

1 Einleitung

1.1 Die Knochenmarktransplantation im Rahmen der Leukämiebehandlung

Der Versuch, Knochenmark therapeutisch einzusetzen, lässt sich bis ins 19. Jahrhundert zurückverfolgen (Quine, 1896). Bis zu den ersten erfolgreichen Knochenmarktransplantationen sollte allerdings noch mehr als ein halbes Jahrhundert vergehen. Nach zunächst enttäuschenden und frustrierenden Transplantationsversuchen in den fünfziger und sechziger Jahren (Santos, 1983), gelang es Thomas und seinen Mitarbeitern Anfang der siebziger Jahre, die ersten gelungenen Knochenmarktransplantationen durchzuführen (Thomas, 1999). Seither wurden die Therapieschemata und der Einsatz der Knochenmarktransplantation immer weiter optimiert, so dass die Zahl der mit Erfolg behandelten Patienten stetig wuchs. Zwischen 1990 und 2001 ist die Transplantationsrate in Europa insgesamt nahezu um das Fünffache angestiegen (Gratwohl et al., 2003).

Die wichtigsten Indikationen für eine Knochenmark- oder Stammzelltransplantation sind akute Leukämien, die chronische myeloische Leukämie, das myelodysplastische Syndrom, multiples Myelom und bestimmte Lymphome, die schwere aplastische Anämie, angeborene Immundefekte oder Stoffwechselerkrankungen sowie ausgewählte solide Tumoren und schwere Autoimmunerkrankungen (Gratwohl, 2002).

Das Prinzip der Stammzelltransplantation besteht darin, dem Patienten nach einer myeloablativen Therapie (Konditionierung) hämatopoetische Stammzellen intravenös zu infundieren, welche zuvor einem Spender entnommen wurden. Je nach Spender und Stammzellherkunft unterscheidet man verschiedene Arten der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (Gratwohl, 2002):

Transplantationstyp	Spender
Autolog	Patient selbst
Syngen	Eineiiger Zwilling
Allogen	HLA-identischer verwandter oder nicht verwandter Spender
	Stammzellherkunft
Knochenmarktransplantation	Knochenmark
Periphere Stammzelltransplantation	Peripheres Blut
Nabelschnurbluttransplantation	Nabelschnurblut

Die im Rahmen der Transplantation durchgeführte Konditionierung erfolgt entweder durch eine alleinige hochdosierte Chemotherapie oder durch eine Hochdosis-Chemotherapie mit zusätzlicher Ganzkörperbestrahlung. Die spezielle Funktion der Strahlentherapie ist es, Zellen zu eliminieren, die durch die Chemotherapie nicht erfasst wurden (Pape, 1996). Während heutzutage eine fraktionierte Bestrahlung zum Einsatz kommt, wurde die Ganzkörperbestrahlung bis Anfang der achtziger Jahre meist unfraktioniert durchgeführt (Thomas, 1999). Die Konditionierung hat drei Ziele: Immunsuppression des Empfängers, um die Abstoßung des fremden Knochenmarks zu verhindern, Zerstörung der malignen Zellen und Raumschaffung für das neue Transplantat. Die Spenderzellen finden ihren Weg ins Knochenmark des Empfängerorganismus und reifen dort zu funktionstüchtigen Zellen aus.

Während Patienten nach einer Knochenmarktransplantation früher häufig schon nach wenigen Wochen oder Monaten an Frühkomplikationen der Transplantation verstarben, liegt die Lebenserwartung dieser Patienten heute aufgrund der stetig verbesserten Behandlungsschemata im allgemeinen um ein Vielfaches höher. Die 10-Jahres-Überlebensraten liegen je nach Diagnose und individuellen Risikofaktoren zwischen 10 und über 80% (Gratwohl, 2002).

Diese Behandlungserfolge der letzten Jahre bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen wirken sich jedoch dahingehend aus, dass nun die Frage nach möglichen Spätfolgen solch intensiver Therapiemaßnahmen, besonders bei Kindern und jungen Erwachsenen, immer mehr in den Vordergrund rückt.

So wurde beobachtet, dass Patienten nach Knochenmarktransplantation ein erhöhtes Risiko haben, später an einem Zweitmalignom zu erkranken (Witherspoon et al., 1989; Curtis et al., 1997; Kolb et al., 1999; Bhatia et al., 2001). In diesem Zusammenhang relevant sind einerseits die so genannten PTLDs („posttransplant lymphoproliferative disorders“), welche relativ bald (im Durchschnitt fünf Monate) nach Transplantation auftreten, andererseits neu entstandene hämatologische Malignome, in besonderem Maße aber die meist erst nach Jahren bis Jahrzehnten vorkommenden soliden Tumoren (Deeg und Socié, 1998). Hier konnte eine Häufung bestimmter Tumoren festgestellt werden. So wurde besonders von Neoplasmen der Haut, des Mundraumes, der Schilddrüse sowie des ZNS berichtet (Curtis et al., 1997; Kolb et al., 1999). Je jünger der Patient bei der Transplantation, desto höher war das Risiko eines soliden Tumors (Curtis et al., 1997).

Welche Faktoren bei der Entstehung dieser soliden Tumoren ursächlich eine Rolle spielen, ist umstritten. Kolb et al. (1999) sehen das größte Risiko in der nach der Transplantation langandauernden Immunsuppression. Curtis et al. (1997) dagegen geben die Bestrahlung im Rahmen der Konditionierung als Hauptrisikofaktor an. Einigkeit herrscht jedoch darüber, dass

solide Tumoren nach Stammzelltransplantation mit einer Latenzperiode von mehreren Jahren bis Jahrzehnten auftreten und dass das Risiko dafür im Laufe der Jahre immer weiter ansteigt.

1.2 Wirkung von ionisierender Strahlung auf den menschlichen Organismus

Kaum ein anderes physikalisches oder chemisches Agens wurde bezüglich seiner schädigenden Wirkung auf den menschlichen Körper gründlicher untersucht als Strahlung (Upton, 1975). Dass ionisierende Strahlung ein karzinogenes Potential besitzt, wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts vermutet, als man gehäuft Hautkarzinome bei Physikern und Radiologen feststellte (v. Frieben, 1902). In den folgenden Jahrzehnten erhärtete sich dieser Verdacht immer mehr (Martland, 1931), und inzwischen sind fast alle Krebsarten im Zusammenhang mit Strahlenbelastung beschrieben worden (Holm, 1990). Der genaue Entstehungsmechanismus strahleninduzierter Tumoren ist bis heute nicht in allen Einzelheiten geklärt. Man geht von einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Faktoren aus, wobei der Schädigung des genetischen Materials eine Schlüsselrolle zugeschrieben wird.

Die DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung entstehen können, sind vielfältiger Natur. Sehr häufig kommt es zu Strukturveränderungen an Nukleotid-Basen, insgesamt konnten bisher fast hundert verschiedene strahlenbedingte Basenschäden identifiziert werden (Knippers, 2001). Des Weiteren kann es durch Trennung der Phosphodiesterbindung bzw. durch Öffnung des Desoxyriboseringes zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommen. Auch neue kovalente Bindungen können entstehen, zum Beispiel zwischen Nukleotiden in den komplementären DNA-Strängen, die auch als „cross links“ bezeichnet werden (Knippers, 2001). Weitere mögliche Schädigungen sind Basenverluste sowie Veränderungen an den Zuckermolekülen (Frankenberg-Schwager, 1989).

Diese so genannten DNA-Primärläsionen werden üblicherweise von der Zelle erkannt und repariert – über eine Enzymkaskade werden hierzu verschiedene DNA-Reparaturmechanismen aktiviert (Basen-, Nukleotidexzisionsreparatur, Reparatur durch homologe und nicht homologe Rekombination). Zusätzlich kann über eine weitere Enzymkaskade der Zellzyklus verlangsamt werden, um der Zelle mehr Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden zu geben. Bei fehlender oder mangelhafter Reparatur der DNA-Primärläsionen jedoch resultieren Mutationen und Chromosomenaberrationen.

Der genaue Mechanismus der Schädigung des genetischen Materials durch ionisierende Strahlung ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Lange Zeit ging man davon aus, dass der Zellkern und insbesondere die DNA die Hauptangriffsorte von Strahlung sind. Man

nahm an, dass strahleninduzierte DNA-Schäden nur eine unmittelbare Folge der Strahlenwirkung auf den Nukleus sind und dass sie nur in direkt bestrahlten Zellen entstehen können. Im Laufe der letzten zehn Jahre jedoch haben sich die Hinweise dafür gehäuft, dass diese DNA-Schäden nicht nur in den ursprünglich bestrahlten Zellen auftreten, sondern auch noch in nachfolgenden Zellgenerationen entstehen können, obwohl diese selbst keinerlei Bestrahlung ausgesetzt waren. Daraus schloss man, dass Bestrahlung eine Art übertragbare genetische Instabilität in den Zellen induziert, welche auch noch nach vielen Zellgenerationen zu multiplen genetischen Auswirkungen wie beispielsweise einer erhöhten Rate an Mutationen und Chromosomenaberrationen führt (Kronenberg, 1994; Little, 1998; Little, 2000; Huang et al., 2003) (siehe Abbildung 1). Diese Erkenntnisse stammen jedoch zum Großteil aus *in vitro* Untersuchungen.

Abbildung 1: Schema der so genannten „strahleninduzierten genomischen Instabilität“ (modifiziert nach Huang et al., 2003). Eine Zellpopulation (Petrischale) wird bestrahlt. Eine überlebende Zelle vermehrt sich klonal. Während der klonalen Expansion kann es aufgrund der „strahleninduzierten genomischen Instabilität“ in den (nicht bestrahlten) Folgegenerationen der ursprünglich bestrahlten Zelle zu neu auftretenden DNA-Schäden kommen (symbolisiert durch die unterschiedlich gemusterten Kreise: gestreift, gepunktet und schwarz). Die genauen Mechanismen, die für dieses Phänomen verantwortlich sind, sind noch unklar.

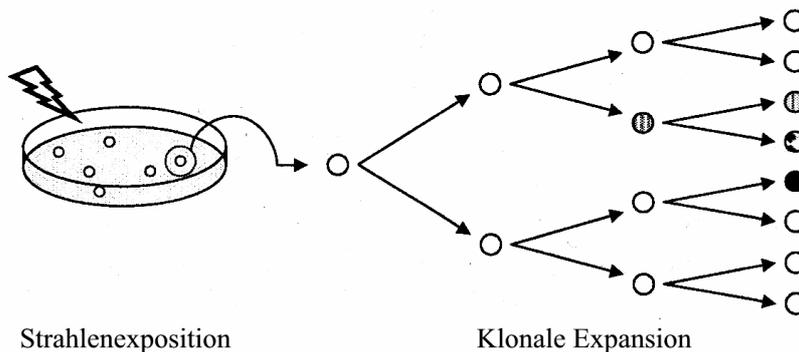


Figure 1 (Abbildung 1) is reprinted and translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: Huang L., Snyder A.R., Morgan W.F.: Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* 22: 5848-5854, copyright 2003

Hinsichtlich strahleninduzierter DNA-Schäden und Tumoren gilt, dass sie schon durch kleinste Strahlendosen induziert werden können. Es gibt also keine für den Menschen ungefährliche, „untere“ Schwellendosis. Je höher dabei die Strahlendosis, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zu solchen Schäden kommt. Das heißt nicht, dass eine höhere Strahlendosis zu dramatischeren Mutationen oder bösartigeren Tumoren führt, sondern vielmehr, dass diese Veränderungen mit größerer Häufigkeit auftreten (Jung und Streffer, 2003).

1.3 Strukturelle Chromosomenaberrationen

1.3.1 Theorien zur Entstehung von strukturellen Chromosomenaberrationen

Für die Entstehung von strukturellen Chromosomenaberrationen stellen Doppelstrangbrüche die wichtigsten DNA-Primärläsionen dar (Natarajan und Obe, 1978; Obe et al., 1992). Auf welche genaue Art und Weise diese Doppelstrangbrüche bei der Bildung von Chromosomenaberrationen miteinander interagieren, wird seit vielen Jahrzehnten kontrovers diskutiert (Edwards, 2002). Grundsätzlich gibt es hierzu zwei Theorien:

Die klassische „**breakage first theory**“ (1938 von Sax vorgeschlagen und 1946 von Lea mathematisch formuliert) besagt, dass es durch einen Doppelstrangbruch zu zwei komplett voneinander getrennten freien Chromosomenenden kommt, die sich innerhalb des Zellkerns bewegen können. Diese reaktiven Bruchenden („sticky ends“) können sich nun auf verschiedene Weise verhalten. Entweder werden sie durch Reparaturvorgänge wieder zu ihrer ursprünglichen Form zusammengefügt (*restitutio ad integrum*), oder aber sie treffen auf andere freie Chromosomenenden und vereinigen sich mit diesen fehlerhaft, woraus Chromosomenaberrationen resultieren. Eine dritte Möglichkeit ist, dass sich der primäre Bruch weder restituiert noch anderweitig zusammenfügt – es verbleiben einfache Bruchstücke.

Im Gegensatz dazu besagt die so genannte „**exchange theory**“ von Revell (1955), dass sich die nach Einwirkung des Klastogens (= chromosomenbrechendes Agens) gebrochenen Chromosomen nicht vollständig voneinander trennen, sondern durch das Chromatin an dieser Stelle zusammengehalten werden. Die so gebildeten „instabilen Läsionen“ sind bestrebt, zum normalen Zustand zurückzukehren, also repariert zu werden. Trifft ein solches geschädigtes Chromosom jedoch im Rahmen intrazellulärer Bewegungen auf ein anderes ebenfalls geschädigtes Chromosom, kann es an den Läsionsstellen zu Austauschreaktionen zwischen den beteiligten Chromosomenstücken kommen, die sich in Chromosomenaberrationen manifestieren.

1.3.2 Klassifizierung von strukturellen Chromosomenaberrationen

Ionisierende Strahlung kann in jeder Phase des Zellzyklus Doppelstrangbrüche induzieren (Obe et al., 1992), der Zeitpunkt der Bestrahlung bestimmt jedoch die Art der entstehenden Aberrationen: wird die Zelle während der präreplikativen Interphase, also in der G₀, G₁ oder frühen S-Phase bestrahlt, so werden die entstehenden Aberrationen repliziert und folglich in der nachfolgenden Metaphase in beiden Chromatiden sichtbar, man spricht auch von Chromosomentypaberrationen. In der späten S- oder in der G₂-Phase liegen die Chromosomen bereits in replizierter Form vor, also mit beiden Chromatiden. Kommt es in dieser Phase zur

Bestrahlung, so ist jeweils nur eine Schwesterchromatide von einem Bruchereignis betroffen, es resultieren Aberrationen vom Chromatidtyp. Bei ihnen ergibt sich eine Vielzahl von Austauschmöglichkeiten, so dass sich teilweise sehr komplexe Strukturen zeigen. Aberrationen vom Chromatidtyp können auch durch Chemikalien wie zum Beispiel durch alkylierende Substanzen induziert werden, diese müssen dann allerdings auch während der nächsten S-Phase der Zelle einwirken (Miller und Therman, 2001), man spricht deshalb auch von S-Phase-abhängigen Klastogenen im Gegensatz zu dem S-Phase-unabhängigen Klastogen Strahlung. Im Folgenden werden anhand von Abbildung 2 (aus Miller und Therman, 2001) die Aberrationen vom Chromosomentyp näher erläutert.

Abbildung 2: Strukturelle Aberrationen vom Chromosomentyp (aus Miller und Therman, 2001). a und f: normale Chromosomen; b: terminale Deletion und azentrisches Fragment; c: zentrisches Ringchromosom und azentrisches Fragment; d: zentrisches Chromosom mit interstitieller Deletion und azentrischer Ring; e: perizentrische Inversion; g: dizentrisches Chromosom und azentrisches Fragment; h: reziproke Translokation. Weitere Beschreibung siehe Text

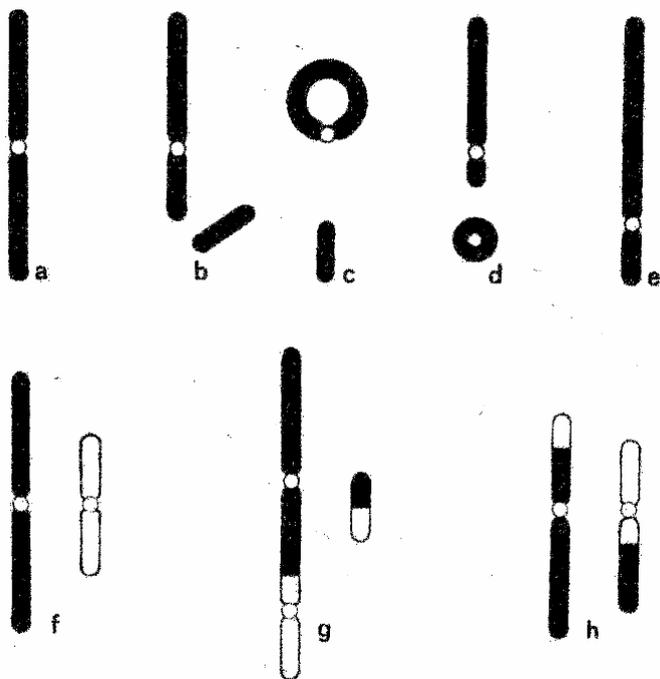


Abbildung 2 ist übernommen aus: Miller O.J., Therman E.: Human Chromosomes. Springer-Verlag, New York, 4. Auflage, S. 189 (Figure 13.2), copyright des Springer-Verlages (2001).

Je nachdem, wieviele Brüche sich ereignen und wo diese lokalisiert sind, ergeben sich die verschiedensten Kombinationsmöglichkeiten für die freien Chromosomenenden:

Findet ein einziges Bruchereignis in nur einem Chromosom statt, so führt dies (bei fehlender Reparatur) zu einer terminalen Deletion und einem azentrischen Fragment (Abb. 2b).

Zwei Brüche innerhalb desselben Chromosoms können dagegen schon zu vier verschiedenen Anordnungen führen. Liegen die Brüche auf demselben Arm des Chromosoms, kommt es entweder zu einer so genannten parazentrischen Inversion, bei der die Position des Zentromers unverändert bleibt (wie Abb. 2a), oder aber es entsteht ein azentrischer Ring und ein zentrisches Chromosom mit einer interstitiellen Deletion (Abb. 2d). Liegen die zwei Brüche auf unterschiedlichen Armen desselben Chromosoms, bildet sich entweder eine so genannte perizentrische Inversion (Abb. 2e), oder aber ein zentrisches Ringchromosom und ein azentrisches Fragment (Abb. 2c). Durch perizentrische Inversionen wird in manchen Fällen die Position des Zentromers verändert.

Kommt es in zwei verschiedenen Chromosomen zu jeweils einem Bruchereignis, so entsteht entweder ein so genanntes dizentrisches Chromosom und ein azentrisches Fragment (Abb. 2g), oder aber es kommt zu einer reziproken Translokation (Abb. 2h).

Selbstverständlich können Austauschvorgänge zwischen den Chromosomen auch mehr als zwei Bruchereignisse beinhalten. Bei drei Bruchereignissen zum Beispiel kann es zu einer Insertion eines interstitiellen Segments von einem Chromosom in dasselbe oder in ein anderes Chromosom kommen. Sind die drei Bruchereignisse auf drei verschiedenen Chromosomen lokalisiert, kann es zu einem regelrechten Ringtausch kommen. Solche komplizierten Austauschvorgänge, an denen mindestens drei Bruchereignisse und mindestens zwei Chromosomen beteiligt sind, bezeichnet man als komplexe Chromosomenaberrationen (Edwards und Savage, 1999).

Manche der entstehenden Chromosomenaberrationen haben zur Folge, dass das genetische Material während der nächsten Zellteilung aufgrund mechanischer Teilungsprobleme nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden kann. Das hat zur Folge, dass Zellen mit solchen Aberrationen bei anschließenden Mitosen zugrunde gehen, man spricht auch von den so genannten instabilen Aberrationen. Hierzu zählen Ringchromosomen, di- und mehrzentrische Chromosomen sowie azentrische Fragmente. Im Gegensatz dazu versteht man unter stabilen Aberrationen solche, die weitere Mitosen ermöglichen und sich daher über mehrere Zellgenerationen hinweg nachweisen lassen. Zu den stabilen Chromosomenaberrationen gehören reziproke Translokationen, terminale und interstitielle Deletionen, peri- und parazentrische Inversionen sowie Insertionen.

1.3.3 Bruchpunktlokalisierung und „fragile sites“

Eine wichtige und seit langem viel diskutierte Frage ist, ob die durch Bestrahlung induzierten Chromosomenbrüche rein zufällig über das Genom verteilt sind oder ob es bestimmte

Chromosomen oder gar bevorzugte Banden gibt, an denen gehäuft Bruchereignisse auftreten. Die Ergebnisse hierzu sind sehr widersprüchlich (zusammengefasst von Johnson et al., 1999). Während erste Arbeiten zu diesem Thema von einer zufälligen Verteilung der strahleninduzierten Bruchpunkte ausgingen (Savage et al., 1973), konnte in späteren Studien das Gegenteil gezeigt werden (Buckton, 1976; Lee und Kamra, 1981; Kano und Little, 1986; Barrios et al., 1989; Tucker und Senft, 1994). Dabei wird in diesen Studien zwar jeweils von einer nicht-zufälligen Verteilung der Bruchpunkte berichtet, die genauen Angaben zu den Bruchpunktlokalisationen nach Bestrahlung sind jedoch unterschiedlich.

Weiterhin erscheint es interessant, ob solche eventuell gefundenen Bruchpunkthäufungen mit Bandenlokalisationen übereinstimmen, die zu den so genannten „fragile sites“ zählen.

Fragile sites sind bestimmte Chromosomenregionen, die unter dem Einfluss bestimmter Substanzen oder nach Kultivierung bei niedrigem Folatspiegel häufiger brechen als andere Chromosomenregionen. Bisher sind mindestens 117 fragile sites bekannt (Sutherland et al., 1996). Man unterscheidet dabei die so genannten „common“, „intermediate“ und „rare“ fragile sites. Common fragile sites findet man in der gesamten Bevölkerung, intermediate fragile sites kommen mit einer Häufigkeit von 1-5% vor und rare fragile sites treten bei weniger als 1% der Personen auf (McKinlay Gardner und Sutherland, 2004). Die Rolle von fragile sites im Zusammenhang mit der Entstehung maligner Erkrankungen wird seit langem kontrovers diskutiert. Anlass zu der Vermutung, dass fragile sites eine Rolle bei der Onkogenese spielen könnten, gab die Beobachtung, dass die Lokalisationen bestimmter fragile sites mit Bruchpunkten übereinstimmten, die aus bestimmten Chromosomenaberrationen bei malignen Tumoren bekannt waren (Yunis und Soreng, 1984). Solch eine Assoziation konnten andere Studien jedoch nicht bestätigen (Simmers et al., 1987; Sutherland und Simmers, 1988). Während einige Autoren weiterhin die Bedeutung von fragile sites in Verbindung mit Tumorentstehung betonen (Gümüs et al., 2002; Glover, 2006), weisen andere ausdrücklich darauf hin, dass für Personen mit rare oder intermediate fragile sites (alle besitzen common fragile sites) kein erhöhtes Malignitätsrisiko besteht (McKinlay Gardner und Sutherland, 2004).

1.3.4 Chromosomenaberrationen im Zusammenhang mit malignen Tumoren

Die Rolle von Chromosomenaberrationen im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs wurde schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts diskutiert (Boveri, 1914). Inzwischen konnten für viele hämatologische und solide Tumoren spezifische Chromosomenaberrationen beschrieben werden, welche mit diesen Krankheiten assoziiert sind (Rowley, 1977; Mitelman et al., 1990). Dabei ist nahezu jede Chromosomenbande repräsentiert, was die große Anzahl von Genen

verdeutlicht, die bei der Onkogenese eine Rolle spielen (Mitelman et al., 1997). Die Bedeutung chromosomaler Veränderungen in Verbindung mit der Entstehung maligner Erkrankungen wird auch verdeutlicht durch die autosomal-rezessiv vererbten Chromosomeninstabilitätssyndrome wie Bloom-Syndrom, Fanconi-Anämie, Ataxia teleangiectatica und Nijmegen-Breakage-Syndrom. Diesen Erkrankungen gemeinsam ist eine deutlich erhöhte Rate spontaner und induzierter Chromosomenaberrationen, welche mit einem drastisch erhöhten Risiko zur Tumorentwicklung einhergeht. Die Art der entstehenden Aberrationen, die induzierenden Agenzien sowie die jeweiligen Tumoren sind dabei unterschiedlich. Die Gene, die bei diesen Syndromen betroffen sind, spielen alle eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden (Taylor, 2001).

Bei der Ataxia teleangiectatica sind zudem spezifische Banden bekannt, die bevorzugt von Bruchereignissen betroffen sind. So kommt es besonders an den Banden 7p14, 7q35, 14q12 und 14q32 zu Chromosomenaberrationen (McKinlay Gardner und Sutherland, 2004). Bei der Fanconi-Anämie sind Trisomien des langen Arms von Chromosom 1 sowie Monosomien von Chromosom 7 häufig. Ebenso wurde von einem hohen Anteil klonaler Aberrationen des langen Arms von Chromosom 3 berichtet, die Bruchpunktlokalisationen waren dabei jedoch variabel (Tönnies et al., 2003). Bei Bloom-Syndrom-Patienten mit akuten Leukämien oder myelodysplastischem Syndrom findet man häufig Deletionen oder komplette Verluste des Chromosoms 7 (Poppe et al., 2001).

Nicht nur primäre Tumoren, auch therapieinduzierte sekundäre Tumoren weisen spezifische Chromosomenaberrationen auf. So sind mittlerweile für therapieinduzierte Leukämien mehrere spezifische Aberrationen bekannt. Bei Patienten, die nach einer Therapie mit alkylierenden Substanzen eine sekundäre Leukämie entwickelten, fand man Deletionen und/oder komplette Verluste der Chromosomen 5 und 7 (Rowley et al., 1977; Le Beau et al., 1986; Rubin et al., 1991; Pedersen-Bjergaard et al., 2000). Patienten, die mit Epipodophyllotoxinen, Anthrazyklinen, Alkylantien oder Bestrahlung behandelt worden waren, zeigten Aberrationen unter Einbeziehung der chromosomalen Region 11q23 (Locus des *MLL*-Gens) (Huret, 1998). Des Weiteren konnten in sekundären Leukämien nach Anthrazyklinbehandlung gehäuft Rearrangements der chromosomalen Region 21q22 nachgewiesen werden (Huret, 2003).

Die zytogenetischen Befunde in soliden Tumoren nach Bestrahlung sind bisher weniger klar beschrieben. Meist handelt es sich um extrem komplexe Karyotypen mit mehreren klonalen Aberrationen. Es kommen strukturelle und numerische Aberrationen vor, die sowohl balanciert als auch unbalanciert vorliegen können (Chauveinc et al., 1999).

Zusammenfassend legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass die durch intensive Therapiemaßnahmen verursachten Chromosomenaberrationen bei der Entstehung von Zweitmalignomen eine wichtige Rolle spielen.

1.4 Das Hautorgan

Die menschliche Haut (Kutis) ist in zwei Schichten gegliedert, die Epidermis (Oberhaut) und die Dermis (Lederhaut). Unter der Dermis liegt die Subkutis, ein lockeres Bindegewebe mit Ansammlungen von Fettzellen, welches die Haut mit dem darunter liegenden Gewebe verbindet. Die Epidermis besteht aus einem mehrschichtigen verhornten Plattenepithel, das sich zu 90% aus den so genannten Keratinozyten zusammensetzt. Diese Epithelzellen differenzieren sich innerhalb von vier Wochen zu toten und kernlosen Zellen und wandern an die Hautoberfläche, um dort abgeschilfert zu werden. Die Epidermis ist somit ein sich ständig erneuerndes Gewebe, das dem Organismus Schutz vor schädigenden äußeren Einflüssen bietet. Zusätzlich zu den Keratinozyten befinden sich in der Epidermis Pigmentzellen (Melanozyten), Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen) und Sinneszellen (Merkel-Zellen).

Die unter der Epidermis liegende Dermis verleiht der Haut Elastizität und Reißfestigkeit. Sie besteht aus Kollagenfasern, elastischen Fasern, Nerven und Gefäßen sowie einer gelartigen Grundsubstanz aus Proteoglykanen. Zwischen den Fasern liegen Fibroblasten, Mastzellen und andere Gewebszellen. Aufgabe der Fibroblasten ist es vor allem, Kollagene und Proteoglykane zu synthetisieren. Im Gegensatz zu den Keratinozyten der Epidermis handelt es sich bei Fibroblasten um langlebige Zellen mit weniger hohem Zellumsatz, die besonders im Rahmen von Wundheilungsvorgängen zur Proliferation angeregt werden können (Welsch, 2003; Fritsch, 2004). Über das genaue Teilungsverhalten von Fibroblasten *in vivo* gibt es jedoch keine eindeutigen Angaben. Aus *in vitro* Untersuchungen weiß man, dass Fibroblasten aus einem Stammzellsystem hervorgehen (Bayreuther et al., 1988) und dass in Kultur gebrachte Fibroblasten sehr proliferationsfreudig sind, was sie beliebt für Zellkulturen gemacht hat. Zu Beginn einer Kultur beträgt die Zellverdopplungszeit von Fibroblasten 16-28 Stunden (im Durchschnitt 20 Stunden), mit zunehmender Zellkulturzeit nimmt die Teilungsgeschwindigkeit ab (Tamm et al., 1984). Aus längerfristigen *in vitro* Untersuchungen ist bekannt, dass Fibroblasten bis zu einem Zeitraum von 302 Tagen die Fähigkeit zur Proliferation besitzen und sich in diesem Zeitraum im Durchschnitt 53 mal teilen, um danach ohne weitere Zellteilungen für zusätzliche 305 Tage zu leben (Bayreuther et al., 1988).

Keratinocyten lassen sich im Gegensatz zu Fibroblasten schwieriger in Kultur bringen. Dies liegt einerseits daran, dass sie schnell zu reifen Zellen ausdifferenzieren (Geara et al., 1992), andererseits an der Tatsache, dass die Kulturen leicht durch das gleichzeitige Wachstum von Fibroblasten kontaminiert werden (Linge, 2004).

1.5 Bisherige Untersuchungen zu Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung

1.5.1 In Zellen des hämatopoetischen Systems

Chromosomenaberrationen nach Strahlenbelastung sind in Zellen des hämatopoetischen Systems schon vielfach beschrieben worden. Die ersten Berichte über Chromosomenaberrationen im Blut therapeutisch bestrahlter Personen stammen von Bender und Gooch (1962) und von Buckton et al. (1962). Erste Hinweise auf den klonalen Charakter strahleninduzierter stabiler Chromosomenaberrationen lieferten Court Brown et al. (1967).

Der Großteil der vorhandenen Informationen zu Chromosomenaberrationen nach Ganzkörperbestrahlung stammt von Untersuchungen an Personen, die die Atombombenabwürfe überlebt haben (Amenomori et al., 1988; Lucas et al., 1992; Greulich et al., 2000; Nakano et al., 2001) oder von Untersuchungen an Opfern von Strahlenunfällen (Goh, 1968; Goh, 1975; Lindholm et al., 1998; Lloyd et al., 1998; Salomaa et al., 1998; Kreja et al., 1999). Dabei konnten Chromosomenaberrationen bereits zu solch frühen Zeitpunkten wie zwei Minuten nach Bestrahlung (Silberstein et al., 1974), aber auch mit einem enormen Zeitabstand von über 50 Jahren nach Strahleneinwirkung nachgewiesen werden (Nakano et al., 2001). In den Blutlymphozyten, die bei diesen Personen nach Bestrahlung untersucht wurden, konnten sowohl instabile als auch stabile Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Durch prospektive Verlaufsuntersuchungen wurde festgestellt, dass die Häufigkeit von Zellen mit instabilen Chromosomenaberrationen mit der Zeit abnahm (Norman et al., 1966; Buckton et al., 1967; Buckton, 1983), während die Häufigkeit stabiler Chromosomenaberrationen über viele Jahre hinweg weitgehend konstant blieb (Buckton et al., 1967; Buckton, 1983; Lucas, 1997; Lindholm et al., 1998; Lloyd et al., 1998; Salomaa et al., 1998).

Auch bei Patienten nach therapeutischer Ganzkörperbestrahlung und anschließender Knochenmark- oder Stammzelltransplantation konnten Chromosomenaberrationen in Blutlymphozyten (Carbonell et al., 1983; Baker et al., 1986; Heinze et al., 1995) und in vereinzelt Fällen auch in Knochenmarkzellen (Baker et al., 1986) beobachtet werden. Dabei konnten aberrante Zellen bis zu sechs Jahre nach der Konditionierungstherapie nachgewiesen werden (Heinze et al., 1995). Es handelt sich hier um Zellen des Empfängers, die durch die

Konditionierungstherapie nicht abgetötet wurden und an denen somit der schädigende Einfluss der Ganzkörperbestrahlung sichtbar bleibt. Diese Zellen scheinen aber nicht den gleichen Regeln zu folgen wie die oben beschriebenen Zellen der zwar auch ganzkörperbestrahlten, jedoch an und für sich gesunden Personen. So wurde mehrfach berichtet, dass die Häufigkeit instabiler Chromosomenaberrationen in den Blutlymphozyten knochenmark- bzw. stammzell-transplantierten Patienten im Laufe der Zeit nicht signifikant abnahm (Carbonell et al., 1983; Heinze et al., 1995), was mit dem geschwächten Immunsystem dieser Patienten erklärt wurde (Carbonell et al., 1983). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Häufigkeit von Blutlymphozyten mit stabilen Chromosomenaberrationen nicht konstant blieb, sondern im Laufe der Zeit stetig zunahm (Baker et al., 1986; Heinze et al., 1995) und dass es sich in einem großen Prozentsatz der Fälle um klonale Veränderungen handelte (Heinze et al., 1995).

1.5.2 In Fibroblasten

Im Gegensatz zu der Fülle an Informationen, die zu *in vivo* bestrahlten Zellen des hämatopoetischen Systems vorliegen, sind zytogenetische Untersuchungen an anderen *in vivo* bestrahlten Geweben, wie zum Beispiel der Haut, nur begrenzt vorhanden. Einen Überblick über bisherige diesbezügliche Studien gibt Tabelle 16 (S. 75). Die ersten Untersuchungen zu diesem Thema stammen von Engel et al. und Visfeldt. Engel et al. untersuchten 1964 die Haut eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, der drei Jahre zuvor wegen eines Bronchialkarzinoms massiv bestrahlt worden war (Strahlendosis 52,8 Gy). Alle untersuchten Zellen wiesen Aberrationen auf. 1966 veröffentlichte Visfeldt Ergebnisse von vier Tumorpatienten, denen er vor der eigentlichen therapeutischen Bestrahlung eine Probedosis von 1 Gy (in einem Fall 5 Gy) im Bereich des rechten Unterarms verabreichte, um dort anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (3, 24 bzw. 72 Stunden) Hautproben zu entnehmen. Die Biopsie des mit 5 Gy bestrahlten Patienten wuchs nicht an, die Ergebnisse der restlichen Biopsien fasste er zusammen, wobei sich ein Prozentsatz aberranter Zellen von 8,3 % ergab. 1978 untersuchten Savage und Bigger sechs Patienten, die eine unterschiedlich starke lokale Strahlentherapie erhalten hatten (Strahlendosis zwischen 10 und 44,8 Gy). Die Hautbiopsien wurden jeweils im Bereich der ursprünglich bestrahlten Körperregion entnommen. Besonders interessant an dieser Studie sind die extrem unterschiedlichen Zeitspannen zwischen Bestrahlung und Hautbiopsieentnahme. So konnten hier Chromosomenaberrationen bereits eine Stunde nach Bestrahlung, jedoch auch noch nach 60 Jahren nachgewiesen werden. Mouthuy und Dutrillaux berichteten 1982 von einem jungen Algerier, der nach dem Hantieren mit einer Iridium-192-Quelle schwer an den Händen verstrahlt worden war (Strahlendosis 25 Ci). Es

wurden sowohl zwei als auch drei Jahre nach dem Unfall Hautproben von den Händen des jungen Mannes entnommen. Das Interessante an dieser Studie ist, dass zu beiden Biopsiezeitpunkten Zellen mit der gleichen klonalen Veränderung in den Zellkulturen gefunden wurden. In einer weiteren Studie wurden Fibroblasten aus einem Lymphknoten einer Patientin mit Non-Hodgkin-Lymphom untersucht, die neun Monate zuvor an dieser Stelle bestrahlt worden war (Strahlendosis 20 Gy) sowie eine Chemotherapie erhalten hatte (Zaslav et al., 1988). Alle untersuchten Zellen waren aberrant. Honda et al. (1993) untersuchten Hautfibroblasten einer 76jährigen Frau, die 45 Jahre zuvor dem Atombombenangriff in Nagasaki ausgesetzt war (geschätzte Strahlendosis 5,14 Gy), und stellten nach fünfwöchiger Kulturdauer einen Prozentsatz aberranter Zellen zwischen 30 und 36% fest.

Der vorliegenden Arbeit am ähnlichsten ist die Studie von Rubin et al. (1992): hier wurden Hautproben von Patienten untersucht, die zuvor im Rahmen einer Knochenmarktransplantation eine intensive Konditionierungstherapie erhalten hatten. Drei kindliche Patienten wurden mit hochdosierter Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung (Strahlendosis 7,5 bzw. 13,2 Gy), ein vierter jugendlicher Patient mit hochdosierter Chemotherapie und TLI („total lymphoid irradiation“) behandelt (Strahlendosis 7,5 Gy). Ein weiterer jugendlicher Patient wurde untersucht, der lediglich eine Kombinationschemotherapie erhalten hatte und nicht knochenmarktransplantiert wurde. Als Kontrolle diente die Hautbiopsie eines gesunden Spenderkindes. Bei den innerhalb des Strahlenfeldes entnommenen Hautproben lag der Anteil aberranter Zellen zwischen 49 und 88 Prozent.

Bei dem Vergleich der aufgeführten Studien fällt auf, dass untersuchter Personenkreis, Strahlenquellen und -dosen sowie das Zeitfenster zwischen Bestrahlung und Probenentnahme sehr unterschiedlich sind: mal handelt es sich um therapeutische, mal um durch einen Unfall verursachte Bestrahlung, mal betrug die Strahlendosis nur 1 Gray, dann über 50 Gray, mal wurde die Haut wenige Stunden nach der Bestrahlung untersucht, ein anderes Mal lagen mehrere Jahre zwischen Bestrahlung und Biopsieentnahme. Erstaunlicherweise gibt es dennoch eine weitgehende Übereinstimmung bei der Art der gefundenen Veränderungen. So berichten alle Autoren nur von stabilen Chromosomenaberrationen wie reziproken Translokationen, Inversionen, Deletionen und Insertionen, während instabile Aberrationen kaum beobachtet werden konnten. Lediglich das Vorhandensein eines einzigen Ringchromosoms wurde von einigen Autoren beschrieben (Engel et al., 1964; Visfeldt, 1966; Mouthuy und Dutrillaux, 1982). Auch wurde mehrfach vom Auftreten komplexer Translokationen berichtet, an denen mindestens drei verschiedene Chromosomen beteiligt waren (Mouthuy und Dutrillaux, 1982; Rubin et al., 1992). Weiterhin berichteten alle Autoren von dem Vorhandensein multipler Klone in den

Zellkulturen (Engel et al., 1964; Visfeldt, 1966; Savage und Bigger, 1978; Mouthuy und Dutrillaux, 1982; Zaslav et al., 1988; Rubin et al., 1992; Honda et al., 1993). Eine wichtige Frage hierbei ist, ob diese Klone bereits *in vivo*, das heißt im lebenden Organismus, vorhanden sind oder ob sie erst *in vitro*, also in der Zellkultur, entstehen. Ein starker Hinweis auf das Vorhandensein von Klonen *in vivo* ist dann gegeben, wenn Zellen mit der gleichen Veränderung in Zellkulturen von unabhängig voneinander angesetzten Hautproben nachgewiesen werden. Dies war bisher nur in einigen Fällen möglich (Engel et al., 1964; Savage und Bigger, 1978; Mouthuy und Dutrillaux 1982; Rubin et al., 1992), siehe auch Tabelle 16 (letzte Spalte).

2 Aufgabenstellung

Die zytogenetischen Aberrationen, welche bei Patienten nach Knochenmark- oder Stammzelltransplantation durch die vorangehenden Therapiemaßnahmen wie Chemotherapie und Ganzkörperbestrahlung in den Hautfibroblasten induziert werden, sind bisher nur in einer Studie von Rubin et al. (1992) untersucht worden. In dieser Studie wurden nur wenige Patienten untersucht, und in den meisten Fällen wurden die Hautproben nur zu einem Zeitpunkt nach der Konditionierung entnommen (in einem Fall auch zu zwei Zeitpunkten nach Konditionierung). Die längste Zeitspanne zwischen Konditionierung und Biopsieentnahme betrug dabei 13 Monate.

Ausgehend von den Ergebnissen der Studie von Rubin et al. (1992) sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

- Was bewirkt die intensive Bestrahlung und Chemotherapie im Rahmen einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation auf zytogenetischer Ebene in Hautfibroblasten?
- Welche Art von Chromosomenaberrationen treten bevorzugt auf? Stabile oder instabile Chromosomenaberrationen? Translokationen, Deletionen, Inversionen, Insertionen oder andere?
- Liegen die gefundenen Veränderungen *in vivo* klonal vor?
- Gibt es Bruchpunkte, die bevorzugt von Chromosomenaberrationen betroffen sind, oder ist die Lokalisation der Bruchpunkte zufällig verteilt?
- Wie entwickeln sich die zytogenetischen Veränderungen in Hautfibroblasten im Verlauf über einen längeren Zeitraum? Bleibt das Ausmaß der Veränderungen konstant, wird es geringer oder nimmt es im Laufe der Zeit zu?
- Besteht eine Assoziation zwischen dem Ausmaß der zytogenetischen Aberrationen und klinischen Parametern, wie zum Beispiel Geschlecht, Diagnose, Vortherapie, Art der Konditionierung oder Graft-versus-Host-Disease (GvHD)?
- Ist es möglich, aufgrund der nachgewiesenen Aberrationen Risikogruppen für das Auftreten von Zweittumoren zu definieren?
- Kann man aus diesen Erkenntnissen Schlüsse bezüglich der Latenzzeiten bis zum Auftreten von Zweittumoren nach Strahlenbelastung ziehen?

3 Material und Methoden

3.1 Ganzkörperbestrahlung (GKB)

Für die Durchführung einer Ganzkörperbestrahlung sind viele unterschiedliche Bestrahlungstechniken entwickelt worden, die von Haus zu Haus stark variieren können. Empfohlen wird dabei die so genannte a.-p. – p.-a.-GKB-Technik, die sich am zuverlässigsten in ausgestreckter Bauch- und Rückenlage durchführen lässt (Leitlinien in der Radioonkologie, 2003). Bei dieser (auch in der Klinik für Strahlentherapie der Charité – Universitätsmedizin Berlin angewendeten) Technik kann einerseits eine gute Dosishomogenität im Zielvolumen erreicht werden (als Zielvolumen wird der gesamte Körper angesehen), außerdem kann das Risikoorgan Lunge effektiv abgeschirmt werden. Beides sind Optimierungskriterien der GKB-Planung.

Auch die Dosierungs-Fraktionierungs-Schemata sind von Einrichtung zu Einrichtung unterschiedlich. In der Klinik für Strahlentherapie der Charité – Universitätsmedizin Berlin erhalten die Patienten eine Gesamtdosis von 12 Gy (Gesamtdosis der Lunge: 10 Gy), die in sechs Fraktionen zu jeweils 2 Gy an drei aufeinander folgenden Tagen appliziert wird. Pro Tag werden zwei Fraktionen mit einem zeitlichen Abstand von 8-10 Stunden verabreicht. Die Bestrahlung erfolgt mit einem Kobalt-60-Gerät, die Dosisleistung beträgt 0,125 Gy/min. Pro Fraktion werden die Patienten jeweils 40-45 Minuten in Bauch- und 40-45 Minuten in Rückenlage bestrahlt. Um die Dosis in der Lunge zu reduzieren, werden individuell angefertigte Bleigummischeiben verwendet.

3.2 Immunsuppression

Zur Prophylaxe einer Transplantatabstoßung und einer GvHD erhalten Patienten nach einer Stammzelltransplantation eine immunsuppressive Therapie in Abhängigkeit von der Art des Stammzellspenders. Bei verwandtem Spender erhalten die Patienten Cyclosporin A (CSA) ab Tag – 1 bis Tag 150-180 nach Transplantation sowie eine kurzdauernde intravenöse Methotrexat (MTX)-Gabe (15mg/m² MTX an Tag 1; an Tag 3, 6 und 11 je 10mg/m²). Wenn Etoposid Bestandteil der Konditionierung ist, wird anstelle des MTX Prednison verabreicht (ab Tag 7: Prednison 0,5mg/kg Körpergewicht (KG), ab Tag 15: 1mg/kg KG). Bei nicht verwandtem Spender besteht die GvHD-Prophylaxe üblicherweise aus der Gabe von CSA, MTX und Prednison. Prednison wird jeweils nach Tag 28 ausgeschlichen.

Tritt eine akute GvHD auf, so wird mit hochdosiertem Prednison behandelt. Refraktäre Patienten erhalten monoklonale chimäre Interleukin-2-Rezeptor-Antagonisten sowie Antithymozytenglobulin (ATG).

Eine chronische GvHD wird mit CSA und Prednison behandelt. Bei refraktärer chronischer GvHD werden Mycophenolat Mofetil (MMF), Cyclophosphamid und extrakorporale Photopherese eingesetzt.

3.3 Beschreibung des Patientenkollektivs

In der vorliegenden Arbeit wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Hautbiopsien von Patienten zytogenetisch untersucht, welche im Rahmen einer allogenen Knochenmark- oder Stammzelltransplantation eine Konditionierung mit Ganzkörperbestrahlung erhielten (Ausnahmen: Lfd.-Nr.: 204 und 207, siehe unten). Ursprünglich waren 46 Patienten in die Studie eingeschlossen. Von 38 dieser Patienten konnten die entnommenen Hautproben zytogenetisch analysiert werden. In das Prospektivkollektiv waren 25 Patienten eingeschlossen, von denen 20 ausgewertet werden konnten, in das Retrospektivkollektiv waren 21 Patienten eingeschlossen, von denen 18 ausgewertet werden konnten.

3.3.1 Prospektivkollektiv

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte im Zeitraum von Frühjahr 2000 bis 31.03.2001 in der Abteilung für Knochenmarktransplantation der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie (Charité Campus Mitte) und ab 01.04.2001 (nach Umzug der Abteilung für Knochenmarktransplantation) in der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Campus Virchow-Klinikum) der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Die Patienten wurden erstmals 1-2 Wochen vor der Transplantation untersucht, also vor Beginn der Konditionierung. Bei 14 der Patienten wurde drei bis sechs Monate nach Transplantation eine zweite Hautprobe entnommen. Acht dieser Patienten wiederum standen nach zwölf Monaten zur Entnahme einer dritten Hautprobe zur Verfügung. Bei vier der voruntersuchten Patienten ist nur die Probe nach zwölf Monaten, nicht jedoch die nach drei bis sechs Monaten vorhanden.

Bei fünf der ursprünglich mit in die Studie aufgenommenen Patienten konnte die erste Hautbiopsie aus nachfolgend genannten Gründen nicht ausgewertet werden, weshalb von diesen Patienten anschließend keine weiteren Proben entnommen wurden und sie somit von der Studie

ausgeschlossen wurden (Lfd.-Nr.: 203, 212, 214, 221 und 222). Bei drei dieser Patienten (Lfd.-Nr.: 203, 212 und 214) lag dies an einer schlechten Qualität der Chromosomenpräparate, welche eine zuverlässige Beurteilung unmöglich machte, bei den anderen zwei Patienten (Lfd.-Nr.: 221 und 222) dagegen waren die Hautbiopsien nicht angewachsen.

Konditionierung

18 der Patienten erhielten im Rahmen der Konditionierung eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von insgesamt $6 \times 2 = 12$ Gray an drei aufeinander folgenden Tagen. Zusätzlich erhielten diese Patienten eine Hochdosis-Chemotherapie mit insgesamt 2×60 mg/kg KG Cyclophosphamid an zwei aufeinander folgenden Tagen. Drei dieser Patienten erhielten zudem 3×20 mg/kg KG Antithymozytenglobulin (Lfd.-Nr.: 201, 208 und 210). Eine Patientin erhielt anstelle des Cyclophosphamids 1×60 mg/kg KG Etoposid (Lfd.-Nr.: 224). Aufgrund von Hautinfiltraten im Rahmen eines MDS wurde bei einem der Patienten zusätzlich eine lokale Bestrahlung der Thoraxwand (1×2 Gy) sowie eine Milzbestrahlung ($3 \times 2 = 6$ Gy) durchgeführt (Lfd.-Nr.: 201).

Zwei der voruntersuchten Patienten erhielten keine Ganzkörperbestrahlung, weshalb sie zu den späteren Untersuchungszeitpunkten nicht weiter ausgewertet wurden (Lfd.-Nr.: 204 und 207). Einer dieser Patienten wurde mit Fludarabin, Busulfan und Antithymozytenglobulin konditioniert (Lfd.-Nr.: 204), bei einer anderen Patientin wurde bei rascher Krankheitsprogression auf eine Stammzelltransplantation und dementsprechend auf die Konditionierung verzichtet (Lfd.-Nr.: 207).

Zusätzliche klinische Angaben zu dem prospektiven Patientenkollektiv sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Klinische Daten des Prospektivkollektivs

Lfd.-Nr.	Geschlecht	Diagnose	Alter bei 1. PE	Stadium d. Erkr. bei SZT	Konditionierung
201	m	MDS	46	RAEB-t	GKB/Cyclo/ATG/lokale Thorax- und Milzbestr.
202	m	ALL	29	1.CR	GKB/Cyclo
203	n.auswertbar	-	-	-	-
204	m	NHL	29	1.PR	Flud/Bus/ATG
205	m	CML	43	2.cP	GKB/Cyclo
206	w	CMPS	49	1.cP	GKB/Cyclo
207	w	CMPS	32	refraktär	keine SZT durchgeführt
208	w	MDS	16	unbeh. MDS	GKB/Cyclo/ATG
209	w	MDS	31	unbeh. MDS	GKB/Cyclo
210	m	ALL	35	1.CR	GKB/Cyclo/ATG
211	m	CML	41	1.cP	GKB/Cyclo
212	n.auswertbar	-	-	-	-
213	m	AML	38	2.CR	GKB/Cyclo
214	n.auswertbar	-	-	-	-
215	m	CML	39	1.cP	GKB/Cyclo
216	m	CML	42	1.cP	GKB/Cyclo
217	m	AML	32	2.CR	GKB/Cyclo
218	w	ALL	27	beginn. 1. Rez.	GKB/Cyclo
219	m	CML	25	1.cP	GKB/Cyclo
220	m	CML	38	akzelerierte Phase	GKB/Cyclo
221	n.gewachsen	-	-	-	-
222	n.gewachsen	-	-	-	-
223	w	AML	20	2.CR	GKB/Cyclo
224	w	ALL	18	1.CR	GKB/Etop
225	m	CML	45	1.cP	GKB/Cyclo

Legende: ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; ATG: Antithymozytenglobulin; Beginn.: beginnendes; Bus: Busulfan; CML: chronische myeloische Leukämie; CMPS: chronisches myeloproliferatives Syndrom; cP: chronische Phase; CR: Komplettremission; Cyclo: Cyclophosphamid; Erkr.: Erkrankung; Etop: Etoposid; Flud: Fludarabin; GKB: Ganzkörperbestrahlung; m: männlich; MDS: myelodysplastisches Syndrom; n: nicht; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; PE: Probeexzision (Hautbiopsie); PR: Partialremission; RAEB-t: refraktäre Anämie, Exzess von Blasten in Transformation; Rez.: Rezidiv; SZT: Stammzelltransplantation; unbeh.: unbehandeltes; w: weiblich

Das Alter zum ersten Biopsiezeitpunkt betrug 16-49 Jahre (Median: 33,5 Jahre).

3.3.2 Retrospektivkollektiv

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte im Zeitraum von Frühjahr 2000 bis 31.03.2001 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie (Charité Campus Mitte) und ab 01.04.2001 (nach Umzug der Abteilung für Knochenmarktransplantation) in der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Campus Virchow-Klinikum) der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Von zwei Patienten

(Lfd.-Nr.: 101 und 102) waren die Hautproben bereits im Mai (Lfd.-Nr.: 101) bzw. im Juli 1999 (Lfd.-Nr.: 102) entnommen worden.

Die Hautbiopsien der Patienten wurden mit einem Abstand von 23 bis 216 Monaten (Median: 44 Monate) nach Transplantation entnommen (Transplantationszeitraum von 1981 bis 1999).

Von einer Patientin wurden zwei Hautproben zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten entnommen (Lfd.-Nr.: 107 und 108). Drei der insgesamt 22 entnommenen Hautbiopsien konnten aus nachfolgend genannten Gründen nicht mit berücksichtigt werden, weshalb die jeweiligen Patienten von der Studie ausgeschlossen wurden (Lfd.-Nr.: 103, 104 und 116). Bei einem dieser Patienten (Lfd.-Nr.: 116) war die Hautbiopsie nicht angewachsen, bei den zwei anderen Patienten dagegen wurden versehentlich die Aufbewahrungsröhrchen für die Hautbiopsien vertauscht, so dass eine richtige Zuordnung nicht mehr möglich war (Lfd.Nr.: 103 und 104).

Konditionierung

Bei einer Patientin (Lfd.-Nr.: 101) der insgesamt 18 retrospektiv untersuchten Patienten wurde die Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Konditionierung noch unfraktioniert durchgeführt (im Jahre 1981), und zwar mit einer einmaligen Dosis von 10 Gray. Zusätzlich erhielt diese Patientin eine Hochdosis-Chemotherapie von 2 x 60 mg/kg KG Cyclophosphamid an zwei aufeinander folgenden Tagen. Alle anderen Patienten dieses Kollektivs erhielten im Rahmen ihrer Konditionierung eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von insgesamt $6 \times 2 = 12$ Gray an drei aufeinander folgenden Tagen. 13 dieser 17 Patienten erhielten zusätzlich die übliche Hochdosis-Chemotherapie (2 x 60 mg/kg KG Cyclophosphamid an zwei aufeinander folgenden Tagen). Die anderen vier Patienten erhielten anstelle dieses Therapieplans individuell unterschiedliche Chemotherapiekombinationen: eine Patientin (Lfd.-Nr.: 106) erhielt lediglich 1 x 60 mg/kg KG Etoposid, eine andere Patientin (Lfd.-Nr.: 107 und 108) erhielt 1 x 60 mg/kg KG Cyclophosphamid sowie 1 x 50 mg/kg KG Etoposid. Bei zwei weiteren Patientinnen (Lfd.-Nr.: 118 und 120) bestand die Chemotherapie aus der Gabe von 1 x 100 mg/kg KG Cyclophosphamid sowie 1 x 50 mg/kg KG Etoposid.

Weitere klinische Angaben zu den Patienten des Retrospektivkollektivs sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Klinische Daten des Retrospektivkollektivs

Lfd.-Nr.	Geschlecht	Diagnose	Konditionierung	Alter bei PE	Nachbeobachtung
101	w	AML	GKB 10Gy/Cyclo	36	tot (Herzversagen 8/99)
102	m	CML	GKB/Cyclo	30	lebt in CR
103	Röhrchen vertauscht	-	-	-	-
104	Röhrchen vertauscht	-	-	-	-
105	m	CML	GKB/Cyclo	41	lebt in CR
106	w	ALL	GKB/Etop	47	lebt in CR
107*	w	ALL	GKB/Cyclo/Etop	24	tot (sept. Schock 3/02)
108*				25	
109	w	CML	GKB/Cyclo	40	lebt in CR
110	w	CML	GKB/Cyclo	42	lebt in CR
111	m	CML	GKB/Cyclo	59	lebt in CR
112	m	MDS	GKB/Cyclo	23	lebt in CR
113	m	CML	GKB/Cyclo	22	lebt in CR
114	w	MDS	GKB/Cyclo	31	lebt in CR
115	w	AML	GKB/Cyclo	46	lebt in CR
116	n.gewachsen	-	-	-	-
117	w	CML	GKB/Cyclo	37	lebt in CR
118	w	AML	GKB/Cyclo/Etop	45	lebt in CR
119	m	CML	GKB/Cyclo	40	lebt in CR
120	w	ALL	GKB/Cyclo/Etop	28	lebt in CR
121	m	CML	GKB/Cyclo	56	lebt in CR
122	m	CML	GKB/Cyclo	48	lebt im Rezidiv

Legende: ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; Bus: Busulfan; CML: chronische myeloische Leukämie; CR: Komplette Remission; Cyclo: Cyclophosphamid; Etop: Etoposid; GKB: Ganzkörperbestrahlung; m: männlich; MDS: myelodysplastisches Syndrom; n: nicht; PE: Probeexzision (Hautbiopsie); SZT: Stammzelltransplantation; sept.: septischer; w: weiblich; * beide Hautproben stammen von derselben Patientin zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten

Das Alter zum Biopsiezeitpunkt betrug 22-59 Jahre (Median: 40 Jahre).

3.4 Material

In der vorliegenden Studie wurden die unter 3.4.1 aufgeführten Geräte verwendet sowie die unter 3.4.2 angegebenen Chemikalien. Das verwendete Enzym ist unter 3.4.3 aufgelistet. Angaben zu den verwendeten Lösungen befinden sich unter 3.4.4, zu den eingesetzten Nährmedien unter 3.4.5 und zum verwendeten Karyotypisierungssystem unter 3.4.6. Hersteller sind jeweils in Klammern angegeben.

3.4.1 Verwendete Geräte

Biohazard-Sicherheitswerkbank (Biohit Deutschland GmbH, Köln, Deutschland), Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland), Umkehrmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), Zentrifuge (Jovan S.A., Saint-Herblain, Frankreich), Schüttler (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland), Wasserbad (Dinkelberg-Labortechnik GmbH, Neu-Ulm, Deutschland), Objektträger (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland), Deckgläser (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland), Lichtmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), Micropositioner (Berliner Glas KGaA, Berlin, Deutschland), Biopsiegerät (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland), Skalpell (Becton Dickinson, Hancock, NY, USA)

3.4.2 Verwendete Chemikalien

Colcemid [N-Methyl-N-deacetyl-Colchicin] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), Essigsäure = Eisessig (J.T. Baker, Deventer, Holland), Kaliumdihydrogenphosphat = KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Lidocain 1% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), Magnesiumchlorid = MgCl_2 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Methanol (J.T. Baker, Deventer, Holland), Natriumchlorid = NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Natriumcitrat = Na-Citrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei = Na_2HPO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Zitronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

3.4.3 Verwendetes Enzym

Trypsin 250 (Difco Laboratories, Detroit, USA)

3.4.4 Verwendete Lösungen

Pufferlösung PBS-Dulbecco

1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH_2PO_4 , 65 mM Na_2HPO_4

(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Hypotone Lösung

MgCl_2 (0,33%) / Na-Citrat (1%) im Verhältnis 3 + 2

Fixativ

Methanol / Eisessig im Verhältnis 3 + 1

Trypsinlösung

22 mg Trypsin 250

200 ml PBS-Dulbecco

Färbelösung

6 ml Zitronensäure

6 ml Methanol

22 ml Na₂HPO₄

20 ml Giemsa-Hollborn-Original-Stammlösung (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland)

200 ml Aqua bidest

Schnelleindeckmittel

Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

3.4.5 Verwendete Nährmedien

Amniomax-C100 Basal Medium mit Supplement (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA)

fetales Kälberserum = FCS (Sigma, Cat.no.: F7524, LOT70K3359)

3.4.6 Verwendetes Karyotypisierungssystem

ikaros (Metasystems)

3.5 Methoden**3.5.1 Gewinnung der Hautproben**

Die Hautbiopsien wurden in den meisten Fällen am oberen Rücken über dem rechten bzw. über dem linken Schulterblatt entnommen. Hiervon gibt es folgende Ausnahmen im Prospektivkollektiv: bei den Patienten 201 und 204 wurden die Hautproben vor SZT am Oberschenkel entnommen. Bei Patient 205 und bei Patientin 218 wurden die Hautproben zum Zeitpunkt drei bis sechs Monate nach SZT am Bauch im Bereich des Nabels entnommen. Bei den Patientinnen 223 und 224 wurden sowohl die Biopsie vor SZT als auch die nach drei bis sechs Monaten im Bauchnabelbereich entnommen. Im Retrospektivkollektiv gibt es nur zwei Patienten, deren Hautprobe nicht im Bereich des oberen Rückens entnommen wurde: so erfolgte bei Patientin 101 die Entnahme am unteren Rücken, bei Patient 121 dagegen an der linken ventralen Thoraxwand.

Alle Eingriffe erfolgten nach vorheriger Lokalanästhesie mit 1%igem Lidocain. Das verwendete Biopsiegerät wurde bis zu einer Tiefe von ca. 5 mm im Uhrzeigersinn in die Haut hineingedreht und anschließend wieder entnommen. Die schon gelöste, sich aber noch in der Haut befindliche Biopsie wurde nun mit Hilfe einer sterilen Pinzette leicht angehoben, mittels eines Skalpells vom darunter liegenden Gewebe abgetrennt und in ein steriles Röhrchen mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gegeben. Die entnommene Hautbiopsie hatte einen Durchmesser von 3 bis 4 mm und war ca. 4 mm lang.

Abhängig von der Blutungsneigung des Patienten wurde die Wunde entweder mit einem Wundstrip oder, wenn nötig, mit einem Nadelstich geschlossen und steril abgedeckt.

3.5.2 Zellkultur

Die Bearbeitung der Hautproben erfolgte im Institut für Medizinische Genetik der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Im Zellzuchtlabor wurden sie innerhalb von 24 Stunden in zwei separaten Kulturflaschen angesetzt (Ausnahmen hiervon sind die Hautproben vor SZT von den Patienten 201 bis 209 sowie die Hautproben der Patienten 101 und 102: hier wurde jeweils nur eine Kulturflasche angesetzt). Das Hautstück wurde mit Hilfe zweier Skalpelle in 15 bis 20 Stückchen zerschnitten und gleichmäßig auf die zwei Flaschen verteilt. Um das Anwachsen der Fibroblasten auf dem Flaschenboden zu erleichtern, war der Boden zuvor mit fetalem Kälberserum benetzt worden. Pro Flasche wurde 1 ml Amniomax Medium hinzugefügt. Dies geschah sehr langsam und vorsichtig, um ein Ablösen der Hautstückchen zu vermeiden. Anschließend wurden die Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5%igem CO₂-Druck inkubiert. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte einmal wöchentlich. Um optimale Bedingungen für das Wachstum der Fibroblasten zu ermöglichen, wurden die Kulturflaschen innerhalb der ersten sieben Tage keinerlei Bewegung ausgesetzt. Ab der zweiten Woche wurden sie dann regelmäßig kontrolliert, um das Auswachsen der Fibroblasten zu verfolgen. Waren genügend Fibroblasten gewachsen, so wurden die Zellen abgelöst und aus jeder ursprünglichen Kulturflasche in zwei neue, größere Flaschen umgesetzt. Absicht war, einen gleichmäßigeren Zellrasen herzustellen sowie einen neuen, synchronen Teilungsschub der Fibroblasten zu induzieren. Zum so genannten Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit isotoner Lösung (PBS) gewaschen, bevor sie mit 0,4 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und 4 min im Brutschrank inkubiert wurden, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Umkehrmikroskop kontrolliert. Anschließend konnten die Zellen dann mit jeweils 3 ml frischem Nährmedium auf die zwei neuen Kulturflaschen verteilt werden.

Die anfänglich noch frei im Nährmedium flottierenden Fibroblasten setzten sich innerhalb weniger Stunden auf dem Flaschenboden fest und begannen erneut mit der Zellteilung. Ziel war es nun, einen Zeitpunkt abzuwarten, an dem sich genügend Zellen in der Mitose, also der Teilungsphase des Zellzyklus, befinden würden, da sich nur in dieser Phase das Chromatin in Chromosomenform darstellt. Da sich Fibroblasten während der ersten Wochen in Kultur im Durchschnitt alle 16-28 Stunden teilen (Tamm et al., 1984), war der Zeitpunkt einer hohen Mitoserate (abhängig von der anfänglichen Dichte des Zellrasens) in der Regel nach zwei bis drei Tagen erreicht. Erkennen konnte man das Mitosestadium der Zellen durch die zu diesem Zeitpunkt eindeutig kugelige Form der Zellen im Gegensatz zum eher spindelförmigen Erscheinungsbild der Zellen in der Ruhe- und Synthesephase.

Insgesamt betrug die Kulturzeit der Fibroblasten zwischen zwei und sechs Wochen.

3.5.3 Chromosomenaufarbeitung

Um die Zellen in der für die Chromosomendarstellung notwendigen Metaphase zu arretieren, wurde der Zellansatz für 2 Stunden mit 50 µl Colcemid versetzt. Anschließend wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden mit isotoner Lösung (PBS) gewaschen, danach mit 0,4 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Abzentrifugieren des Mediums bei 1000 rpm für 10 min wurde der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt und die Zellen schonend resuspendiert. Anschließend wurden den Zellen auf dem Schüttler tropfenweise 8 ml der angewärmten hypotonen Lösung zugeführt. So wurden die Zellen für 20 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie mit 2,8 ml des eisgekühlten Fixativs tropfenweise vorfixiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 1000 rpm für 10 min wurde der Überstand abermals bis auf 1 ml abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Die endgültige Fixierung erfolgte in mindestens fünf Waschgängen mit jeweils 5 ml reinen eisgekühlten Fixativs, das unter Schütteln tropfenweise hinzugegeben wurde. Zwischen den Waschgängen wurden die Zellen bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert (und nach Absaugen des Überstandes resuspendiert).

Nach dem letzten Fixierungsschritt wurde der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt, die Zellen resuspendiert und mit wenigen Tropfen frischen Fixativs versetzt. Diese entsprechend konzentrierte Zellsuspension wurde nun auf eiskalte, fettfreie Objektträger aufgetropft. Diese wurden anschließend zum schonenden Trocknen für einige Minuten auf eine mit einem feuchten Tuch bedeckte Heizplatte (41°C) gelegt.

3.5.4 Giemsa-Färbung der Metaphasenpräparate

Um die Chromosomen künstlich altern zu lassen, wurden die Objektträger vor dem Färben für eine Stunde auf eine Heizplatte (80°C) gelegt.

Der Färbevorgang bestand aus zwei Schritten: zunächst wurden die Objektträger für 20 s in eine zuvor im Wasserbad auf 20°C angewärmte Lösung aus 22 mg Trypsin und 200 ml isotoner Lösung (PBS) gegeben. Nach anschließendem gründlichen Spülen in Aqua destillata wurden sie dann für 4 min in der Färbelösung inkubiert. Danach wurden sie wieder gründlich in Aqua destillata gespült und an der Luft getrocknet. Zum Schutz der Präparate wurden die Objektträger schließlich mit Schnelleindeckmittel und Deckgläsern versehen.

3.5.5 Auswahl der Metaphasen

Pro Fall wurden 30 Metaphasen aufgenommen und ausgewertet. Soweit Präparate von zwei separat angesetzten und aufgearbeiteten Flaschen zur Verfügung standen, wurden jeweils 15 Metaphasen aus jeder Flasche ausgewertet. Beim Durchsuchen der Objektträger auf geeignete Metaphasen mit einem Lichtmikroskop wurde darauf geachtet, dass die Chromosomen nicht im Plasma lagen, eine ausreichende Länge aufwiesen, möglichst gerade vorlagen und sich gegenseitig nicht überlagerten. Geeignete, diesen Kriterien entsprechende Metaphasen wurden durch ein Ölimmersionsobjektiv mit einer in das Mikroskop integrierten, hochauflösenden CCD-Kamera aufgenommen. Anschließend wurden die Chromosomen unter Verwendung der Software ikaros karyotypisiert. Zu Dokumentationszwecken wurde die genaue Position der Metaphase auf dem Objektträger mittels eines Mikropositioners bestimmt und auf einem entsprechenden Auswertungsfeld notiert.

Mittels des „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN) wurden die Karyotypen und, soweit bestimmbar, die genauen Bruchpunkte der Chromosomenaberrationen festgelegt.

3.5.6 Statistik

Alle Daten wurden deskriptiv ausgewertet und graphisch dargestellt. Für die Verlaufsuntersuchung des Parameters „Prozentsatz aberranter Zellen“ wurde im Prospektivkollektiv eine parameterfreie Varianzanalyse (Brunner) durchgeführt, um zu ermitteln, ob zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten signifikante Unterschiede bestehen. Bei ermittelten signifikanten Unterschieden wurde anhand des Wilcoxon-Tests geprüft, zwischen welchen jeweiligen Zeitpunkten diese Unterschiede bestehen.

Für den Parameter „durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle“ wurde die Verlaufsuntersuchung nur zwischen den zwei Zeitpunkten nach Bestrahlung durchgeführt, da sich beim Zeitpunkt vor Bestrahlung nur bei zwei Patienten aberrante Zellen fanden. Verwendet wurde der Wilcoxon-Test.

Um die Ergebnisse des Retrospektivkollektivs mit einzelnen Zeitpunkten aus dem Prospektivkollektiv zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Dieser kam ebenfalls zum Einsatz, um die Ergebnisse zwischen verschiedenen klinischen Subgruppen innerhalb des gleichen Kollektivs zu vergleichen. Beim Auftreten von kleinen Stichprobenumfängen wurde die exakte Methode des Mann-Whitney-U-Tests (Monte-Carlo-Signifikanz) angewendet.

Die anhand der verschiedenen Analysen ermittelten p-Werte gelten als signifikant, wenn $p < 0,05$. Alle Ergebnisse sind explorativ zu betrachten.

Die Analysen wurden unter Verwendung von SPSS 11.0 und SAS 8.2 vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der zytogenetischen Auswertung

In den Tabellen 3 und 10 sind, den zytogenetischen Ergebnissen vorangestellt, klinische Angaben zum Prospektiv- bzw. Retrospektivkollektiv aufgeführt. Tabellen 4 bis 9 zeigen die Ergebnisse der zytogenetischen Auswertung für das Prospektivkollektiv zu den drei Untersuchungszeitpunkten (Tab. 4 und 5: vor Bestrahlung, Tab. 6 und 7: drei bis sechs Monate nach Bestrahlung, Tab. 8 und 9: zwölf Monate nach Bestrahlung), in den Tabellen 11 und 12 sind die Ergebnisse des retrospektiven Kollektivs (Untersuchungszeitpunkt 23 bis 216 Monate nach Bestrahlung) aufgeführt.

Zunächst wurde bestimmt, wie viele der insgesamt 30 beurteilten Metaphasen Aberrationen aufwiesen. Eine Zelle (Fibroblast) wurde als aberrant klassifiziert, sobald mindestens eine strukturelle oder numerische Chromosomenaberration in der Metaphase vorlag. Aufgeführt sind sowohl der absolute (n) wie auch der prozentuale (%) Anteil der aberranten Zellen. Zusätzlich ist in Prozent angegeben, wie viele aller insgesamt aberranten Zellen klonale Aberrationen aufwiesen.

Weiterhin ist aufgeführt, ob und wie viele verschiedene Klone in den 30 ausgewerteten Zellen gefunden wurden. Ein Klon ist definiert als eine Zellpopulation, die aus einer einzigen Vorläuferzelle hervorgegangen ist. Dabei muss ein Klon nicht zwangsläufig aus exakt identischen Zellen bestehen, da während der klonalen Expansion Subklone entstehen können (ISCN, 1995). Dieses Phänomen wird auch als „Karyotypevolution“ bezeichnet (Auftreten von zusätzlichen Anomalien bei einem bereits aberranten Karyotyp). Um von einem Klon sprechen zu können, müssen immer mindestens zwei Zellen mit der gleichen Aberration vorliegen (ISCN, 1995). Dies gilt jedoch nur, wenn es sich bei den Veränderungen um Strukturanomalien der Chromosomen oder um einen Zugewinn von Chromosomen handelt. Bei Verlust eines Chromosoms (Monosomie) müssen drei oder mehr Zellen mit der gleichen Veränderung nachweisbar sein, um die Definition eines Klons zu erfüllen. Weiterhin ist angegeben, ob die Klone nur in einer oder in beiden der separat angelegten Zellkulturflaschen gefunden wurden. Dies ist wichtig, um einschätzen zu können, ob es sich bei den gefundenen Aberrationen um bereits *in vivo* bestehende, „echte“ Klone handelt, oder nur um in der Zellkultur entstandene Aberrationen beziehungsweise Vermehrungen. Der Nachweis von Zellen mit der gleichen zytogenetischen Veränderung in zwei separaten Flaschen macht das Vorliegen eines „echten“, schon *in vivo* vorhandenen Klons wahrscheinlich.

In der letzten Spalte der Tabellen ist angegeben, wie viele Bruchpunkte eine aberrante Zelle im Durchschnitt aufwies. Neben den Mittelwerten ist jeweils auch die Spannbreite (Range) der aufgetretenen Bruchpunktanzahlen angegeben. Bei der Berechnung wurden nur die aberranten der 30 beurteilten Zellen berücksichtigt, unauffällige Zellen (Zellen ohne Aberrationen) wurden naturgemäß nicht mit einbezogen, da sie ja auch keine Bruchpunkte besitzen.

4.1.1 Prospektivkollektiv

Tabelle 3 zeigt klinische Daten des Prospektivkollektivs. Ersichtlich sind Angaben zur Diagnose, zur chemo- und strahlentherapeutischen Vorbehandlung der Patienten, zur Art der Konditionierung sowie zum Entnahmeort der Hautbiopsien.

Von den insgesamt 20 Patienten, die prospektiv untersucht wurden, mussten zwei von den Gesamtbetrachtungen ausgeschlossen werden (Lfd.-Nr.: 204 und 209, in Tabelle 3 rot markiert), da sie bereits zu einem früheren Zeitpunkt aus anderen Gründen bestrahlt worden waren. Sie wurden daher als Einzelfälle berücksichtigt, die Ergebnisse sind zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten jeweils in separaten Tabellen aufgeführt. Bei einem Patienten (Lfd.-Nr.: 204) wurde zehn Monate vor Entnahme der Hautprobe eine perkutane Bestrahlung des Mediastinums und beider Lungenhili mit einer Gesamtdosis von 39,6 Gray durchgeführt. Im zweiten Fall handelt es sich um eine Patientin (Lfd.-Nr.: 209), die wegen eines Morbus Hodgkin vorbestrahlt worden war. Hier wurden zwei Bestrahlungsserien von je drei Wochen Dauer durchgeführt. In der ersten Serie wurden die supradiaphragmalen Lymphknotenstationen in "Mantelfeld"-Technik bestrahlt. Die erzielte Gesamtdosis betrug etwa 30 Gray (im Einzelnen: cervical 31,2 Gray, axillär 29,7 Gray, supraclaviculär 30,2 Gray, hochmediastinal 31,3 Gray, unteres Mediastinum 29,7 Gray). Es wurde fraktioniert bestrahlt mit einer täglichen Dosis von 1,8 Gray an fünf Tagen pro Woche. Während der zweiten Bestrahlungsserie wurden die paraaortocavalen Lymphknotenstationen und die Milz über lokalisierte ventro-dorsale 18MV-Photonen Gegenfelder, ebenfalls mit einer Fraktionierung von 1,8 Gray täglich an fünf Tagen pro Woche, bestrahlt. Hier betrug die erzielte Gesamtdosis 30,6 Gray. Diese letzte Bestrahlungsserie wurde 19 Monate vor Entnahme der ersten Hautprobe durchgeführt.

Tabelle 3: Klinische Daten des Prospektivkollektivs

Lfd.-Nr.	Diagnose	Vorbehandlung		Konditionierung	Ort der PE		
		Chemo	Bestr.		vor SZT	nach 3-6 Mo.	nach 12 Mo.
201	MDS	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo / 3x20mg/kg KG ATG / **	OS	-	RÜ
202	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	-	RÜ
204	NHL	ja	ja	6x30mg/m ² Flud / 2x4mg/kg KG Bus / 4x10mg/kg KG ATG	OS	-	-
205	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	B	-
206	CMPS	nein	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
207*	CMPS	nein	nein	keine SZT durchgeführt	RÜ	-	-
208	MDS	nein	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo / 3x30mg/kg KG ATG	RÜ	RÜ	RÜ
209	MDS	ja	ja	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
210	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo / 3x30mg/kg KG ATG	RÜ	RÜ	RÜ
211	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
213	AML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	-	RÜ
215	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
216	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
217	AML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
218	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	B	-
219	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	RÜ
220	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	-
223	AML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	B	B	-
224	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 1x60mg/kg KG Etop	B	B	-
225	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	RÜ	RÜ	-

Legende: ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; ATG: Antithymozytenglobulin; B: Bauch; Bestr.: Bestrahlung; Bus: Busulfan; CML: chronische myeloische Leukämie; CMPS: chronisches myeloproliferatives Syndrom; Cyclo: Cyclophosphamid; Etop: Etoposid; Flud: Fludarabin; GKB: Ganzkörperbestrahlung; KG: Körpergewicht; MDS: myelodysplastisches Syndrom; Mo.: Monate; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; OS: Oberschenkel; PE: Probeexzision (Hautbiopsie); RÜ: Rücken; SZT: Stammzelltransplantation; **Zeilen in rot:** aufgrund der Vorbestrahlung von der Gesamtanalyse ausgeschlossen; * nur im Kollektiv vor Bestrahlung ausgewertet, da keine SZT durchgeführt wurde; ** lokale Thorax- und Milzbestrahlung

4.1.1.1 Untersuchungszeitpunkt vor Ganzkörperbestrahlung

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der nicht vorbestrahlten Patienten zusammengefasst: 16 dieser insgesamt 18 Patienten wiesen wie erwartet einen normalen Karyotyp auf. Bei zwei Patienten allerdings war der Karyotyp vor Bestrahlung auffällig: es wurde jeweils ein aberranter Klon gefunden, der aber in beiden Fällen nur in einer der zwei angelegten Zellkulturflaschen vorlag. In beiden Fällen handelte es sich um eine einfache balancierte Translokation (Fall 218: t(12;18); Fall 219: t(5;17)). Zusätzlich wurden in beiden Fällen zwei weitere Einzelaberrationen gefunden. Fall 218 hatte – wie auch Patienten 202, 204, 210, 223 und 224 – vor Hautprobenentnahme im Rahmen der Therapie eine Schädelbestrahlung mit einer Dosis von 24 Gray erhalten, bei Fall 219 ist anamnestisch keinerlei Strahlenanwendung bekannt.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der vorbestrahlten und daher von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Patienten (Lfd.-Nr. 204 und 209).

Tabelle 4: Ergebnisse vor Bestrahlung

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%	%		davon in 2 Fl.	Range	Mittelwert
201	0	0	-	-	-	-	-
202	0	0	-	-	-	-	-
205	0	0	-	-	-	-	-
206	0	0	-	-	-	-	-
207	0	0	-	-	-	-	-
208	0	0	-	-	-	-	-
210	0	0	-	-	-	-	-
211	0	0	-	-	-	-	-
213	0	0	-	-	-	-	-
215	0	0	-	-	-	-	-
216	0	0	-	-	-	-	-
217	0	0	-	-	-	-	-
218	4	13,3	50	1	-	2-3	2,3
219	8	26,7	75	1	-	2	2
220	0	0	-	-	-	-	-
223	0	0	-	-	-	-	-
224	0	0	-	-	-	-	-
225	0	0	-	-	-	-	-
Range	0-8	0-26,7%	-	-	-	2-3	2-2,3
Mittelwert	-	2,2%	-	-	-	-	2,2
Median	-	0	-	-	-	-	2,2

Tabelle 5: Ergebnisse der von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Patienten

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%		%		davon in 2 Fl.	Range
204	0	0	-	-	-	-	-
209	21	70	90,5	3	-	1-4	3,4

4.1.1.2 Untersuchungszeitpunkt drei bis sechs Monate nach Ganzkörperbestrahlung

Die Hautproben der Patienten wurden im Zeitraum von drei bis sechs Monaten nach Durchführung der Ganzkörperbestrahlung entnommen. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der 13 nicht vorbestrahlten Patienten aufgeführt. Hier wurde lediglich bei einem Patienten (Lfd.-Nr.: 205) ein unauffälliger Karyotyp gefunden. Bei den restlichen Proben schwankte der Anteil der aberranten Zellen zwischen 46,7 und 100 Prozent, der Median betrug 76,7 Prozent. Es traten ein bis sechs Klone auf, in einem Fall (Lfd.-Nr.: 211) konnte ein Klon sogar in beiden Zellkulturflaschen nachgewiesen werden. Die aberranten Zellen wiesen zwischen einem und 10 Bruchpunkten auf, die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte schwankte zwischen 2,3 und 6,8 Bruchereignissen pro aberranter Metaphase bei einem Median von 3,45 Brüchen.

In Tabelle 7 ist das Ergebnis der vorbestrahlten und daher von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Patientin aufgeführt.

Tabelle 6: Ergebnisse 3 - 6 Monate nach Bestrahlung

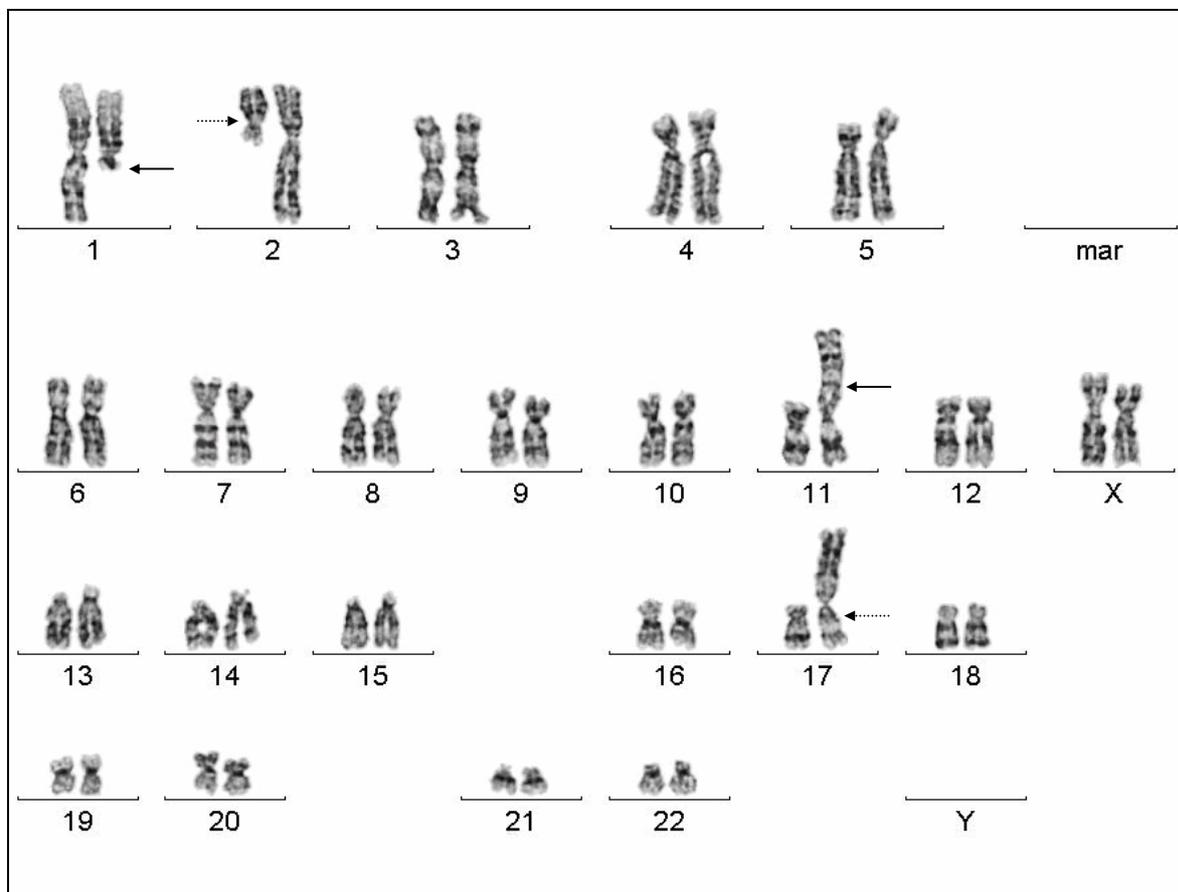
Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%		%		davon in 2 Fl.	Range
205	0	0	-	-	-	-	-
206	14	46,7	100	1	-	3	3
208	25	83,3	96	4	-	2-4	3,6
210	30	100	100	3	-	2-5	3,1
211	18	60	77,8	3	1	1-8	5,6
216	22	73,3	86,4	3	-	2-10	6,8
217	30	100	100	4	-	1-5	3,6
218	28	93,3	89,3	3	-	2-4	3
219	23	76,7	91,3	6	-	1-4	3,3
220	24	80	95,8	4	-	1-3	2,3
223	27	90	96,3	3	-	3-6	5
224	17	56,7	82,4	5	-	1-8	4,1
225	16	53,3	68,8	3	-	1-5	3,2
Range	0-30	0-100%	68,8-100%	1-6	-	1-10	2,3-6,8
Mittelwert	-	70,3%	-	-	-	-	3,9
Median	-	76,7%	-	-	-	-	3,5

Tabelle 7: Ergebnis der von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Patientin

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%	%		davon in 2 Fl.	Range	Mittelwert
209	30	100	96,7	2	-	2-6	4,1

Abbildung 3 zeigt ein Beispiel eines aberranten Karyogramms einer Patientin (Lfd.-Nr.: 223) zum Untersuchungszeitpunkt 3 Monate nach Bestrahlung. Es liegen zwei reziproke Translokationen vor, t(1;11) und t(2;17). Die entsprechenden Bruchpunkte sind im Karyogramm mit Pfeilen gekennzeichnet.

Abbildung 3: Karyogramm einer Patientin (Lfd.-Nr.: 223) zum Zeitpunkt 3 Monate nach Bestrahlung; 46,XX,t(1;11)(q21;p15),t(2;17)(p13;q11)



4.1.1.3 Untersuchungszeitpunkt zwölf Monate nach Ganzkörperbestrahlung

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der elf nicht vorbestrahlten Patienten. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt waren alle Karyotypen aberrant mit einem Anteil aberranter Zellen zwischen 33,3 und 96,7 Prozent bei einem Median von 63,3 Prozent. Es traten zwei bis fünf Klone auf. Die durchschnittlichen Bruchpunktanzahlen lagen zwischen 1,6 und 5,8

Bruchereignissen pro aberranter Metaphase mit einem Median bei 2,9. Der Range der pro aberranter Zelle gefundenen Bruchpunkte reichte von eins bis sieben.

In Tabelle 9 ist das Ergebnis der vorbestrahlten und daher von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Patientin aufgeführt.

Tabelle 8: Ergebnisse 12 Monate nach Bestrahlung

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%			davon in 2 Fl.	Range	Mittelwert
201	21	70	90,5	2	-	1-6	3,6
202	19	63,3	100	5	-	2-5	3,1
206	26	86,7	73,1	5	-	1-7	3,3
208	18	60	88,9	2	-	2-6	2,2
210	19	63,3	57,9	3	-	1-7	2,9
211	10	33,3	60	3	-	1-5	2,7
213	17	56,7	82,4	5	-	2-6	2,6
215	24	80	66,7	4	-	2-7	3
216	29	96,7	96,6	4	-	1-5	2,7
217	17	56,7	88,2	2	-	1-7	5,8
219	10	33,3	70	2	-	1-4	1,6
Range	10-29	33,3-96,7%	57,9-100%	2-5	-	1-7	1,6 - 5,8
Mittelwert	-	63,6%	-	-	-	-	3,1
Median	-	63,3	-	-	-	-	2,9

Tabelle 9: Ergebnis der von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Patientin

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%		%	davon in 2 Fl.	Range	Mittelwert
209	30	100	96,7	3	-	4-9	5,9

4.1.2 Retrospektivkollektiv

In Tabelle 10 sind Angaben zu klinischen Daten der Patienten des Retrospektivkollektivs aufgeführt. Neben den Angaben zur Diagnose, zur chemo- und strahlentherapeutischen Vorbehandlung, zur Art der Konditionierung sowie zum Entnahmeort sind die Zeitspannen (in Monaten) zwischen SZT und Hautprobenentnahme aufgeführt.

Auch im retrospektiven Kollektiv mussten zwei Hautproben von der Gesamtanalyse ausgeschlossen werden (Lfd.-Nr.: 101 und 107, in Tabelle 10 rot markiert). Im ersten Fall (Lfd.-Nr.: 101) handelt es sich um eine Patientin, die im Jahre 1981 knochenmarktransplantiert wurde und aus zweierlei Gründen nur als Einzelfall berücksichtigt wurde: einerseits stellt diese extrem lange Zeitspanne zwischen Bestrahlung und Hautprobenentnahme (216 Monate) einen Extremwert im Gegensatz zu den anderen Proben dar (Zeitspannen zwischen 23 und 65 Monaten nach Bestrahlung). Außerdem wurde damals noch eine unfraktionierte Ganzkörperbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 10 Gray durchgeführt, im Gegensatz zur heute durchgeführten fraktionierten Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 12 Gray.

Ebenso wurde eine Hautprobe der zweimal biopsierten Patientin (Lfd.-Nr.: 107 und 108) nicht in die Gesamtanalyse mit einbezogen (Lfd.-Nr.: 107), da es sich um eine (von Lfd.-Nr.: 108) abhängige Probe handelt, die man aus statistischen Gründen nicht mit den anderen, unabhängigen Proben vergleichen kann.

Tabelle 10: Klinische Daten des Retrospektivkollektivs

Lfd.-Nr.	Diagnose	Vorbehandlung		Konditionierung	Mo.n.SZT	Ort der PE
		Chemo	Bestr.			
101	AML	ja	nein	GKB 1x10 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	216	RÜ u.
102	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	35	RÜ
105	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	48	RÜ
106	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 1x60mg/kg KG Etop	31	RÜ
107*	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 1x100mg/kg KG Cyclo / 1x50mg/kg KG Etop	54	RÜ
108*	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 1x100mg/kg KG Cyclo / 1x50mg/kg KG Etop	63	RÜ
109	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	44	RÜ
110	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	48	RÜ
111	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	60	RÜ
112	MDS	nein	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	38	RÜ
113	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	38	RÜ
114	MDS	nein	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	23	RÜ
115	AML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	53	RÜ
117	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	38	RÜ
118	AML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 1x100mg/kg KG Cyclo / 1x50mg/kg KG Etop	65	RÜ
119	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	37	RÜ
120	ALL	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 1x100mg/kg KG Cyclo / 1x50mg/kg KG Etop	38	RÜ
121	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	28	Th v.
122	CML	ja	nein	GKB 6x2 Gy / 2x60mg/kg KG Cyclo	65	RÜ

Legende: ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; CML: chronische myeloische Leukämie; Cyclo: Cyclophosphamid; Etop: Etoposid; GKB: Ganzkörperbestrahlung; KG: Körpergewicht; MDS: myelodysplastisches Syndrom; Mo.n.SZT: Monate nach SZT (Zeitspanne zwischen SZT und Hautprobenentnahme in Monaten); PE: Probeexzision (Hautbiopsie); RÜ: Rücken; SZT: Stammzelltransplantation; TH v.: ventrale Thoraxwand; u.: unten; **Zeilen in rot:** von der Gesamtanalyse ausgeschlossen; * beide Hautproben stammen von derselben Patientin zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der siebzehn Hautproben wiedergegeben, die für die Gesamtanalyse verwendet wurden. Alle Karyotypen waren aberrant mit einem Anteil aberranter Zellen zwischen 33,3 und 100 Prozent bei einem Median von 83,3 Prozent. Es wurden zwei bis sieben Klone gefunden, in zwei Fällen (Lfd.-Nr.: 111 und 114) konnten Klone auch in beiden Zellkulturflaschen nachgewiesen werden. Die aberranten Zellen wiesen zwischen einem und 13 Bruchpunkten auf, die Mittelwerte der aufgetretenen Bruchpunktanzahlen reichten von 1,8 bis 5,4 mit einem Median von 3,8 Bruchpunkten pro aberranter Metaphase.

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Hautproben.

Tabelle 11: Ergebnisse >23 Monate nach Bestrahlung

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%			davon in 2 Fl.	Range	Mittelwert
102	27	90	74,1	3	-	1-5	3,8
105	28	93,3	67,9	7	-	1-4	2,8
106	21	70	95,2	3	-	2-9	5,2
108	29	94	86,2	4	-	1-13	5,2
109	24	80	87,5	5	-	2-8	4
110	25	83,3	80	3	-	1-4	1,9
111	26	86,7	88,5	6	3	2-8	3,5
112	16	53,3	93,8	4	-	1-2	1,8
113	23	76,7	91,3	4	-	2-6	4,8
114	20	66,7	85	3	1	1-4	2,1
115	25	83,3	96	3	-	2-8	5,4
117	22	73,3	95,5	3	-	2-4	2,6
118	26	86,7	88,5	3	-	2-4	3,4
119	26	86,7	92,3	5	-	1-6	3
120	23	76,7	82,6	5	-	2-8	4,4
121	10	33,3	100	2	-	4-6	5
122	30	100	100	4	-	2-6	4,6
Range	10-30	33,3-100%	67,9-100%	2-7	-	1-13	1,8 - 5,4
Mittelwert	-	78,5%	-	-	-	-	3,7
Median	-	83,3%	-	-	-	-	3,8

Tabelle 12: Ergebnisse der von der Gesamtanalyse ausgeschlossenen Hautproben

Lfd.-Nr.	Anteil aberr./ 30 Metaph.		Anteil aberr. Zellen mit klonalen Aberr.	Anzahl unterschiedl. Klone/ 30 Metaph.		Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaphase	
	n	%		%		davon in 2 Fl.	Range
101	23	76,7	43,5	5	-	2-7	3,7
107	23	76,7	56,5	6	1	1-8	3,3

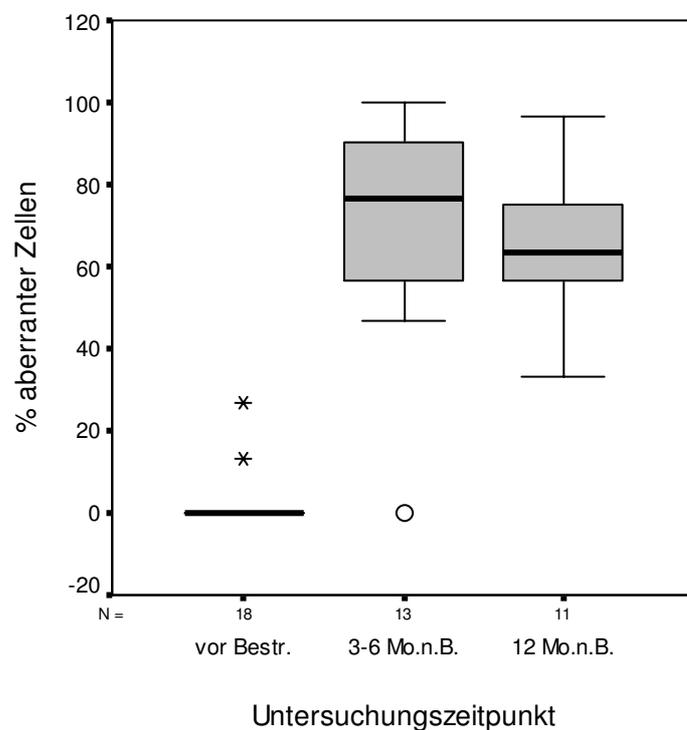
4.2 Zeitverlauf der Ergebnisse

Für die Verlaufsbeobachtung der zytogenetischen Veränderungen wurden die zwei Parameter „Prozentsatz aberranter Zellen“ und „durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle“ betrachtet.

4.2.1 Vergleich des Prozentsatzes aberranter Zellen

4.2.1.1 Innerhalb des Prospektivkollektivs

Abbildung 4: Prozentsatz aberranter Zellen zu den drei Untersuchungszeitpunkten; Box Plots



Legende: Mo.n.B.: Monate nach Bestrahlung; vor Bestr.: vor Bestrahlung; ○ Ausreißer; * Extremwert

Mit Hilfe des globalen Tests (parameterfreie Varianzanalyse (Brunner)) wurde zunächst ermittelt, dass es zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten signifikante Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils aberranter Zellen gab (p -Wert $< 0,00001$). Anschließend wurde anhand des Wilcoxon-Tests ermittelt, zwischen welchen Zeitpunkten diese Unterschiede bestanden: so ergab sich im Vergleich zum Untersuchungszeitpunkt vor Bestrahlung ein signifikant höherer Anteil aberranter Zellen sowohl zum Untersuchungszeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung ($p = 0,002$) als auch zum Untersuchungszeitpunkt 12 Monate nach Bestrahlung ($p = 0,003$). Zwischen den Zeitpunkten 3-6 und 12 Monate nach Bestrahlung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied des Anteils aberranter Zellen nachgewiesen werden ($p = 0,237$).

4.2.1.2 Zwischen Prospektiv- und Retrospektivkollektiv

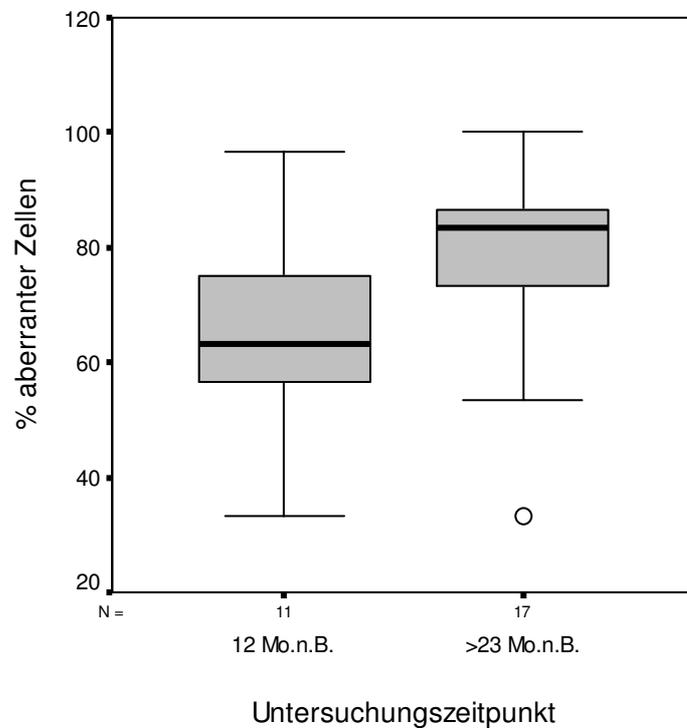
Für die Untersuchungen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Wie erwartet war der Anteil aberranter Zellen im retrospektiven Kollektiv signifikant höher als der Anteil aberranter Zellen im Kollektiv vor Bestrahlung (p-Wert < 0,001).

Der Unterschied zwischen dem Kollektiv 3-6 Monate nach Bestrahlung und dem retrospektiven Kollektiv war jedoch nicht signifikant (p-Wert: 0,502).

Im Gegensatz dazu war der Anteil aberranter Zellen im retrospektiven Kollektiv signifikant höher als im Kollektiv 12 Monate nach Bestrahlung (p-Wert: 0,038, siehe Abb.5).

Abbildung 5: Prozentsatz aberranter Zellen 12 Monate und >23 Monate nach Bestrahlung; Box Plots



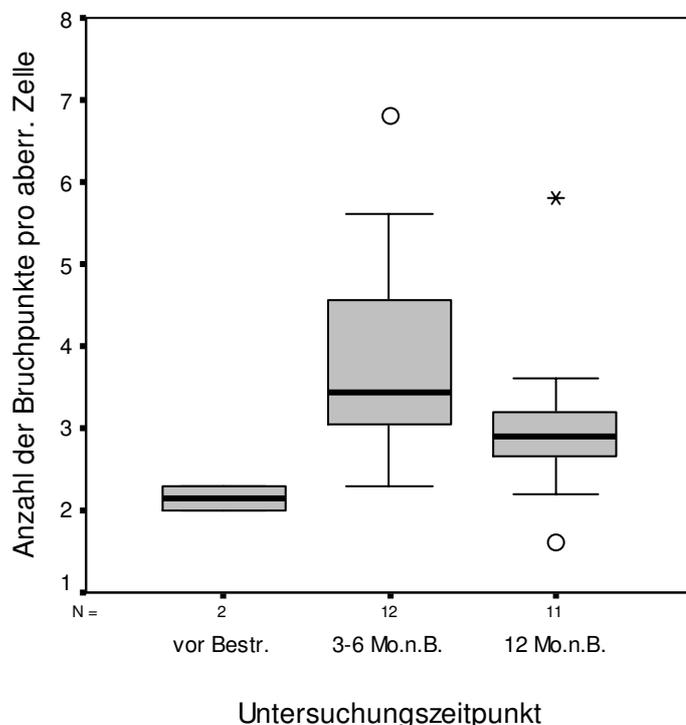
Legende: Mo.n.B.: Monate nach Bestrahlung; ○ Ausreißer

p-Wert: 0,038 (s.)

4.2.2 Vergleich der durchschnittlichen Anzahl der Bruchpunkte

4.2.2.1 Innerhalb des Prospektivkollektivs

Abbildung 6: Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle zu den drei Untersuchungszeitpunkten; Box Plots



Legende: Mo.n.B.: Monate nach Bestrahlung; vor Bestr.: vor Bestrahlung; ○ Ausreißer; * Extremwert

Da die Fallzahl zum Untersuchungszeitpunkt vor Bestrahlung zu niedrig war (nur bei zwei Patienten wurden aberrante Zellen gefunden), wurde nur zwischen den zwei Zeitpunkten nach Bestrahlung ein statistischer Test durchgeführt (Wilcoxon-Test).

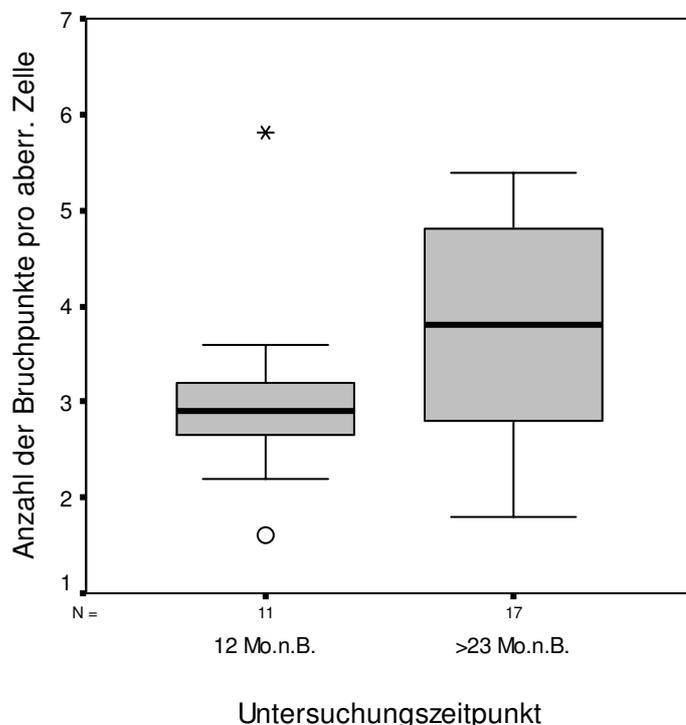
Der Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle zwischen den Zeitpunkten 3-6 und 12 Monate nach Bestrahlung war jedoch nicht signifikant ($p = 0,237$).

4.2.2.2 Zwischen Prospektiv- und Retrospektivkollektiv

Statistische Tests wurden nur zwischen dem Untersuchungszeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung und dem retrospektiven Kollektiv sowie zwischen dem Untersuchungszeitpunkt 12 Monate nach Bestrahlung und dem retrospektiven Kollektiv durchgeführt (Mann-Whitney-U-Test), da die Fallzahl im Prospektivkollektiv zum Untersuchungszeitpunkt vor Bestrahlung zu niedrig war. Die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle unterschied sich dabei weder zwischen dem Kollektiv 3-6 Monate nach Bestrahlung und dem retrospektiven Kollektiv

signifikant (p-Wert: 0,877), noch zwischen dem Kollektiv 12 Monate nach Bestrahlung und dem retrospektiven Kollektiv (p-Wert: 0,138, siehe Abb. 7).

Abbildung 7: Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle 12 und >23 Monate nach Bestrahlung; Box Plots



Legende: Mo.n.B.: Monate nach Bestrahlung; ○ Ausreißer; * Extremwert
p-Wert: 0,138 (n.s.)

4.3 Einfluss klinischer Parameter

Unabhängig vom Einfluss des Zeitfaktors nach Bestrahlung wurde untersucht, ob einzelne klinische Faktoren einen Einfluss auf den Anteil aberranter Zellen und auf die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle hatten. Die Analysen wurden mit den Patienten des prospektiven Kollektivs zum Zeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung sowie mit dem retrospektiven Patientenkollektiv durchgeführt. Folgende klinische Parameter wurden in diesem Zusammenhang untersucht: Geschlecht, Diagnose, Durchführung einer Schädelbestrahlung, Vorhandensein einer akuten oder chronischen GvHD an der Haut, Art der Konditionierung, Typ des Knochenmarkspenders, Vortherapie (aggressiv: systemische Induktions- und Konsolidationspolychemotherapie; nicht aggressiv: andere/keine Vortherapie), Auftreten von Rezidiven und Zweitumoren sowie Nachbeobachtung. Verwendet wurde der Mann-Whitney-U-Test.

4.3.1 Prospektivkollektiv

Tabelle 13: Einfluss klinischer Parameter auf den Anteil aberranter Zellen und auf die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle zum Zeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung

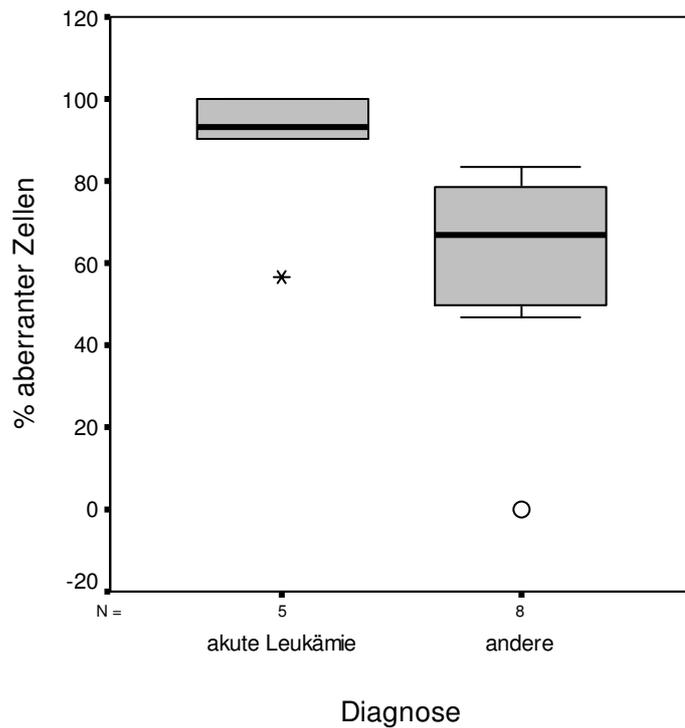
Klinische Parameter	n	% aberr.	p-Wert	Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaph.	p-Wert
		Median (min/max)		Median (min/max)	
1. Geschlecht					
männlich	8	75 (0/100)	0,883	3,3 (2,3/6,8)	0,871
weiblich	5	83,3 (46,7/93,3)		3,6 (3/5)	
2. Diagnose					
akute Leukämien	5	93,3 (56,7/100)	0,028	3,6 (3/5)	0,935
andere	8	66,7 (0/83,3)		3,3 (2,3/6,8)	
3. Schädelbestr.					
ja	4	91,7 (56,7/100)	0,158	3,6 (3/5)	0,956
nein	9	73,3 (0/100)		3,5 (2,3/6,8)	
4. GvHD der Haut					
ja	9	80 (46,7/100)	0,311	3,2 (2,3/6,8)	0,626
nein	4	66,7 (0/83,3)		3,6 (3,3/4,1)	
5. Konditionierung					
mit ATG	2	(83,3/100)	-	(3,1/3,6)	-
ohne ATG	11	73,3 (0/100)		3,5 (2,3/6,8)	
6. Spender					
verwandt	8	65 (0/100)	0,164	3,2 (3/6,8)	0,463
nicht verwandt	5	83,3 (60/100)		3,6 (2,3/5,6)	
7. Vortherapie					
aggressiv	6	91,7 (0/100)	0,198	3,6 (3/5)	0,935
nicht aggressiv	7	73,3 (46,7/83,3)		3,3 (2,3/6,8)	
8. Rezidiv					
ja	2	(0/100)	-	(3,6)*	-
nein	11	76,7 (46,7/100)		3,3 (2,3/6,8)	
9. Nachbeobachtung					
am Leben	11	76,7 (46,7/100)	-	3,6 (3/6,8)	-
tot	2	(0/80)		(2,3)*	

Legende: % aberr.: Prozentzahl aberranter Zellen/Metaphasen; Anzahl d. Bruchp./aberr. Metaph.: durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle/Metaphase; ATG: Antithymozytenglobulin; GvHD: Graft-versus-Host-Disease; * Wert stammt nur von einem Patienten, da bei dem anderen Patienten keine aberranten Zellen gefunden wurden

Aufgrund der zu geringen Fallzahl wurden für die Parameter Konditionierung, Rezidiv und Nachbeobachtung keine p-Werte ermittelt.

Ein signifikanter Unterschied des Prozentsatzes aberranter Zellen ergab sich zwischen den unterschiedlichen Diagnosegruppen ($p = 0,028$, siehe Abb. 8), wobei die Patienten mit akuten Leukämien einen höheren Anteil aberranter Zellen aufwiesen als die Patienten mit anderen Diagnosen. Alle anderen Unterschiede waren nicht signifikant.

Abbildung 8: Einfluss der Diagnose auf den Anteil aberranter Zellen zum Zeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung; Box Plots



Legende: ○ Ausreißer; * Extremwert

p-Wert: 0,028 (s.)

4.3.2 Retrospektivkollektiv

Tabelle 14: Einfluss klinischer Parameter auf den Anteil aberranter Zellen und auf die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle im Retrospektivkollektiv

Klinische Parameter	n	% aberr.	p-Wert	Anzahl d. Bruchp./ aberr. Metaph.	p-Wert
		Median (min/max)		Median (min/max)	
1. Geschlecht					
männlich	8	86,7 (33,3/100)	0,469	3,7 (1,8/5)	0,7
weiblich	9	80 (66,7/94)		4 (1,9/5,4)	
2. Diagnose					
akute Leukämien	5	83,3 (70/94)	0,751	5,2 (3,4/5,4)	0,027
andere	12	81,7 (33,3/100)		3,3 (1,8/5)	
3. GvHD der Haut					
ja	9	83,3 (33,3/90)	0,524	3,8 (1,8/5,4)	0,672
nein	7	80 (66,7/94)		3,4 (2,1/5,2)	
4. Konditionierung					
mit Etoposid	4	81,7 (70/94)	0,803	4,8 (3,4/5,2)	0,157
ohne Etoposid	13	83,3 (33,3/100)		3,5 (1,8/5,4)	
5. Spender					
verwandt	13	83,3 (33,3/100)	0,852	3,8 (1,9/5,4)	0,723
nicht verwandt	4	83,4 (53,3/94)		3,5 (1,8/5,2)	
6. Vortherapie					
aggressiv	5	83,3 (70/94)	0,751	5,2 (3,4/5,4)	0,027
nicht aggressiv	12	81,7 (33,3/100)		3,3 (1,8/5)	
7. Zweittumor					
ja	2	(66,7/86,7)	-	(2,1/3,4)	-
nein	15	83,3 (33,3/100)		4 (1,8/5,4)	

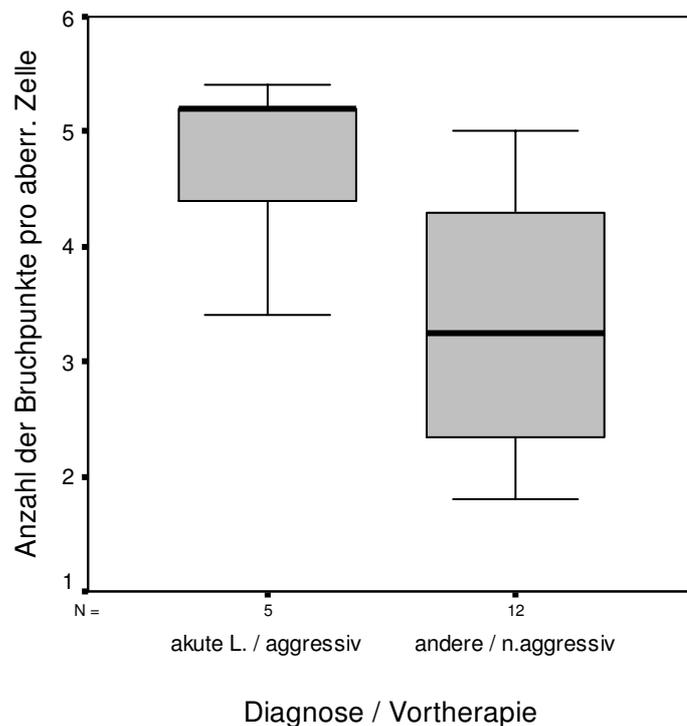
Legende: % aberr.: Prozentzahl aberranter Zellen/Metaphasen; Anzahl d. Bruchp./aberr. Metaph.: durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle/Metaphase; GvHD: Graft-versus-Host-Disease

Aufgrund der zu geringen Fallzahl wurden für den Parameter Zweittumor keine p-Werte ermittelt.

Im retrospektiven Kollektiv gab es zwischen den Diagnosegruppen ebenfalls einen signifikanten Unterschied, diesmal jedoch im Hinblick auf die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte ($p = 0,027$). Der gleiche p-Wert ist auch bei der aggressiven (systemische Induktions- und Konsolidationspolychemotherapie) im Gegensatz zur nicht aggressiven Vortherapie (andere/keine Vortherapie) zu finden, da es sich hier um die gleiche Patientenverteilung wie bei den Diagnosegruppen handelte. So wiesen Patienten mit akuten Leukämien beziehungsweise mit

einer aggressiven Vortherapie eine signifikant höhere Anzahl von Bruchpunkten pro aberranter Zelle auf als Patienten mit anderen Diagnosen beziehungsweise einer nicht aggressiven Vorbehandlung (siehe Abb. 9). Die restlichen klinischen Parameter wiesen keine Signifikanzen auf.

Abbildung 9: Einfluss von Diagnose bzw. Vortherapie auf die durchschnittliche Anzahl der Bruchpunkte pro aberranter Zelle im Retrospektivkollektiv; Box Plots



Legende: L.: Leukämie; n.: nicht

p-Wert: 0,027 (s.)

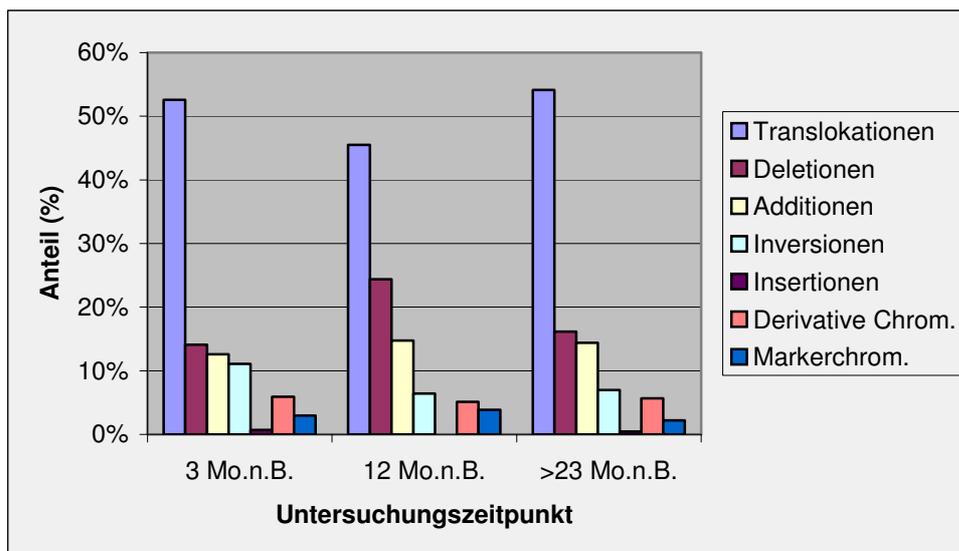
4.4 Typen chromosomaler Aberrationen und ihre Häufigkeit

Alle beobachteten Chromosomenaberrationen waren struktureller Natur: es fanden sich reziproke Translokationen, Deletionen, Additionen, Inversionen sowie Insertionen. Ein aberrantes Chromosom, dessen Herkunft nicht identifiziert werden konnte, wurde als Markerchromosom bezeichnet. Wenn Teile eines aberranten Chromosoms identifiziert werden konnten, eine vollständige Zuordnung aber nicht möglich war, so wurde dieses Chromosom als derivatives Chromosom bezeichnet. Numerische Aberrationen kamen nicht vor. In den wenigen aberranten Zellen vor Bestrahlung kamen nur Translokationen (67%), Deletionen (17%) und derivative Chromosomen (17%) vor. Festzustellen ist, dass sich die prozentuale Verteilung der verschiedenen strukturellen Aberrationen zu den drei Untersuchungszeitpunkten nach

Bestrahlung nur wenig voneinander unterschied (siehe Abb. 10). So wurden am häufigsten reziproke Translokationen gefunden (46-54%), seltener Deletionen (14-24%), Additionen (13-15%) und Inversionen (6-11%). Der Anteil an derivativen Chromosomen lag zwischen 5 und 6%, der an Markerchromosomen zwischen 2 und 4%. Lediglich zwei Insertionen wurden gefunden: eine zum Zeitpunkt 3-6 Monate, die andere zum Zeitpunkt >23 Monate nach Bestrahlung.

Bei einigen der beobachteten Translokationen handelte es sich um komplexe Translokationen. Der Anteil komplexer Translokationen an der Gesamtmenge aller beobachteten Translokationen betrug im Prospektivkollektiv zum Zeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung 7%, zum Zeitpunkt 12 Monate nach Bestrahlung 2,8%, und im Retrospektivkollektiv 6,5%. Meist handelte es sich dabei um 3-Bruch-Translokationen, im Retrospektivkollektiv jedoch wurde jeweils auch eine 4- und eine 5-Bruch-Translokation beobachtet. Letztere stammte von der Patientin, deren Knochenmarktransplantation 18 Jahre zurücklag (Lfd.-Nr.: 101).

Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der verschiedenen strukturellen Aberrationen



Legende: Chrom.: Chromosomen; Mo.n.B.: Monate nach Bestrahlung

4.5 Bruchpunktanalyse

4.5.1 Lokalisation und Anzahl der Bruchereignisse

In Tabelle 15 sind Angaben zur chromosomalen Lokalisation und zur Anzahl der unterschiedlichen Bruchereignisse in den verschiedenen Kollektiven aufgeführt. Bei klonalen Veränderungen wurden die pro Klon beobachteten Bruchereignisse jeweils nur einmal gezählt.

Angegeben sind für jedes Chromosom die jeweilige Anzahl der Bruchereignisse auf dem kurzen (p) und dem langen (q) Arm sowie Bruchereignisse, die nicht exakt lokalisiert werden konnten. Letztere sind mit einem Fragezeichen ausgewiesen und stammen zum Großteil von derivativen Chromosomen. Jedes derivative Chromosom wurde dabei als ein Bruchereignis gezählt (es sei denn, es war ersichtlich, dass das derivative Chromosom aus einer Aberration entstanden war, die mehr als ein Bruchereignis beinhaltetete, z.B. aus einer Inversion).

Zusätzlich ist (rechts unten in der Tabelle, S.53) für jedes Kollektiv die Summe der insgesamt aufgetretenen Bruchereignisse angegeben sowie die Anzahl der ausgewerteten Patienten.

Tabelle 15: Chromosomale Lokalisation und Anzahl der Bruchereignisse in den verschiedenen Kollektiven

Lokalisation		Anzahl der Bruchereignisse				Lokalisation		Anzahl der Bruchereignisse			
Chr.	Arm	t 0	t 3-6 Mo	t 12 Mo	Retro	Chr.	Arm	t 0	t 3-6 Mo	t 12 Mo	Retro
1	p	1	10	5	23	13	p	-	-	1	3
	q	1	3	23	16		q	-	7	9	11
	?	1	-	2	-		?	-	1	1	-
	<i>gesamt</i>	3	13	30	39		<i>gesamt</i>	-	8	11	14
2	p	-	10	5	12	14	p	-	1	1	-
	q	-	12	9	15		q	1	9	13	20
	?	-	-	-	-		?	-	1	-	2
	<i>gesamt</i>	-	22	14	27		<i>gesamt</i>	1	11	14	22
3	p	-	9	9	10	15	p	-	2	4	6
	q	-	10	9	14		q	-	6	7	9
	?	-	-	1	-		?	-	1	-	-
	<i>gesamt</i>	-	19	19	24		<i>gesamt</i>	-	9	11	15
4	p	-	-	7	4	16	p	-	4	3	5
	q	-	7	5	15		q	-	6	5	9
	?	-	-	-	2		?	-	-	1	2
	<i>gesamt</i>	-	7	12	21		<i>gesamt</i>	-	10	9	16
5	p	-	1	5	4	17	p	-	2	-	3
	q	1	12	3	10		q	1	4	6	12
	?	-	-	1	1		?	-	2	-	1
	<i>gesamt</i>	1	13	9	15		<i>gesamt</i>	1	8	6	16
6	p	-	6	6	14	18	p	-	2	1	3
	q	-	9	6	6		q	1	3	4	9
	?	-	-	-	1		?	-	-	1	-
	<i>gesamt</i>	-	15	12	21		<i>gesamt</i>	1	5	6	12
7	p	-	9	4	5	19	p	-	2	2	2
	q	-	9	5	10		q	-	4	2	4
	?	-	-	-	-		?	-	-	-	-
	<i>gesamt</i>	-	18	9	15		<i>gesamt</i>	-	6	4	6
8	p	-	3	1	8	20	p	-	-	2	1
	q	-	4	4	13		q	-	6	4	8
	?	-	-	-	-		?	-	-	1	1
	<i>gesamt</i>	-	7	5	21		<i>gesamt</i>	-	6	7	10

Lokalisation		Anzahl der Bruchereignisse				Lokalisation		Anzahl der Bruchereignisse			
Chr.	Arm	t 0	t 3-6 Mo	t 12 Mo	Retro	Chr.	Arm	t 0	t 3-6 Mo	t 12 Mo	Retro
9	p	-	6	2	3	21	p	-	-	1	1
	q	-	5	4	15		q	1	1	4	1
	?	-	-	-	-		?	-	-	-	-
	gesamt	-	11	6	18		gesamt	1	1	5	2
10	p	-	2	6	5	22	p	-	-	-	-
	q	-	6	6	15		q	1	2	5	3
	?	-	1	-	2		?	-	1	-	-
	gesamt	-	9	12	22		gesamt	1	3	5	3
11	p	-	5	3	2	X	p	-	-	4	10
	q	-	5	7	6		q	-	1	6	10
	?	-	-	-	1		?	-	1	-	2
	gesamt	-	10	10	9		gesamt	-	2	10	22
12	p	-	4	2	3	Y	p	-	-	1	-
	q	1	4	5	6		q	-	1	-	-
	?	-	-	1	-		?	-	-	-	-
	gesamt	1	8	8	9		gesamt	-	1	1	-
								t 0	t 3-6 Mo	t 12 Mo	Retro
								10	222	235	379
								Anzahl ausgewerteter Pat.			
								2	12	11	17

Legende: Chr.: Chromosom; Pat.: Patienten; Retro: Retrospektivkollektiv; t 0: Zeitpunkt vor Bestrahlung; t 3-6 Mo: Zeitpunkt 3-6 Monate nach Bestrahlung; t 12 Mo: Zeitpunkt 12 Monate nach Bestrahlung

4.5.2 Ideogramme

In den folgenden Ideogrammen (S.56-67) sind die in der vorliegenden Studie beobachteten Bruchereignisse mit ihrer genauen Bandenlokalisierung eingetragen.

Die Ideogramme 1 bis 8 sind Einzelideogramme der acht Patienten des Prospektivkollektivs, die komplett zu allen drei Zeitpunkten untersucht wurden. Das Ideogramm 8 stammt von der Patientin, die wegen eines M. Hodgkin vorbestrahlt worden war und deshalb von den Gesamtbewertungen ausgeschlossen wurde (Lfd.-Nr.: 209). Ideogramm 9 stammt von der Patientin des Retrospektivkollektivs, die zu zwei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten biopsiert wurde (Lfd.-Nr.: 107 und 108). Ideogramm 10 zeigt die Bruchpunkte der Patientin des Retrospektivkollektivs, die im Jahre 1981 knochenmarktransplantiert wurde und von den Gesamtbewertungen ausgeschlossen wurde (Lfd.-Nr.: 101). Die Ideogramme 11 und 12 sind Sammelideogramme – im Ideogramm 11 sind alle insgesamt beobachteten Bruchereignisse des Prospektivkollektivs (zu den drei Untersuchungszeitpunkten), im Ideogramm 12 die des Retrospektivkollektivs eingetragen.

Bruchpunkte von reziproken Translokationen sind mit einem Kreuz (x) gekennzeichnet, solche von anderen Aberrationen mit einem Punkt (•). Bruchereignisse, für die nur Regionen oder

Abschnitte von Regionen und keine eindeutigen Bandenlokalisationen angegeben werden konnten, sind im Ideogramm mit einer entsprechenden Klammer angegeben. Bruchereignisse von derivativen Chromosomen konnten aufgrund der fehlenden Bandenlokalisation nicht in die Ideogramme eingetragen werden.

4.5.2.1 Intraindividuelle Häufung von Bruchpunkten

Bei den Einzelideogrammen der in die Gesamtbetrachtungen eingeschlossenen Patienten (Ideogramme 1 bis 7) ist auffällig, dass es bei den meisten Patienten (individuell unterschiedliche) Chromosomen gab, die häufiger von Bruchereignissen betroffen waren als andere (zum Beispiel Chromosom 1 in Ideogramm 1, Chromosom 2 in Ideogramm 2, Chromosomen 6 und 15 in Ideogramm 4). Außerdem traten pro Patient bestimmte Bruchpunkte wiederholt auf. Dies wurde zunächst in unterschiedlichen aberranten Zellen derselben Hautprobe beobachtet (für solch doppelt aufgetretene Bruchpunkte siehe Ideogramme 1, 2, 4 und 7 – in Ideogramm 5 trat der Bruchpunkt 7q11.2 sogar dreimal auf), nachfolgend jedoch auch in mehreren, zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Hautproben eines Patienten. Ein Beispiel für einen Bruchpunkt, der bei dem gleichen Patienten zu zwei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten auftrat, findet sich im Ideogramm 4 (Bruchpunkt 8q13). In einem anderen Fall konnte derselbe Bruchpunkt sogar zu allen drei Untersuchungszeitpunkten gefunden werden (Ideogramm 7, Bruchpunkt 1p13), wobei es sich jedoch um jeweils unterschiedliche Aberrationen handelte.

Auch in den Einzelideogrammen 8 bis 10 konnten die oben genannten Phänomene, teilweise verstärkt, beobachtet werden. So fanden sich bei der vorbestrahlten Patientin aus dem Prospektivkollektiv (Lfd.-Nr.: 209, Ideogramm 8) fünf Banden (2p13, 2q21, 3q21, 11p15, 22q11.2), die jeweils in zwei unterschiedlichen Hautproben vorkamen. Bei der Patientin aus dem Retrospektivkollektiv, die zu zwei Zeitpunkten biopsiert wurde (Lfd.-Nr.: 107 und 108, Ideogramm 9), waren sechs Banden (1q21, 3p21, 4q31, 6p23, 10q26 und 13q14) in beiden Hautproben an Bruchereignissen beteiligt. Bei beiden Patientinnen konnte außerdem die Beobachtung bestätigt werden, dass innerhalb der gleichen Hautprobe Bruchpunkte doppelt, also in unterschiedlichen aberranten Zellen auftraten. Bei der Patientin aus dem Retrospektivkollektiv, deren Knochenmarktransplantation bei Entnahme der Hautprobe 216 Monate zurücklag (Lfd.-Nr. 101, Ideogramm 10), traten doppelte Bruchpunkte an neun verschiedenen Banden auf, an einer Bande (22q11.2) wurden drei Bruchereignisse beobachtet, und die Bande 10q22 war sogar viermal an verschiedenen Bruchereignissen beteiligt.

4.5.2.2 Interindividuelle Häufung von Bruchpunkten

Insgesamt waren im Prospektivkollektiv alle Chromosomen, im Retrospektivkollektiv alle Chromosomen mit Ausnahme des Y-Chromosoms von Bruchereignissen betroffen (siehe Sammelideogramme 11 und 12).

Auch bei dem interindividuellen Vergleich der Bruchpunkte fällt auf, dass es eine Häufung an bestimmten Chromosomenbanden gab. So konnte eine Häufung von mindestens fünf Bruchereignissen nach Bestrahlung an folgenden Chromosomenbanden beobachtet werden:

Prospektivkollektiv (Ideogramm 11, beide Untersuchungszeitpunkte nach Bestrahlung gemeinsam betrachtet): 1q25, 2q31, **3p21**, **6q25**, 7p15, 7q11, **7q22**, **10p13**, 11p15, **15p11**, **15q26**, **16p13**, **19q13**, **20q13**, 22q13

Retrospektivkollektiv (Ideogramm 12): 1p22, **9q22**, **9q34**, 11q23, Xp11, **14q11.2**, **14q32**, 16p13, 16q24, 17q25, 20q13

Ist eine Bande fett gedruckt, bedeutet dies, dass die hier beobachteten Bruchereignisse jeweils von mindestens fünf verschiedenen Patienten stammen. Bei den normal gedruckten Banden stammen die Bruchereignisse jeweils von mindestens drei verschiedenen Patienten. Die Bruchpunkte 16p13 und 20q13 kamen in beiden Kollektiven gehäuft vor.

Bei separater Betrachtung der zwei Untersuchungszeitpunkte nach Bestrahlung des Prospektivkollektivs ergab sich lediglich zum Zeitpunkt zwölf Monate nach Bestrahlung eine Bande (1q25), an der fünf Bruchereignisse (von drei verschiedenen Patienten) auftraten.

Auch bei den von den Gesamtbetrachtungen ausgeschlossenen Hautproben (Lfd.Nr.: 101, 107 und 209) fanden sich diese Bruchpunkte teilweise wieder:

Ideogramm 8 (Lfd.-Nr.: 209): 6q25, 9q22, 11p15, Xp11, 16q24, 17q25

Ideogramm 9 (Lfd.-Nr.: 107): 3p21, 6q25, 11p15, 11q23, 14q32, 16q24

Ideogramm 10 (Lfd.-Nr.: 101): 3p21, 7p15, 9q22, 9q34, 11p15, 14q11.2, 15q26, 16q24, 17q25, 19q13