625$ für ionisierende Strahlung und $h^2=0,588$ für 4-nitroquinolin-1-oxide.

4. Diskussion

In dieser Studie war die Mutagensensitivität nicht mit Einflüssen wie Rasse, Geschlecht, Alter und Raucherstatus assoziiert. Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen die beschriebene starke Abhängigkeit der Varianz der Reparaturkapazität von genetischen Faktoren. Zumindest für die SCE-Rate der mutagenbehandelten Kulturen scheint eine wiederholbar hohe Heritabilität der Varianz der Reparaturkapazität ermittelt werden zu können, sodass sicher von einer starken genetischen Abhängigkeit gesprochen werden kann.

Eine hohe Heritabilität der Varianz der Reparaturkapazität wird gefunden, wenn Verwandte von Brustkrebspatientinnen auf ihre Mutagensensitivität anhand des SCE-Tests untersucht werden (Scott, 2000). Dabei wird die Erbllichkeit ein oder zwei Genen zugeschrieben, die innerhalb einer Familie segregieren.

30% der Variation der unbehandelten SCE-Raten sollen von genetisch bedingter Variation abhängig sein (Hirsch *et al.*, 1992). Dies wurde anhand einer Zwillingsstudie mit 136 monozygoten und 88 dizygoten Zwillingspaaren ermittelt. Die Umwelteinflüsse Raucherstatus und Koffein sollen dabei 21% der Varianz der unbehandelten SCE-Raten ausmachen, die Variablen Demographie und hämatologischer Status 6% (Hirsch *et al.*, 1992).

Bei durch BPDE induzierten DNA-Schäden können Defekte auf dem Wege der homologen Rekombination repariert werden (Bhattacharyya *et al.*, 1989).

Polymorphismen in den Genen XPA, XPC und RAD23B, Gene der Nukleotidexzisionsreparatur, wurden relativ zu der Mutagensensitivität analysiert. Dabei fand man eine signifikante Korrelation von mehreren Allelpolymorphismen und erhöhter Mutagensensitivität. Dies lässt die Schlussfolgerung auf ein multiples genetisches Geschehen im Bereich der Reparaturwege zu, das bei mehreren genetischen Varianten eine erniedrigte Reparaturfähigkeit bedingt (Lin *et al.*, 2007). Genetische Polymorphismen sind bei unseren Probanden nicht untersucht worden. Ähnliche Mutagensensitivität innerhalb eines Zwillingspaars könnte auch durch solche Varianten bedingt sein.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit bestätigen die in den Studien benannten Annahmen, dass die Varianz der Reparaturkapazität durch einen hohen Anteil genetischer Varianz bestimmt wird.

4.5 MD-Werte und Heritabilität

4.5.1 Einfluss genetischer Faktoren auf die MD-Werte

Erhöhte Mitotic Delay Werte treten nach DNA-Reparatur auslösenden Zellschäden auf, die in unserem Fall durch ionisierte Strahlung entstanden sind. Die Höhe des MD ist abhängig von der Dosis der Strahlung und Zellart (Yi *et al.*, 1994; Yi *et al.*, 1993). Dabei scheint die Höhe des MD linear mit der Strahlungs-dosis zu korrelieren (Purrott *et al.*, 1980). Das Zellstadium zur Bestrahlungszeit hat ebenfalls Auswirkungen auf den MD (Aghamohammadi and Savage, 1992). Diese Faktoren sind in vorliegender Arbeit für jede Zwillingskultur konstant.

Die Höhe des Mitotic Delay scheint außerdem mit dem Alter der Probanden zu korrelieren (Tedeschi *et al.*, 2004). Koffein scheint eine Erniedrigung des MD zu bewirken. Gezeigt wurde dies an Fibroblasten (Zampetti-Bosseler and Scott, 1985). Dies scheint auch bei Lymphozyten der Fall zu sein (Ledbetter *et al.*, 1986). Verschieden Mutagene wie Chloramphenicol, ein Antibiotikum, oder Polychlorbiphenyle haben eine Erhöhung des MD zur Folge (Sbrana *et al.*, 1991; Sargent *et al.*, 1989).

Außerdem haben Personen mit verminderter Reparaturkapazität, wie z.B. Träger von BRCA1 Mutationen oder auch Personen mit Trisomie 21 oder Ataxia telangiectasia erhöhte MD-Werte (Febrer *et al.*, 2008; Major, 1994).

Behandelt man Fibroblastenzellen, die Mutationen im ATM-Gen aufweisen, mit Koffein, so scheint die MD-Rate noch niedriger zu sein (Zampetti-Bosseler and Scott, 1985).

Der in meiner Arbeit untersuchte Aspekt der Heritabilität der Varianz der Reparaturkapazität hat signifikante Ergebnisse geliefert. Die Korrelationen der zweieiigen Zwilingspaare sind jedoch nicht signifikant. Aufgrund des kleinen Probandenkollektivs müssen wie auch im MN und SCE-Test Untersuchungen an größeren Kollektiven meine Ergebnisse bestätigen.

Die Korrelation der MD-Werte zwischen den Zwillingspaaren, wurde in 3.3.2 untersucht. Es wurde eine starke Abhängigkeit der Werte eineiiger Zwillinge festgestellt ($R^2=0,954$). Bei zweieiigen Zwillingen besteht keine Korrelation ($R^2=0,013$).

4. Diskussion

Dass die MD-Werte eineiiger Zwillinge stärker korrelieren als die der Zweieiigen ist ein erster Hinweis auf einen hohen Anteil genetischer Faktoren an der Varianz der Reparaturkapazität.

Genetische Polymorphismen oder Mutationen in Genen der Reparaturwege der Probanden sind nicht bekannt.

Die MD-Werte zweieiiger Zwillingspaare unterscheiden sich jedoch innerhalb eines Paares so stark voneinander, dass es die Vermutung zulässt, dass bei einer größeren Probandenzahl eine signifikante Unabhängigkeit festzustellen sein wird.

Durch die sehr einfache Testdurchführung, Möglichkeit zur Messung vieler Probanden am selben Tag und Ausführung meistens durch dieselbe Person, sind Performance-Bias so weit wie möglich minimiert worden.

4.5.2 Heritabilität

Gemessen mit dem Mitotic Delay ist eine hohe Heritabilität von $h^2=0,971$ der Varianz der Reparaturkapazität bestimmt worden (3.3.3).

Da im Mitotic Delay die Ergebnisse der unbehandelten Raten und behandelten Raten miteinander verrechnet werden, ist in diesem Fall kein Rückschluss auf eine eventuell stärkere Darstellung der Höhe der Heritabilität von Raten mit Bestrahlung gegenüber Raten ohne Bestrahlung zu ziehen.

Bisher gibt es keine Studie die den Aspekt der Heritabilität der Reparaturkapazität mit dem Mitotic Delay Test untersucht hat. Daher ist kein direkter Vergleich möglich.

Eine zusammenfassende Arbeit beschreibt eine Mendel'sche Vererbung zur Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, erfasst anhand 95 Familienangehörigen von Brustkrebsfällen (Scott, 2004). Dies könnte bedeuten, dass erhöhte Strahlensensitivität als Marker für die Prädisposition von Krebserkrankungen eingesetzt werden kann. Eine Vielzahl an bekannten Variationen von Genen, die bei der Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen interagieren, macht eine hohe Heritabilität der Reparaturkapazität wahrscheinlich (Wang *et al.*, 2000; Scully *et al.*, 1997; Leng *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven werden notwendig um dieses deutliche Ergebnis zu bestätigen.

4.6 Korrelation der MD-Werte, MN- und SCE-Raten

Bis auf eine signifikante Korrelation ($R^2=0,53$) zwischen den MN-Raten ohne Bestrahlung und SCE-Raten mit Behandlung bei zweieiigen Zwillingen, wurde keine Abhängigkeit der Testergebnisse untereinander festgestellt.

Bei oben genannter Abhängigkeit findet sich dieser Zusammenhang nur bei zweieiigen Zwillingen, nicht jedoch bei eineiigen oder im Gesamtkollektiv.

Unbehandelte SCE-Raten werden von Umweltfaktoren wie Alter, Geschlecht oder Nikotin- und Alkoholkonsum beeinflusst (Barale *et al.*, 1998; Major *et al.*, 1998).

Deshalb wäre eigentlich ein zu den, diesen Faktoren weitgehend überdeckenden behandelten Mikronukleusraten, kein Zusammenhang zu erwarten gewesen. Da bei eineiigen Zwillingen und im Kollektiv zusammen kein Zusammenhang besteht, ist dieser Zusammenhang durch die geringe Stichprobe nicht aussagekräftig.

Es scheint keine Korrelation zwischen dem SCE- und dem MN-Test vorzuliegen, Alter, Lebensstil und Geschlecht mit einbezogen (Barale *et al.*, 1998).

Bei peripheren Blutlymphozyten von Brustkrebspatientinnen ist keine Korrelation der Strahlensensitivitäten im Mikronukleustest und im Schwesterchromatid-austauschtest festzustellen (Speit and Trenz, 2004; Baeyens *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 1999). Dies könnte bedeuten, dass abhängig vom Zellzyklusstadium unterschiedliche Mechanismen gegenüber ionisierender Strahlung aktiviert werden. Außerdem scheint jede Person nur auf einem dieser Mechanismen sensibel zu sein. Es kann somit nicht davon ausgegangen werden, dass erhöhte SCE- mit erhöhten MN-Raten korrelieren.

Die fehlenden Korrelationen zeigen, dass anhand eines Testergebnisses eines Probanden keine Schlussfolgerungen auf die Ergebnisse der anderen zwei Tests gezogen werden können. Man kann nicht davon ausgehen, dass z.B. ein Proband mit einer hohen MN-Rate wahrscheinlich auch eine hohe Anzahl an Schwesterchromatidaustauschen haben wird oder einen niedrigen MD-Wert.

Vermutlich werden mit dem MN-, SCE- und MD-Test, unterschiedliche Bereiche des komplexen Netzwerkes der Reparaturkapazität aufgezeigt. Es wäre deshalb sinnvoll, bei einem Test auf die Reparaturfähigkeit eines Probanden alle drei Tests durchzuführen.

4. Diskussion

4.7 Bedeutung für die Zukunft

Die Entstehung von Mikronuklei und Schwesterchromatidaustauschen kann einfach ermittelt werden und wird oft zur Mutagenitätstestung oder als Biomarker für DNA-Schäden verwendet. Außerdem werden erhöhte MN- und SCE-Raten mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. Vor allem die Rate nach Induktion von DNA-Schäden sollte einen guten Vorhersagewert für ein erhöhtes Krebsrisiko liefern.

Somit ergibt sich die Zukunftsperspektive, dass eine erhöhte Radio- bzw. Mutagensensitivität als Marker für die Prädisposition von Brustkrebs mit erblichem Charakter eingesetzt werden könnte.

Gemessen mit einfachen, schnellen und kostengünstigen zellbiologischen Tests kann unabhängig von der Ursache im komplexen Netzwerk der DNA-Reparatur eine Prädisposition ermittelt werden.

In meiner Arbeit findet sich ein starker Einfluss der genetischen Faktoren auf die Varianz der individuellen Reparaturkapazität. Dabei scheint bei den Untersuchungen der behandelten Kulturen der genetische Anteil noch stärker zu sein als in den unbehandelten Kulturen. Vor allem beim Mitotic Delay Test errechnet sich ein sehr hoher Anteil der genetischen Varianz an der Varianz der Reparaturkapazität.

Dabei sprechen die Tests wahrscheinlich unterschiedliche Bereiche des Repartursystems an, sodass die Untersuchung aller drei Tests zur Ermittlung einer Prädisposition sinnvoll ist.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Tests bei den Untersuchungen der genetischen Faktoren für die Prädisposition von Krebs hilfreich sein werden.

5. Zusammenfassung

Die Ursachen für die Entstehung von Brustkrebs sind komplex. Etwa 5% der Brustkrebserkrankungen sind durch Mutationen in den Suszeptibilitätsgenen breast cancer (BRCA) 1 und 2 bedingt und das Risiko folgt einem autosomal dominanten Erbgang. Bei den weitaus häufigeren sporadischen Mammakarzinomen bleibt der genetische Hintergrund unklar. Ein Teil der Patientinnen zeigt eine erhöhte Radiosensitivität und Mutagensensitivität gegenüber Kontrollen, die nicht in Mutationen der BRCA-Gene begründet ist. Dies lässt auf eine verminderte Reparaturfähigkeit schließen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Heritabilität der Reparaturkapazität anhand dreier zellbiologischer Tests, dem Mikronukleus- (MN), dem Schwesterchromatid-Austausch (SCE) und dem Mitotic Delay (MD)-Test, zu bestimmen. Ein weiterer Aspekt der Arbeit soll die Annahme überprüfen, ob die behandelte Variante des MN- und SCE-Tests eine höhere Heritabilität aufweist als die unbehandelte Variante. Es wurde peripheres Blut von eineiigen und zweieiigen Zwillingen untersucht.

Im MN-Test der unbehandelten Kulturen wurde eine niedrige Heritabilität ($h^2=0,192$) ermittelt, in den behandelten Kulturen konnte die Heritabilität nicht errechnet werden. Nach Herausnehmen zweier Extremwerte aus dem Kollektiv wurde eine hohe Heritabilität ($h^2=0,69$) ermittelt. Im SCE-Test wurden bei den unbehandelten Kulturen ($h^2=0,702$) und bei den behandelten Kulturen ($h^2=0,640$) hohe Heritabilitäten ermittelt. Im Mitotic Delay wurde eine extrem hohe Heritabilität ($h^2=0,971$) berechnet. Bis auf den MN-Test der behandelten Kulturen, wurde bei den zweieiigen Zwillingen in keiner der Korrelationen statistische Signifikanz erreicht.

Sinnvoll ist bei weiteren Zwillingstudien die genaue Befragung der Probanden auf Lebensgewohnheiten, wie Rauchen, Ernährungsverhalten, körperliche Betätigung oder Kaffeegenuss.

Meine Ergebnisse bestätigen jedoch die Annahmen aus der Literatur, dass die Varianz der Reparaturfähigkeit zu einem großen Anteil durch genetische Faktoren bedingt ist. Außerdem scheint die Heritabilität der Reparaturkapazität in den behandelten Kulturen tatsächlich höher zu sein. Dies muss an größeren Kollektiven überprüft werden, um die Befunde statistisch abzusichern.

6. Literaturverzeichnis

1. Adhvaryu SG, Rawal U M, Patel J V, Patel D D and Balar D B (1988) Increased Frequency of Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes of Breast Cancer Patients. *Int J Cancer* 41: 394-398.
2. Aghamohammadi SZ and Savage J R (1992) The Effect of X-Irradiation on Cell Cycle Progression and Chromatid Aberrations in Stimulated Human Lymphocytes Using Cohort Analysis Studies. *Mutat Res* 268: 223-230.
3. Angelini S, Kumar R, Carbone F, Bermejo J L, Maffei F, Cantelli-Forti G, Hemminki K and Hrelia P (2008) Inherited Susceptibility to Bleomycin-Induced Micronuclei: Correlating Polymorphisms in GSTT1, GSTM1 and DNA Repair Genes With Mutagen Sensitivity. *Mutat Res* 638: 90-97.
4. Ardito G, Lamberti L and Piccotti F (1981) Clastogenic Effect of BrdU on Different Phases of Human Lymphocyte "in Vitro" Cell Cycle. *Boll Soc Ital Biol Sper* 57: 259-265.
5. Aristei C, Stracci F, Guerrieri P, Anselmo P, Armellini R, Rulli A, Barberini F, Latini P and Menghini A R (2009) Frequency of Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei Monitored Over Time in Patients With Early-Stage Breast Cancer: Results of an Observational Study. *Cancer Genet Cytogenet* 192: 24-29.
6. Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, De Ridder L and Vral A (2004) Chromosomal Radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Int J Radiat Biol* 80: 745-756.
7. Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, Messiaen L, de Ridder L and Vral A (2002) Chromosomal Radiosensitivity in Breast Cancer Patients With a Known or Putative Genetic Predisposition. *Br J Cancer* 87: 1379-1385.
8. Baeyens A, Van Den B R, Makar A, Thierens H, De Ridder L and Vral A (2005) Chromosomal Radiosensitivity in Breast Cancer Patients: Influence of Age of Onset of the Disease. *Oncol Rep* 13: 347-353.
9. Ban S, Konomi C, Iwakawa M, Yamada S, Ohno T, Tsuji H, Noda S, Matui Y, Harada Y, Cologne J B and Imai T (2004) Radiosensitivity of Peripheral Blood Lymphocytes Obtained From Patients With Cancers of the Breast, Head and Neck or Cervix As Determined With a Micronucleus Assay. *J Radiat Res (Tokyo)* 45: 535-541.
10. Banerjee B, Sharma S, Hegde S and Hande M P (2008) Analysis of Telomere Damage by Fluorescence in Situ Hybridisation on Micronuclei in Lymphocytes of Breast Carcinoma Patients After Radiotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 107: 25-31.

6. Literaturverzeichnis

11. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi M G, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F and Landi S (1998) Sister Chromatid Exchange and Micronucleus Frequency in Human Lymphocytes of 1,650 Subjects in an Italian Population: II. Contribution of Sex, Age, and Lifestyle. *Environ Mol Mutagen* 31: 228-242.
12. Bedford JS, Mitchell J B, Griggs H G and Bender M A (1978) Radiation-Induced Cellular Reproductive Death and Chromosome Aberrations. *Radiat Res* 76: 573-586.
13. Beetstra S, Salisbury C, Turner J, Aitken M, McKinnon R, Suthers G and Fenech M (2006) Lymphocytes of BRCA1 and BRCA2 Germ-Line Mutation Carriers, With or Without Breast Cancer, Are Not Abnormally Sensitive to the Chromosome Damaging Effect of Moderate Folate Deficiency. *Carcinogenesis* 27: 517-524.
14. Bernardini S, Hirvonen A, Jarventaus H and Norppa H (2002) Influence of GSTM1 and GSTT1 Genotypes on Sister Chromatid Exchange Induction by Styrene in Cultured Human Lymphocytes. *Carcinogenesis* 23: 893-897.
15. Berwick M, Song Y, Jordan R, Brady M S and Orlow I (2001) Mutagen Sensitivity As an Indicator of Soft Tissue Sarcoma Risk. *Environ Mol Mutagen* 38: 223-226.
16. Bhattacharyya NP, Maher V M and McCormick J J (1989) Ability of Structurally Related Polycyclic Aromatic Carcinogens to Induce Homologous Recombination Between Duplicated Chromosomal Sequences in Mouse L Cells. *Mutat Res* 211: 205-214.
17. Blackshear PE, Goldsworthy S M, Foley J F, McAllister K A, Bennett L M, Collins N K, Bunch D O, Brown P, Wiseman R W and Davis B J (1998) Brca1 and Brca2 Expression Patterns in Mitotic and Meiotic Cells of Mice. *Oncogene* 16: 61-68.
18. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, Morawiec Z, Drzewoski J and Zadrozny M (2004) Basal, Oxidative and Alkylative DNA Damage, DNA Repair Efficacy and Mutagen Sensitivity in Breast Cancer. *Mutat Res* 554: 139-148.
19. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin Y P, Chang W P, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E and Fenech M (2003) Effect of Smoking Habit on the Frequency of Micronuclei in Human Lymphocytes: Results From the Human MicroNucleus Project. *Mutat Res* 543: 155-166.
20. Branzei D and Foiani M (2008) Regulation of DNA Repair Throughout the Cell Cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 297-308.
21. Buchholz TA and Wu X (2001) Radiation-Induced Chromatid Breaks As a Predictor of Breast Cancer Risk. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 533-537.
22. Burrill W, Barber J B, Roberts S A, Bulman B and Scott D (2000) Heritability of Chromosomal Radiosensitivity in Breast Cancer Patients: a Pilot Study With the Lymphocyte Micronucleus Assay. *Int J Radiat Biol* 76: 1617-1619.

6. Literaturverzeichnis

23. Cefle K, Ucur A, Guney N, Ozturk S, Palanduz S, Tas F, Asoglu O, Bayrak A, Muslumanoglu M and Aydiner A (2006) Increased Sister Chromatid Exchange Frequency in Young Women With Breast Cancer and in Their First-Degree Relatives. *Cancer Genet Cytogenet* 171: 65-67.
24. Djuzenova CS, Muhl B, Fehn M, Oppitz U, Muller B and Flentje M (2006) Radiosensitivity in Breast Cancer Assessed by the Comet and Micronucleus Assays. *Br J Cancer* 94: 1194-1203.
25. Durocher F, Simard J, Ouellette J, Richard V, Labrie F and Pelletier G (1997) Localization of BRCA1 Gene Expression in Adult Cynomolgus Monkey Tissues. *J Histochem Cytochem* 45: 1173-1188.
26. Febrer E, Mestres M, Caballin M R, Barrios L, Ribas M, Gutierrez-Enriquez S, Alonso C, Cajal T and Francesc B J (2008) Mitotic Delay in Lymphocytes From BRCA1 Heterozygotes Unable to Reduce the Radiation-Induced Chromosomal Damage. *DNA Repair (Amst)* 7: 1907-1911.
27. Fenech M and Morley A A (1985) Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. *Mutat Res* 147: 29-36.
28. Fenech M, Neville S and Rinaldi J (1994) Sex Is an Important Variable Affecting Spontaneous Micronucleus Frequency in Cytokinesis-Blocked Lymphocytes. *Mutat Res* 313: 203-207.
29. Fenech M and Rinaldi J (1995) A Comparison of Lymphocyte Micronuclei and Plasma Micronutrients in Vegetarians and Non-Vegetarians. *Carcinogenesis* 16: 223-230.
30. Garcia-Sagredo JM (2008) Fifty Years of Cytogenetics: a Parallel View of the Evolution of Cytogenetics and Genotoxicology. *Biochim Biophys Acta* 1779: 363-375.
31. Gutierrez-Enriquez S, Fernet M, Dork T, Bremer M, Lauge A, Stoppa-Lyonnet D, Moullan N, Angele S and Hall J (2004) Functional Consequences of ATM Sequence Variants for Chromosomal Radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer* 40: 109-119.
32. Han T and Dadey B (1978) T-Lymphocyte Dependency of B-Lymphocyte Blastogenic Response to Phytomitogens. *Immunology* 34: 625-629.
33. Hei TK, Geard C R, Osmak R S and Travisano M (1985) Correlation of in Vitro Genotoxicity and Oncogenicity Induced by Radiation and Asbestos Fibres. *Br J Cancer* 52: 591-597.
34. Hirsch BA, Sentz K K and McGue M (1992) Genetic and Environmental Influences on Baseline SCE. *Environ Mol Mutagen* 20: 2-11.
35. Höhne A (1996) Chromosomeninstabilität in peripheren Lymphozyten bei Frauen mit sporadischen Brustkrebs, Med Dissertation, Universität Ulm

6. Literaturverzeichnis

36. Hu JJ, Smith T R, Miller M S, Mohrenweiser H W, Golden A and Case L D (2001) Amino Acid Substitution Variants of APE1 and XRCC1 Genes Associated With Ionizing Radiation Sensitivity. *Carcinogenesis* 22: 917-922.
37. Husain SA, Balasubramanian S and Bamezai R (1992) Sister Chromatid Exchange Frequency in Breast Cancer Cases. *Cancer Genet Cytogenet* 61: 142-146.
38. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan R A and Orsiere T (2008) Genetic Polymorphisms and Micronucleus Formation: a Review of the Literature. *Mutat Res* 658: 215-233.
39. Ishikawa H, Tian Y and Yamauchi T (2003) Influence of Gender, Age and Lifestyle Factors on Micronuclei Frequency in Healthy Japanese Populations. *J Occup Health* 45: 179-181.
40. Joksic G, Petrovic S and Ilic Z (2004) Age-Related Changes in Radiation-Induced Micronuclei Among Healthy Adults. *Braz J Med Biol Res* 37: 1111-1117.
41. Kelsey KT, Christiani D C and Little J B (1986) Enhancement of Benzo[a]Pyrene-Induced Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes From Cigarette Smokers Occupationally Exposed to Asbestos. *J Natl Cancer Inst* 77: 321-327.
42. Kim MK, Zitzmann S, Westermann F, Arnold K, Brouwers S, Schwab M and Savelyeva L (2004) Increased Rates of Spontaneous Sister Chromatid Exchange in Lymphocytes of BRCA2+/- Carriers of Familial Breast Cancer Clusters. *Cancer Lett* 210: 85-94.
43. Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V and Gamulin M (2007) Cytogenetic Outcomes of Adjuvant Chemotherapy in Non-Target Cells of Breast Cancer Patients. *Hum Exp Toxicol* 26: 391-399.
44. Larsson DE, Gustavsson S, Hultborn R, Nygren J, Delle U and Elmroth K (2007) Chromosomal Damage in Two X-Ray Irradiated Cell Lines: Influence of Cell Cycle Stage and Irradiation Temperature. *Anticancer Res* 27: 749-753.
45. Ledbetter DH, Airhart S D and Nussbaum R L (1986) Caffeine Enhances Fragile (X) Expression in Somatic Cell Hybrids. *Am J Med Genet* 23: 445-455.
46. Lee TK, O'Brien K, Eaves G S, Christie K I and Varga L (1999) Effect of Blood Storage on Radiation-Induced Micronuclei in Human Lymphocytes. *Mutat Res* 444: 201-206.
47. Leeper DB and Hagemann R F (1973) Repair Kinetics of Radiation-Induced Mitotic Delay. *Biopolymers* 13: 179-185.

6. Literaturverzeichnis

48. Leng SG, Zheng Y X, Pan Z F, Niu Y, Dai Y F, Wang Y W, Zhang W Z, Xiao J, Wang Z X, Li T and He F S (2004) [A Study on the Inherited Susceptibility of Chromosomal Damage in Peripheral Blood Lymphocytes Among Coke Oven Workers]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 38: 94-98.
49. Lerda D (1994) Sister-Chromatid Exchange (SCE) Among Individuals Chronically Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Mutat Res* 312: 111-120.
50. Li C, Wang L E and Wei Q (2009) DNA Repair Phenotype and Cancer Susceptibility--a Mini Review. *Int J Cancer* 124: 999-1007.
51. Lin J, Swan G E, Shields P G, Benowitz N L, Gu J, Amos C I, de Andrade M, Spitz M R and Wu X (2007) Mutagen Sensitivity and Genetic Variants in Nucleotide Excision Repair Pathway: Genotype-Phenotype Correlation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 2065-2071.
52. Livingston GK, Cannon L A, Bishop D T, Johnson P and Fineman R M (1983) Sister Chromatid Exchange: Variation by Age, Sex, Smoking, and Breast Cancer Status. *Cancer Genet Cytogenet* 9: 289-299.
53. Lou JL, Chen Z J, Wei J, He J L, Jin L F, Chen S J, Zheng W and Xu S J (2008) Response of Lymphocytes to Radiation in Untreated Breast Cancer Patients As Detected With Three Different Genetic Assays. *Biomed Environ Sci* 21: 499-508.
54. Major J (1994) Mitotic Delay in Peripheral Blood Lymphocytes and Fibroblast Cultures Obtained From a Child With Down's Syndrome and From a Healthy Child. *Acta Med Hung* 50: 109-115.
55. Major J, Jakab M G and Tompa A (1998) Genotoxicological Monitoring of 175 Subjects Living in the Green Belts, Inner Town or Near Chemical Industrial Estates in Greater Budapest Agglomeration, Hungary. *Mutat Res* 412: 9-16.
56. Marmorstein LY, Ouchi T and Aaronson S A (1998) The BRCA2 Gene Product Functionally Interacts With P53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13869-13874.
57. Meindl A (2002) Comprehensive Analysis of 989 Patients With Breast or Ovarian Cancer Provides BRCA1 and BRCA2 Mutation Profiles and Frequencies for the German Population. *Int J Cancer* 97: 472-480.
58. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal P A, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett L M, Ding W (1994) A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* 266: 66-71.
59. Morgan WF and Crossen P E (1980) X Irradiation and Sister Chromatid Exchange in Cultured Human Lymphocytes. *Environ Mutagen* 2: 149-155.
60. Morimoto K (1987) [Sister Chromatid Exchanges and Chromosome Aberrations As Parameters for Human Risk of Cancer Development]. *Gan No Rinsho* 33: 587-595.

6. Literaturverzeichnis

61. Mozdarani H, Mansouri Z and Haeri S A (2005) Cytogenetic Radiosensitivity of G0-Lymphocytes of Breast and Esophageal Cancer Patients As Determined by Micronucleus Assay. *J Radiat Res (Tokyo)* 46: 111-116.
62. Norppa H (1997) Cytogenetic Markers of Susceptibility: Influence of Polymorphic Carcinogen-Metabolizing Enzymes. *Environ Health Perspect* 105: 829-835.
63. Patel KJ, Yu V P, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite F C, Evans M J, Colledge W H, Friedman L S, Ponder B A and Venkitaraman A R (1998) Involvement of Brca2 in DNA Repair. *Mol Cell* 1: 347-357.
64. Patino-Garcia B, Hoegel J, Varga D, Hoehne M, Michel I, Jainta S, Kreienberg R, Maier C and Vogel W (2006) Scoring Variability of Micronuclei in Binucleated Human Lymphocytes in a Case-Control Study. *Mutagenesis* 21: 191-197.
65. Purrott RJ, Vulpis N and Lloyd D C (1980) The Use of Harlequin Staining to Measure Delay in the Human Lymphocyte Cell Cycle Induced by in Vitro X-Irradiation. *Mutat Res* 69: 275-282.
66. Rosado IV, Niedzwiedz W, Alpi A F and Patel K J (2009) The Walker B Motif in Avian FANCM Is Required to Limit Sister Chromatid Exchanges but Is Dispensable for DNA Crosslink Repair. *Nucleic Acids Res* 37: 4360-4370.
67. Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R, Vogel W and Speit G (2000) Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes As a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Res* 60: 390-394.
68. Roy SK, Trivedi A H, Bakshi S R, Patel R K, Shukla P H, Patel S J, Bhatavdekar J M, Patel D D and Shah P M (2000) Spontaneous Chromosomal Instability in Breast Cancer Families. *Cancer Genet Cytogenet* 118: 52-56.
69. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu rev Biochem* 73: 39-85
70. Sargent L, Roloff B and Meisner L (1989) In Vitro Chromosome Damage Due to PCB Interactions. *Mutat Res* 224: 79-88.
71. Sbrana I, Caretto S, Rainaldi G and Loprieno N (1991) Induction of Chromosomal Aberrations and SCE by Chloramphenicol. *Mutat Res* 248: 145-153.
72. Schiffel C, Zieres C and Zankl H (1997) Exhaustive Physical Exercise Increases Frequency of Micronuclei. *Mutat Res* 389: 243-246.
73. Schlade-Bartusiak K, Rozik K, Laczmanska I, Ramsey D and Sasiadek M (2004) Influence of GSTT1, MEH, CYP2E1 and RAD51 Polymorphisms on Diepoxybutane-Induced SCE Frequency in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat Res* 558: 121-130.

6. Literaturverzeichnis

74. Schmidt MA and Sanger W G (1981) Sister Chromatid Exchange in Aged Human Lymphocytes. A Brief Note. *Mech Ageing Dev* 16: 67-70.
75. Scott D (2000) Chromosomal Radiosensitivity, Cancer Predisposition and Response to Radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 176: 229-234.
76. Scott D (2004) Chromosomal Radiosensitivity and Low Penetrance Predisposition to Cancer. *Cytogenet Genome Res* 104: 365-370.
77. Scott D, Barber J B, Levine E L, Burrill W and Roberts S A (1998) Radiation-Induced Micronucleus Induction in Lymphocytes Identifies a High Frequency of Radiosensitive Cases Among Breast Cancer Patients: a Test for Predisposition? *Br J Cancer* 77: 614-620.
78. Scott D, Barber J B, Spreadborough A R, Burrill W and Roberts S A (1999) Increased Chromosomal Radiosensitivity in Breast Cancer Patients: a Comparison of Two Assays. *Int J Radiat Biol* 75: 1-10.
79. Scott D and Zampetti-Bosseler F (1982) Cell Cycle Dependence of Mitotic Delay in X-Irradiated Normal and Ataxia-Telangiectasia Fibroblasts. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 42: 679-683.
80. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T and Livingston D M (1997) Association of BRCA1 With Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells. *Cell* 88: 265-275.
81. Shao L, Lai M and Huang Q (2001) Mutagen Sensitivity and P53 Expression in Colorectal Cancer in China. *Postgrad Med J* 77: 713-716.
82. Shiraishi Y, Yosida T H and Sandberg A A (1983) Analyses of Bromodeoxyuridine-Associated Sister Chromatid Exchanges (SCEs) in Bloom Syndrome Based on Cell Fusion: Single and Twin SCEs in Endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4369-4373.
83. Speit G and Trenz K (2004) Chromosomal Mutagen Sensitivity Associated With Mutations in BRCA Genes. *Cytogenet Genome Res* 104: 325-332.
84. Speit G and Vogel W (1986) Detection of Bromodeoxyuridine Incorporation in Mammalian Chromosomes by a Bromodeoxyuridine Antibody. II. Demonstration of Sister Chromatid Exchanges. *Chromosoma* 94: 103-106.
85. Speit G, Vogel W and Mehnert K (1985) Do the Frequencies of Sister Chromatid Exchanges in Endoreduplicated Mitoses Provide a Measure for Lesion Persistence and Repair? *Chromosoma* 91: 369-371.
86. Staff S, Isola J and Tanner M (2003) Haplo-Insufficiency of BRCA1 in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* 63: 4978-4983.
87. Strom SS, Gu Y, Sigurdson A J, Bailey N M, Amos C I, Spitz M R, Rodriguez M A and Liang J C (1998) Chromosome Breaks and Sister Chromatid Exchange As Predictors of Second Cancers in Hodgkin's Disease. *Leuk Lymphoma* 28: 561-566.

6. Literaturverzeichnis

88. Taghavi-Dehaghani M, Mohammadi S, Ziafazeli T and Sardari-Kermani M (2005) A Study on Differences Between Radiation-Induced Micronuclei and Apoptosis of Lymphocytes in Breast Cancer Patients After Radiotherapy. *Z Naturforsch C 60*: 938-942.
89. Tedeschi B, Cicchetti R, Argentin G, Caporossi D, Pittaluga M, Parisi P and Vernole P (2004) Aphidicolin and Bleomycin Induced Chromosome Damage As Biomarker of Mutagen Sensitivity: a Twin Study. *Mutat Res 546*: 55-64.
90. Thompson ME, Jensen R A, Obermiller P S, Page D L and Holt J T (1995) Decreased Expression of BRCA1 Accelerates Growth and Is Often Present During Sporadic Breast Cancer Progression. *Nat Genet 9*: 444-450.
91. Trenz K, Rothfuss A, Schutz P and Speit G (2002) Mutagen Sensitivity of Peripheral Blood From Women Carrying a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *Mutat Res 500*: 89-96.
92. Varga D, Hoegel J, Maier C, Jainta S, Hoehne M, Patino-Garcia B, Michel I, Schwarz-Boeger U, Kiechle M, Kreienberg R and Vogel W (2006) On the Difference of Micronucleus Frequencies in Peripheral Blood Lymphocytes Between Breast Cancer Patients and Controls. *Mutagenesis* .
93. Varga D, Johannes T, Jainta S, Schuster S, Schwarz-Boeger U, Kiechle M, Patino G B and Vogel W (2004) An Automated Scoring Procedure for the Micronucleus Test by Image Analysis. *Mutagenesis 19*: 391-397.
94. Vijayalaxmi and Evans H J (1982) In Vivo and in Vitro Effects of Cigarette Smoke on Chromosomal Damage and Sister-Chromatid Exchange in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Mutat Res 92*: 321-332.
95. Walpita D, Plug A W, Neff N F, German J and Ashley T (1999) Bloom's Syndrome Protein, BLM, Colocalizes With Replication Protein A in Meiotic Prophase Nuclei of Mammalian Spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A 96*: 5622-5627.
96. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge S J and Qin J (2000) BASC, a Super Complex of BRCA1-Associated Proteins Involved in the Recognition and Repair of Aberrant DNA Structures. *Genes Dev 14*: 927-939.
97. Weksler ME and Kuntz M M (1976) Synergy Between Human T and B Lymphocytes in Their Response to Phythaemagglutinin and Pokeweed Mitogen. *Immunology 31*: 273-281.
98. Welcsh PL, Lee M K, Gonzalez-Hernandez R M, Black D J, Mahadevappa M, Swisher E M, Warrington J A and King M C (2002) BRCA1 Transcriptionally Regulates Genes Involved in Breast Tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A 99*: 7560-7565.
99. Wood RD, Mitchell M, Lindahl T (2005) Human DNA repair genes. *Mutat Res. 577 (1-2)*: 275-83

6. Literaturverzeichnis

100. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C and Micklem G (1995) Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *Nature* 378: 789-792.
101. Wooster R, Neuhausen S L, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D and . (1994) Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. *Science* 265: 2088-2090.
102. Wu X, Gu J, Grossman H B, Amos C I, Etzel C, Huang M, Zhang Q, Millikan R E, Lerner S, Dinney C P and Spitz M R (2006a) Bladder Cancer Predisposition: a Multigenic Approach to DNA-Repair and Cell-Cycle-Control Genes. *Am J Hum Genet* 78: 464-479.
103. Wu X, Gu J, Patt Y, Hassan M, Spitz M R, Beasley R P and Hwang L Y (1998) Mutagen Sensitivity As a Susceptibility Marker for Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 567-570.
104. Wu X, Gu J and Spitz M R (2007) Mutagen Sensitivity: a Genetic Predisposition Factor for Cancer. *Cancer Res* 67: 3493-3495.
105. Wu X, Spitz M R, Amos C I, Lin J, Shao L, Gu J, de Andrade M, Benowitz N L, Shields P G and Swan G E (2006b) Mutagen Sensitivity Has High Heritability: Evidence From a Twin Study. *Cancer Res* 66: 5993-5996.
106. Wu X, Zheng Y L and Hsu T C (2005) Mutagen-Induced Chromatid Breakage As a Marker of Cancer Risk. *Methods Mol Biol* 291: 59-67.
107. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan K H and Brody L C (2002) BRCA1 Regulates the G2/M Checkpoint by Activating Chk1 Kinase Upon DNA Damage. *Nat Genet* 30: 285-289.
108. Yi PN, Evans H H, Beer J Z and Rha C K (1994) Relationships Between Mitotic Delay and the Dose Rate of X Radiation. *Radiat Res* 140: 387-392.
109. Yi PN, Stanley W S and Lee W (1993) Relationship Between Mitotic Delay and the Minimum Dose Rate of X Irradiation Required to Stop Cell Proliferation. *Radiat Res* 133: 163-169.
110. Yokota K, Ueda K, Takenaka M, Fujiwara A and Ohama K (1987) [Sister Chromatid Exchange (SCE) in Lymphocytes of Patients With Cancer of the Cervix Uteri]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 39: 249-255.
111. Yue J, Wang Q, Lu H, Brenneman M, Fan F and Shen Z (2009) The Cytoskeleton Protein Filamin-A Is Required for an Efficient Recombinational DNA Double Strand Break Repair. *Cancer Res*: 7978-7985.
112. Zampetti-Bosseler F and Scott D (1985) The Effect of Caffeine on X-Ray-Induced Mitotic Delay in Normal Human and Ataxia-Telangiectasia Fibroblasts. *Mutat Res* 143: 251-256.

6. Literaturverzeichnis

113. Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh J C, Kim S, Weaver D T, Chung J H, Powell S N and Xia F (2004) Chk2 Phosphorylation of BRCA1 Regulates DNA Double-Strand Break Repair. *Mol Cell Biol* 24: 708-718.
114. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz M R, Tashkin D P, Yu G P, Hsu T C and Schantz S P (2000) Environmental Tobacco Smoking, Mutagen Sensitivity, and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1043-1049.
115. Zhong Q, Chen C F, Li S, Chen Y, Wang C C, Xiao J, Chen P L, Sharp Z D and Lee W H (1999) Association of BRCA1 With the HRad50-HMre11-P95 Complex and the DNA Damage Response. *Science* 285: 747-750.
116. Zunino A, Degan P, Vigo T and Abbondandolo A (2001) Hydrogen Peroxide: Effects on DNA, Chromosomes, Cell Cycle and Apoptosis Induction in Fanconi's Anemia Cell Lines. *Mutagenesis* 16: 283-288.

7. Anhang

7.1. Classifier H21

7.1.1. MCF-file

Nuclei

Nuclei: Count Nuclei during Metaphase Search:	0
Nuclei: Display Nucleus Positions:	0
Nuclei: Image Processing Operations:	SBHistoMax SBMinGray(100) Sharpen(3,4)
Nuclei: Object Threshold (in %):	10
Nuclei: Minimum Area (in 1/100 μm^2):	6000
Nuclei: Maximum Area (in 1/100 μm^2):	50000
Nuclei: Maximum Relative Concavity Depth (in 1/1000):	90
Nuclei: Maximum Aspect Ratio (in 1/1000):	1500

7.1.2. MNC-file

Micronuclei Classifier, Version 3.1.2

Classifier Name:	H21
Classifier Description:	fluorescence1

Nuclei

Nuclei: Image Processing Operation:	
Nuclei: Object Threshold (in %):	Sharpen (3,4)
Nuclei: Minimum Area (in 1/100 μm^2):	18
Nuclei: Maximum Area (in 1/100 μm^2):	6000
Nuclei: Maximum Relative Concavity Depth (in 1/1000):	50000
Nuclei: Maximum Aspect Ratio (in 1/1000):	90
Nuclei: Maximum Distance (in 1/10 μm):	1500
Nuclei: Maximum Area Asymmetry (in %):	250
Nuclei: Region of Interest Radius (in 1/10 μm):	90
Nuclei: Maximum Object Area in ROI (in 1/100 μm^2):	300

7. Anhang

<i>Micronuclei</i>	5000
Micronuclei: Image Processing Operations:	
Micronuclei: Object Threshold (in %):	MedianV(3) Average(3,1) Sharpen(5,5) MedianH(3)
Micronuclei: Minimum Area (in 1/100 μm^2):	5
Micronuclei: Maximum Area (in 1/100 μm^2):	400
Micronuclei: Maximum Relative Concavity Depth (in 1/1000):	6000
Micronuclei: Maximum Aspect Ratio (in 1/1000):	1000
Micronuclei: Maximum Distance (in 1/10 μm):	1720
	400

7.2. Flow-Zytometer Einstellungen

Gain (Photomultiplier)	430 - 450
Lower Level (LL)	40 - 60
Upper Level (UL)	999
Lin (linear)	
Durchflussrate in (Zellen/s)	ca.100
Gated Count	20000

Danksagung

Gerne möchte ich mich bei den vielen Probanden für die Teilnahme an unserer Studie bedanken.

Der größte Dank gilt Prof. Vogel, der mich immer unterstützt hat und mich freundlich im Team willkommen hieß. Vor allem seine unermessliche Geduld und zahlreichen Bemühungen die Thematik zu verdeutlichen werden mir in Erinnerung bleiben – vielen Dank!

Außerdem ein riesiges Dankeschön an Harald Surowy, der uns mit unermüdlicher Geduld den Einblick in die Forschung erleichterte und hervorragend betreute. Des Weiteren ein herzliches Dankeschön an Anna – für Hilfe in allen Lebenslagen und den „Biss“ bis zum Ende.

Vielen Dank an Antje für zahlreiche Stunden am Mikroskop. Des Weiteren danke ich allen im Team, die mich herzlich aufgenommen und mir den Alltag versüßt haben.

Außerdem danke ich meine Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützen und mir somit das Medizinstudium und eine tolle Studienzeit ermöglicht haben! Vielen Dank für die heißen Ohren auch an Phoebe, Mirjam und Philipp.