

Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen

**Prädiktion der intrinsischen Radiosensibilität an
prätherapeutischen Biopsien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sänger, Moritz Amadeus

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Zips
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. A. Staebler

Tag der Disputation: 27.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Überblick.....	8
1.2 Tumore des oberen Aerodigestivtrakts	8
1.2.1 Epidemiologie und Äthiologie.....	8
1.2.2 Diagnostik und Staging	9
1.2.3 Therapie.....	10
1.3 γ H2AX.....	11
1.3.1 Die Phosphorylierung von γ H2AX als Zellantwort auf einen DNA-Schaden.....	11
1.3.2 Formen der DNA-Reparatur.....	12
1.3.3 Quantifizierung residueller γ H2AX-Foci, Potential und Limitationen	13
1.4 Ziel der Studie.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Technische Geräte.....	18
2.1.2 Labor-Gerätschaften	19
2.1.3 Chemikalien	20
2.1.4 Lösungen	21
2.1.5 Antikörper	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Ethikvotum	22
2.2.2 Vorbereitung	22
2.2.3 Probensammlung.....	23
2.2.4 Schneiden.....	27
2.2.5 Färben	27
2.2.6 Funktionskontrolle der Agentien mit UT-SCC-45-Zellen	31

2.2.7	Induktionsversuch	32
2.2.8	Bildakquisition	32
2.2.9	Auswertung der Bilder.....	33
2.3	Statistik	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Patientencharakteristika.....	35
3.2	Nachweis und Quantifizierung von residuellen Doppelstrangbrüchen mit Hilfe von γ H2AX-Foci in der Zellkultur.....	40
3.3	Der γ H2AX-Assay als Nachweis von Doppelstrangbrüchen an ex-vivo bestrahltem Tumorgewebe	42
3.4	Bestimmung der zellulären Radiosensitivität bei ex-vivo bestrahlten Tumorproben	43
3.5	Unterschiede in der intertumoralen Radiosensitivität	46
3.6	Unterschiede in der intratumoralen Radiosensitivität	47
3.7	Zwischenzusammenfassung und ergänzende Untersuchungen zur Fehleranalyse	48
3.8	Nachweis von Unterschieden der Radiosensitivität bei unterschiedlichen Histologien	57
4	Diskussion	58
5	Zusammenfassung.....	67
	Anhang.....	68
	Literaturverzeichnis	69
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	76
	Danksagung.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ex-vivo-Probenmaterial von #Öso21 nach 20 h Inkubation bei 37 °C;	25
Abbildung 2: Dapi-Bild und komplementäres multi-Bild von #Öso7_8Gy_Bezirk1;	34
Abbildung 3: Darstellung einer nicht verwertbaren Tumorprobe (#Öso1) in der Hämatoxylin/Eosin-Färbung;	36
Abbildung 4: Anstieg der residuellen γ H2AX-Foci nach Bestrahlung bei 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy bei Zellen der Zelllinie UTSCC45;	41
Abbildung 5: repräsentative Bilder des Zellkulturversuchs UTSCC45 nach Bestrahlung bei 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy;	41
Abbildung 6: Nachweis von Doppelstrangbrüchen bei Tumorzellen durch γ H2AX-Foci mit Hilfe von Bestrahlung;	42
Abbildung 7: Veränderung der Anzahl residueller γ H2AX-Foci in Abhängigkeit zur Strahlendosis (Gy);	44
Abbildung 8: Darstellung der Unterschiede der Radiosensitivität unterschiedlicher Patientenproben;	46
Abbildung 9: Beispielbilder zur Darstellung der unterschiedlichen intertumoralen Radiosensitivität;	47
Abbildung 10: Analyse der intratumoralen Radiosensitivität bei Patient #ZPM3;	48
Abbildung 11: CT-Bild von #Öso21;	49
Abbildung 12: repräsentative Abbildung zur Verteilung von Tumorzellen innerhalb der Muscularis bei Adenokarzinomen (#Öso21_1);	51
Abbildung 13 a,b,c: repräsentative Bilder zur Analyse von #Öso19T_2Gy (Adenokarzinom);	52
Abbildung 14 a,b: repräsentative Bilder zur Analyse von #Öso20T (Adenokarzinom);	52
Abbildung 15: repräsentatives Areal von #Öso21_1_8Gy 30 min nach Bestrahlung;	53
Abbildung 16: Anzahl der γ H2AX-Foci 30 min und 24 h nach Bestrahlung bei 0 Gy, 4 Gy, 8 Gy im Vergleich zu Normalgewebe;	54
Abbildung 17: Lineare Regressionslinien von #Öso21 30 min und 24 h nach Bestrahlung;	55
Abbildung 18: #Öso21_2 im Vergleich zu zuvor ausgewerteten Patientenproben;	56
Abbildung 19: Unterschied zwischen Adeno-und Plattenepithelkarzinom;	57
Abbildung 20: Entzündungszellen im Tumorgewebe;	63
Abbildung 21: Darstellung der immunhistochemischen Färbung mit Pimonidazol und BrdU im Positiv- und Negativvergleich;	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristika;	38
Tabelle 2: Auswertung der linearen Regressionslinien;.....	45

Abkürzungsverzeichnis

a	=	annus (Jahr)
Abb.	=	Abbildung
BrdU	=	Bromdesoxyuridin
bzw.	=	beziehungsweise
°C	=	Grad Celsius
Chx	=	Chemotherapie
cm	=	Zentimeter
CT	=	Computertomographie
DDR	=	Zellantwort auf DNA-Schaden (DNA damage response)
DNA-PK _{cs}	=	DNA-abhängige Proteinkinase (katalytische Untereinheit)
DAPI	=	40,6-Diamidino-2-Phenylindol
ED	=	Erstdiagnose
GFP	=	Grün fluoreszierendes Protein
GÖÜ	=	gastroösophagealer Übergang
Gy	=	Gray (Einheit der Energie/Strahlendosis)
h	=	Stunde
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	=	Wasserstoffperoxid
HPV	=	Humanes Papilloma Virus

IF	=	Immunfluoreszenz
IgG	=	Immunglobulin G
IHC	=	Immunhistochemie
IRIFs	=	ionizing radiation induced foci
kb	=	Kilobasen
kV	=	Kilovolt
L	=	Liter
mA	=	Milliampere
µg	=	Mikrogramm
µm ²	=	Quadratmikrometer
min.	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
M	=	molar
OP	=	Operation
PBS	=	gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PET-CT	=	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
PLECA	=	Plattenepithelkarzinom
rpm	=	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RtChx	=	Radiochemotherapie
sec	=	Sekunde
Tab.	=	Tabelle
vs	=	versus/gegen
%	=	Prozent
<	=	kleiner

1 Einleitung

1.1 Überblick

Tumore des oberen Aerodigestivtrakts, zu denen Tumore des Kopf-Hals-Bereichs, der Lunge und des Ösophagus zählen, gehören weltweit zu den häufigsten Tumorentitäten (1). Die Strahlentherapie als Monotherapie oder in Kombination mit einer Systemtherapie ist für diese Tumore eine etablierte Standardtherapie. Trotz technologischer Fortschritte und kontinuierlich weiterentwickelter Therapiekonzepte liegt in den lokal fortgeschrittenen Stadien das 5-Jahres-Überleben in der nicht metastasierten Primärsituation bei etwa 20 bis 40 % (1, 2). Biomarker, die zuverlässig das Ansprechen auf eine Strahlentherapie vorhersagen können, konnten noch nicht etabliert werden. Aus diesem Grund werden neue Biomarker untersucht, um im Rahmen einer personalisierten Medizin die optimale Therapie für den einzelnen Patienten zu definieren, das Ergebnis zu verbessern und Nebenwirkungen zu minimieren. In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Detektion residueller Doppelstrangbrüche durch die Phosphorylierung am Chromatin-Molekül γ H2AX nach ionisierender Bestrahlung mit der intrinsischen Radiosensitivität korreliert (3). In der vorgelegten Arbeit soll nun untersucht werden, ob der Nachweis residueller Doppelstrangbrüche via γ H2AX zur Prädiktion der intrinsischen Radiosensibilität an prätherapeutischen Biopsien aus dem Bereich des oberen Aerodigestivtrakts verwendet werden kann.

1.2 Tumore des oberen Aerodigestivtrakts

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit gibt es große Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit der Tumore des oberen Aerodigestivtrakts, wobei pro Jahr etwa eine Million Menschen an deren Folgen versterben (1). Allein das Ösophagus-Karzinom steht an Position 6 der tumorbedingten Todesursachen weltweit (4, 5). Tumore des oberen Aerodigestivtrakts umfassen eine sehr heterogene Gruppe an Tumoren, deren Chancen auf Heilung in Abhängigkeit des Tumorstadiums und weiteren Faktoren wie z.B. des HPV-Status bei Kopf-Hals-Tumoren stark variieren (6). Weiterhin

besteht hinsichtlich der Inzidenz eine große Divergenz zwischen beiden Geschlechtern, wobei Männer deutlich häufiger an diesen Tumoren erkranken (7). Dabei fällt auf, dass die Fälle erkrankter Frauen in den letzten Jahren im Gegensatz zu denen der Männer weiter angestiegen sind (6). Bezüglich einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate aufgrund eines aggressiven Wachstums und eines meist späten Diagnostikzeitpunkts stellt diese Tumorentität damit ein globales Gesundheitsproblem mit steigender Tendenz dar und bedarf besonderer Beachtung (8, 9).

Kopf-Hals-Tumore und Tumore des Ösophagus zeigen hinsichtlich ihrer Biologie Gemeinsamkeiten (4). Insbesondere bei den Plattenepithelkarzinomen spielen als Risikofaktoren chronischer Tabak- und Alkoholkonsum v.a. in Kombination eine entscheidende Rolle (10, 11). Deshalb werden sie in dieser Arbeit auch zusammen als Tumore des oberen Aerodigestivtrakts behandelt.

Von den Plattenepithelkarzinomen, die weltweit 90 % aller diagnostizierten Ösophaguskarzinome (4) umfassen, sind die Adenokarzinome, meist im distalen Ösophagus, am gastroösophagealen Übergang oder der Cardia, hinsichtlich Ätiopathogenese, Tumorbiologie, Komorbidität, operativem Ansatz und Prognose abzugrenzen (12). Die Fallzahlen dieser Tumore stiegen im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom zuletzt kontinuierlich an (13, 14), wobei die Inzidenz der Adenokarzinome des unteren Ösophagus die Inzidenz der Plattenepithelkarzinome in der westlich geprägten Hemisphäre übertroffen hat (15). Als Ätiologie für das Adenokarzinom kann die Refluxösophagitis mit Übergang zur Barrett-Mukosa in Folge von Adipositas und Stress genannt werden (16).

1.2.2 Diagnostik und Staging

Die Diagnose wird meist erst spät gestellt, da Frühsymptome stark variieren und sehr selten auftreten (4). Häufige Symptome wie Dysphagie, Heiserkeit, Gewichtsverlust oder Fatigue (17) treten meist erst im späteren Krankheitsverlauf auf. Dadurch sind bereits 75 % aller Patienten für einen kurativ chirurgischen Therapieansatz nicht geeignet (18). Weiterhin hat sich gezeigt, dass ein nur

geringes Risiko von 0,1-0,15 % pro Jahr von einem Barrett-Ösophagus ausgeht, sich zu einem Karzinom zu entwickeln (19) und damit nur wenige Menschen trotz eines großen Vorkommens der Refluxkrankheit in der Gesamtbevölkerung schlussendlich an einem Ösophaguskarzinom erkranken. Aufgrund der niedrigen Inzidenzen in der westlichen Welt und des geringen Entartungsrisikos werden somit keine Screening-Tests angeboten, auch wenn ein niedriger Entartungsgrad mit einem verlängerten Gesamtüberleben korreliert (20).

Da Tumore des oberen Aerodigestivtrakts meist aus mukosalem Gewebe hervorgehen, ist die Endoskopie mit Histologiegewinnung der Goldstandard zur Diagnosesicherung (8, 21).

Nach Diagnosestellung erfolgt das Staging zur Ausbreitungsdiagnostik. Das histologische Ergebnis wird unterstützt durch unterschiedliche bildgebende Verfahren. Die Eindringtiefe des Tumors sowie der mögliche Befall von Lymphknoten können mittels endoskopischem Ultraschall ermittelt werden (22). Zusätzlich kann ein ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose-PET (FDG-PET) angeboten werden, das mit hoher Sensitivität mögliche Lymphknoten- und Fernmetastasen ermittelt (23, 24).

1.2.3 Therapie

Wird nach Ausschluss von Fernmetastasen eine Kuration angestrebt, richtet sich die Wahl der Therapiemodalität u.a. nach Histologie, Tumorausbreitung, Allgemeinzustand und oft auch Patientenpräferenz. Bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus stellt die kombinierte Radiochemotherapie eine kurative Therapieoption dar. Präferiert wird diese Therapieform bei hochsitzenden Tumoren und bei Komorbiditäten mit hohem OP-Risiko (25). Bei Plattenepithelkarzinomen des mittleren und distalen Ösophagus kommt die Radiochemotherapie entweder auch als definitive Radiochemotherapie oder neoadjuvant vor einer chirurgischen Resektion zum Einsatz (26, 27). Bei Adenokarzinomen des Ösophagus ist die Operation Goldstandard. Bei lokal fortgeschrittenen Stadien wird diese zusätzlich entweder mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie oder einer perioperativen

Chemotherapie kombiniert (4). Bei lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren sind die definitive Radiotherapie, ggf. mit begleitender Chemotherapie, oder die Resektion mit nachfolgender Radiochemotherapie bei Risikofaktoren Leitlinien-gerechte Optionen (28).

Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von einzelnen Therapiebausteinen (Chemotherapie, Radiotherapie, Operation) zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens führen (13).

Bei den Kombinationstherapien der Adenokarzinome des Ösophagus, des gastroösophagealen Übergangs und des Magens ist auf eine nicht konklusive Studienlandschaft hinzuweisen. Die perioperative Chemotherapie und die neoadjuvante Radiochemotherapie stehen hierbei als Optionen zusätzlich zur Resektion zur Verfügung. Standardmäßig werden platinbasierte Chemotherapien eingesetzt (29). Ziel des neoadjuvanten Therapieschemas ist, vor der Operation die Tumorgöße zu verringern („Downstaging“) und die Wahrscheinlichkeit für eine R0-Resektion zu erhöhen und damit eine Verlängerung des Gesamtüberlebens zu erreichen (27, 30). Hinsichtlich der Dosierung der Strahlen(-chemo)therapie sind im neoadjuvanten Setting Dosen von ca. 41,4 Gy (31) bis ca. 50 Gy (32) üblich. Bei der definitiven Radiochemotherapie kommen Dosen zwischen 50 Gy und 60 Gy zum Einsatz, wobei der Benefit der höheren Dosis in einer randomisierten Phase-III-Studie nicht nachgewiesen werden konnte (33). Bei Kopf-Hals-Tumoren ist eine Cisplatin basierte Radiochemotherapie mit ca. 70 Gy der international anerkannte Standard (34).

1.3 γ H2AX

1.3.1 Die Phosphorylierung von γ H2AX als Zellantwort auf einen DNA-Schaden

Die intrinsische bzw. zelluläre Radiosensitivität einer Tumorzelle hängt wesentlich von der Fähigkeit ab, DNA-Schäden zu reparieren (35-37). Punktmutationen sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche werden zu den von ionisierender Strahlung verursachten DNA-Schäden gezählt. Hierbei hat sich

gezeigt, dass der schwerwiegendste der genannten DNA-Schäden der Doppelstrangbruch ist (38, 39). Bereits ein unreparierter Doppelstrangbruch kann zum Zelltod führen (40). Zur Reparatur besitzt eine Zelle Mechanismen, um Doppelstrangbrüche zu detektieren, das Signal am Ort des Schadens zu verstärken und zu reparieren. Hierbei wird das Signal mit Hilfe einer Abfolge unterschiedlicher Phosphoinositid-3-Kinasen übertragen, die durch den DNA-Schaden aktiviert werden. Im Besonderen kommen die Kinasen ATM, DNA-PKcs und ATR zum Einsatz (41), die eigene Rollen im Reparatursignalweg einnehmen und über unterschiedliche Mediatorproteine miteinander verknüpft sind (42, 43).

Damit ATM aktiviert werden kann, wird der DNA-Doppelstrangbruch durch den MRN-Mediator-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1) abgelesen und dabei gebrochene DNA-Moleküle erkannt. Die ATM-Kinase wird aus einem zunächst inaktiven Dimer aktiviert und markiert die betroffenen Stellen durch Autophosphorylierung (44). ATM kann somit auch als Tumorsuppressorprotein angesehen werden (45). Die ATM- und ATR-Kinasen dienen ihrerseits einer weiteren Aktivierung wichtiger Mediatorproteine abwärts des DNA-Strangs, die eine Gerüstfunktion übernehmen und weitere Substrate zum DNA-Schaden führen (42, 46). Die Histonvariante H2AX wird an der Stelle Serin139 durch ATM, ATR und DNA-PK phosphoryliert (41, 47, 48). Das phosphorylierte H2AX bindet Mdc1, das die Phosphorylierung von H2AX verstärkt, ATM bindet und auch eine Dephosphorylierung von H2AX verhindert (43). Der Komplex aus Mdc1 und H2AX führt zur Rekrutierung weiterer Kofaktoren, die in der Bildung sogenannter durch ionisierende Strahlung induzierter Foci (IRIFs) münden (42, 49). Dies führt zu einer Pause des Zellzyklus, zu Apoptose oder zu einer Reparatur der Läsion (50). Folglich ist davon auszugehen, dass H2A vornehmlich der Signalverstärkung dient, durch Chromatinmodifikationen und Anlockung wichtiger Reparaturproteine aber möglicherweise auch der Reparatur dienen kann (51, 52).

1.3.2 Formen der DNA-Reparatur

Bezüglich der Reparatur von Doppelstrangbrüchen wird zwischen zwei Hauptmechanismen (homologer Rekombination und nicht homologem End-

Joining) unterschieden (53). Homologe Rekombination tritt am häufigsten während der mittleren S-Phase auf, da hier die Menge an sich replizierender DNA am höchsten ist (54) und eine intakte homologe Sequenz auf dem Schwesterchromatid benötigt wird (55). Der Beginn für die homologe Rekombination (HR) ist das Einwandern einer 3'-Einzelstrang-DNA in die homologe Duplex. Die Einzelstrang-DNA wird generiert aus den Enden des Doppelstrangbruchs (56) und kann als Nukleoproteinfilament mit Hilfe der Rekombinase Rad51 einwandern (57). Das einwandernde 3'-Ende dient als Startpunkt der Reparatur, wofür die intakte Doppelstrang-DNA-Helix als Schablone dient. Schlussendlich wird der eingewanderte Strang (D-Loop) wieder gelöst (53) und der Vorgang mit einer Ligation beendet (58), wobei Crossover- oder Non-Crossover-Formationen entstehen können (53). Die homologe Rekombination ist meist fehlerfrei (57), präziser und dauert länger.

Klassisches nicht-homologes Endjoining kann während des gesamten Zellzyklus stattfinden, v. a. aber während der G₁/G₂-Phase (54). Hier werden die gebrochenen glatten DNA-Enden verbunden, ohne dass zuvor längere komplementäre Sequenzen gebildet werden und damit unabhängig von der Homologie der Basensequenz. Dazu werden mehrere Kofaktoren benötigt. Ku70/80 und die DNA-PKcs binden an die glatten DNA-Enden des Doppelstrangbruchs, um beide Bruchstücke anzunähern und einen Abbau zu vermeiden. Die Enden werden durch eine Entfernung von DNA mit Hilfe des Artemis-DNA-PKcs-Komplexes und einem anschließenden Auffüllen der Lücken durch Polymerasen gebildet. Die anschließende Ligation erfolgt durch die DNA Ligase IV (57). Meist entsteht keine exakte Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Sequenz (59). Dadurch ist diese Form der DNA-Reparatur unpräzise und damit anfälliger für Fehler (60), kann aber auch einfacher und schneller stattfinden.

1.3.3 Quantifizierung residueller γ H2AX-Foci, Potential und Limitationen

In Folge eines Doppelstrangbruchs kommt es zu subnukleären Umlagerungen, wobei γ H2AX Areale im Chromatin mittels Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert werden können und somit als quantifizierbares Signal eines

Doppelstrangbruchs dienen (61). H2A ist dabei neben H2B, H3 und H4 als Histonprotein Teil des Nukleosoms und dient als Oktamer der Anlagerung von 145 bis 147 bp (62). Die Modifikation der Chromatinstruktur spielt nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Transkription, sondern auch bei der DNA-Reparatur. Deren Destabilisierung z.B. in Folge eines Doppelstrangbruchs kann erkannt werden und über Chromatinmodifikationen weitere Reparaturmechanismen in die Wege leiten (61). H2AX ist dabei die auffälligste Histonvariante und hat einen Anteil von 2-25 % des gesamten H2A-Pools, abhängig von Zelllinie bzw. Gewebe (61). Durch Phosphorylierung wird aus H2AX γ H2AX in unmittelbarer Nachbarschaft des DNA-Doppelstrangbruchs (47, 63). Dieses markiert dann ein Areal von etwa 2×10^6 bp (47). Charakteristische lokale Modifikationen bzw. Relokalisationen von Proteinen, die einen DNA-Schaden anzeigen und sich z.B. mittels Immunfluoreszenz visualisieren lassen, werden Foci genannt (61).

Bezüglich der Kinetik der γ H2AX-Foci ist auf ihr sehr schnelles Erscheinen nach Strahlenexposition hinzuweisen. Bereits die Hälfte des Maximalniveaus ist nach einer Minute erreicht, ein Maximum nach etwa 10 min bis 30 min (47, 61, 64). Eine Dephosphorylierung ist im Gegensatz zur Phosphorylierung ein Marker für die abgeschlossene Reparatur des DNA-Schadens (65). Die Dephosphorylierung steht im Zusammenhang mit der Protein Phosphatase 2A (PP2A) bzw. einem Austausch der Histone (66). Das Verschwinden des Phosphorylierungssignals bedeutet auch ein Ende des Zellzyklusarrests und damit unter Umständen dessen Wiederaufnahme (67). Somit folgen die γ H2AX-Foci direkt der Kinetik des DNA-Doppelstrangbruchs (68).

Studien von Menegakis et al. konnten zeigen, dass der γ H2AX-Assay eine einfache, innovative und sensitive Methode ist, die Bildung und Rückbildung von Doppelstrangbrüchen nicht nur in Zellkulturen sondern auch in Gewebeproben zu quantifizieren (3, 47, 63, 69). Doppelstrangbrüche werden im Verhältnis 1:1 erkannt (70). Dabei zeigt sich eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der residuellen Foci und dem klonogenen Potential einer Zelle (71-73). Hierbei bietet der γ H2AX-Assay die Möglichkeit, ihn auf unterschiedliche genotoxische

Mechanismen wie Strahlen- aber auch Chemotherapie anzuwenden (74). γ H2AX wird allgemein anerkannt als konsistenter und quantitativer Marker von Doppelstrangbrüchen, auch unter Bedingungen, bei denen nur sehr wenige Doppelstrangbrüche auftreten wie beispielsweise bei geringer Strahlendosis (68). Durch die Bestimmung residueller γ H2AX-Foci bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen konnte so z.B. die Radiosensitivität von FaDu und SKX-Zellen (Plattenepithelkarzinom) vorhergesagt werden (72).

Aus translationaler Perspektive ist von besonderer Relevanz, dass die in-vitro Versuche auf ex-vivo Tumormaterial übertragen werden können. Im Rahmen von Operationen entnommene und untersuchte Tumore ließen sich anhand der residuellen γ H2AX-Foci in radiosensitive und radioresistente Tumore einteilen. Das Besondere hieran war, dass die Vorhersagen mit dem γ H2AX-Assay sich gut mit der klinischen Erfahrung hinsichtlich der Radiosensitivität dieser Tumore deckten. So gehören die bekanntermaßen mit sehr geringen Strahlendosen kurierbaren Seminome zu den Tumoren mit den meisten residuellen γ H2AX-Foci (3, 38). Operationspräparate wurden hierbei als Versuchsgewebe verwendet. De-Colle et al. konnten in angeschlossenen Versuchen derselben Arbeitsgruppe an Prostatagewebe (Operationspräparate und Feinnadelbiopsien) zeigen, dass die Heterogenität des Prostatakarzinoms zwischen unterschiedlichen Patienten größer ist als die Heterogenität des Tumors eines Patienten an unterschiedlichen Lokalisationen (75).

Die Erzeugung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen hängt neben der intrinsischen Radiosensitivität jedoch auch vom Tumormikromilieu ab. Hierbei spielt der Oxygenierungsstatus des Gewebes eine zentrale Rolle (35). Die Anzahl der γ H2AX-Foci erwies sich in sauerstoffreichem Gewebe bis zu dreimal höher als in Gewebe, das schlecht mit Sauerstoff versorgt war (69). Als klinische Bestätigung hierfür dienen Studien, die zeigen konnten, dass Tumorphoxie, die z.B. mit einem F-Misonidazol PET-CT im Kopf-Hals-Bereich detektiert wird, mit einer schlechteren Prognose nach Radiochemotherapie einhergeht (76, 77). Hypoxie führt zu einer veränderten Genexpression und einem aggressiveren Tumorphänotyp (78). Pimonidazol erlaubt die Detektion von hypoxischem

Gewebe in histologischen Schnitten und konnte auch als prognostischer Biomarker nachgewiesen werden (79). Zudem konnten Menegakis et al. zeigen, dass bereits eine geringe Herabstufung der Sauerstoffversorgung zu einer Abnahme in der Anzahl der Foci und damit zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit des Zelltods führt (80).

Als Limitation der Methode ist zu beachten, dass nicht alle γ H2AX-Foci Doppelstrangbrüchen entsprechen (80). Dies ist darin begründet, dass die Aktivierung der DNA-Reparatur-Antwort (DDR) nicht unbedingt von einem DNA-Schaden abhängt, sondern bereits eine verlängerte Bindung von Reparaturproteinen am Chromatin ausreichend ist (81). Aufgrund der Signalausbreitung und -modifikation der γ H2AX-Foci und der damit verbundenen Immunfluoreszenzanalyse werden nicht alle benachbarten Foci phosphoryliert (61). Darüber hinaus variiert der Anteil von H2AX im Nukleosom zwischen den unterschiedlichen Zelllinien wie Lymphozyten und Gliomzellen, wobei die Ursachen dafür noch nicht gänzlich geklärt sind (82). Weiterhin sind γ H2AX-Foci nicht nur durch Radiotherapie, sondern auch durch zellulären Stress wie Hypoxie, endogenen Stress oder hyperosmotische Bedingungen induzierbar (40). Schlussendlich ist auf die Abhängigkeit des γ H2AX-Assays von den Phasen des Zellzyklus hinzuweisen (40, 83).

Trotz dieser Limitationen ist der γ H2AX-Assay eine vielversprechende Möglichkeit, die Radiosensitivität von Tumorzellen in vitro und ex vivo zu untersuchen (3, 84). Er gilt als so sensitiv, dass bereits einzelne Doppelstrangbrüche detektiert werden können (40).

1.4 Ziel der Studie

Trotz mehrerer prospektiver randomisierter Phase-III-Studien (85-88) zur multimodalen Therapie zum Ösophaguskarzinom ist die Festlegung der optimalen Therapie für den einzelnen Patienten oft herausfordernd. In Tumorkonferenzen werden folgende Fragen häufig diskutiert:

- Sollte ein Patient mit einem Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs mit einer perioperativen Chemotherapie oder

Radiochemotherapie behandelt werden? Studien konnten eine Verbesserung des Überlebens durch beide Therapien im Vergleich zu einer alleinigen Operation zeigen.

- Benötigt ein Patient mit einem Plattenepithelkarzinom des oberen und mittleren Ösophagus überhaupt eine Operation nach einer neoadjuvant intendierten Radiochemotherapie? Bei ca. 30 % der Patienten der CROSS-Studie lässt sich im Rahmen der Operation nach einer Radiochemotherapie kein vitaler Tumor mehr nachweisen; die Morbidität und Mortalität nach dem Eingriff bleibt allerdings beträchtlich (89).
- Welche Bestrahlungsdosis ist erforderlich, wenn eine definitive Radiochemotherapie bei Tumoren des oberen Aerodigestivtrakts erfolgt?

Die hier gestellten Fragen sind von höchster klinischer Relevanz und es liegt zweifelsohne ein „unmet medical need“ vor. Ein Biomarker, der das Ansprechen auf die zur Verfügung stehende Therapieoptionen frühzeitig vorhersagen könnte, wäre ein großer Fortschritt. In diesem Kontext erscheint die Bestimmung von residuellen Doppelstrangbrüchen über γ H2AX-Foci ein vielversprechender Ansatz. Zum einen kann das Gewebe bei den gegenständigen Tumorentitäten mit verhältnismäßig geringem Aufwand endoskopisch gewonnen werden, zum anderen ist das Ergebnis der Untersuchung frühzeitig vorliegend, um rechtzeitig Therapieentscheidungen treffen zu können. Zudem konnten vorangegangene Studien zu γ H2AX an operativ gewonnenen und ex-vivo bestrahltem Tumorgewebe nachweisen, dass auf diesem Wege unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten detektiert werden können (90). Ebenso konnte das Prinzip auch an Biopsien aus Prostatatumoren bestätigt werden (91).

Es werden daher folgende Hypothesen aufgestellt:

- 1) Mit dem γ H2AX-Assay lassen sich auch bei routinemäßig gewonnenen Biopsien aus prätherapeutischen Endoskopien des oberen Aerodigestivtrakts ex-vivo erzeugte Doppelstrangbrüche detektieren.
- 2) Der γ H2AX-Assay ist geeignet, Unterschiede in der Radiosensitivität zwischen unterschiedlichen Tumoren desselben histologischen Subtyps

am Beispiel von Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakts zu detektieren.

- 3) Der γ H2AX-Assay ermöglicht, Unterschiede der Radiosensitivität zwischen Histologien nachzuweisen. Dazu eignet sich der gastroösophageale Übergang besonders gut, um Aussagen über die heterogene Radiosensibilität von Plattenepithel- gegenüber Adenokarzinomen machen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Technische Geräte	Hersteller
Axio Imager Z1 Apotome florescence microscope	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany
Hiclave HV-25 L	HMC Europe GmbH, Germany
Inkubator Heracell 240	Thermo Fischer Scientific Inc., USA
Kühlschrank	Liebherr Comfort, Germany
Laborabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & CoKG, Germany
Labormarker	Marienfeld, Germany
Lichtmikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany
Linearbeschleuniger LinacG	Elekta, Sweden
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Germany
Monochrome digital camera (AxioCamMRm)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany
Motorized scanning stage (400x, EC Plan Neofluar)	Märzhäuser Wetzlar GmbH&Co.KG, Germany
Nanozoomer 2.0 HAT	Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan
Ofen OV1000	Analytik Jena AG, Germany
Präzisionswaage	Sartorius Weighing Technology GmbH, Germany
Shandon Cytospin III Zytozentrifuge	Thermo Fischer Scientific Inc., USA

Small-Animal Image-Guided Radiotherapy (SAIGRT 02)	OncoRay National Center for Radiation Research in Oncology, Germany
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Germany
Tiefkühlgerät	Liebherr Comfort, Germany
Vortexer RS-VA10	Phoenix Instrument, Germany
Waage Kern510	Kern&Sohn GmbH, Germany
Wärmeplatte MR3001	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany
Wärmewasserbad HaakeP21	Thermo Haake, Germany
Wasserbad Typ 1052	GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Germany
Zentrifuge	Eppendorf AG, Germany

2.1.2 Labor-Gerätschaften

Labor-Gerätschaften	Hersteller
Chirurgische Pinzette	BD027R, B. BRAUN, Aesculap, Germany
Deckgläschen	R. Langenbrinck GmbH, Germany
Einbettkassette	Engelbrecht GmbH, Germany
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Germany
Falkonröhrchen	Sarstedt AG&Co.KG, Germany
Färbeeinsatz aus rostfreiem Edelstahl	Carl Roth GmbH & Co.KG, Germany
Färbegestell aus Glas	Carl Roth GmbH & Co.KG, Germany
Filterkarten (Shandon CytoSpin III)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Handschuhe	Abena, Denmark
Hitzeresistente Handschuhe	W+R, Pioneering glove technology, Germany
KimTech Science Labortücher	Kimberly-Clark Professional, UK
Laborflasche Duran	neoLab Migge GmbH, Germany
Labormarker Marienfeld	R. Langenbrinck GmbH, Germany
Microscope KP Frost Slides blue	Klinipath BV, Netherlands
Microscope Slides	R. Langenbrinck GmbH, Germany
Mikrotom HM430	Microm GmbH, Walldorf, Germany
Mikrotom-Klinge	Feather Safety Razor CO., LTD., Japan
Neubauer Improved Einwegzählkammer	Merck KGaA, Germany
Petrischalen	Corning Incorporated–Life Sciences, USA
Pipette	Eppendorf AG, Germany

Pipettenspitze	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Pipettierhilfe PIPETBOY comfort	Integra Bioscience, Switzerland
Skalpell	FEATHER Safety Razor Co., Japan
Slide Box HS 15994B	Heathrow Scientific, USA
Stripette	Corning Incorporated–Life Sciences, USA
Super Pap pen	Life Technologies, USA
TC-Flasche T25	Sarstedt AG&Co.KG, Germany
Tomo IHC Adhesive Glass Slide	Matsunami Glass Ind., Japan

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
40,6-diamidino2-phenylindole (DAPI)	Sigma Aldrich Co., USA
AEC-Kit	Sigma–Aldrich, Germany
Agarose A9539	Sigma–Aldrich, Germany
Aluminium potassiumsulfate dodecahydrate	Merck KGaA, Germany
ArkTM kit (animal research kit)	Dako Deutschland GmbH, Germany
Chloral hydrate	Merck KGaA, Germany
Citric acid monohydrate	Merck KGaA, Germany
Dako Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako North America, Inc., USA
Dulbecco´s MEM (DMEM)	Biochrom GmbH, Germany
Ethanol 99 %	SAV Liquid Production GmbH, Germany
Fetal Bovine Serum	Biochrom GmbH, Germany
Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Germany
Formaldehyd 4 % in PBS	Affymetrix, USA
Hematoxylin crystals	Sigma Aldrich Co., USA
HEPES-Buffer	Biochrom GmbH, Germany
Hydrogen peroxide 30 %	Merck KGaA, Germany
K ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co.KG, Germany
KCl	Carl Roth GmbH & Co.KG, Germany
Mikroskopieröl	
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	AppliChem GmbH, Germany
NaCl	VWR Chemicals International, Germany
NiCl ₂	Sigma Aldrich Co., USA
Non-essential amino-acids	Biochrom GmbH, Germany
Penicillin/Streptomycin	Life technologies (Gibco), USA
Sodium iodate	Sigma Aldrich Co., USA

Sodium Pyruvate	Biochrom GmbH, Germany
Steriles PBS	Biochrom GmbH, Germany
Tri-Sodium citrate dehydrate	VWR Chemicals, USA
TritonX100	Sigma Aldrich Co., USA
Trypsin	Sigma Aldrich Co., USA
Tyramid Signal Amplification kit (TSA Kit)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
Vectastain elite ABC kit PK-6102, Mouse IgG	Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 USA
Wundbenzin SAV, UN1268	SAV LP GmbH, Germany
Xylol 98,7 %	VWR Chemicals, USA

2.1.4 Lösungen

DMEM	Fetal Bovine Serum (10 %)	58 ml
	Non-essential amino acids (1 %)	5,8 ml
	HEPES-Buffer (2 %)	11,6 ml
	Sodium-Pyruvate (1 %)	5,8 ml
	Penicillin/Streptomycin (1 %)	5,8 ml
	DMEM	500 ml
PBS	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	14,4 g
	KCl	2 g
	K ₂ HPO ₄	2 g
	H ₂ O (destilliert)	10 l
Flask A	Citric acid monohydrate 0,1 M	21,01 g
	H ₂ O	1 l
Flask B	tri-Sodium citrate dehydrate	29,44 g
	H ₂ O	1 l
Hämatoxylin	Sodium iodate	0,2 g
	Hematoxylin crystals	1 g
	Citric acid monohydrate 0,1 M	1 g
	Chloral hydrate	50 g
	Aluminium potassiumsulfate dodecahydrate	50 g

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller
BRDU (Clone Bu20a)	Dako Deutschland GmbH, Germany
Pimonidazol	Natural Pharmacia International, Belmont, USA
γ H2AX (phospho Ser 139)	Merck Millipore, Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Ethikvotum

Die Studie zur Bestimmung der intrinsischen Radiosensitivität von Ösophaguskarzinomen anhand der Untersuchung residueller Doppelstrangbrüche nach ex-vivo Bestrahlung prätherapeutischer Gewebeproben wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (057/2017B02) genehmigt. Alle Patienten gaben ihr Einverständnis zur Verwendung von Biomaterial, das im Rahmen von klinischen Routineprozeduren gewonnen wurde. Es erfolgten keine zusätzlichen Endoskopien oder Operationen für die Gewinnung des Biomaterials. Weitere im vorliegenden Experiment untersuchte Proben (#ZPM3, 4, 6) stammen aus der „ZPM-Studie“ und sind durch das Ethikvotum 025/2015 abgedeckt. Eingeschlossen wurden Patienten mit Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen (einschließlich Magen).

2.2.2 Vorbereitung

Die Petrischalen werden mit Agar befüllt und können mehrere Monate bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt werden. Dazu wird eine 1,5 prozentige Agaroselösung vorbereitet, wobei jede Petrischale mit einem Durchmesser von 3,5 cm mit 1 ml Agaroselösung befüllt wird. Für 200 Petrischalen werden somit 3 g Agar und 200 ml DMEM-Medium benötigt. Ist das Agar vollständig im Medium gelöst, wird die entstandene Lösung 3 h bei Programm 1 (20 min bei 121 °C, danach Abkühlung auf 50 °C) autoklaviert. Die Lösung wird auf eine 100 °C heiße Platte gestellt, um ein Stocken der flüssigen Masse zu verhindern. Nun wird jeweils 1 ml Agarosemasse pro Petrischale unter sterilen Bedingungen durch leichtes

Schwänken gleichmäßig auf dem Boden verteilt. Die befüllten Petrischalen müssen nun 30 min trocknen, bevor sie in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Box im Kühlraum bei 5 °C gelagert werden.

Als Bestandlösung zur Probensammlung wird die DMEM-Lösung verwendet. Proliferative Tumorareale sollen mit BrdU (Bromdesoxyuridin), hypoxische Tumorareale mit Pimonidazol markiert werden. Bezüglich des verwendeten Volumens wird mit 3 ml Medium pro Petrischale kalkuliert. Aus einer 1%igen Stammlösung (100 mg Pimonidazol-Hydrochlorid (Pulver) plus 10 ml DMEM-Medium) wird ein Medium mit einer endgültigen Pimonidazol-Konzentration von 2,9017 µg/ml erstellt. Aus einer 1%igen Stammlösung (1000 mg BrdU (Pulver) plus 100 ml DMEM-Medium) wird ein Medium mit der BrdU-Konzentration 1,5355 µg/ml erstellt. Der Zusatz von BrdU und Pimonidazol ist für die anschließende immunhistochemische Färbung von Nöten.

2.2.3 Probensammlung

Proben, die von der Zentralen Endoskopie der Universitätsklinik Tübingen gewonnen werden, werden unmittelbar nach Entnahme (binnen Sekunden) in das Medium gegeben. Die Probe (Biopsien aus der zentralen Endoskopie bzw. OP-Präparate aus dem Schnellschnittlabor der CRONA-Kliniken Tübingen) wird sofort nach Entnahme in 10 ml DMEM-Nährmedium in ein 15 ml Falcon-Tube gegeben. Nun ist es möglich, die Probe etwa 30 min bei 37 °C in einem Inkubationsschrank aufzubewahren.

Danach erfolgt der erste Wechsel des Nährmediums. Die folgenden Schritte finden unter sterilen Bedingungen statt. Zur Vorbereitung wird steriles PBS und das DMEMcomplete Nährmedium 15 min lang in einem 37 °C Wasserbad erwärmt. Während dieses Schritts erfolgt die Beschriftung der Petrischalen wie folgt: Öso/ZPM ..., Datum, 0/(2)/4/(6)/8 Gy. Sodann wird die Probe mit einer sterilen Pinzette in eine Petrischale mit sterilem PBS überführt, um sie grob zu waschen. Anschließend folgt die Aufteilung der Gewebeprobe in mindestens drei Probenstücke mit Hilfe einer Pinzette und Skalpell, sofern nicht bereits drei Proben aus der Endoskopie vorliegen. Allgemein ist ein Quetschen des Gewebes

zu vermeiden, um die Gefahr von Hypoxie- und Nekrosearealen zu minimieren. Es hat sich als günstig erwiesen, mindestens drei Biopsien zu verwenden, um die Bearbeitung zu erleichtern, eine bessere Schonung des Gewebes zu erreichen und die Wahrscheinlichkeit auf klar erkennbare Tumorareale in der Histologie zu erhöhen. Bei OP-Präparaten sollte der Durchmesser der Probe nicht mehr als etwa 5 mm betragen, um eine vollständige Ernährung des Gewebes mit Hilfe von Osmose und Diffusion über die nächsten 48 h zu ermöglichen und dadurch zentrale Nekrosen zu vermeiden. Weiterhin sollte BrdU und Pimonidazol möglichst weit in das Gewebe hinein diffundieren können. Nach dem Waschen und Zerkleinern der Gewebestücke werden sie auf die bereits beschrifteten Petrischalen, die mit Agar befüllt sind, übertragen. Das größte Gewebestück sollte in die 0-Gy-Schale gelegt werden, um später eine möglichst verwertbare Referenz zu haben. Nun werden 3 ml DMEM-Nährmedium pro Petrischale auf die Probe pipettiert. Ist das Gewebestück zu groß (wie bei OP-Präparaten) und noch nicht vollständig bedeckt, können auch 4 ml Nährmedium verwendet werden. Das Überlaufen des Nährmediums wurde stets vermieden. Es wurde großer Wert darauf gelegt, eine mögliche Kontamination mit Alkohol zu verhindern und sterile Bedingungen zu gewährleisten. Um ein Austrocknen der Probe konsequent zu verhindern, ist eine vollständige Bedeckung mit Nährmedium bzw. PBS zwingend notwendig. Abschließend wird das Gewebe bei 37 °C 20 h lang inkubiert.



Abbildung 1: ex-vivo-Probenmaterial von #Öso21 nach 20 h Inkubation bei 37 °C;
 Bild oben: Darstellung dreier Petrischalen mit Tumorgewebe (#Öso21/2“) nach der Bestrahlung mit der Dosis 0 Gy, 4 Gy, 8 Gy; Bild Mitte: Petrischalen mit Normalgewebe („N“), die nicht bestrahlt wurden; Bild unten: im Gegensatz zu den Normalgewebeproben zeigt sich in den Tumorproben (#Öso21/2) eine deutliche Gelbfärbung des Nährmediums; dies dient als Hinweis einer erhöhten Stoffwechselaktivität im Tumorgewebe;

Der nächste Nährmediumwechsel erfolgt nach 20 h. Dazu wird das mit Pimonidazol und BrdU versetzte Nährmedium verwendet, das auch 15 min im 37 °C Wasserbad vor Verwendung erwärmt wurde. Unter sterilen Bedingungen wird das DMEM-Nährmedium komplett abgesaugt, ohne die Probe oder den Agar-Nährboden zu beschädigen. Pro Schale wird eine neue Stripette verwendet, um ein mögliches Verschleppen von Keimen zu verhindern. Es werden 3 ml des angewärmten Nährmediums (jetzt mit Pimonidazol und BrdU) pro Petrischale aufpipettiert. Die Probe muss wieder vollständig bedeckt sein. Es folgt ein weiterer 4 h dauernder Inkubationsschritt bei 37 °C.

Die Bestrahlung erfolgt bei Raumtemperatur am „SAIGRT02“ (bei 200 kV und 15 mA), wobei die Dosis laut Bestrahlungsplan 2 Gy pro 59 sec beträgt. Je nach Verfügbarkeit des SAIGRT wurde alternativ mit Einzeldosen von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy auch an einem konventionellen Linearbeschleuniger (6 mV) mit einer Dosisrate von 4 Gy/min bestrahlt. Eine homogene Bestrahlung des gesamten Gewebestücks wurde durch das Auflegen einer 1 cm dicken RW3-Platte erreicht. Die Bestrahlung erfolgte in der open-field-Einstellung (92). Nach Bestrahlung wird sofort das Nährmedium gewechselt. Nach Absaugen des Nährmediums mit Pimonidazol und BrdU werden wieder 3 ml Nährmedium (DMEMcomplete) hinzugefügt. Die vollständig bedeckte Patientenprobe wird nun 24 h bei 37 °C inkubiert. Noch am Bestrahlungstag werden die Einbettkassetten mit einem Formaldehyd festen Stift beschriftet. Nach 24 h erfolgt die Probenfixierung in Einbettkassetten unter einem Abzug. Zunächst wird die Probe zur Säuberung mit einer sterilen Pinzette in eine mit Formaldehyd gefüllte Petrischale gegeben. Nun wird die Probe vorsichtig mit der Pinzette von der Petrischale in die Plastikkassette überführt. Diese wird geschlossen und in ein mit Formaldehyd gefülltes Plastikgefäß gegeben. Sollte die Probe beispielsweise als Biopsie oder nur halbe Biopsie zu klein sein, wurde die Pinzette durch eine kurz abgeschnittene 1 ml Pipettenspitze zum Ansaugen und Übertragen der Probe ersetzt. Im Rahmen des Ösophagus-Projekts ist vorsichtiges Gewebe-Management zwingend erforderlich, um im späteren Versuchsablauf die malignen Veränderungen der Schleimhaut noch beurteilen zu können. Nach Überführung der Probe in das mit Formaldehyd befüllte Plastikgefäß wird das

Gewebe mindestens 48 h vor Einbettung in Paraffinwachs in der Pathologie bei Raumtemperatur in Formaldehyd belassen.

2.2.4 Schneiden

Aus den in Paraffin eingebetteten Proben werden 2,5 bis 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Von jeder Probe wurden drei konsekutive Schnitte hergestellt (zur Hämatoxilin-Eosin-Färbung, Immunhistochemie-Färbung und Immunfluoreszenz-Färbung). Die Beschriftung der Objektträger erfolgte wie folgt: Probennummer, Bestrahlungsstufe, Färbedatum und Art der Färbung. Das Schneiden der Proben erfolgte in Eigenregie an einem Microtom des strahlenbiologischen Labors, in Ausnahmefällen durch das Personal des Schnellschnittlabors an einem Microtom der Pathologie. Um eine Ablösung des Gewebes von den Objektträgern bereits im Rahmen der Deparaffinisierung zu vermeiden, sollten Adhäsionsobjektträger verwendet werden.

2.2.5 Färben

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung erfolgte zur Definition von Tumorarealen, CIS (Carcinoma in situ) oder Dysplasieanteilen. Vor Beginn der Färbung werden die Proben in Färbereinsätze gestellt und über Nacht (etwa 10 h) bei 37 °C in einem Ofen getrocknet.

Um die Proben in einen Zustand zu versetzen, der sowohl eine Immunhistochemie- als auch Immunfluoreszenz-Färbung ermöglicht, werden die Schnitte mit Hilfe von 100 % Xylol deparaffinisiert. Die Proben werden dreimal in einer Abfolge von 10 min von einem Xylolbad in das darauf folgende versetzt. Daraufhin wird die Rehydrierung der Proben durch eine Verdünnungsreihe mit Alkohol (100 % x 2, 96 %, 80 %, 70 %, 40 % à 3 min) erreicht. Um die Epitope der Zelle für die anschließende Färbung aufzuschließen, werden die Proben in einem Bad mit einer Citrat-Puffer-Lösung 30 min bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Zur Erstellung von 1 L Citrat-Puffer werden 18 ml der Lösung A (enthält 21,01 g gelöstes 0,1 molares Zitronensäuremonohydrat in einem Liter destilliertem Wasser) und 82 ml der Lösung B (enthält 29,44 g gelöstes

Tri-Natrium Citrat Dehydrat in einem Liter destilliertem Wasser) zu 900 ml destilliertem Wasser gegeben. Nach der Mikrowelle werden die Proben mindestens 15 min auf Eis gekühlt und danach in PBS überführt. Anschließend werden die Gewebestücke mit einem Fettstift als Areal deutlich eingekreist, ohne die Probe dabei austrocknen zu lassen.

Allgemein wird im Folgenden mit einer applizierten Menge von 100 µl Lösungsvolumen pro Objektträger gerechnet.

2.2.5.1 Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Färbung wird zunächst die Peroxidase-Aktivität mit einem Peroxidase-Block beendet, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben des ARK-Kits wird der primäre **BrdU-Antikörper** vorbereitet. Dieser dient der Markierung proliferierender Zellareale (93). Dazu wird zunächst der primäre Antikörper in einer 1:50-Verdünnung zu einem Reagenz gegeben, das der Biotinylierung, d.h. der spezifischen Markierung von Molekülen in der DNA, dient (94). Diese beiden Reagenzien werden in PBS gelöst. Nach 15 min wird eine weitere Lösung zum Blocken (blue reagent) dazugegeben, die 5 min bei Raumtemperatur belassen wird. Nun wird diese BRDU-Antikörper-Lösung auf die Objektträger mit der Pipette appliziert. Die Lösung, die den BRDU-Antikörper enthält, wird 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird ein Komplex aus Streptavidin und Peroxidase auf die Proben gebracht, der der Stabilisierung des Proteins dient und eine antimikrobielle Komponente enthält. Um die hergestellte Proteinbindung sichtbar zu machen, wird ein Farbenerzeuger in Form von DAB (3,3'-diaminobenzidine-chromogen-solution) auf die Proben aufgebracht. Dies stellt sich als Braunfärbung an der Antigen-Bindungsstelle dar (95).

Als Hypoxiemarker wird **Pimonidazol** verwendet, der mit Hilfe des Vectastain-elite-ABC-Kits appliziert wird. Auch hier wird zum Einstieg ein Puffer verwendet, der die Peroxidase-Aktivität beenden soll, nun allerdings in einer 0,3%igen Konzentration. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird Serum hinzugefügt, das wieder auf das Blocken unspezifischer Bindungen

abzielt. Enthalten sind drei Tropfen des Serums, die in 10 ml PBS gelöst werden. Die Lösung wird 30 min bei Raumtemperatur auf der Probe belassen. Im folgenden Schritt wird der primäre Antikörper (in diesem Fall anti-Pimondazol) appliziert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zwischen beiden Schritten ist kein Waschschrift zu vollziehen. Der Antikörper wird im Verhältnis 1:100 im zuvor hergestellten Blocking-Serum gelöst. Nach einem Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird ein biotinylierender Antikörper auf die Objektträger appliziert. Dazu werden in 10 ml PBS drei Tropfen Serum und ein Tropfen biotinylierender Antikörper hinzugegeben. Diese Mischung bleibt 30 min lang bei Raumtemperatur auf den Proben. Nach Applikation des biotinylierenden Antikörpers kann sofort das ABC-Reagenz vorbereitet werden, das 30 min lang vor Applikation in einem 12 ml Falcon vorreagieren soll. Dazu werden in 5 ml PBS jeweils zwei Tropfen Reagenz A und Reagenz B miteinander gemischt, die einen stabilen makromolekularen ABC-Komplex bilden und an aktive Enzyme binden sollen (96). Nach einem Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird das vorbereitete ABC-Reagenz auf die Objektträger appliziert und 30 min bei Raumtemperatur dort belassen (96).

Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 5 min) kommt der AEC-Chromogen-Kit zur Anwendung, der sich 20 min auf der Probe befinden soll. Hier wird eine Lösung hergestellt, die Peroxidase enthält und einen Farbstoff bilden soll. Dazu wird zu 4 ml destilliertem Wasser zwei Tropfen Acetat Puffer (2.5 M, pH 5.0), ein Tropfen dreiprozentiges Hydrogenperoxid und erst kurz vor Applikation ein Tropfen AEC-Chromogen (3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in N,N-dimethylformamide) beigegeben (97). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird Hämatoxin 1-2 min lang auf die Proben gegeben und anschließend zweimal für 10 sec in Leitungswasser abgewaschen. Um die Proben nach der immunhistochemischen Färbung nun zu fixieren, werden ein bis zwei Tropfen Dako-Faramount-Mounting-Medium verwendet und ein Deckgläschen möglichst ohne Blasenbildung vorsichtig aufgelegt. Die Objektträger wurden bei 4 °C bis zur Erstellung der Bilder gelagert.

2.2.5.2 Immunfluoreszenz

Zu Beginn der Immunfluoreszenzfärbung wird die Aktivität der endogenen Peroxidase mit Hilfe von dreiprozentigem Hydroxidperoxid gestoppt, wobei es 60 min auf der Probe belassen wird. Um γ H2AX zu detektieren, wird gemäß der Herstellerangaben der TSATM Kit T20912 verwendet, der IgG anti mouse enthält. Im folgenden Schritt werden unspezifische Bindungen durch das Blocking Reagenz blockiert. Um ein 1%iges Mischungsverhältnis zu erhalten, werden 10 mg des festen Pulvers pro ml PBS gelöst. Diese Lösung kann nicht in der bereits gelösten Version eingefroren und zur nächsten Färbung abermals verwendet werden, sondern muss bei der Färbung direkt gemischt und auf die Proben gebracht werden. Pro Färbung wird es in drei Schritten verwendet. Zunächst werden die Proben, sorgsam mit Blocking-Reagenz bedeckt, 60 min lang bei 37 °C inkubiert. Ohne Waschschrift wird nun der Primärantikörper für 60 min auf die Probe gebracht. Dazu wird anti- γ H2AX (Isotyp: Maus-IgG1, monoklonal) im Verhältnis 1:1000 im Blocking Reagenz gelöst. Nach einem Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird HRP (horseradish peroxidase) als sekundärer Antikörper, im Verhältnis 1:100 in Blocking-Reagenz gelöst und auf die Proben gebracht. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) wird das Tyramid als „Farbstoff“ auf die Proben gebracht, wobei ab diesem Schritt in absoluter Dunkelheit gearbeitet werden muss. Zur Herstellung der Tyramid-Lösung ist ein Zwischenschritt von Nöten, um eine Hydroxidperoxidkonzentration von 0,0015 % zu erreichen (dieser Schritt wird am Beispiel von 25 Objektträgern vorgerechnet, was bedeutet, dass man insgesamt 2500 μ l an Arbeitsvolumen schlussendlich benötigt). Dabei wird zunächst 1 μ l H_2O_2 in 200 μ l Puffer gelöst (jetzige Konzentration von H_2O_2 ist 0,15 %) und dann aus dieser Lösung 24,7 μ l in ein separat vorbereitetes Eppendorf-Cup pipettiert. Dazu werden weitere 2450,3 μ l des zuvor verwendeten Puffers gegeben, wodurch eine Konzentration von 0,0015 % Hydroxidperoxid erreicht wird. Dieses separate Eppendorf-Reaktionsgefäß wird mit 25 μ l Tyramid aufgefüllt. Die so entstandene Lösung wird 10 min auf der Probe bei Raumtemperatur belassen (98). Nach einem Waschschrift (3 x 5 min) werden die Zellkerne mit 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), in einem Mischungsverhältnis 1:1000 in PBS gelöst, gegengefärbt, wobei DAPI 10 min auf den Proben bei Raumtemperatur bleibt. Nach einem weiteren

Waschschritt mit PBS (3 x 5 min) werden die Objektgläschen unter Einsatz eines Fluoreszenzklebstoffs („fluorescent mounting medium“) ohne Blasenbildung aufgebracht und bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

2.2.5.3 Zytokeratinfärbung AE1/AE3

Häufig wachsen Adenokarzinome des Ösophagus oder Magens diskontinuierlich und damit nicht als homogene Zellverbände, was die Definition von Tumorarealen und Abgrenzung zu nicht-tumorösen Zellen wie Makrophagen im HE-Schnitt erschwert. Dieser Fall trifft auch für das hier durchgeführte Projekt unter anderem wegen der großen Anzahl an Adenokarzinomen zu. Deshalb wird eine Panzytokeratinfärbung verwendet, wobei ein Gemisch aus zwei Antikörpern gegen saure und basische Zytokeratine AE1/AE3 zum Einsatz kommen (99). Diese Färbung ist am pathologischen Institut der Universität Tübingen etabliert.

2.2.6 Funktionskontrolle der Agentien mit UT-SCC-45-Zellen

Ziel der Färbung von Zelllinien ist die Funktionskontrolle des verwendeten ARK-Kits und des Antikörpers γ H2AX sowie die Überprüfung der Methode und Arbeitsweise. Verwendet wurde der Zellstamm UT-SCC-45. Dabei handelt es sich um Plattenepithelkarzinomzellen mit hoher Radioresistenz (78, 100), die von einem Primärtumor des Mundbodens extrahiert wurden (101). Bestrahlt wurden die Zellen bei 0 Gy, 2 Gy und 6 Gy am SAIGRT02. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen trypsinisiert, d.h. der Zellverband wurde durch die Protease Trypsin aufgelöst und damit eine Einzelzellsuspension erstellt. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung mit einer Zählkammer. Dies dient dem Ziel, näherungsweise 400.000 Zellen pro neues Gefäß zu erreichen. Nach einem Zentrifugationsschritt (20 °C, 1200 rpm, 5 min) wurde der Überstand entfernt und 5 ml PBS hinzugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20 °C, 1200 rpm, 5 min) wurde abermals der Überstand abpipettiert und das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Nach Vereinzeln der Zellen wurden 50.000 Zellen pro Punkt auf einem Objektträger mit dem Cytospin zentrifugiert (20 °C, 250 rpm, 2 min) und in vierprozentigem Formaldehyd 15 min lang fixiert. Nach Waschen mit PBS (3 x 3 min) wird die zuvor 15 min lang vorbereitete TritonX100-Lösung (Konzentration 0,1 %) auf die Zellen gebracht und dort 5 min lang belassen. Dies

dient der Reinigung der Zellpellets von Membranproteinen, ohne die native Konformation der DNA zu ändern oder zu denaturieren. Anschließend wird in zwei aufeinander folgenden Schritten Triton X100 abgewaschen und für jeweils 5 min inkubiert. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift mit PBS können die Zellareale mit einem Fettstift nach Abtrocknen der Objektträger markiert werden. Die weiteren Schritte der Immunfluoreszenzfärbung folgen exakt dem Protokoll des TSATM Kits T20912 (98). Auf eine immunhistochemische Pimonidazol-Färbung wurde bei dem Zellversuch verzichtet, da keine Hypoxieareale in Zellkulturen vorhanden sind. Zur Darstellung der Mittelwerte der residuellen γ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung wird ein Säulendiagramm verwendet. Die Rohwerte aller ausgewerteter Nuclei werden in einem Punktdiagramm abgebildet und daraus eine Regressionsgerade gebildet.

2.2.7 Induktionsversuch

Dieser Versuch soll die dosisabhängige Induktion von Doppelstrangbrüchen durch die Radiatio belegen. Als Material dient Gewebe eines siegelringzelligen Magenkarzinoms (#Öso21). Die Probe wird in sechs Fragmente aufgeteilt; drei Proben werden 30 min nach Bestrahlung mit 0 Gy, 4 Gy bzw. 8 Gy, die anderen drei Proben wie im bisherigen Versuchsablauf 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy, 4 Gy bzw. 8 Gy in Formalin fixiert. Ziel dieses Experiments ist es, nach 30 min die Induktion von γ H2AX-Foci und damit Doppelstrangbrüche in Folge der Bestrahlung nachzuweisen, die im Laufe der 24 h Kultivierung durch die Zellen repariert werden und damit zu einer Verminderung der γ H2AX-Foci in der zweiten Versuchsgruppe führen. Auch gesundes Magengewebe dieses Patienten wird 24 h nach Bestrahlung (0 Gy/4 Gy/8 Gy) in Formalin fixiert, um den Unterschied der Anzahl der γ H2AX-Foci zwischen Tumor- und Normalgewebe darzustellen. Eine Zytokeratinfärbung AE11/13 zur Definition von Tumorarealen erfolgt ebenfalls.

2.2.8 Bildakquisition

Zunächst wurden HE- und IHC-(Pimonidazol und BrdU)Bilder aller Proben unter Zuhilfenahme einer 3-chip TDI Digital-Farb-Kamera eines NanoZoomers 2.0 HT

und der Software NDP.view (Nanozoomer Digital Pathology) von Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan erstellt (75). Anhand dieser Bilder wurden Tumoreareale, die BrdU positiv (Braunfärbung) und damit vital waren, sowie normoxische Areale markiert, wobei diese Pimonidazol negativ waren, also nicht rot. Diese markierten Areale wurden zusammen mit erfahrenen Pathologen (Dr. med. Thorsten Biegner, Dr. med. Markus Scharpf, Dr. med. Dominik Nann) hinsichtlich ihres Tumorgehalts und Gewebezustands besprochen. Diese Areale wurden am Fluoreszenzmikroskop identifiziert. 17 Einzelbilder der Dicke 0,25 µm wurden pro Areal in Z-Richtung mit einer monochromen Digital Kamera (AxioCamMRm, Carl Zeiss, Jena, Germany; motorized scanning stage, Maerzhaeuser, Wetzlar, Germany, 400_, EC Plan Neofluar) am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Imager Z1 Apotome fluorescence microscope led) erstellt, wobei die Software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Jena, Germany) verwendet wurde.

2.2.9 Auswertung der Bilder

Es wurden möglichst ähnliche und vergleichbare Bilder hinsichtlich der Farbintensität und Bildqualität erstellt. Ausgewertet wurden die Bilder meist in der Einstellung „maximal intensity projection“; nur in Ausnahmefällen wurden die Einzelbilder gebraucht, z.B. zur Beurteilung der intra- oder extranukleären Lage der Foci oder zur Differenzierung zwei eng aneinander gelagerter Zellen. Bei der Belichtungszeit wurde die Einstellung „Set Exposure“ des Programms Zen 2.3 blue edition verwendet und als Belichtungszeit beibehalten. Dadurch variieren die Belichtungszeiten zwischen unterschiedlichen Patientenproben, aber gelegentlich auch zwischen den verschiedenen Proben eines Patienten stark. Die Objektträger wurden im Strahlengang für Dapi (blau) etwa 5 bis 15 msec und für GFP (grün) ungefähr 30 bis 150 msec lang belichtet. Bezüglich der Nachbearbeitung wird zunächst die Programmeinstellung „Best fit“ von Zen 2.3 blue edition verwendet und der Wert der Farbkanäle DAPI und GFP bei der Erstellung der Bilder der Gewebeproben eines Patienten im ähnlichen Rahmen belassen und notiert. Der γ -Wert wird bei allen Bildern bei 1,00 belassen. Zur Auszählung wurden die Bilder zweimal im jpeg-Format gespeichert, wobei ein

DAPI-Bild, das nur die Nuclei zeigt, und ein multi-Bild, das sowohl Nuclei als auch Foci zeigt, erstellt werden. Zur Auszählung der Bilder wird das Programm ImageJ 1.52a (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) verwendet. Geeignete Zellen werden im DAPI-Bild durch Umkreisung markiert und die Zellfläche vermessen. Dies dient der Objektivierung der Methode. Als geeignete Zellen werden Zellen mit rundem, großem Nucleus und homogener DAPI-Färbung befunden. Die markierten Areale werden auf das multi-Bild mit beiden Farben übertragen und dort die Anzahl der Foci (residuelle Doppelstrangbrüche) pro Zelle gezählt. Residuelle Foci sind als grüne Punkte markiert. Zellen mit komplett grünem Zellkern und damit starkem Hintergrund werden als ungeeignet befunden (102), da dies auf S-Phase, Nekrose oder Apoptose hindeutet. Es kann sich aber auch um andere Zelltypen (z.B. Lymphozyten) als die ausgewerteten Tumorzellen handeln.

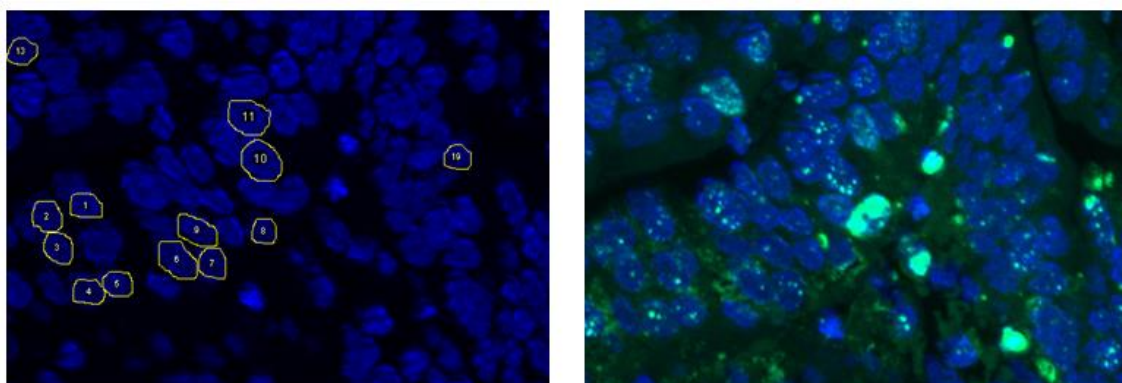


Abbildung 2: Dapi-Bild und komplementäres multi-Bild von #Öso7_8Gy_Bezirk1; markierte Zellen werden ausgewertet und γ H2AX-Foci gezählt; Zellen mit zu starkem Hintergrund (grün) werden nicht berücksichtigt;

Zur Harmonisierung der Ergebnisse wurde die Zählweise von Dr. med. Chiara de-Colle (Radioonkologie der Universitätsklinik Tübingen), die an den vorangegangenen Studien beteiligt war, supervidiert.

2.3 Statistik

Die Anzahl der korrigierten γ H2AX-Foci wird wie folgt kalkuliert. Zunächst wird die Kernfläche in Pixel nach Angaben des Programms Zen 2.3 blue edition in Kernfläche in μm^2 berechnet:

Kernfläche in $\mu\text{m}^2 = 0,161^2 \times \text{Kernfläche in Pixel}$

$$\text{Foci je Kernfläche} = \frac{\text{Anzahl Foci}}{\text{Kernfläche in } \mu\text{m}^2}$$

Die Anzahl der γH2AX -Foci wird auf den Mittelwert der Kernfläche in μm^2 normalisiert. Die ursprünglich gezählte Anzahl der γH2AX -Foci wird mit dem Wert der normalisierten Foci subtrahiert. Sollte das Ergebnis kleiner als 0 werden, wird es mit 0 gleichgesetzt. Diese Werte werden als korrigierte Foci bezeichnet.

Zur Erstellung der Abbildungen und Graphen wurde das Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.04 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) verwendet. Zur Quantifizierung der intrinsischen Radiosensibilität wurde die Steigung einer linearen Regressionslinie über die bestrahlten Dosispunkte und die korrespondierenden residuellen Foci berechnet. Um die Regressionslinie und damit die Steigung („slope“) der unterschiedlichen Patientenproben zu erreichen, wird der durchschnittliche Wert der γH2AX -Foci zu der jeweiligen Strahlendosis bestimmt. Dieser ist direkt abhängig von der mittleren Kernfläche und der Anzahl der γH2AX -Foci im Hintergrund, mit deren Hilfe die γH2AX -Foci-Werte normalisiert werden.

Um Werte zu vergleichen, wird der Mann-Whitney-U-Test angewendet. P-Werte $<0,05$ werden als statistisch signifikant betrachtet, p-Werte zwischen 0,05 und 0,1 werden als Trend bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Zwischen Januar 2017 und Januar 2018 wurden in die Studie 21 Patienten mit Tumoren des Ösophagus, gastroösophagealen Übergangs oder Magens eingeschlossen. Zum Vergleich wurden drei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren aus der ZPM-Studie (Sammlung zwischen Oktober 2015 und März 2016) aufgenommen. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme unbehandelt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Patientencharakteristika.

Nach den ersten fünf Proben erfolgte eine Zwischenauswertung hinsichtlich der Verwertbarkeit des Gewebes. Bei diesen Patienten (#Öso1-5) wurde eine einzelne Probe aus der Endoskopie verwendet und für die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen mit Pinzette und Skalpell dreigeteilt. Hierbei zeigte sich bei der gemeinsamen Begutachtung der Proben mit den Kollegen der Pathologie (Dr. med. Markus Scharpf, Dr. med. Thorsten Biegner) bei allen fünf Patienten in der unbestrahlten Referenzprobe kein Tumor. Da wie im Methodenteil geschildert, die 0Gy-Probe zwingend zur Bestimmung der residuellen Focianzahl erforderlich ist, konnten diese Proben nicht verwertet werden (vgl. #Öso1 in Abb. 3).

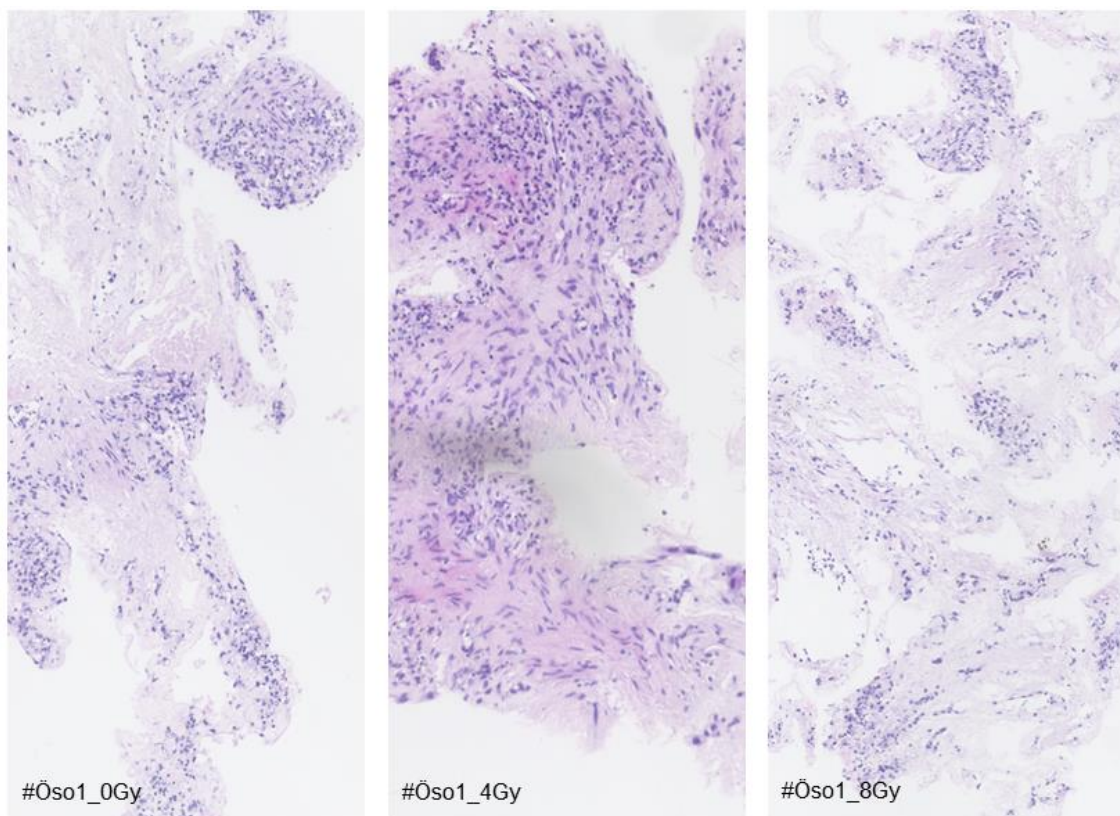


Abbildung 3: Darstellung einer nicht verwertbaren Tumorprobe (#Öso1) in der Hämatoxylin/Eosin-Färbung; in der 0 Gy/4 Gy/8 Gy_Probe wurde in Zusammenarbeit mit der Pathologie kein Tumor festgestellt; die 0Gy-Probe zeigt lediglich Anzeichen einer Dysplasie; damit konnte diese Probe nicht auf residuelle γ H2AX-Foci untersucht werden und musste aus der Studie ausgeschlossen werden;

Als Konsequenz der Zwischenauswertung wurde in Absprache mit der Zentralen-Endoskopie-Einheit der Einschluss auf Patienten begrenzt, von denen zwei bis drei Biopsien als Restgewebe vorhanden waren und verwendet werden konnten.

Gründe für den Ausschluss von Patientenproben lassen sich in drei Kategorien gruppieren.

- 1.) Es lag zu wenig Gewebe vor (#Öso1, 2, 3, 4, 5).
- 2.) Es konnte kein maligner Tumor im Gewebe nachgewiesen werden (#Öso8, 9, 18; #ZPM3_TR).
- 3.) Es mussten teilweise Proben ausgeschlossen werden, obwohl sich Tumorareale zeigten, diese jedoch in der immunhistochemischen Färbung in hypoxischen Arealen lagen und somit keine Bewertung der intrinsischen Radiosensitivität erlaubten (#Öso6, 12, 15).

#Öso6 wurde nicht ausgewertet, da sich in der Immunhistochemie die Tumorproben als komplett hypoxisch darstellten. Die Tumorareale waren Pimonidazol-positiv und damit nicht verwertbar. #Öso8 wurde aus der Studie ausgeschlossen, da die Proben, die mit 4 Gy und 8 Gy bestrahlt wurden, keine ausreichende Tumorzellzahl im Dapi-Bild der Immunfluoreszenzmikroskopie, die nur Zellkerne darstellt, erreichten (mindestens 50 Zellen). #Öso9 wurde ausgeschlossen, da histologisch keine Tumorzellen festgestellt wurden. #Öso12 wurde ebenfalls nicht ausgewertet, da alle Tumorzellen hypoxisch waren. #Öso15 musste aus der Studie ausgeschlossen werden, da von Seiten der Pathologie der Tumorgehalt als fraglich eingestuft wurde und sich darüber hinaus im Rahmen der Immunhistochemie weite Hypoxieareale zeigten. #Öso18 musste aus der Studie ausgeschlossen werden, da die 0Gy-Probe komplett nekrotisch war. Durch Ausschluss der Negativprobe wurde damit die Auswertung unmöglich. Bei den Patientenproben #Öso19 und #Öso20 handelte es sich um Operationspräparate. Das Schnellschnittlabor der CRONA-Kliniken Tübingen stellte auch Normalgewebe derselben Patienten zur Verfügung, das wieder mit 0 Gy, 4 Gy, 8 Gy behandelt wurde. Bei beiden Patientenproben konnte das Normalgewebe im Gegensatz zum Tumorgewebe aufgrund weitreichender Nekrose- und Ischämieareale nicht ausgewertet werden. Ein BrdU-positives Areal, das proliferierende Zellen darstellt, konnte hierbei nicht festgestellt werden. Die Probe des Patienten #ZPM3 aus dem Bereich der rechten Tonsille (#ZPM3_TR) wurde wegen fehlender Malignität ausgeschlossen; die Proben

dieses Patienten #ZPM3, die am Sinus piriformis (SP) und einem angrenzenden Lymphknoten (LK) entnommen wurden, konnten allerdings ausgewertet werden.

Auch innerhalb der ausgewerteten Patienten mussten Proben einzelner Bestrahlungsdosen ausgeschlossen werden. Bei Patient #Öso11 war die Gewebemenge in der 8Gy-Probe zu gering, weshalb keine ausreichende Anzahl an Tumorzellen identifiziert werden konnte. Bei Patient #Öso16 musste die 4Gy-Probe ausgeschlossen werden, da die Biopsie zu klein war. Bei Patient #Öso19T wurde in der 4Gy- und 6Gy-Probe eine nicht ausreichende Zellzahl zur Auswertung aufgrund von weitreichenden Nekrose- und Ischämiearealen sowie großen Hypoxiearealen erreicht und damit ausgeschlossen. Bei #ZPM4 wurde die 8Gy-Probe wegen fehlender Tumorzellen im proliferierenden Stadium ausgeschlossen. Gleiches gilt für die 2Gy-Probe von #ZPM6_TA und die 6- und 8Gy-Probe von #ZPM6_TC.

Somit waren von 24 Patienten 13 verwertbar, was 54 % entspricht.

Tabelle 1: Patientencharakteristika; ausgewertete Charakteristika sind Geschlecht (m (männlich) oder w (weiblich)), Alter bei Erstdiagnose (ED), Art und Weise der Entnahme (als Biopsie oder als Operationsresektat (OP)), Tumorklassifikation (TNM), Tumorlokalisierung (u.a. Gastroösophagealer Übergang (GÖÜ)) und Tumorhistologie aller 21 Ösophaguskarzinompatienten (#Öso) und der drei Kopf-Hals-Tumorpatienten (#ZPM), Folgetherapie nach Biopsieentnahme (OP (Operation), Chx (Chemotherapie), RtChx (Radiochemotherapie), Rt (Radiotherapie)); dunkelgrau unterlegt sind Patientenproben, die nicht ausgewertet werden konnten; hellgrau unterlegt sind ausgewertete Patientenproben;

	Ge- schlecht	Alter ED	Entnahme als	TNM	Lokalisation	Histologie	Therapie
#Öso1	m	77	Biopsie	T3N2M0	Kardia	tubuläres Adeno- karzinom, intestinaler Typ	Chx
#Öso2	m	57	Biopsie	T2N+M0	Ösophagus- eingang	Plattenepithel-karzinom, G2	RtChx
#Öso3	w	84	Biopsie	T2N0M0	GÖÜ	tubuläres Adeno- karzinom, intestinaler Typ	OP
#Öso4	m	61	Biopsie	T2N3M0	GÖÜ	sigelringzelliges Adenokarzinom, Mischtyp	Chx

	Ge- schlecht	Alter ED	Entnahme als	TNM	Lokalisation	Histologie	Therapie
#Öso5	m	76	Biopsie	T1N1M0	mittlerer Ösophagus	Plattenepithelkarzinom	RtChx
#Öso6	m	66	Biopsie	T3N2M1	GÖÜ	Adenokarzinom, intestinaler Typ	Chx
#Öso7	m	55	Biopsie	T3N2M0	GÖÜ	tubuläres Adeno- karzinom, intestinaler Typ, G2	Chx
#Öso8	w	74	Biopsie	T4N3M0	mittl. Ösophagus- drittel	Plattenepithelkarzinom, G3	Chx
#Öso9	m	76	Biopsie	n/a		keine Malignität	
#Öso10	m	68	Biopsie	TxN2M0	Angulusregion Magen	tubuläres Adenokarzinom, intestinaler Typ	Chx
#Öso11	m	66	Biopsie	T3N1M0	proximaler Ösophagus	Plattenepithelkarzinom, G3	RtChx
#Öso12	m	77	Biopsie	n/a	Kardia	Schleimhautadenom	Chx
#Öso13	w	48	Biopsie	T4N2M0	GÖÜ	solid-invasives Adenokarzinom, G3	Chx
#Öso14	m	70	Biopsie	T2N1M0	Ösophagus ob. Drittel	Plattenepithelkarzinom	RtChx
#Öso15	m	70	Biopsie	T4N2M1	Kardia	Adenokarzinom, intestinaler Typ, G2	Chx
#Öso16	m	51	Biopsie	T2N+M1	Antrum	Adenokarzinom, intestinaler Typ, G3	Chx
#Öso17	w	76	OP	T3N2M0	dist. Ösophagus	Plattenepithelkarzinom, G2	OP
#Öso18	m	71	Biopsie	T3N2M1	Kardia	tubuläres Adenokarzinom	Chx
#Öso19	m	82	OP	T2N0M0	GÖÜ	Adenokarzinom, intestinaler Typ, G3	OP
#Öso20	w	70	OP	T2N0M0	Angulusregion Magen	tubuläres Adenokarzinom, intestinaler Typ, G2	Nachsorge
#Öso21	w	73	OP	T3N1M0	Magen	sigelringzelliges Adenokarzinom, G3	OP

	Ge- schlecht	Alter ED	Entnahme als	TNM	Lokalisation	Histologie	Therapie
#ZPM3	m	52	OP	T2N1M0	Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom, G3	OP +RtCHx
#ZPM4	m	71	OP	T1N1M0	Hypopharynx	Plattenepithelkarzinom, G2	OP+Rt
#ZPM6	m	60	OP	T2N2M0	Oropharynx	Plattenepithelkarzinom, G2	OP +RtChx

Es verbleiben neun männliche und vier weibliche Patienten für die nachfolgenden Untersuchungen. Das mittlere Patientenalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug 65 Jahre. Im Probenkollektiv befinden sich sechs Proben mit einem Plattenepithelkarzinom und sieben Proben mit einem Adenokarzinom. Bei Erstdiagnose wurde das T-Stadium eines Patienten als T1 eingestuft. Fünf Patienten hatten einen Tumor im T-Stadium T2, vier in T3 und ein Patient in T4. Bezüglich der Tumorlokalisation wurde eine Tumorprobe aus dem Oropharynx entnommen, zwei aus dem Hypopharynx, drei aus dem thorakalen Ösophagus, drei aus dem Bereich des gastroösophagealen Übergangs, vier aus dem Magenkorpus. Tabelle 1 zeigt die nach der Diagnose erfolgten Therapien der Patienten. Viermal erfolgte eine alleinige Chemotherapie, zweimal eine Radiochemotherapie und dreimal die primäre Operation. Bei #Öso20 folgte stadiengerecht nach der primären Resektion die Nachsorge. Alle Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs (#ZPM3, 4, 6) wurden mit kombinierten Verfahren therapiert. Alle unterzogen sich zunächst einer Operation, zwei Patienten erhielten nachfolgend eine adjuvante Radiochemotherapie, der dritte eine adjuvante alleinige Radiotherapie (#ZPM4).

3.2 Nachweis und Quantifizierung von residuellen Doppelstrangbrüchen mit Hilfe von γ H2AX-Foci in der Zellkultur

Dieser Versuch sollte im in-vitro Setting an UTSCC45-Zellen die Funktion der verwendeten Materialien wie Bestrahlungsgerät, Antikörper, Färbekits sowie Mikroskopieprotokoll sicherstellen. Hierbei fällt eine kontinuierliche Steigung der γ H2AX-Foci auf. Die mittlere Foci-Zahl beträgt 1,2 (+/- 2,3) bei 0 Gy, 3,1 (+/- 4,6)

bei 2 Gy und 10,8 (+/- 13,4) bei 6 Gy. Die Steigung der Regressionsgeraden beträgt 1,60 (Abb. 4). Die durchschnittliche Größe der Zellkerne beträgt $187,14 \mu\text{m}^2$. Damit sind die Zellen dieses Zellkulturstamms häufig doppelt bis dreimal so groß wie die Zellen des später bearbeiteten ex-vivo-Gewebes (vgl. Tab. 2). Die lineare Zunahme der Foci-Anzahl bestätigt die Funktionalität der verwendeten Materialien.

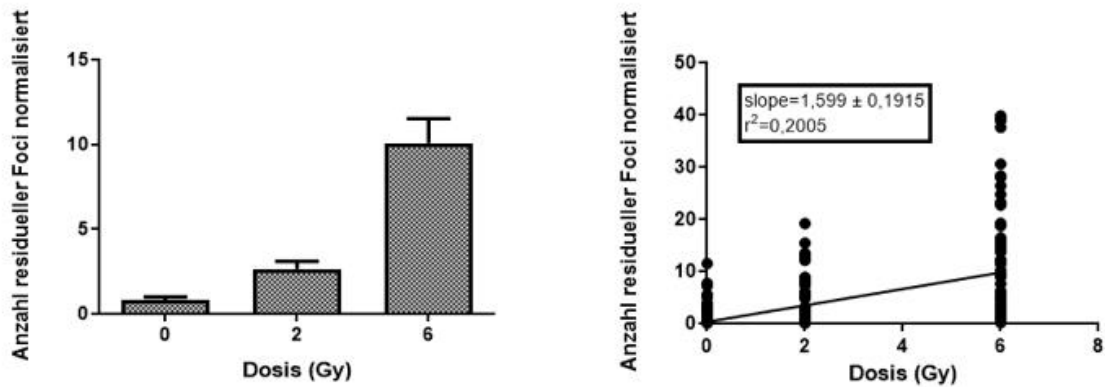


Abbildung 4: Anstieg der residuellen γ H2AX-Foci nach Bestrahlung bei 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy bei Zellen der Zelllinie UTSCC45; Darstellung des Anstiegs mit Hilfe eines Säulendiagramms links und einer Regressionsgerade rechts; links: die Mittelwerte werden als Säule mit Standardfehler als Fehlerbalken aufgetragen; Diagramm rechts: die gefüllten Kreise stellen die Rohwerte der γ H2AX-Foci aller ausgewerteten Nuclei dar;

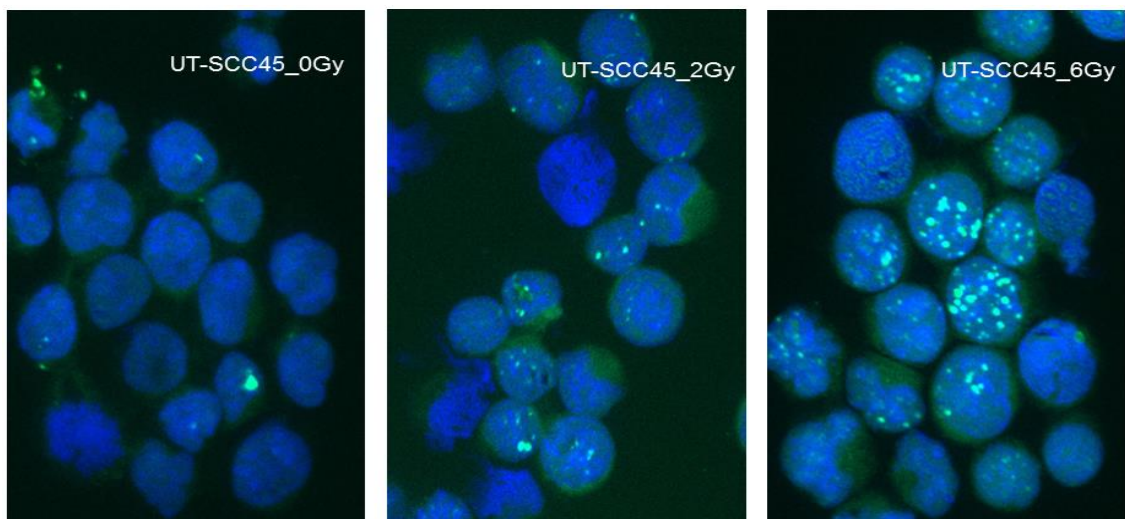


Abbildung 5: repräsentative Bilder des Zellkulturversuchs UTSCC45 nach Bestrahlung bei 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy; erkennbar sind große, runde, homogen blau gefärbte Nuclei; deutlicher Anstieg der γ H2AX-Foci von 0 Gy zu 2 Gy mit einem Maximum bei 6 Gy; unrunde, nicht homogen gefärbte Nuclei wurden nicht ausgewertet; Immunfluoreszenzmikroskopie: Vergrößerung 40x10;

3.3 Der γ H2AX-Assay als Nachweis von Doppelstrangbrüchen an ex-vivo bestrahltem Tumorgewebe

Mit dem γ H2AX-Assay lassen sich bei unbehandelten Tumorproben aus prätherapeutischen Endoskopien oder OP-Präparaten ex vivo dosisabhängig Doppelstrangbrüche erzeugen und nachweisen. Exemplarisch verdeutlicht dies Abbildung 6. Während bei 0 Gy kaum γ H2AX-Foci (grüne Punkte) darstellbar sind, lassen sich durch ionisierende Strahlung (hier 8 Gy) γ H2AX-Foci erzeugen und diese mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie darstellen.

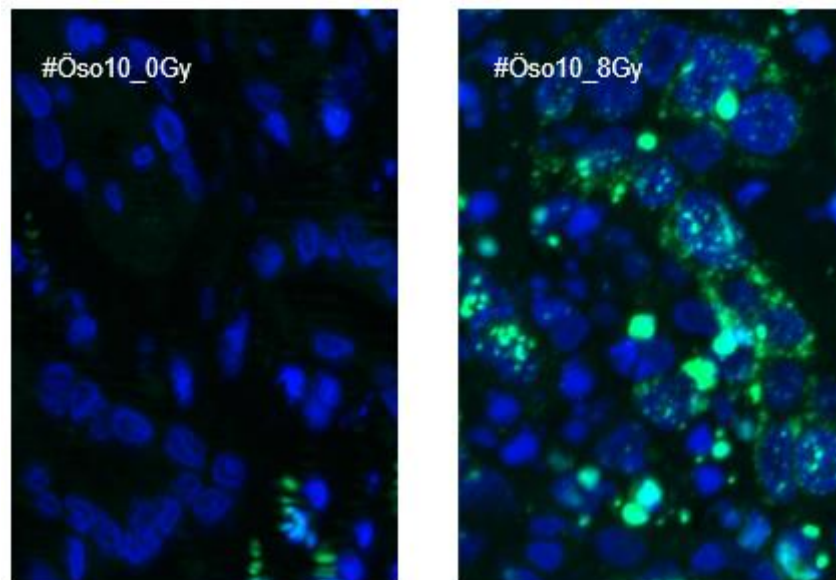


Abbildung 6: Nachweis von Doppelstrangbrüchen bei Tumorzellen durch γ H2AX-Foci mit Hilfe von Bestrahlung; typische Abbildung eines Magenkarzinoms (#Öso10) 24 Stunden nach Bestrahlung bei 0 Gy (links) und 8 Gy (rechts), wobei die Anzahl der γ H2AX-Foci als Marker der Doppelstrangbrüche bei den bestrahlten Zellen rechts überwiegt; Immunfluoreszenzmikroskopie: Vergrößerung 40x10;

3.4 Bestimmung der zellulären Radiosensitivität bei ex-vivo bestrahlten Tumorproben

Die entnommenen Biopsien wurden aufgrund der geringen Gewebemenge mit 0 Gy, 4 Gy und 8 Gy bestrahlt, während bei Operationspräparaten, bei denen die Gewebemenge nicht limitierend war, eine Bestrahlung zusätzlich mit 2 Gy und 6 Gy durchgeführt wurde.

Die mittlere Kernfläche beträgt $52,4 \mu\text{m}^2$. Alle Nuklei zeigten eine Kernfläche von ca. $37\text{-}56 \mu\text{m}^2$, einzig #Öso11 hat einen deutlich höheren Wert mit $116,54 \mu\text{m}^2$. Ebenso war die Anzahl an γH2AX -Foci im Hintergrund bei 0 Gy bei allen Proben außer #Öso7 unter 0,4. Bei #Öso7 wurde ein größerer Foci-Hintergrund von 1,28 festgestellt.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, zeigt sich bei allen Patienten ein Anstieg der residuellen γH2AX Foci mit zunehmender Dosis. Zur Quantifizierung der intrinsischen Radiosensitivität wurde eine lineare Regressionslinie über die bestrahlten Dosispunkte und die korrespondierenden residuellen Foci (s. Methoden) berechnet. Die Steigung dieser Geraden beträgt maximal 0,43 (bei #Öso11) und minimal 0,02 (bei #ZPM4). Dies bedeutet, dass die Anzahl der residuellen γH2AX -Foci exemplarisch bei #Öso11 um 0,43 pro Gy Strahlung ansteigt. Bei #Öso20T, #ZPM6, #Öso14, #Öso17, #ZPM4 wurden sehr geringe Steigungen $<0,1$ errechnet. Für alle Proben werden die Steigungen in Tabelle 2 zusammengefasst.

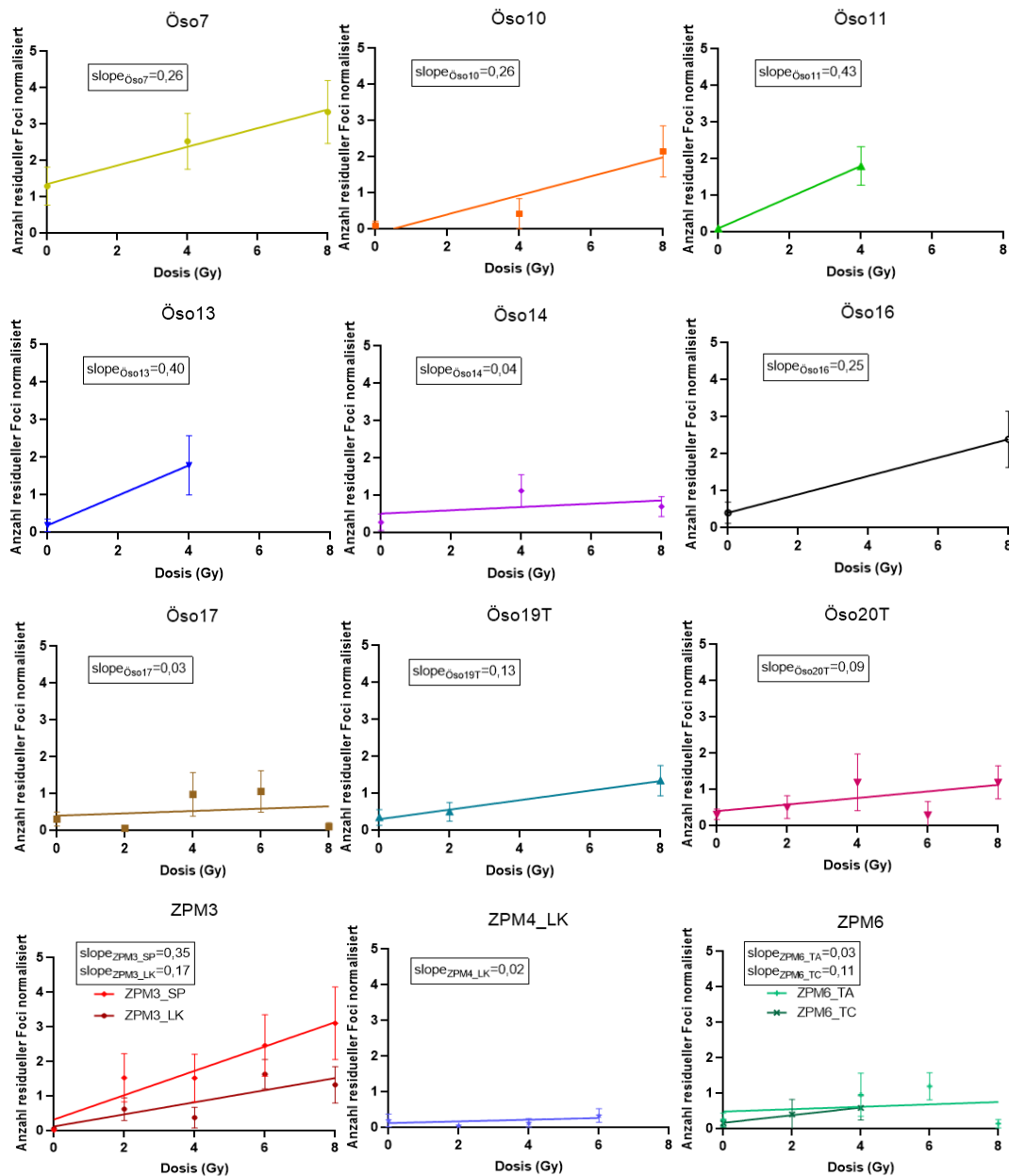


Abbildung 7: Veränderung der Anzahl residueller γ H2AX-Foci in Abhängigkeit zur Strahlendosis (Gy); Darstellung der linearen Regressionslinie jeder individuellen Patientenprobe als Anstieg der mittleren γ H2AX-Foci-Anzahl in Abhängigkeit der Strahlendosis; die Symbole stellen den Mittelwert der Anzahl residueller γ H2AX-Foci (von mindestens 50 ausgezählten Zellen) und den 95 %-Konfidenzintervall dar; die Patientenproben (Biopsie- oder Operationspräparate) von Tumoren des oberen Aerodigestivtrakts wurden 24 h vor Bestrahlung bei 2, 4, 6, 8 Gy mit Nährmedium kultiviert;

Patientennr.	Slope (Steigung)	Mittl. Kernfläche (μm^2)	Anzahl der Foci im Hintergrund pro Nucleus (bei 0 Gy)
#Öso11	0,43	116,54	0,09
#Öso13	0,40	46,38	0,18
#ZPM3	0,26	52,03	0,04
#Öso7	0,26	44,68	1,28
#Öso10	0,26	41,92	0,08
#Öso16	0,25	50,03	0,39
#Öso19T	0,13	37,19	0,34
#Öso20T	0,09	46,76	0,31
#ZPM6	0,05	56,86	0,22
#Öso14	0,04	42,44	0,27
#Öso17	0,03	48,87	0,30
#ZPM4	0,02	53,84	0,19

Tabelle 2: Auswertung der linearen Regressionslinien; Darstellung der unterschiedlichen Steigungswerte in absteigender Reihenfolge; dargestellt werden die mittleren Kernflächen (μm^2) und die Anzahl der γH2AX -Foci im Hintergrund, die in die Kalkulation der korrigierten γH2AX -Foci einbezogen werden;

3.5 Unterschiede in der intertumoralen Radiosensitivität

Die berechneten Steigungswerte werden zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts als Fehlerbalken in absteigender Reihenfolge dargestellt. Wie in Abbildung 8 dargestellt, lassen sich große Unterschiede bezüglich der Steigung der Regressionslinie zwischen unterschiedlichen Tumoren darstellen. Die Spanne für die Steigung der Regressionslinie der residuellen γ H2AX-Foci reicht von 0,43 (#Öso11) bis 0,02 (ZPM4_LK).

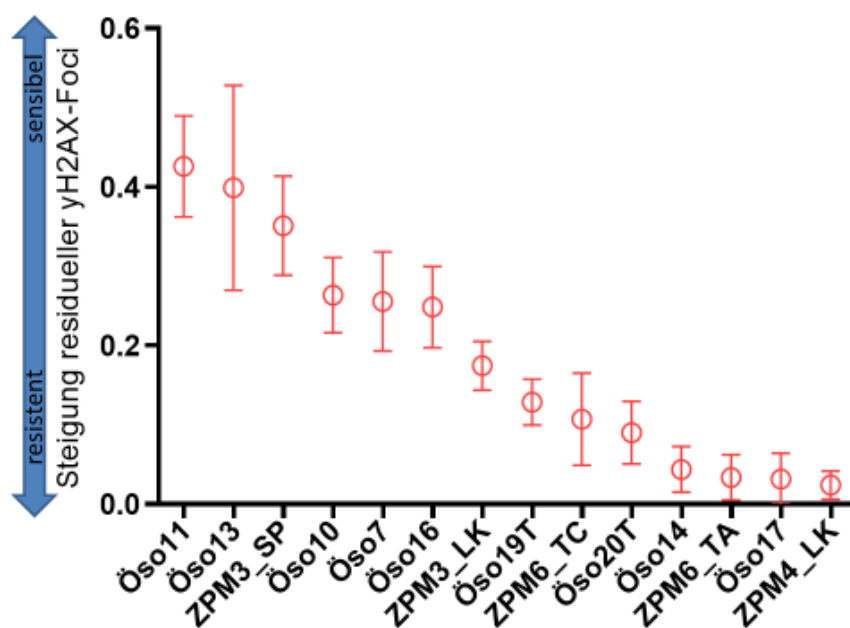


Abbildung 8: Darstellung der Unterschiede der Radiosensitivität unterschiedlicher Patientenproben; dargestellt wird die Steigung der Regressionslinie (Einheit: residuelle Foci/Gy) aller ausgewerteter Patienten als offene Kreise in absteigender Reihenfolge von links nach rechts; die Fehlerbalken markieren die Standardfehler des Mittelwerts;

Abbildung 9 zeigt drei hinsichtlich der Strahlungssensitivität ihrer Tumorproben unterschiedliche Patienten (#Öso21_2 (slope=0,47), #Öso16 (slope=0,25), #Öso17 (slope=0,03) (vgl. Tab. 2)). Gezeigt wird hierbei ein repräsentatives Areal 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und 8 Gy. Die Nuclei sind erkennbar durch die blaue dapi-Färbung. Die residuellen γ H2AX-Foci erscheinen in der Immunfluoreszenz grün. Vollständig grüne Zellen werden nicht berücksichtigt,

weil dies auf S-Phase, Nekrose, Apoptose oder auch andere Zelltypen (z.B. Lymphozyten) hindeutet.

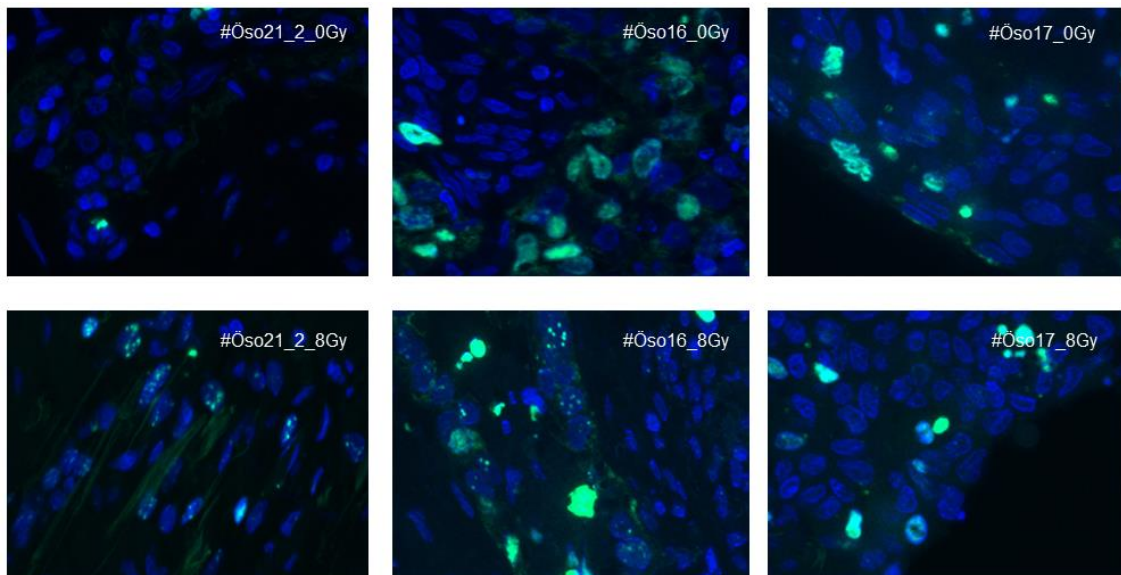


Abbildung 9: Beispielbilder zur Darstellung der unterschiedlichen intertumoralen Radiosensitivität; repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder von residuellen γ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung bei 0 und 8 Gy; gezeigt werden die Patienten #Öso21_2 (Adenokarzinom (slope=0,47)), #Öso16 (Adenokarzinom (slope=0,25)), #Öso17 (Plattenepithelkarzinom (slope=0,03)); Vergrößerung 40x10;

3.6 Unterschiede in der intratumoralen Radiosensitivität

Bei Patient #ZPM3 wurden Proben an unterschiedlichen Tumorlokalisationen (Sinus piriformis (SP), Tonsille rechts (TR), Lymphknoten (TR)) entnommen. Die Probe #ZPM3_TR musste aus der Analyse aufgrund fehlendem Tumornachweis ausgeschlossen werden. Abbildung 10 zeigt einen stärkeren Anstieg der „slope“ bei den Primärtumorproben des Sinus piriformis (slope=0,35) im Gegensatz zu denen des Lymphknotens (slope=0,17). Hierbei fällt auf, dass die Mittelwerte (gefüllte Kreise) nicht immer kontinuierlich ansteigen, was allerdings im Rahmen der Messungengenauigkeit begründbar ist.

#ZPM3

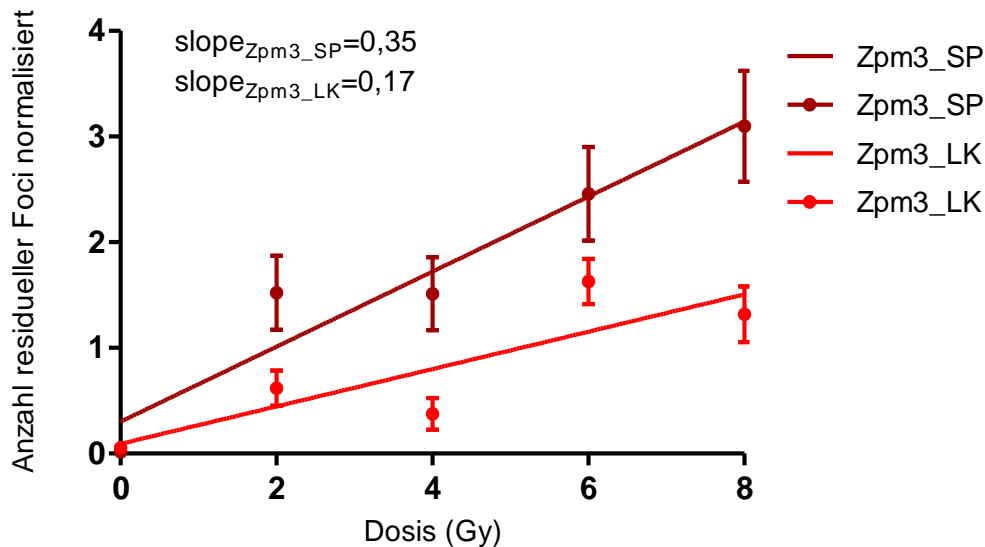


Abbildung 10: Analyse der intratumoralen Radiosensitivität bei Patient #ZPM3; die unterschiedlichen Tumorlokalisationen sind Sinus piriformis (SP) (dunkelrot) und ein zugleich befallener Lymphknoten (LK) (hellrot); dargestellt wird die errechnete Regressionsgerade mit Mittelwerten (gefüllte Kreise) und Standardfehlern (Fehlerbalken);

3.7 Zwischenzusammenfassung und ergänzende Untersuchungen zur Fehleranalyse

In den bisherigen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass sich an Biopsien von Tumoren des Ösophagus und Operationspräparaten ex vivo DNA-Schäden erzeugen lassen und diese in Form von γ H2AX-Foci nachgewiesen werden können. Eine dosisabhängige Zunahme der residuellen Focianzahl nach 24 Stunden konnte ebenfalls belegt werden. Allerdings ist die Zahl der nachgewiesenen residuellen Foci und die Steigung der Regressionslinie über die Bestrahlungsdosispunkte deutlich geringer als in der in unserer Arbeitsgruppe bisher bestimmten und publizierten Literatur (siehe Diskussion). Beispielsweise sind für das kolorektale Karzinom Werte von 1,89 bis 2,02 beschrieben (3). Bei Glioblastomproben, d.h. einer sehr strahlenresistenten Tumorart, wurden Werte zwischen 0,62 und 1,24 erreicht (3). Die Funktionalität der Reagenzien, der Bestrahlungseinrichtung und des Mikroskops war in vitro belegt worden.

Als weitere mögliche Fehlerquellen werden folgende Aspekte definiert und untersucht.

1.) Sollte das Verhältnis aus Tumorzellen und Normalgewebe sehr zu Gunsten des Normalgewebes liegen, könnte dies auch die sehr niedrigen Steigungen der Regressionskurven erklären.

Dieser Aspekt sollte durch weitere, tumorspezifische Färbungen des entnommenen Gewebes untersucht werden. Hierzu wurde Operationsmaterial verwendet, sodass die zur Verfügung stehende Tumormenge kein limitierender Faktor war. In einer Computertomographie ließ sich der tumoröse Prozess gut abgrenzen (Abb. 11). Der Tumor wurde primär ohne Vorbehandlung mittels Chemo- oder Strahlentherapie reseziert.

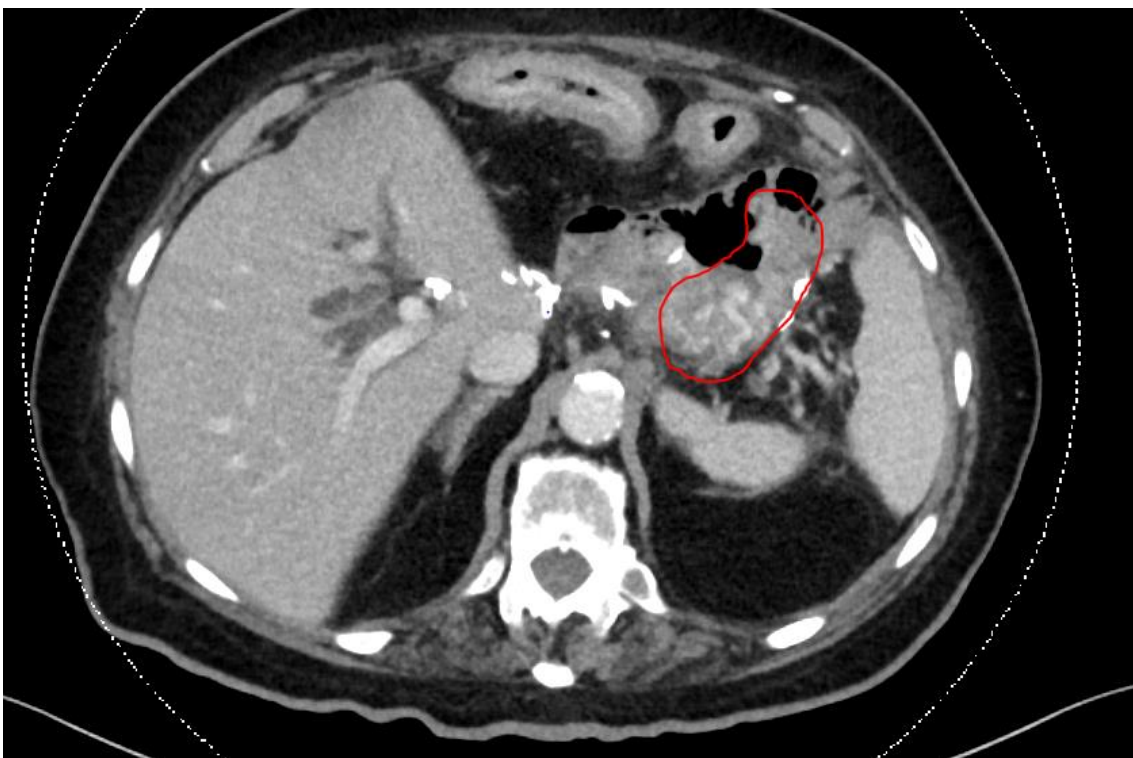


Abbildung 11: CT-Bild von #Öso21; klar erkennbare Raumforderung des Magens im rot umrandeten Kreis mit Verdickung und Inhomogenität der Wandstruktur;

Aus dem Gastrektomiepräparat wurden sowohl gesundes, nicht tumorbehaftetes Magengewebe („#Öso21_N“) und Tumorgewebe entnommen. Das Tumorgewebe wurde in insgesamt sechs Fragmente aufgeteilt. Drei wurden bei 0 Gy, 4 Gy und 8 Gy bestrahlt und nach 30 min fixiert („#Öso21_1), die anderen

drei Fragmente wurden ebenfalls bei 0 Gy, 4 Gy und 8 Gy bestrahlt und nach 24 h fixiert. Die weitere Verarbeitung bis zur Immunfluoreszenz und dem Mikroskopieren sind identisch zu der im Methodenteil beschriebenen Routine. Durch die Immunhistochemie mit Cytokeratin AE1/3, welche bei fast 100 % aller Adenokarzinome des Ösophagus und Magens positiv ausfällt, sollte nun eine Differenzierung zwischen Tumor und Normalgewebe erfolgen. In Abbildung 12 sind aus demselben Tumorareal eine HE-Färbung, eine Immunhistochemie für Cytokeratin AE1/3 und die bekannte Immunhistochemie für Proliferation (BrdU) und Hypoxie (Pimonidazol) dargestellt. Dabei fällt vor allem auf, dass die Tumorzellen in diesem Casus nicht in einem Verbund vorliegen, sondern ein diskontinuierliches Wachstumsmuster zeigen und von nicht-tumorösen Gewebe umgeben sind (Abb. 12, oben rechts).

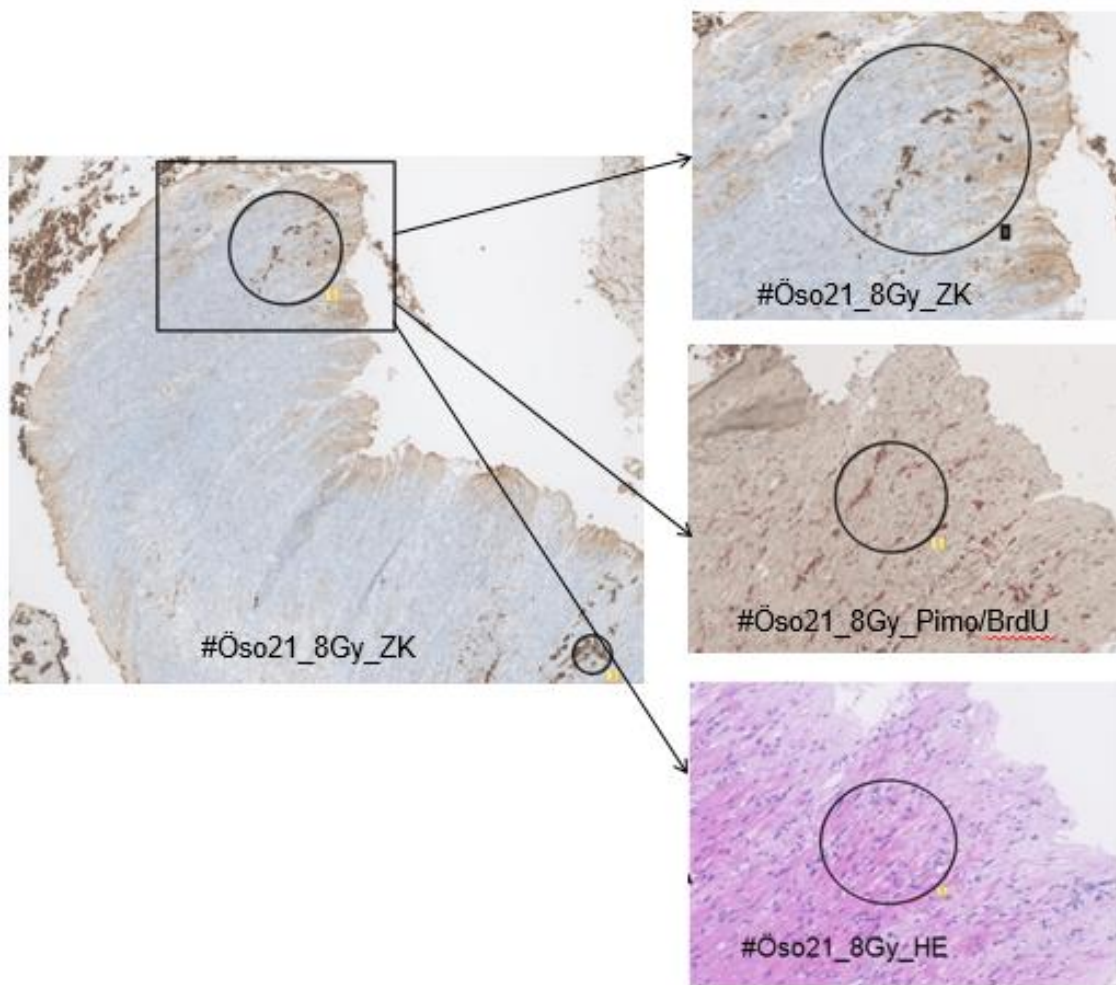


Abbildung 12: repräsentative Abbildung zur Verteilung von Tumorzellen innerhalb der Muscularis bei Adenokarzinomen (#Öso21_1); Zytokeratin AE1/3 (ZK) und zugeordnetes Immunhistochemiebild mit Pimonidazol- und BrdU-Färbung (Pimo/BrdU) und Hämatoxylin-Eosin-Bild (HE); dunkelbraun gefärbte Zellen im ZK-Bild stellen Tumorzellen (zum Teil Siegelringzellen) dar; kein homogener Zellverband des Tumorgewebes; im Pimo/BrdU-Bild sind hypoxische Zellen rot (Pimonizol positiv) und proliferative Zellen braun (BrdU positiv) markiert; Zellen im Bereich braun markierter Zellen wurden ausgewertet; eine eindeutige Zuordnung von Zellen z.B. aus der Zytokeratinfärbung auf die Pimonidazol-/BrdU-Färbung ist aufgrund nicht-konsequenter Schnitte nicht möglich;

Ein ähnliches Bild zeigt sich in den folgenden Präparaten (Abb.13, 14), welche ebenso Adenokarzinomen entstammen. Auch hier liegen die Tumorzellen nicht in einem geordneten Verbund.

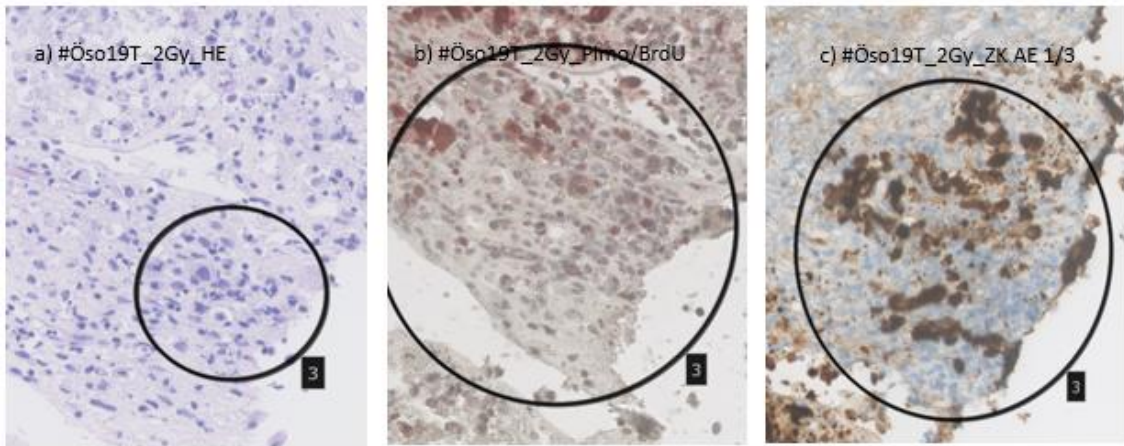


Abbildung 13 a,b,c: repräsentative Bilder zur Analyse von #Öso19T_2Gy (Adenokarzinom); im Zytokeratinbild (c) zeigen sich einige dunkelbraun gefärbte Tumorzellen im schwarz umrandeten ausgewerteten Bezirk; die Tumorzellen liegen allerdings nicht in einem deutlichen homogenen Verband vor; im HE-Bild (a) und Pimonidazol/BrdU-Bild (b) zeigen sich Siegelringzellen, die lose im Gewebe verteilt liegen; das Zytokeratinbild (c) wurde nachgefärbt und ist kein direkter konsekutiver Schnitt zu den Bildern 13 a+b;

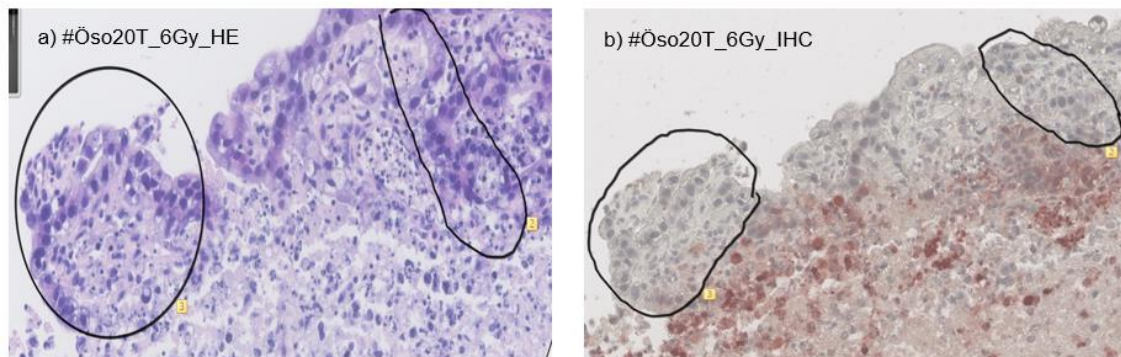


Abbildung 14 a,b: repräsentative Bilder zur Analyse von #Öso20T (Adenokarzinom); HE-Bild (a) mit entsprechendem Immunhistochemie-(IHC)-Bild (Pimonidazol/BrdU) (b) von #Öso20T_6Gy: aus den schwarz umkreisten Arealen wurde ein Immunfluoreszenzbild erstellt und zur Auswertung verwendet; hierbei fällt die Inhomogenität der großen Tumorzellen auf;

2.) Wie in der Literatur etabliert, wurde nach 24 Stunden die Anzahl residueller γ H2AX-Foci bestimmt. Zur Sicherstellung, dass an Biopsie und Operationsmaterial tatsächlich Doppelstrangbrüche erzeugt werden, wurden weitere Proben 30 Minuten nach der Applikation ionisierender Strahlen fixiert und nach Färbung die Immunfluoreszenz hinsichtlich γ H2AX-Foci durchgeführt.

Die Proben entstammen dem zuvor geschilderten Casus #Öso21 und wurden bei 0 Gy, 4 Gy und 8 Gy bestrahlt und nachfolgend nach 30 min (#Öso21_1) bzw. 24 h (#Öso21_2) fixiert und weiter bis zur Immunhistochemie bearbeitet.

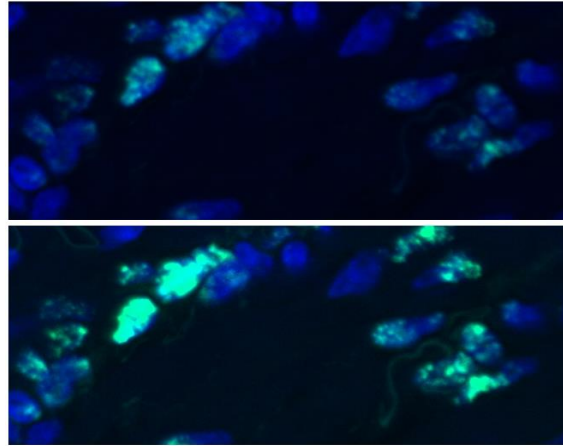


Abbildung 15: repräsentatives Areal von #Öso21_1_8Gy 30 min nach Bestrahlung; dargestellt wird dasselbe Areal mit zwei unterschiedlichen Belichtungseinstellungen, da Nuklei mit sehr vielen Foci sonst überbelichtet erscheinen;

In Abbildung 15 ist die Immunfluoreszenz für γ H2AX eines solchen Tumors 30 Minuten nach Bestrahlung mit 8 Gy dargestellt. Es lassen sich in den meisten Nuklei mehr als 20 Foci darstellen, sodass eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nachgewiesen ist.

In Abbildung 16 ist zudem die Quantifizierung der Foci zusätzlich für die Tumorproben, die nach 24 Stunden fixiert wurden, und für das Normalgewebe, welches ebenfalls nach 24 Stunden fixiert wurde, dargestellt. Im Unterschied zu den Präparaten von anderen Patienten wurden bei Tumorgewebe hier nun nur Nuklei ausgewertet, die im Bereich Cytokeratin AE1/3 positiver Areale lagen. Es zeigt sich, dass im Normalgewebe nach 24 Stunden fast keine Foci mehr nachweisbar sind, während nach 24 Stunden im Tumorgewebe noch ca. fünf Foci pro Nukleus zu detektieren sind.

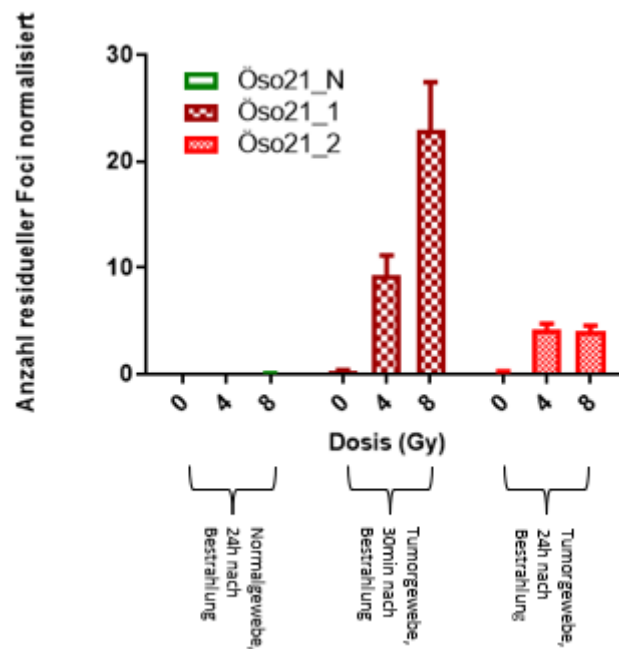


Abbildung 16: Anzahl der γ H2AX-Foci 30 min und 24 h nach Bestrahlung bei 0 Gy, 4 Gy, 8 Gy im Vergleich zu Normalgewebe; Darstellung des Mittelwerts der normalisierten Focianzahl als Säule mit Standardfehler als Balken; die dunkelroten Säulen zeigen die mittlere Focianzahl von Tumorgewebe 30 min nach Bestrahlung, die hellroten Säulen zeigen die mittlere Focianzahl von Tumorgewebe 24 h nach Bestrahlung, mit grün ist die mittlere Focianzahl von Normalgewebe 24 h nach Bestrahlung dargestellt;

Wird nach der zuvor etablierten Methodik die Steigung der Regressionsgeraden gebildet, ergibt sich eine Steigung von 0,47 für das 24 Stunden nach Bestrahlung fixierte Tumorgewebe (s. Abb. 17).

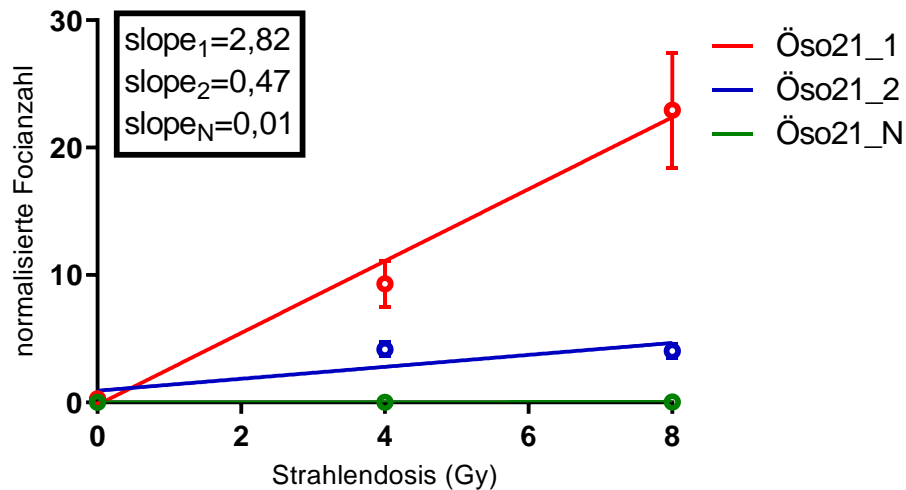


Abbildung 17: Lineare Regressionslinien von #Öso21 30 min und 24 h nach Bestrahlung; Auswertung der durchschnittlichen residuellen γ H2AX-Foci im Tumorgewebe, das nach 30 Minuten (rote Gerade „Öso21_1“) oder 24 Stunden fixiert wurde (blaue Gerade „Öso21_2“); zudem ist grün die Regressionsgerade für Normalgewebe dargestellt, das 24 Stunden nach Bestrahlung fixiert wurde („Öso21_N“); die ungefüllten Kreise stellen die Mittelwerte mit Standardmessfehler (Fehlerbalken) dar; für das Tumorgewebe, das 24 Stunden nach Bestrahlung fixiert wurde, zeigt sich eine Steigung der Regressionslinie von 0,47;

Diese Steigung der Regressionsgerade von Öso21_2, die nur aus Nuklei bestimmt wurde, die basierend auf der Cytokeratin AE1/3 Färbung in Tumorealen lagen, wird in Abbildung 18 mit den Proben verglichen, die bisher im Resultatteil berichtet wurden. Es zeigt sich hierbei, dass die Steigung in dieser Probe die höchste im Gesamtkollektiv ist.

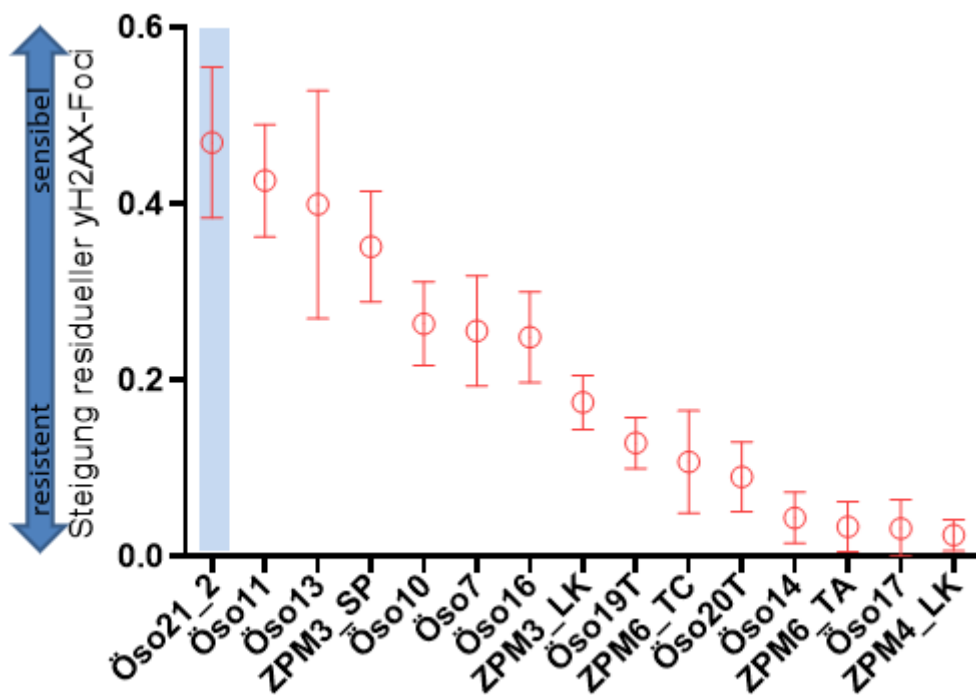


Abbildung 18: #Öso21_2 im Vergleich zu zuvor ausgewerteten Patientenproben; die zuvor verwendete Abbildung (Abb.8) mit den Steigungen der Regressionslinien aller in dieser Studie verwendeten Präparate, ergänzt um Öso21_2 (blau hinterlegt), bei dem nur Zytokeratin AE1/3 positive Areale hinsichtlich γ H2AX-Foci quantifiziert wurden;

3.8 Nachweis von Unterschieden der Radiosensitivität bei unterschiedlichen Histologien

Zu der Gruppe der Tumore des oberen Aerodigestivtrakts werden die histologisch grundsätzlich unterschiedlichen Tumorsubtypen Plattenepithel- und Adenokarzinom gerechnet, die auch Teil dieser Studie sind. Hierbei stellt sich die Frage, ob der γ H2AX-Assay Unterschiede in der Radiosensitivität zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen, dargestellt durch unterschiedliche Steigungen, nachweisen kann. Abbildung 19 zeigt eine stärkere durchschnittliche Steigung (Faktor 2) bei den Patienten mit Adenokarzinomen ($\text{slope}=0,23$) im Gegensatz zu den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen ($\text{slope}=0,14$).

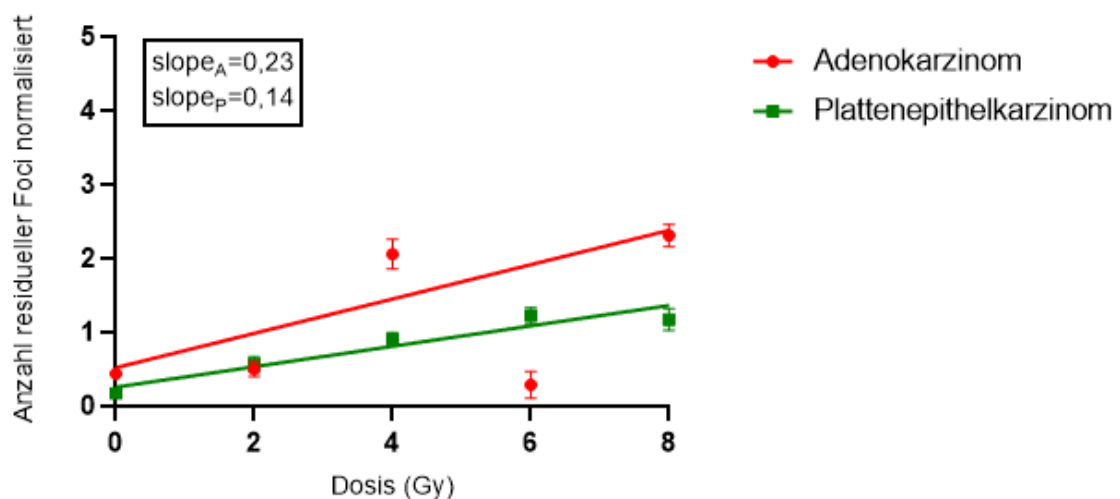


Abbildung 19: Unterschied zwischen Adeno-und Plattenepithelkarzinom; rot stellt die errechnete Regressionslinie aller ausgewerteter Adenokarzinompatienten dar; grün stellt die errechnete Regressionsgerade aller ausgewerteter Plattenepithelkarzinompatienten dar; die Fehlerbalken verdeutlichen die jeweiligen Mittelwerte mit Standardmessfehler abhängig von der applizierten Strahlendosis;

4 Diskussion

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob sich mit Hilfe des Biomarkers γ H2AX an prätherapeutischen Biopsien von Tumoren des oberen Aerodigestivtrakts residuelle, ex-vivo erzeugte Doppelstrangbrüche nachweisen lassen. Während in unserer Arbeitsgruppe γ H2AX mehrfach an operativ gewonnenen Tumoren bestätigt werden konnte, sollte dies in der vorliegenden Arbeit nun an prätherapeutischen Proben evaluiert werden. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob sich hierbei unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten zwischen Tumoren verschiedener Patienten nachweisen lassen. Diese Fragestellung ist von höchster klinischer Relevanz. Für viele onkologische Patienten in kurativen Stadien bestehen verschiedene Therapieoptionen, die basierend auf randomisierten Studien als gleichwertig zu bezeichnen sind. Oft kann z.B. die Strahlentherapie als alleinige Therapieform zum Einsatz kommen oder in Kombination mit einer Operation. Biomarker, die für den einzelnen Patienten vorhersagen können, ob z.B. ein besonders strahlenempfindlicher Tumor vorliegt, der mit einer alleinigen Radiatio saniert werden kann, konnten bisher nicht etabliert werden. Insbesondere bei Tumoren der Speiseröhre, des gastroösophagealen Übergangs und bei Kopf-Hals-Tumoren ist dieser Aspekt interessant, sodass diese Entitäten auch Gegenstand der Arbeit waren. Menegakis und Kollegen hatten die Methodik zur Quantifizierung residueller Doppelstrangbrüche, die in der aktuellen Arbeit zum Einsatz kam, zuvor an Operationspräparaten evaluiert (3). In der vorliegenden Arbeit war unbehandeltes Tumorgewebe, das im Rahmen einer Operation entfernt worden war, ex vivo bestrahlt und 24 Stunden später fixiert worden. Mittels Immunfluoreszenz wurden die residuellen γ H2AX-Foci quantifiziert und nach der etablierten Methodik die „slope“, also die Steigung der Regressionsgeraden über die zunehmenden Bestrahlungsdosen bestimmt. Tumore, die in der Klinik bekanntermaßen mit sehr geringen Dosen kuriert werden können, zeigten auch im γ H2AX-Assay die höchste Strahlenempfindlichkeit, während Glioblastome und Chondrosarkome passend zum klinischen Szenario sich als besonders strahlenresistent herausstellten. Für

die Personalisierung der Therapie bei Tumoren der Speiseröhre, des gastroösophagealen Übergangs und bei Kopf-Hals-Tumoren ist jedoch Biomaterial erforderlich, das bereits vor einer Operation vorlag, da eine Operation dann ggf. nicht mehr Bestandteil des Therapieregimes des betreffenden Patienten ist.

In der aktuellen Arbeit wurde nun diese an Operationspräparaten etablierte Methodik auf prätherapeutische Biopsien übertragen.

Eine große Herausforderung war der hohe Anteil von Proben, die nicht verwertbar waren. Bei insgesamt elf von 21 Patienten mit Tumoren des Ösophagus oder gastroösophagealen Übergangs konnten die Proben nicht ausgewertet werden. Gründe, die zum Ausschluss führten, waren eine geringe Gewebemenge, ein fehlender Malignitätsnachweis, eine nicht ausreichende Zahl an Tumorzellen oder Tumorzellen, die ausschließlich in Hypoxie- und Nekrosearealen lagen. Ein wichtiger Aspekt, der in diesem Zusammenhang zu diskutieren ist, ist der sogenannte „sampling error“. Hierunter ist zu verstehen, dass bei jeder Gewebeentnahme aus einem malignen Tumor das Risiko besteht, nicht invasive Anteile des Tumors zu biopsieren. In der Literatur wird das Risiko eines „sampling errors“ bei Entnahme nur einer einzigen Biopsie auf etwa 20 % beziffert (103). Es finden sich Publikationen, die die Entnahme von bis zu zehn Biopsien empfehlen, um eine „falsch negativ“ Rate von unter einem Prozent zu erreichen (104-106). Da in der vorliegenden Studie nur Restgewebe verwendet wurde, lagen deutlich weniger Proben für die Studienfragestellung zur Verfügung. De-Colle et al. haben den γ H2AX-Assay zum Nachweis residueller Doppelstrangbrüche in einer anderen Studie an ex-vivo bestrahlten Biopsien von Prostatakarzinompatienten verwendet. In der Studie wurden gezielt Biopsien aus dem Bereich der Prostata-Proben entnommen, in dem basierend auf allen zur Verfügung stehenden klinischen Informationen (Tastbefund und Bildgebung) die höchste Wahrscheinlichkeit für eine positive Biopsie vorlag. Dennoch mussten auch in dieser Arbeit zehn von 31 Proben wegen fehlendem Tumornachweis ausgeschlossen werden (75). Zum Vergleich gelang in den vorangegangenen Studien, die an Operationspräparaten erfolgte, lediglich bei einer Probe

(6Gy-Probe eines Zervixkarzinoms) der Tumornachweis nicht (3). Zusammenfassend ist festzustellen, dass der „sampling error“ ein limitierender Faktor beim γ H2AX-Assay ist, vor allem dann, wenn nur eine Biopsie vorliegt.

Zur Sicherstellung der einwandfreien Funktionalität der verwendeten Agenzien, wie z.B. Antikörper und Immunfluoreszenz-Kits, erfolgten zunächst in-vitro Versuche an einer Zelllinie, zu der bereits Daten aus der Literatur vorlagen. Der Zellkulturversuch mit Plattenepithelkarzinomen des Stamms UTSCC45 ergab einen linearen Anstieg der residuellen γ H2AX-Foci mit einer Steigung („slope“) von 1,60 über Bestrahlungsdosen von 0 Gy, 2 Gy, 6 Gy. Hiermit war sichergestellt, dass mit den verwendeten Materialien γ H2AX-Foci erzeugt und nachgewiesen werden können. Hauth et al. ermittelten in einem ähnlichen Experiment eine Steigung von 1,13 für UTSCC5-Zellen (107). Die Steigung bei der UTSCC45-Zelllinie ist somit um 30 % höher und legt eine höhere Strahlenempfindlichkeit als UTSCC5 nahe. Dies erscheint plausibel, wenn Studienergebnisse von Yaromina et al. herangezogen werden. Hier wurden unterschiedliche Zelllinien in in-vivo Studien „tumor control dose – TCD₅₀“ Experimente durchgeführt. Die TCD₅₀ gibt an, welche Strahlendosis erforderlich ist, um 50 % der Tumore langfristig zu kontrollieren. In der zitierten Arbeit lag die TCD₅₀ für UTSCC45-Tumoren bei 45,4 Gy und für UTSCC5-Tumoren bei 117,2 Gy. Somit waren auch hier die UTSCC45-Zellen deutlich strahlenempfindlicher (108). Dies zeigt konsistent mit den γ H2AX-Daten aus der aktuellen Arbeit und der Arbeit von Hauth et al. eine höhere Strahlensensibilität für UTSCC45 Zellen im Vergleich mit UTSCC5 Zellen an.

In den Patientenproben, in denen sich nach Einschätzung der Mitarbeiter des pathologischen Instituts ein invasiver Tumor zeigte, ließen sich dann auch residuelle γ H2AX-Foci nachweisen. Auch zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der residuellen Focianzahl nach 24 Stunden. Allerdings war die absolute Zahl an Foci und die Steigung der Regressionsgerade über die einzelnen Dosispunkte deutlich geringer als in der Literatur beschrieben. Menegakis et al. beschrieben für ex-vivo bestrahlte Tumore aus Operationspräparaten eine Steigung der Regressionslinie von minimal 0,58 bis

3,89 (90). Die in der aktuellen Arbeit an Biopsien beobachteten Steigungswerte sind allesamt geringer und liegen zwischen 0,02 und 0,47.

Auch wenn Menegakis et al. keine Tumore der Speiseröhre untersucht haben, sind die Unterschiede der Steigungswerte als Surrogat für die Strahlenempfindlichkeit der jeweiligen Tumoren nicht mit den Erfahrungen aus der Klinik in Einklang zu bringen. So zeigten in der CROSS-Studie ca. 30 % der Tumore der Speiseröhre nach einer neoadjuvanten Strahlentherapie mit der 41,4 Gy und konkomitanter Chemotherapie eine pathologische Komplettremission, während z.B. Glioblastome nach einer postoperativen Radiochemotherapie mit 60 Gy in den seltensten Fällen eine langfristige lokale Kontrolle erreichen. In der vorliegenden Arbeit war die Steigung der Regressionslinie der Ösophaguskarzinome niedriger als die für die Glioblastome in der vergangenen Arbeit (31, 109). Als Erklärung für diese Diskrepanz wurden folgende mögliche Ursachen identifiziert und untersucht.

1) Funktionalität der verwendeten Reagenzien

Dieser Aspekt war bereits a priori, wie oben geschildert, untersucht worden und es hatten sich γ H2AX-Foci in erwartbarem Ausmaß nach 24 Stunden in Zellkultur nachweisen lassen. Auch hatten sich mit denselben Reagenzien in Tumorgewebe γ H2AX-Foci nachweisen lassen. Diese Fehlerquelle erscheint somit unwahrscheinlich als Ursache für die beobachteten, niedrigen Steigungswerte der Regressionslinie.

2) Fehlende Induktion von Doppelstrangbrüchen

Als weitere mögliche Fehlerquelle wurde eine verminderte Erzeugung von γ H2AX-Foci diskutiert. Eine geringe Anzahl an erzeugten γ H2AX-Foci würde dann auch zu einer geringeren Anzahl an nicht-reparierten, residuellen Foci führen. Um die Erzeugung von γ H2AX-Foci nachzuweisen, wurde Tumorgewebe eines Magenkarzinoms verwendet. Da der Versuch die Anzahl der Foci nach 30 Minuten und nach 24 Stunden quantifizieren sollte und somit mehr Tumorgewebe als für die bisherigen Versuche erforderlich war, war auf Operationsmaterial ausgewichen worden. 30 Minuten nach der

ex-vivo Bestrahlung ließen sich im Mittel über 20 Foci per Nukleus darstellen. Dieser nach 30 Minuten bestimmte Wert liegt deutlich über dem, der bei den anderen Proben nach 24 Stunden gemessen wurde und bestätigt die Induktion einer hohen Anzahl an γ H2AX-Foci. Ein Vergleich mit Literaturdaten zur besseren Einordnung gelingt trotz entsprechender Recherche nicht, da keine geeignete Studie, die ebenfalls Biopsien 30 Minuten nach Bestrahlung fixiert und auf γ H2AX untersucht hatte, ausgemacht werden konnte.

3) Quantifizierung nicht auf maligne Zellen begrenzt

Als weitere Fehlerquelle wurde der Möglichkeit nachgegangen, dass durch den inzidentellen Einschluss von Normalgewebe, das z.B. an Tumorgewebe angrenzt, die Ergebnisse verzerrt werden. Normalgewebe kann Doppelstrangbrüche aufgrund der intakten DNA-Reparaturmechanismen besser als Tumorzellen reparieren und es ist daher zu erwarten, dass sich in Normalgewebe nach Radiatio auch weniger residuelle Doppelstrangbrüche nach 24 Stunden zeigen (110). Dies wurde durch einen entsprechenden Versuch an gesunder Schleimhaut in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Der Einschluss von Normalgewebe in die Quantifizierung würde daher einen radioresistenteren Phänotyp „vortäuschen“. Die Definition der Tumorareale erfolgte in der aktuellen Studie basierend auf den HE-Schnitten; im Rahmen der Immunofluoreszenz erfolgte die Auswahl der zu quantifizierenden Areale basierend auf der DAPI-Färbung. Tatsächlich können v.a. bei Adenokarzinomen die HE-Färbungen den Tumoranteil überschätzen. Auch eine Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen wurde mehrmals beobachtet und kann zu einer Verzerrung führen, da diese im DAPI-Bild nicht von Tumorzellen unterschieden werden können. Ein repräsentatives Bild wird im Nachfolgenden gezeigt.

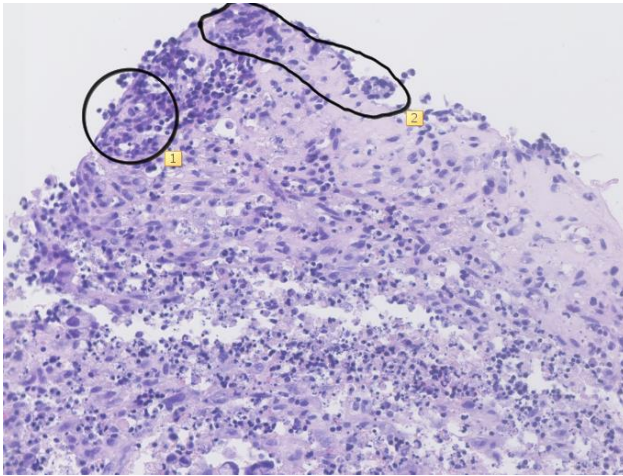


Abbildung 20: Entzündungszellen im Tumorgewebe;

viele Lymphozyten sind im HE-Bild von #Öso20T_0Gy erkennbar (kleine runde dunkelblaue Zellen); die schwarz markierten Areale wurden hinsichtlich der γ H2AX-Foci-Anzahl ausgewertet;

Die zu diesem Zweck in dieser Arbeit durchgeführten Zytokeratinfärbungen bestätigten diesen Aspekt als eine mögliche Ursache für die unerwartet niedrigen Steigungswerte der Regressionslinien.

Der letztgenannte Punkt erklärt die geringe Anzahl an residuellen Foci jedoch sicherlich nur anteilig. So wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre oder aus dem Kopf-Hals-Bereich ähnliches beobachtet. Bei den Plattenepithelkarzinomen war die Selektion der Areale, die für die Quantifikation von γ H2AX-Foci geeignet sind, ebenfalls diffizil. Hier lag die Problematik jedoch eher darin begründet, dass die sicheren Tumoreale oft hypoxisch waren und damit auf benachbarte Zellareale ausgewichen werden musste, die zwar ebenfalls suspekt waren, aber nicht in dem Ausmaß, wie die hypoxischen Areale.

Beobachtet wurden darüber hinaus ausgedehnte Gewebsnekrosen, weshalb einzelne Dosispunkte ausgeschlossen werden mussten. Bei den Operationspräparaten kann noch von Bedeutung gewesen sein, dass bei den großen abdominalen Eingriffen frühzeitig die großen Blutgefäße abgeklemmt werden und bis zur Entfernung des Tumors noch mehrere Stunden vergehen können. Hierdurch kann es zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff kommen und dem Absterben von Tumorgewebe.

Konzentrierten sich die Nekrosen- und Tumoreale auf den zentralen Probebereich, lag dies möglicherweise darin begründet, dass die verwendeten Tumorfragmente wiederum zu groß waren und es zu einer ungenügenden Versorgung des Gewebes während der Inkubationsschritte mit dem DMEM-Nährmedium durch Diffusion gekommen ist. Auffällig war eine zentrale Hypoxie mit einem negativen BrdU-Nachweis als Proliferationsmarker. Menegakis et al. und de-Colle et al. verwendeten deshalb in ihren Versuchen äußere Bereiche, in denen die Färbung durch Pimonidazol und BrdU stärker sowie eine gute Versorgung mit DMEM-Nährmedium gegeben ist (3, 91). Dabei rieten Menegakis et al. zu einer Auftrennung des Gewebes in 2 bis 3 mm große Probenstücke (3). Um eine Unterversorgung innerer Gewebereiche zu verhindern und eine homogene Färbung mit Pimonidazol und BrdU im gesamten Gewebe zu erreichen, ist eine Beibehaltung dieser Probengröße anzuraten.

Eine Hypothese der Studie war es, zu untersuchen, ob sich mit Hilfe des γ H2AX-Assays aus prätherapeutischen Biopsien Tumore in ihrer Radiosensitivität unterscheiden lassen. De-Colle et al. haben diese Fragestellung in der bereits zuvor zitierten Studie an Prostatakarzinomgewebe untersucht. In dieser Arbeit konnten bei neun Patienten γ H2AX-Foci aus mindestens zwei unterschiedlichen Tumorealen aus der Prostata untersucht werden. Bei nur einem der neun Patienten zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der residuellen Focianzahl zwischen den unterschiedlichen Tumorealen. Eine deutlich größere Streuung zeigte sich hingegen zwischen unterschiedlichen Patienten. Auch wenn sich bei de-Colle und Kollegen keine relevante Heterogenität innerhalb einzelner Patienten zeigte, ist die sogenannte Tumorerogenität grundsätzlich ein bekanntes Phänomen. Tumorerogenität bedeutete, dass sich innerhalb eines einzelnen Tumors in unterschiedlichen Tumorealen z.B. verschiedene genetische Mutationen oder Proteinexpressionsmuster zeigen können. Tumorerogenität ist z.B. sowohl für Plattenepithel- als auch für Adenokarzinome beschrieben worden (111-115). Diese Heterogenität hinsichtlich der Expression kann sich auch in eine Heterogenität hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit übersetzen lassen, sollten z.B. Gene, die in der DNA-Reparatur involviert sind, betroffen sein. Für den γ H2AX-Assay anhand von

Biopsien wäre dies von Relevanz und bei der Interpretation zu berücksichtigen, da, wie zuvor beschrieben, eine einzelne Biopsie selten ausreicht und auf mehrere Biopsien aus verschiedenen Tumorarealen zurückgegriffen werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurde die Heterogenität zwischen Primärtumor im Sinus piriformis und einem Lymphknoten des Patienten #ZPM3 untersucht. Es zeigten sich unterschiedliche Steigungen der Regressionslinien um den Faktor zwei mit einer höheren Radioresistenz des Lymphknotens. Dies wäre mit der häufigen klinischen Beobachtung einer Diskrepanz im Ansprechen zwischen Primärtumor und Lymphknoten zu vereinen (116). Allerdings sind auch hier wieder die Absolutwerte der Steigungen deutlich geringer als in den zuvor beschriebenen Arbeiten. Eine abschließende Beurteilung hinsichtlich dieser Hypothese ist daher nicht möglich; dies gilt auch für den untersuchten Unterschied zwischen Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen.

Es sind für die Weiterentwicklung der Anwendung des γ H2AX-Assays an Biopsien folgende Optimierungsansätze denkbar:

- Die konsequentere Anwendung von Färbungen, die mit sehr hoher Sicherheit auf das Vorliegen von Tumorgewebe hindeuten, sollte bei den untersuchten Histologien routinemäßig eingesetzt werden.

Die vorliegenden Versuche an Tumoren des oberen Aerodigestivtrakts haben gezeigt, dass die Bestimmung von Tumorzellen alleine mit der HE-Färbung nicht zuverlässig ist. Die Hinzunahme einer weiteren Färbung z.B. des Zytokeratins CK AE13 erscheint sinnvoll. Dies betrifft insbesondere siegelringzellige Adenokarzinome des Ösophagus, des gastroösophagealen Übergangs und des Magens. In dieser Karzinomentität ist häufig keine Homogenität der Tumorstruktur gegeben und eine Verteilung einzelner Tumorzellen ins Interstitium zu beobachten. Diffizil wird auch trotz Zuhilfenahme der Zytokeratinfärbung die Übertragung der Tumorzellen auf das Immunfluoreszenzbild sein.

- Die gezielte Biopsie von Tumorarealen, die in bildgebenden Verfahren wie PET oder diffusionsgewichteter MRT mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf vitalen Tumor hindeutet, könnte das Risiko, nekrotische Tumorareale zu biopsieren, minimieren.
- Im Sinne einer personalisierten Medizin könnte das Verfahren der Liquid Biopsy mit der Erforschung von Biomarkern wie γ H2AX kombiniert werden und die Entnahme von Ösophagusbiopsien ersetzen.

Es ist bekannt, dass sich in peripherem Blut häufig Tumorbestandteile in Form von zirkulierender DNA oder ganzer Tumorzellen nachweisen lassen. Die Gewinnung solcher Tumorbestandteile aus dem peripheren Blut wird unter dem Begriff „Liquid Biopsy“ zusammengefasst. Diese Tumorbestandteile sind zum Beispiel beim Bronchialkarzinom geeignet, um Mutationen nachzuweisen, die eine personalisierte Behandlung mit zielgerichteten Substanzen ermöglichen (117). Auch für Tumore des Ösophagus konnte nachgewiesen werden, dass sich im peripheren Blut zirkulierende Tumorzellen nachweisen lassen (118). Ein innovativer Ansatz zur Weiterentwicklung der Ansprechensvorhersage mittels γ H2AX wäre die Nutzung von zirkulierenden Tumorzellen zur ex-vivo Bestrahlung und nachfolgenden Bestimmung der residuellen Doppelstrangbrüche. Der Vorteil wäre die deutlich geringere Invasivität im Vergleich zur endoskopischen Materialgewinnung sowie möglicherweise eine bessere Abbildung der Tumorpheterogenität.

5 Zusammenfassung

Tumore des oberen Aerodigestivtrakts gelten trotz ihrer Häufigkeit und einer großen wissenschaftlichen Expertise verschiedenster Disziplinen weiterhin als Tumore mit schlechter Prognose bei Erstdiagnose. Menegakis et al. konnten zeigen, dass das γ H2AX-Molekül ein äußerst vielversprechender Biomarker zur Prädiktion der Strahlensensitivität unterschiedlichster Tumorentitäten ist. Hierbei korrelierte die Anzahl der residuellen γ H2AX-Foci als Indiz von Doppelstrangbrüchen direkt mit der Strahlensensitivität des Tumors. Die vorgelegte Dissertationsschrift sollte dazu dienen, Doppelstrangbrüche mit Hilfe des γ H2AX-Assays auch an prätherapeutischen Biopsien von Ösophagustumoren sichtbar zu machen und mögliche Unterschiede hinsichtlich der Radiosensitivität darzustellen.

Die ermittelten Daten zeigen, dass Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung mit Hilfe des γ H2AX-Assays an prätherapeutischen Biopsien von Tumoren des oberen Aerodigestivtrakts induziert werden können. Hierbei wurde bei allen Patientenproben ein Anstieg der residuellen Focianzahl in Abhängigkeit von der zunehmenden Strahlendosis nachgewiesen. Die Steigung der Regressionslinie der residuellen γ H2AX-Foci reichte von 0,02 (ZPM4_LK) bis 0,47 (#Öso21_2). Diese Werte sind geringer als in der Literatur von Menegakis et al. beschrieben. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit sind bedeutend bei der Entwicklung des Biomarkers γ H2AX als Prädiktor der individuellen Strahlensensitivität und dessen Etablierung im klinischen Alltag mit Fokus auf eine „personalisierte Medizin“ in der Zukunft.

Anhang

In Abbildung 21 wird ein Bild einer Immunhistochemiefärbung mit Pimonidazol und BrdU im Vergleich zu einer Negativprobe eines Operationsresektats eines Glioblastompatienten gezeigt. Dieses Projekt wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (184/2015B02) genehmigt. Das Glioblastomgewebe wurde in Zusammenarbeit mit Andreas Riedel angefärbt, der das Gewebe zuvor auch bearbeitete. In der Negativprobe wurde in der Vorbehandlung kein Pimonidazol und BrdU dem DMEM-Nährmedium hinzugegeben. Folglich sind die Hypoxiebereiche nicht rot (Pimonidazol positiv) und die proliferativen Bereiche nicht braun gefärbt (BrdU positiv).

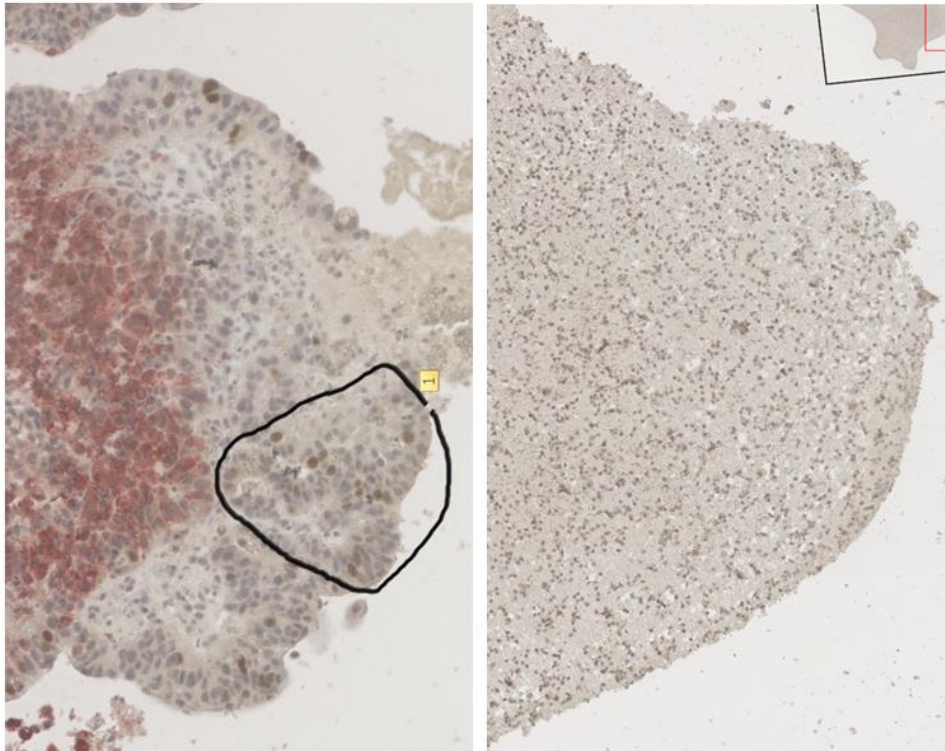


Abbildung 21: Darstellung der immunhistochemischen Färbung mit Pimonidazol und BrdU im Positiv- und Negativvergleich; links: #Öso7_4Gy; erkennbar sind braun gefärbte (BrdU pos.) proliferierende Zellen (schwarz umrandeter Auswertungsbereich 1) und ein zentrales rot gefärbtes (Pimonidazol pos.) Hypoxieareal, dessen Zellen nicht ausgewertet wurden; rechts: Glioblastom (#GBM1163) als Negativprobe; in der Probenanzucht wurde kein Pimonidazol und BrdU verwendet, keine roten oder braunen Zellen sind erkennbar;

Literaturverzeichnis

1. Koyanagi YN, Ito H, Oze I, Hosono S, Tanaka H, Abe T, et al. Development of a prediction model and estimation of cumulative risk for upper aerodigestive tract cancer on the basis of the aldehyde dehydrogenase 2 genotype and alcohol consumption in a Japanese population. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2017;26(1):38-47.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
3. Menegakis A, De Colle C, Yaromina A, Hennenlotter J, Stenzl A, Scharpf M, et al. Residual γ H2AX foci after ex vivo irradiation of patient samples with known tumour-type specific differences in radio-responsiveness. *Radiotherapy and Oncology*. 2015;116(3):480-5.
4. Smyth EC, Lagergren J, Fitzgerald RC, Lordick F, Shah MA, Lagergren P, et al. Oesophageal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3:17048.
5. Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, Bass AJ, Rustgi AK. The tumor microenvironment in esophageal cancer. *Oncogene*. 2016;35(41):5337-49.
6. Robert Koch Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 2016 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile].
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(1):7-30.
8. Domper Arnal MJ, Ferrandez Arenas A, Lanas Arbeloa A. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol*. 2015;21(26):7933-43.
9. Gockel I, Hoffmeister A. Endoscopic or Surgical Resection for Gastro-Esophageal Cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(31-32):513-9.
10. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncology*. 2011;47(8):725-31.
11. Granados-Garcia M. Oropharyngeal cancer: an emergent disease? *Salud Publica Mex*. 2016;58(2):285-90.
12. Siewert JR, Ott K. Are squamous and adenocarcinomas of the esophagus the same disease? *Semin Radiat Oncol*. 2007;17(1):38-44.
13. Ashraf N, Hoffe S, Kim R. Locally advanced gastroesophageal junction tumor: a treatment dilemma. *Oncologist*. 2015;20(2):134-42.
14. Haustermans K. The rationale and evidence for radiotherapy in the management of gastroesophageal junction tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013.
15. Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut*. 2015;64(3):381-7.
16. Kaz AM, Grady WM, Stachler MD, Bass AJ. Genetic and Epigenetic Alterations in Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2015;44(2):473-89.
17. Anandavadivelan P, Lagergren P. Cachexia in patients with oesophageal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(3):185-98.
18. Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2013;63(4):232-48.

19. de Jonge PJ, van Blankenstein M, Grady WM, Kuipers EJ. Barrett's oesophagus: epidemiology, cancer risk and implications for management. *Gut*. 2014;63(1):191-202.
20. Cancer Research UK. Oesophageal cancer statistics 2016 [Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/oesophageal-cancer>].
21. Krishnatreya M, Rahman T, Kataki AC, Lahkar K. Synchronous primary cancers in the head and neck region and upper aero digestive tract: Role of triple endoscopy. *Indian J Cancer*. 2015;52(1):53-6.
22. Rosch T. Endosonographic staging of esophageal cancer: a review of literature results. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1995;5(3):537-47.
23. Linge A, Lohaus F, Löck S, Nowak A, Gudziol V, Valentini C, et al. HPV status, cancer stem cell marker expression, hypoxia gene signatures and tumour volume identify good prognosis subgroups in patients with HNSCC after primary radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiotherapy and Oncology*. 2016;121(3):364-73.
24. Meyers BF, Downey RJ, Decker PA, Keenan RJ, Siegel BA, Cerfolio RJ, et al. The utility of positron emission tomography in staging of potentially operable carcinoma of the thoracic esophagus: results of the American College of Surgeons Oncology Group Z0060 trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(3):738-45.
25. Stahl M, Budach W. Definitive chemoradiotherapy. *Journal of thoracic disease*. 2017;9(Suppl 8):S792-S8.
26. Lordick F, on behalf of the EGC, Mariette C, on behalf of the EGC, Haustermans K, on behalf of the EGC, et al. Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2016;27(suppl_5):v50-v7.
27. Kelsen DP, Winter KA, Gunderson LL, Mortimer J, Estes NC, Haller DG, et al. Long-Term Results of RTOG Trial 8911 (USA Intergroup 113): A Random Assignment Trial Comparison of Chemotherapy Followed by Surgery Compared With Surgery Alone for Esophageal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(24):3719-25.
28. Semrau R. The Role of Radiotherapy in the Definitive and Postoperative Treatment of Advanced Head and Neck Cancer. *Oncology research and treatment*. 2017;40(6):347-52.
29. Kato H, Nakajima M. Treatments for esophageal cancer: a review. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2013;61(6):330-5.
30. Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TPJ. A Comparison of Multimodal Therapy and Surgery for Esophageal Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*. 1996;335(7):462-7.
31. van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, et al. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(22):2074-84.
32. Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, et al. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol*. 2008;26(7):1086-92.
33. Minsky BD, Pajak TF, Ginsberg RJ, Pisansky TM, Martenson J, Komaki R, et al. INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94-05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(5):1167-74.
34. Bourhis J, Sire C, Graff P, Gregoire V, Maingon P, Calais G, et al. Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant

- chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(2):145-53.
35. Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2013;25(10):578-85.
36. El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J. Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *British Journal Of Cancer.* 2003;89:593.
37. Wada S, Khoa TV, Kobayashi Y, Funayama T, Ogihara K, Ueno S, et al. Prediction of Cellular Radiosensitivity from DNA Damage Induced by γ -Rays and Carbon Ion Irradiation in Canine Tumor Cells. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2005;67(11):1089-95.
38. Menegakis A, von Neubeck C, Yaromina A, Thames H, Hering S, Hennenlotter J, et al. γ H2AX assay in ex vivo irradiated tumour specimens: A novel method to determine tumour radiation sensitivity in patient-derived material. *Radiotherapy and Oncology.* 2015;116(3):473-9.
39. Jenner TJ, deLara CM, O'Neill P, Stevens DL. Induction and Rejoining of DNA Double-strand Breaks in V79-4 Mammalian Cells Following γ - and α -irradiation. *International Journal of Radiation Biology.* 1993;64(3):265-73.
40. Takahashi A, Ohnishi T. Does γ H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 2005;229(2):171-9.
41. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42462-7.
42. Harper JW, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular cell.* 2007;28(5):739-45.
43. Stucki M, Jackson SP. γ H2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst).* 2006;5(5):534-43.
44. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421:499.
45. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001;27(3):247-54.
46. Nakamura TM, Du LL, Redon C, Russell P. Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 2004;24(14):6215-30.
47. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-68.
48. Shroff R, Arbel-Eden A, Pilch D, Ira G, Bonner WM, Petrini JH, et al. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol.* 2004;14(19):1703-11.
49. Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle.* 2003;2(5):426-7.
50. Lee J-H, Paull TT. ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science.* 2005;308(5721):551-4.
51. Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature.* 2000;408:1001.
52. Thiriet C, Hayes JJ. Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell.* 2005;18(6):617-22.
53. Jasin M, Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a012740.

54. Karanam K, Kafri R, Loewer A, Lahav G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Molecular cell*. 2012;47(2):320-9.
55. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(6):435-45.
56. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4):a016600.
57. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in cell biology*. 2016;26(1):52-64.
58. Zelensky A, Kanaar R, Wyman C. Mediators of homologous DNA pairing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(12):a016451.
59. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*. 2008;283(1):1-5.
60. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(9):712-20.
61. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(17):5678-94.
62. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-60.
63. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res*. 2002;158(4):486-92.
64. MacPhail SH, Banath JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol*. 2003;79(5):351-8.
65. Keogh M-C, Kim J-A, Downey M, Fillingham J, Chowdhury D, Harrison JC, et al. A phosphatase complex that dephosphorylates γ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature*. 2005;439:497.
66. Chowdhury D, Keogh M-C, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. γ -H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular cell*. 2005;20(5):801-9.
67. Downey M, Durocher D. γ H2AX as a Checkpoint Maintenance Signal. *Cell Cycle*. 2006;5(13):1376-81.
68. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5057-62.
69. Olive PL, Banáth JP. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2004;58(2):331-5.
70. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008;22(3):305-9.
71. Banath JP, Macphail SH, Olive PL. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res*. 2004;64(19):7144-9.
72. Menegakis A, Yaromina A, Eichel W, Dorfler A, Beuthien-Baumann B, Thames HD, et al. Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by gammaH2AX staining. *Int J Radiat Biol*. 2009;85(11):1032-41.
73. Banáth JP, Klovov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. Residual γ H2AX foci as an indication of lethal DNA lesions. *BMC Cancer*. 2010;10(1):4.

74. Banath JP, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 2003;63(15):4347-50.
75. De-Colle C, Yaromina A, Hennenlotter J, Thames H, Mueller A-C, Neumann T, et al. Ex vivo γ H2AX radiation sensitivity assay in prostate cancer: Inter-patient and intra-patient heterogeneity. *Radiotherapy and Oncology.* 2017;124(3):386-94.
76. Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, et al. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol.* 2005;77(1):18-24.
77. Welz S, Monnich D, Pfannenbergl C, Nikolaou K, Reimold M, La Fougere C, et al. Prognostic value of dynamic hypoxia PET in head and neck cancer: Results from a planned interim analysis of a randomized phase II hypoxia-image guided dose escalation trial. *Radiother Oncol.* 2017;124(3):526-32.
78. Yaromina A, Thames H, Zhou X, Hering S, Eicheler W, Dorfler A, et al. Radiobiological hypoxia, histological parameters of tumour microenvironment and local tumour control after fractionated irradiation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.* 2010;96(1):116-22.
79. Yaromina A, Zips D, Thames HD, Eicheler W, Krause M, Rosner A, et al. Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol.* 2006;81(2):122-9.
80. Menegakis A, Eicheler W, Yaromina A, Thames HD, Krause M, Baumann M. Residual DNA double strand breaks in perfused but not in unperfused areas determine different radiosensitivity of tumours. *Radiotherapy and Oncology.* 2011;100(1):137-44.
81. Soutoglou E, Misteli T. Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science.* 2008;320(5882):1507-10.
82. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):957-67.
83. McManus KJ, Hendzel MJ. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):5013-25.
84. Hauth F, Toulany M, Zips D, Menegakis A. Cell-line dependent effects of hypoxia prior to irradiation in squamous cell carcinoma lines. *Clinical and translational radiation oncology.* 2017;5:12-9.
85. Suntharalingam M, Winter K, Ilson D, Dicker AP, Kachnic L, Konski A, et al. Effect of the Addition of Cetuximab to Paclitaxel, Cisplatin, and Radiation Therapy for Patients With Esophageal Cancer: The NRG Oncology RTOG 0436 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2017;3(11):1520-8.
86. Shitara K, Ozguroglu M, Bang YJ, Di Bartolomeo M, Mandala M, Ryu MH, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2018;392(10142):123-33.
87. Alderson D, Cunningham D, Nankivell M, Blazeby JM, Griffin SM, Crellin A, et al. Neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine followed by resection in patients with oesophageal adenocarcinoma (UK MRC OE05): an open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2017;18(9):1249-60.
88. Sohda M, Kuwano H. Current Status and Future Prospects for Esophageal Cancer Treatment. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia.* 2017;23(1):1-11.
89. van Hagen P, Hulshof MCCM, van Lanschot JJB, Steyerberg EW, Henegouwen MlvB, Wijnhoven BPL, et al. Preoperative Chemoradiotherapy for Esophageal or Junctional Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2012;366(22):2074-84.

90. Menegakis A, De Colle C, Yaromina A, Hennenlotter J, Stenzl A, Scharpf M, et al. Residual gammaH2AX foci after ex vivo irradiation of patient samples with known tumour-type specific differences in radio-responsiveness. *Radiother Oncol.* 2015;116(3):480-5.
91. De-Colle C, Yaromina A, Hennenlotter J, Thames H, Mueller AC, Neumann T, et al. Ex vivo gammaH2AX radiation sensitivity assay in prostate cancer: Inter-patient and intra-patient heterogeneity. *Radiother Oncol.* 2017;124(3):386-94.
92. Klumpp D, Frank SC, Klumpp L, Sezgin EC, Eckert M, Edalat L, et al. TRPM8 is required for survival and radioresistance of glioblastoma cells. *Oncotarget.* 2017;8(56):95896-913.
93. Eminaga S, Teekakirikul P, Seidman CE, Seidman JG. Detection of Cell Proliferation Markers by Immunofluorescence Staining and Microscopy Imaging in Paraffin-Embedded Tissue Sections. *Current protocols in molecular biology.* 2016;115:14.25.1-14.25.14.
94. Birner P, Ritzi M, Musahl C, Knippers R, Gerdes J, Voigtländer T, et al. Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *The American journal of pathology.* 2001;158(6):1991-6.
95. Dako Denmark A/S. ARK (Animal Research Kit), Peroxidase 2015 [Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/128053001.PDF>].
96. Vector Laboratories. VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit [Available from: <https://vectorlabs.com/vectastain-elite-abc-kit-standard.html>].
97. Sigma. AEC Chromogen kit [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/aec101dat.pdf>].
98. molecular probes by life technologies. Tyramide Signal Amplification Kits 2013 [Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp20911.pdf>].
99. Turzynski. Zytokeratine [Available from: <http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikorper/Zytokeratine/zytokeratine.html>].
100. Yaromina A, Thames H, Zhou X, Hering S, Eicheler W, Dörfler A, et al. Radiobiological hypoxia, histological parameters of tumour microenvironment and local tumour control after fractionated irradiation. *Radiotherapy and Oncology.* 2010;96(1):116-22.
101. Yaromina A, Krause M, Thames H, Rosner A, Krause M, Hessel F, et al. Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiotherapy and Oncology.* 2007;83(3):304-10.
102. Hauth FD. Heterogeneous impact of hypoxia on cellular radiation sensitivity of three squamous cell carcinoma lines [Inaugural-Dissertation]: Eberhard Karls Universität zu Tübingen; 2018.
103. Choi Y, Choi HS, Jeon WK, Kim BI, Park DI, Cho YK, et al. Optimal number of endoscopic biopsies in diagnosis of advanced gastric and colorectal cancer. *J Korean Med Sci.* 2012;27(1):36-9.
104. Dekker W, Tytgat GN. Diagnostic accuracy of fiberoendoscopy in the detection of upper intestinal malignancy. A follow-up analysis. *Gastroenterology.* 1977;73(4 Pt 1):710-4.
105. Smyth EC, Lagergren J, Fitzgerald RC, Lordick F, Shah MA, Lagergren P, et al. Oesophageal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17048.
106. Graham DY, Schwartz JT, Cain GD, Gyorkey F. Prospective evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 1982;82(2):228-31.

107. Hauth F, Toulany M, Zips D, Menegakis A. Cell-line dependent effects of hypoxia prior to irradiation in squamous cell carcinoma lines. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2017;5:12-9.
108. Yaromina A, Krause M, Thames H, Rosner A, Krause M, Hessel F, et al. Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol*. 2007;83(3):304-10.
109. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
110. Gani C, Coackley C, Kumareswaran R, Schütze C, Krause M, Zafarana G, et al. In vivo studies of the PARP inhibitor, AZD-2281, in combination with fractionated radiotherapy: An exploration of the therapeutic ratio. *Radiother Oncol*. 2015;116(3):486-94.
111. van Nistelrooij AMJ, van Marion R, Koppert LB, Biermann K, Spaander MCW, Tilanus HW, et al. Molecular clonality analysis of esophageal adenocarcinoma by multiregion sequencing of tumor samples. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):144-.
112. Lin L, Lin D-C. Biological Significance of Tumor Heterogeneity in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1156.
113. Wang X, Jia Y, Deng H, Liu Y, Liu Y. Intratumoral heterogeneity of esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Pathol Res Pract*. 2019;215(2):308-14.
114. Wu H, Yu J, Li Y, Hou Q, Zhou R, Zhang N, et al. Single-cell RNA sequencing reveals diverse intratumoral heterogeneities and gene signatures of two types of esophageal cancers. *Cancer Lett*. 2018;438:133-43.
115. Walter D. Intratumoral heterogeneity of esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Thoracic Disease*. 2017;9(5):E465-E7.
116. Mehanna H, McConkey CC, Rahman JK, Wong WL, Smith AF, Nutting C, et al. PET-NECK: a multicentre randomised Phase III non-inferiority trial comparing a positron emission tomography-computerised tomography-guided watch-and-wait policy with planned neck dissection in the management of locally advanced (N2/N3) nodal metastases in patients with squamous cell head and neck cancer. *Health Technol Assess*. 2017;21(17):1-122.
117. Cabanero M, Tsao MS. Circulating tumour DNA in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol*. 2018;25(Suppl 1):S38-S44.
118. Gopalan V, Lam AK. Circulatory Tumor Cells in Esophageal Adenocarcinoma. *Methods Mol Biol*. 2018;1756:177-86.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Radioonkologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Daniel Zips und Herrn PD Dr. Cihan Gani durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Daniel Zips, ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Radioonkologie in Tübingen und Doktorvater, und durch Herrn PD Dr. Cihan Gani, stellvertretender ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Radioonkologie in Tübingen und Betreuer der Dissertation.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Apostolos Menegakis) eigenständig/in Zusammenarbeit mit (Dr. Simon Boeke, Andreas Riedel, Dr. Chiara de-Colle, Lukas Klumpp, Dr. Kerstin Zwirner) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich nach Anleitung durch PD Dr. Cihan Gani.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 31.01.2021

Moritz Sängler

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Zips, ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit des näheren Einblicks in die experimentelle medizinische Forschung herzlich danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Cihan Gani, der mich in allen Bereichen der Doktorarbeit, sei es der Patientenrekrutierung oder Auswertung unterstützte und mir in seiner immer positiven, freundlichen Art dabei half, die Arbeit fortzuführen.

Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik Tübingen um Prof. Dr. Stephan Huber: Lukas Klumpp, Dr. Simon Böke, Heidrun Faltin, Dr. Chiara de-Colle, Dr. Pierluigi Bonomo, Dr. Apostolos Menegakis, Andreas Riedel, Christian Dieter, Dr. Franziska Hauth. Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. Martin Götz und seinem Team bei der Biopsieentnahme, sowie Dr. Markus Scharpf und seinem Team bei der Befundung des vorgelegten Tumorgewebes. Außerdem bin ich allen Patienten sehr dankbar, die ihr Gewebe für die Forschung frei gegeben und mir damit die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir stets ein offenes Ohr geschenkt und mich unermüdlich begleitet und unterstützt haben.