

Biodosimetrische Untersuchungen mit dem GPA-Test: Verbesserung der Methode durch magnetische Anreicherung Glycophorin A (GPA) negativer Erythrozytenvarianten und Bestimmung der Variantenhäufigkeit bei strahlenexponierten Personen

J. Schiwietz, Bad Kissingen

Der Glycophorin A Test ist ein biodosimetrisches Testverfahren zur Erkennung und Quantifizierung von Mutationen auf dem GPA-Gen. Glycophorin A ist das Antigen des Blutgruppensystems MN. Es wird in zwei kodominanten Formen, der M- und der N-Form, exprimiert. Aus technischen Gründen ist der GPA-Test nur an heterozygoten MN-Personen durchführbar, denn nur bei dieser Antigen-Konstellation kann eine Mutation mit Verlust eines Antigens nicht durch ein anderes Allel kompensiert werden. Etwa die Hälfte der Bevölkerung ist heterozygot für diesen Genlocus. Mit dem GPA-Test werden M-Verlust Mutationen gemessen, d.h. es werden Erythrozytenvarianten gemessen, die durch Stammzell-Mutation auf dem GPA-Lokus die Expression des M-Allels verloren haben. Dabei können zwei verschiedene Variantentypen unterschieden werden: ein hemizygoter Phänotyp (sog. N0-Varianten) und ein homozygoter Phänotyp (sog. NN-Varianten). Da diesen bei den Variantentypen unterschiedliche Mutationsmechanismen zugrunde liegen, scheinen auch unterschiedliche Arten der Gentoxizität unterschieden werden zu können, beispielsweise bewirkt eine Strahlenexposition in erster Linie eine Zunahme der hemizygoten N0-Variantenhäufigkeit. Der Anstieg der Variantenhäufigkeit bleibt lebenslang erhalten, wie Untersuchungen an Überlebenden der Atombombenexplosion in Hiroshima zeigen konnten. Somit ist der GPA-Test unter den somatischen Testsystemen bisher die einzige Methode zur Bestimmung einer lange zurückliegenden bzw. lebenslangen Strahlenbelastung.

Die Methode der Wahl zur Bestimmung der GPA-Varianten ist derzeit die von Langlois et al. entwickelte sog. BR6-Assay. Hierbei werden formalinfixierte MN-Erythrozyten mit fluorochromierten M- und N-spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt und die Varianten anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Aufgrund der geringen Variantenhäufigkeit (ca. $1 \cdot 10^{-5}$) mußten je Bestimmung etwa 5 Mio. Zellen gemessen werden, um wenigstens einige Dutzend Varianten zu finden. Hieraus resultierten zwei Probleme: Zum einen war am Durchflußzytometer eine sehr hohe Zählrate (ca. 4.000 Zellen pro Sekunde) erforderlich, um die Messung in einer vertretbaren Zeit von etwa 30

min durchführen zu können. Diese hohe Zählrate begünstigt jedoch eine schlechte Fokussierung der Zellen im Laserstrahl und ermöglicht so eine falsche Zellklassifikation. Das zweite Problem lag in der geringen Zahl der gefundenen Varianten, so daß der statistische Fehler der Messung relativ groß war.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der seltene M-negative Varianten vor der Analyse selektiv angereichert werden können; dies wurde mit dem magnetischen Zellseparationssystem MACS erreicht. Hierdurch wurde es möglich, seltene Varianten aus einer sehr viel größeren Blutprobe anzureichern und die durchflußzytometrische Messung mit einer variantenreichen Probe von etwa 1.000 Varianten unter optimalen Meßbedingungen durchzuführen.

Eine typische Anreicherung der Varianten mit dem MACS-System verläuft folgendermaßen: $2 \cdot 10^8$ formalinfixierte MN-Erythrozyten (das entspricht einer 20 mal größeren Blutprobe als mit dem herkömmlichen BR6-Assay) werden zunächst mit dem biotinylierten, M-spezifischen Antikörper und anschließend mit Streptavidin-konjugierten, submikroskopischen Magnetpartikeln inkubiert. Über die Streptavidin-Biotin-Bindung beladen sich dabei die Zellen mit M-Antigenen an der Oberfläche mit Magnetpartikeln, während M-negative Varianten nicht magnetisch markiert werden. Die so vorbehandelte Zellsuspension wird über eine mit ferromagnetischer Stahlwolle gefüllte Säule gegeben, die sich im Feld eines starken Permanent-Magneten befindet. Magnetisch markierte MN-Erythrozyten werden zum größten Teil in der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Säule passieren und in der nichtmagnetischen Fraktion angereichert werden. Der unspezifische Verlust von Varianten in der Säule hat sich dabei als relativ gering erwiesen, eine empirische Wiederfindungsrate ging schließlich in die Berechnung der Variantenhäufigkeit mit ein. Durch die Magnettrennung konnte eine etwa 1.000-10.000fache Anreicherung der Varianten erreicht werden. Schließlich wird der Anteil der N0- und NN-Varianten wie beim BR6-Assay mit dem Durchflußzytometer bestimmt und die Variantenhäufigkeit berechnet. Durch Kontrollversuche, bei denen GPA-Varianten durch NN-Erythrozyten simuliert wurden, konnte die Zuverlässigkeit des Verfahrens überprüft werden.

Diese neu entwickelte sog. MACS-BR6-Methode wurde an Personen, bei denen eine erhöhte Variantenhäufigkeit (VH) zu erwarten wäre, getestet. Die Kollektive umfaßten zum einen strahlenexponierte Personen (hierzu zählten Patienten nach Radioiodtherapie, sowie eine kleine Gruppe von Opfern des Reaktorunfalls von Tschernobyl) und zum anderen zytostatisch behandelte Tumorkranke.

Bei einer Gruppe von 11 Patienten mit Schilddrüsenkarzinom wurde die Variantenhäufigkeit 2-16 Jahre nach Radioiodtherapie gemessen, um die Abhängigkeit der Variantenhäufigkeit von der Knochenmarks-Strahlendosis zu

ermitteln. Sowohl die hemi- als auch die homozygote Variantenhäufigkeit waren erhöht, der Unterschied zu den Kontrollpersonen war jedoch nur für die N0-Variantenhäufigkeit statistisch signifikant. Ebenso fand sich für die N0-Variantenhäufigkeit eine signifikante Dosisabhängigkeit, welcher entsprechend früherer Studien ein lineares Dosis-Wirkungs-Modell zugrunde gelegt wurde. Die Dosisabhängigkeit entsprach dabei weitgehend bereits früher publizierten Ergebnissen von Messungen an Überlebenden der Atombombenexplosion in Japan (Tab. 1).

Tab. 1: Regressionsparameter der linearen Dosis-Wirkungs-Kurve

Kollektiv	a [$\cdot 10^{-6}$]	b [$\cdot 10^{-6}$]	r^2	p (Regr.)
Hiroshima-Gruppe	16,0	27,0	0,36	<0,001
Radioiodtherapie-Gruppe	16,3	24,8	0,39	0,0013

Für vier Personen, die während der Reaktorkatastrophe von Tschernobyl unbekanntem Strahlendosen ausgesetzt waren, wurde mit der entwickelten Methode die N0-Variantenhäufigkeit gemessen und anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve die Strahlendosis retrospektiv abgeschätzt. Dabei fand sich acht Jahre nach Exposition eine gute Übereinstimmung mit bereits früher anhand zytogenetischer Verfahren oder mit der FISH-Methode ermittelten Ganzkörperdosen.

Schließlich wurde geprüft, ob eine zytostatische Therapie die Häufigkeit der GPA-Varianten beeinflusst. Untersucht wurden acht Patienten, die nur zytostatisch behandelt worden waren und sieben Patienten nach einer kombinierten Strahlen- und Chemotherapie. Das untersuchte Kollektiv war überaus heterogen, was Tumorart, Tumorstadium oder Therapieschema betraf. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, daß beide Gruppen gegenüber dem nichtexponierten Kontrollkollektiv eine signifikant erhöhte Variantenhäufigkeit für beide Variantentypen aufwiesen. Im Vergleich beider Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied der Variantenhäufigkeit, obwohl den bestrahlten Patienten lokal bis zu 50 Gy verabreicht wurden. Somit scheint eine lokale Strahlentherapie keine additive genotoxische Wirkung zu besitzen, was auch schon frühere Studien belegen konnten.

Mit der Arbeit ist es gelungen, den Nachweis von seltenen GPA-Varianten durch die Einführung der magnetischen Varianten-Anreicherung zu verbessern. Anhand von Untersuchungen an diversen exponierten Kollektiven konnte die Brauchbarkeit der MACS-BR6-Methode demonstriert werden. Im weiteren ist durch größer angelegte Studien eine genauere Validisierung der entwickelten Methode bzw. der gefundenen Ergebnisse erforderlich.