

Aus dem Labor für Strahlenbiologie & Experimenteller Radioonkologie
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
des Onkologischen Zentrums
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

**BEDEUTUNG VON EINZELNUKLEOTIDPOLYMORPHISMEN IN DEN
GENEN TGF β UND SOD2 BEI BRUSTKREBSPATIENTINNEN
FÜR DIE FIBROSE NACH STRAHLENTHERAPIE**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

SONKO BORSTELMANN

Aus Cuzco, Peru
Hamburg, den 08.02.2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 22.01.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD. Dr. A Krüll

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD. Dr. Annette Raabe

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
2. EINLEITUNG	6
2.1. Das Mammakarzinom	6
2.2. Nebenwirkung der Strahlentherapie	7
2.3. Quantifizierung von akuten und späten Nebenwirkungen	8
2.4. Fibrose	9
2.5. Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen	11
2.6. Genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit	14
2.6.1. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	15
2.6.2. Auswahl der SNPs	20
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Patienten	22
3.2. Isolierung der DNA	22
3.2.1. DNA-Isolierung	22
3.2.2. Bestimmung der DNA Konzentration	23
3.3. Polymerase Kettenreaktion	24
3.4. Gelelektrophorese	26
3.4.1. Prinzip der Methode	26
3.4.2. Herstellung des Ethidiumbromid-Gels	27
3.4.3. Vorbereitung der Proben	27
3.4.4. Elektrophorese und Auswertung	27
3.5. DNA-Elution	28
3.6. Restriktions – Fragment – Längen - Polymorphismus (RFLP)	28
3.6.1. Prinzip der Methode	28
3.6.2. RFLP bei SOD2	29
3.6.3. RFLP bei TGF β 1	29
3.7. Geräte	30
3.8. Puffer und Lösungen	30
4. ERGEBNISSE	32
4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen	32
4.1.1. SOD2	32
4.1.2. TGF β 1	33
4.2. Genstatus der Patienten	34
4.2.1. TGF β 1	34
4.3. Einfluss des Genstatus auf das Fibrosierisiko	36
4.4. Einfluss des Genstatus auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit	39
5. DISKUSSION	43
5.1. Allelhäufigkeit	43

5.2. Fibroserisiko und individuelle Strahlenempfindlichkeit	44
5.3. Bedeutung der SNPs für Fibroserisiko und Strahlenempfindlichkeit	45
5.4. Kombinationsanalyse der SNP's	47
6. ZUSAMMENFASSUNG	51
7. LITERATUR	53
8. DANKSAGUNG	60
9. LEBENS LAUF	61
10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	62

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Durch Strahlentherapie können heute eine Vielzahl an Tumorerkrankungen geheilt werden. Die bei dieser Therapie maximal einsetzbare Dosis wird für viele Tumoren durch das Auftreten vor allem von späten Normalgewebereaktionen begrenzt. Für das Auftreten dieser Reaktionen werden selbst nach identischen Therapieschemata große Variationen beobachtet. Diese Variationen werden zum größten Teil auf Unterschiede in der individuellen Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt.

Die individuelle Strahlenempfindlichkeit ist genetisch determiniert. Für Unterschiede in dieser Strahlenempfindlichkeit werden vor allem genetische Veränderungen, wie sie durch Singel Nucleotide Polymorphisms (SNP's) verursacht werden, verantwortlich gemacht. Für bestimmte SNP's in so genannten Risikogenen konnte dem entsprechend bereits ein Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für späte Normalgewebereaktionen gezeigt werden.

Diese Hypothese soll ebenfalls in dieser Arbeit überprüft werden. Die Untersuchungen sollen dabei an Blutproben von 69 Brustkrebspatientinnen durchgeführt werden, die zuvor strahlentherapeutisch behandelt worden sind. Diese Patientinnen zeigten dabei große Unterschiede in den späten Normalgewebereaktionen, und es soll mit dieser Arbeit geklärt werden, ob diese Unterschiede z.T. durch die durch SNP's bedingte genetische Variation bedingt sein könnten.

Insgesamt sollen in diesem Projekt die Bedeutung von folgenden fünf SNP's untersucht werden: XRCC1 (Arg399Gln), ATM (Asp1853Asn), XPD (Lys751Gln), SOD2 (Ala-9Val) und TGF β 1 (C-509T). Die Untersuchung in dieser Arbeit beschränkt sich auf die Bedeutung der beiden SNP's in den Genen SOD2 und TGF β . Die drei anderen SNP's in den Genen XRCC1, ATM und XPD werden in einer parallelen Studie untersucht. In der abschließenden Diskussion werden diese Daten jeweils zusammengefasst.

Insgesamt beinhaltet diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welche Bedeutung haben SNP's in den Genen SOD2 und TGF β für das Auftreten von Normalgewebereaktionen nach Bestrahlung von Brustkrebspatientinnen?
2. Welche Bedeutung haben diese SNP's für die individuelle Strahlenempfindlichkeit?
3. Wie wirkt sich eine Kombination der untersuchten SNP's auf das Normalgeweberisiko aus?

2. EINLEITUNG

Für die therapeutische Behandlung von malignen Tumoren ist die Strahlentherapie neben der chirurgischen Therapie von essentieller Bedeutung. Im Gegensatz zur medikamentösen Therapie (Chemo- und Hormontherapie) ist ihre Wirkung auf eine lokale Region begrenzt. Die Strahlentherapie kann eingesetzt werden, wenn entweder eine chirurgische Therapie nicht möglich ist, oder die Organerhaltung erforderlich ist bzw. gewünscht wird. Um dem Patienten eine optimale Therapie anbieten zu können, ist häufig eine kombinierte Therapie mit interdisziplinärer Betreuung sinnvoll (Henne-Bruns et al. 2003).

Die kurative Strahlentherapie hat die vollständige Vernichtung des malignen Gewebes bei einem lokal begrenzten Tumor zum Ziel. Die insgesamt erforderliche Strahlendosis von in der Regel 60-70 Gy wird über mehrere Sitzungen „fraktioniert“ verteilt und ist abhängig von der Entität und dem Volumen des Tumors sowie von der Strahlensensibilität des Normalgewebes. Gebiete, in denen sich die Strahlentherapie nachhaltig etabliert hat, sind vor allem Mamma-, Prostata-, Magen-, Zervix-, sowie Kopf- und Halstumore.

2.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Mitteleuropa mit einem Anteil von 23% der häufigste maligne Tumor der Frau (Bühling et al., 2004). Verschiedene genetische Besonderheiten in mehreren Genen z.B. in p53, bcl-2, c-myc und c-myb sind für ein höheres Mammakarzinomrisiko verantwortlich. Noch eindrucksvoller ist die genetische Disposition bei den Genen BRCA1 und BRCA2, die zu einem 85 % höherem Risiko der Entwicklung eines Mamma- und Zervixkarzinoms führen kann (Bühling et al. 2004).

Das Mammakarzinom wird histologisch eingeteilt nach der Invasivität und in Bezug auf die Lokalisation in duktales (85 %) und lobuläres (10 – 15 %) Karzinom. Das **invasive ductale Karzinom (IDK)** ist das häufigste Mammakarzinom (85 %). Wesentlich seltener kommt das **invasive lobuläre Karzinom (ILK)** vor (10%). Zu den nicht invasiven gehören das **Intraductale Karzinom (DCIS)** und das **Lobulären Carcinoma in Situ (CLIS)** (Bühling et al. 2004).

Die Prognose des Mammakarzinoms erfolgt anhand von Prognosefaktoren, wie z.B.

die Tumorgröße, der axilläre Lymphknotenstatus, das histologische Grading, der Östrogen und Progesteron Rezeptorstatus (Henne-Bruns et al. 2003).

Eine Tumorausbreitung erfolgt bei entsprechender Entität lokal, regional oder über Fernmetastasierung.

Das Therapie-Management eines invasiven Karzinoms beinhaltet eine vollständige Entfernung des Tumorherdes (Brusterhaltend) bei R 0 (tumorfreier Rand), sowie die Lymphnodektomie. Durch eine Strahlentherapie nach Tumorresektion wird das Risiko eines Rezidivs gemindert (Vinh-Hung et al. 2004). Die Bestrahlung soll 50 Gy nicht überschreiten und kann 4 bis 6 Wochen nach Operation erfolgen. Die axillären Lymphknoten werden i.d.R. nicht bestrahlt (Ausnahme: inoperable oder mehr als 10 befallene Lymphknoten und Kapseldurchbruch). Die Adjuvanten systemischen Therapie beinhaltet Zytostatika oder Hormone, wobei die Entscheidung für eine der beiden Optionen aufgrund von Menopausen-, Lymphknoten-, Östrogen- Progesteronrezeptorstatus, der Tumorgröße sowie des Gradings und des Genstatus zu treffen ist. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Therapie des Mammakarzinoms sowohl die lokalen, als auch die systemischen Komponenten der Erkrankung abdecken muss. Die chirurgische Therapie begrenzt sich dabei auf das lokale Geschehen, während die medikamentöse Therapie den systemischen Charakter der Erkrankung einzudämmen sucht. Die Nachbestrahlung bei brusterhaltender Therapie bzw. auch nach Ablatio versucht die Metastasierung und somit die Rezidivrate des Mammakarzinoms zu verhindern.

2.2. Nebenwirkung der Strahlentherapie

Neben der erwünschten Zerstörung des Tumorgewebes kommt es auch zu einer Schädigung des Normalgewebes, da die Strahlung auf dem Weg zum Tumor Normalgewebe durchdringen muss. Diese Schädigung konnte in den letzten Jahren durch verbesserte Fixierung während der Bestrahlung (konstantes Bestrahlungsareal bei jeder Bestrahlungseinheit), Verwendung mehrerer Strahlenfelder, sowie durch Optimierung der Fraktionierung erheblich reduziert werden.

Bei den Nebenwirkungen unterscheidet man zwischen akuten und späten Normalgewebereaktionen. Die akuten Nebenwirkungen treten schon während oder kurz nach der Therapie auf und klingen in der Regel schnell wieder ab. Akutreaktionen treten vor allem in Gewebe mit hohem Zellumsatz auf, wie z.B. in Schleimhäuten. Häufige Akut-

reaktionen sind u.a. die Mukositis, die Dermatitis und die Ösophagitis.

Eine Normalgeweberaktion wird als späte Nebenwirkung definiert, wenn die Schädigung erst drei Monate nach Therapieende auftritt. Diese Schädigungen sind i.d.R. nicht reversibel, sondern chronisch progredient und treten vermehrt in Gewebe mit niedrigem Zellzyklus auf. Zu den späten Reaktionen gehören Fibrose, Armödeme, Brustödeme, Plexus brachialis Läsionen, Teleangiektasien, Strahlenulkus sowie Retraktion und Atrophie der belassenen Mamma (Reiser et al. 2004).

Bei der Planung einer strahlentherapeutischen Behandlung müssen vor allem die späten Nebenwirkungen berücksichtigt werden, da diese chronisch sind. Um dieses Therapieziel zu erreichen, ist eine exakte Auswahl der Gesamtdosis sowie des Therapieplans in Bezug auf die Einzeldosis und die Anzahl der Fraktionierungen von essenzieller Bedeutung, um eine möglichst komplikationsfreie Kontrolle des Tumors zu erreichen.

2.3. Quantifizierung von akuten und späten Nebenwirkungen

Um verschiedene Therapieformen und Therapiedosen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Klassifikation der akuten und späten Normalgewebereaktionen erstellt. Zu diesem Zweck führte das National Cancer Institute der U.S.A. (NCI) 1992 eine Konsensus-Konferenz durch. Die Teilnehmer dieser Tagung rekrutierten sich aus onkologischen Arbeitsgruppen, die jahrelang multizentrisch miteinander kooperiert hatten. Dies waren u.a. die „Cancer & Leukemia Group B“ (CALGB), die „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG), die „European Organization for Research and Treatment of Cancer“ (EORTC), die „North Central Cancer Treatment Group“ (NCCTG), die „Pediatric Oncology Group“ (POG), die „Radiation Therapy Oncology Group“ (RTOG) und die „Southwest Oncology Group“ (SWOG). Ziel dieser Tagung war es, aus verschiedener Sicht zur Erfassung von Langzeitfolgen eine einheitliche, interdisziplinäre und internationale Klassifikation zu entwickeln.

Aus dieser Konsensustagung ist das sogenannte LENT-SOMA-Einteilungssystem entstanden. Diese Bezeichnung beinhaltet: LENT = „Late Effects on Normal Tissues“ (Späteffekte am Normalgewebe); SOMA = „Subjective Objective Management Analysis“ (subjektive, objektive, therapiebedingte Kriterien, Analyseverfahren zur Beschreibung von Nebenwirkungen).

Bei diesem System unterscheidet man zwischen verschiedenen Schweregraden. Bei

Grad 0 liegen keine, bei Grad 1 geringe bzw. leichte, bei Grad 2 mäßige oder deutliche, bei Grad 3 ausgeprägte und schwere, bei Grad 4 lebensbedrohliche und bei Grad 5 letale, organspezifische Nebenwirkungen vor. Hierbei wurden 38 verschiedene Organsysteme erfasst (Müller et al., 1997).

Bei jedem der Organsysteme werden vier verschiedene Kategorien (SOMA) berücksichtigt: S = subjektive; O = objektive; M = Management; A = Analyse. Die *subjektiven* Angaben des Patienten beziehen sich z.B. auf die Intensität und Frequenz von Schmerzen. Die *objektive* Einteilung erfolgt durch die körperliche Untersuchung mit Hilfe bildgebender Verfahren und Laborwerte. Das *Management* organspezifischer Nebenwirkungen beinhaltet gezielte Therapiemaßnahmen wie zum Beispiel Schmerzmittel (peripher wirksame Nichtopioide versus zentral wirksame Opioide). Die *Analyse* beinhaltet die Verfahren zur spezifischen Quantifizierung und Validierung von Spätfolgen, zum Beispiel Ultraschall, CT, MR, PET oder anderen Methoden (EEG, EKG, Lungenfunktion, Laborwerte). Mit diesem Einteilungssystem ist es möglich, die Belastung von Normalgewebe nach einer strahlentherapeutischen Tumortherapie zu klassifizieren und verschiedene Behandlungsverfahren nicht nur hinsichtlich ihrer Tumorwirkung, sondern auch hinsichtlich der Nebenwirkungen miteinander zu vergleichen.

2.4. Fibrose

Einer der wichtigsten Spätnebenwirkungen nach Strahlentherapie ist die Fibrose (DeLanian et al. 2004). Als Fibrose wird generell eine Kollagenfaservermehrung in menschlichen Geweben und Organen bezeichnet. Dieser Zuwachs an Bindegewebe kann eine Verhärtung des Gewebes und des Organs zur Folge haben. Kollagen ist das häufigste Eiweiß im menschlichen Körper und kommt in fünf verschiedenen Typen vor. Es dient vor allem dem Aufbau von Binde- und Stützgewebe.

Generell wird zwischen der primären und der sekundären Fibrose unterschieden. Eine Fibrose wird als primär definiert, wenn das jeweilige Gewebe ohne erkennbare äußere Schädigung, wie z.B. bei der primären biliären Zirrhose, fibrotisiert. Die primären Fibrosen sind insgesamt sehr selten. Die Mehrheit bilden die sekundären Fibrosen, denen eine Gewebsschädigung durch exogene oder endogene Noxen zugrunde liegt. In diesem Falle werden Fibroblasten aktiviert, die vermehrt interstitielles Bindegewebe produzieren. Es erfolgt eine Narbenbildung.

Schädigende Noxen, die die Entstehung einer sekundären Fibrose begünstigen, sind z.B. Strahlentherapie, chronische Entzündungsvorgänge, Durchblutungsstörungen und degenerative Prozesse. Bei der sekundären Fibrose handelt es sich also um eine Gewebsschädigung z.B. infolge oben erwähnter Vorgänge. Die Diagnose kann anhand einer Gewebeprobe gestellt werden.

Hinsichtlich der Entwicklung chronischer Strahlenschäden werden nach Denham et al. (Denham et al. 2001) drei interagierende Effekte postuliert: (1) ein zytotoxischer Effekt, der z.B. von der Proliferationsrate und der Reparaturkapazität der Zielzellen abhängt; (2) funktionelle Effekte, z.B. Aktivierung der Genexpression von z.B. Wachstumsfaktoren; (3) indirekte Effekte wie der Schädigung der lokalen Gefäßarchitektur mit konsekutiver Devaskularisierung.

Nach der klinisch asymptomatischen Phase, die Monate bis Jahre dauern kann, entwickeln sich chronische Strahlenschäden wie z.B. Fibrosen der Haut. Die Dauer des asymptomatischen Intervalls hängt vermutlich von Faktoren ab, wie der Höhe der Gesamtdosis, der Einzeldosis und der Dosisleistung. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass Schäden, die in den ersten Jahren nach Bestrahlung auftreten, eher progredient und schwerwiegender verlaufen, als später auftretende.

Die radiogene Schädigung der verschiedenen Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen, die miteinander interagieren und eine funktionelle Einheit bilden, stehen am Anfang einer möglichen Fibroseentwicklung. Die interzelluläre Kommunikation läuft dabei über Zytokine und Wachstumsfaktoren ab (Rodemann et al. 1995, Rodemann et al. 1996) Durch Strahlenexposition kann in den verschiedenen Zelltypen die Synthese, Sekretion und Aktivierung spezifischer Fibrose-induzierender Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteigert werden. Zelluläre Veränderungen der Proliferation, Differenzierung und die extrazelluläre Matrixsynthese, insbesondere der interstiellen Kollagene II und III führen schließlich zur Ausbildung des Phänotyps der Fibrose.

Das Fibroblastenzellsystem zeigt eine strenge Differenzierungshierarchie und setzt sich zusammen aus den regenerativen teilungsaktiven Progenitorfibroblasten und nicht-regenerativen postmitotischen Fibrozyten (Rodemann et al. 1996). Es wurde nachgewiesen, dass in den Bindegeweben verschiedener Organe ein nahezu konstantes Verhältnis von 2:1 für die Zahl der Progenitorfibroblasten und der Funktionsfibrozyten besteht. Die

Lebensfähigkeit eines Funktionsfibrozyten ist genetisch determiniert. Ein Funktionsfibrozyt ist verantwortlich für die Produktion der Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und der Wachstumsfaktoren. Stirbt einer dieser Funktionsfibrozyten ab, muss sich ein Progenitorfibroblast in zwei Funktionsfibrozyten ausdifferenzieren, um das Verhältnis konstant zu halten (Burger et al. 1998). Bei Strahlenexposition wird dieser Prozess dadurch gestört, dass es zu einer vermehrten Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten kommt und damit zu einer überproportionalen Akkumulation von Zellen mit außergewöhnlich hoher ECM-Syntheseleistung. Das bestrahlte Gewebe ist somit gekennzeichnet durch eine hochgradige Kollagenanreicherung, die sich in Form der Fibrose zeigt (Burger et al. 1998, Rodemann et al. 1996).

Eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese nehmen die inflammatorischen Zytokine und insbesondere der „Transforming Growth Factor beta“ (TGF β) ein (Hill et al. 2001, Rodemann et al. 1995). TGF β 1 ist für das Fibroblastenzellsystem ein die Proliferation modulierender und die Differenzierung induzierender Wachstumsfaktor, dessen autokrine Aktivität in Progenitorfibroblasten durch die Strahlenexposition induziert wird (Burger et al. 1998, Hakenjos et al. 2000). Dieses aktivierte TGF β 1 steuert dann über die TGF β -1-Rezeptor-II-abhängige intrazelluläre Signalkaskade die Induktion des Differenzierungsprozesses von Progenitorfibroblasten in postmitotische Funktionsfibrozyten, wobei die zeitlich gestaffelte Veränderung der Expression der Cyclin-abhängigen Kinasen (CdK) Inhibitoren p21, p27, p16 und p15 eine wichtige Rolle spielen (Barcellos-Hoff 2005).

Die strahleninduzierte Synthese von biologisch aktiven TGF β 1 und die terminale Differenzierung von Fibroblasten sind also miteinander verbundene Prozesse in der Entwicklung der strahleninduzierten Fibrose. TGF β 1 übt direkte Effekte auf die Genexpression extrazellulärer Matrixproteine und die Kollageninduktion aus und inhibiert gleichermaßen die Kollagenaseproduktion. Das Resultat ist eine chronische Aktivierung und Differenzierung von Fibrozyten mit der Folge einer Fibroseentstehung.

2.5. Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen

Das Ausmaß der Normalgewebereaktion kann erheblich variieren. Es besteht daher schon seit langem ein großes Interesse daran, Parameter zu etablieren, die eine prädiktive Bestimmung des Normalgeweberisikos vor Beginn der Therapie ermöglichen. Unter

dem Begriff „Holy Gail on Radiobiology“ wurde die Suche nach solchen Parametern zur Prädiktion des Normalgeweberisikos auf eine Strahlentherapie bezeichnet (Peters et al. 1990).

Eine derartige Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen könnte eine Individualisierung der Therapie ermöglichen (Budach 1997). Bisher richtet sich die Strahlentherapie nach dem so genannten Toleranzdosiskonzept aus. Dieses Konzept besagt, dass die Therapiedosis maximal eine Strahlendosis erlaubt, bei der 5 % der Patientinnen eine schwere Nebenwirkung entwickeln. Daraus geht aber auch hervor, dass 95 % der Patientinnen theoretisch eine höhere Strahlendosis vertragen hätten, was zu einem besseren Therapieerfolg bzw. einer Reduktion der Rezidivrate und somit zu einer Senkung der Mortalität geführt hätte (Jones et al. 1995). Könnten vorab die Patientinnen mit einem erhöhten Normalgeweberisiko identifiziert werden, so könnte für diese Patientinnen durch Reduktion der Dosis die Zahl der schweren Nebenwirkungen vermindert werden. Andererseits könnte für die anderen Patientinnen durch Steigerung der Dosis die Heilungschancen erhöht werden.

Die Normalgewebereaktion ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig (West et al. 1991) (Herrmann et al. 1997). Die Wichtigsten sind die Strahlendosis und das Bestrahlungsvolumen (West et al. 1995). Mit steigender Strahlendosis nimmt das Risiko für die Ausprägung einer Normalgewebereaktion eindeutig zu (Bentzen et al. 1994, Dorr et al. 1997, Turesson 1990, Turesson et al. 1996). Jedoch auch bei identischem Fraktionierungsschema und Strahlendosis können deutliche Unterschiede auftreten. Dies wurde von Tucker et al. (Tucker et al. 1992) und Turesson et al. (Turesson 1990) bei Patientinnen mit Mammakarzinom detailliert gezeigt. Die Auswertung dieser Daten ergab, dass 75 % der Strahlenempfindlichkeit genetisch determiniert ist. Die Unterschiede in der Strahlendosis zusammen mit anderen Faktoren (Alter, Menopausenstatus, Systolischer Blutdruck und Medikamentenapplikation) war lediglich zu 25 % für die Variation der Normalgewebereaktion verantwortlich.

Hinsichtlich der Parameter, die das individuelle Normalgeweberisiko bestimmen, wird derzeit vor allem die Bedeutung genetischer Komponenten diskutiert. Erste Hinweise auf eine genetisch determinierte Strahlenempfindlichkeit lieferten vor allem Beobachtungen an Patientinnen mit dem Syndrom *Ataxia teleangiectasia* (AT). Diese Patientinnen zeigten nach einer Bestrahlung eine ausgeprägte Normalgewebereaktion, was

auf eine extrem hohe zelluläre Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt werden konnte (Hart et al. 1987). Andere Syndrome (*Bloom-Syndrom*, *Fanconi-Anämie (FA)*, *Lifraumeni-Syndrom (LFS)*, *Naevusbasalzell-Syndrom*, *Neurofibromatose (NF)*, *Nijmegen-Syndrom (NBS)* und *Retinoblastom (RB)* zeigten ähnliche Zusammenhänge (Peters 1990, Streffer 1997).

Auch die Untersuchungen von Woods et al. (Woods et al. 1988) und Plowman et al. (Plowman et al. 1990) weisen darauf hin, dass das Ausmaß der Normalgewebereaktion durch eine genetisch determinierte, individuelle Strahlenempfindlichkeit bestimmt wird. In ihrer Studie wurde gezeigt, dass die zelluläre Empfindlichkeit strahlensensitiver Patientinnen deutlich über der von gesunden Spenderinnen lag. Von Burnet et al. (Burnet et al. 1992) wurde erstmalig gezeigt, dass nicht nur bei Patientinnen mit bestimmten Syndromen, sondern vermutlich bei allen Patientinnen das Ausmaß der Normalgewebereaktion durch die genetisch determinierte, individuelle Strahlenempfindlichkeit bestimmt wird. Diese Annahme basierte auf der Analyse von sechs Patientinnen, bei denen das Ausmaß der Teleangiektasie bzw. des Hauterythems mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit korrelierte. In Studien von Smith et al. (Smith et al. 1980) und Weichselbaum (Weichselbaum et al. 1976) war zuvor dieser Zusammenhang nicht beobachtet worden. Durch Untersuchungen von Johansen et al. (Johansen et al. 1996) mit 31 Brustkrebspatientinnen konnte die von Burnet (Burnet et al. 1994) aufgestellte Hypothese bestätigt werden. In der Studie von Johansen et al. zeigten Patientinnen mit einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit im Mittel ein größeres Risiko, eine Fibrose zu entwickeln, als solche mit einer geringen Empfindlichkeit. Auch Ramsay und Birrell (Ramsay et al. 1995) berichteten von einer Korrelation zwischen dem Ausmaß der Normalgewebereaktion und der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

In anderen Publikationen konnte diese Hypothese jedoch nicht bestätigt werden. So berichtete Brock et al. (Brock et al. 1995), dass weder die akuten, noch die späten Reaktionen in einem Zusammenhang mit der individuellen Empfindlichkeit stehen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Rudat et al. (Rudat et al. 1997, Rudat et al. 1999) für die akuten bzw. späten Nebenwirkungen sowie Peacock et al. (Peacock et al. 2000) für späte Normalgewebereaktionen. Auch Begg et al. (Begg et al. 1993) konnten keine Beziehung zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und den akuten Nebenwirkungen der Haut finden.

Von Dikomey et al. (Dikomey et al. 2003) wurde gezeigt, dass diese Widersprüche im Wesentlichen darauf zurückzuführen sind, dass einem Teil dieser Arbeiten eine falsche Arbeitshypothese zugrunde lag. In diesen Arbeiten wurde irrtümlicherweise angenommen, dass nur Patientinnen mit einer besonders erhöhten individuellen Strahlenempfindlichkeit schwere akute oder späte Normalgewebereaktionen entwickeln. Von Jung et al. (Jung et al. 2001) ist aber gezeigt worden, dass dieses Risiko nicht nur für eine Untergruppe, sondern für alle Patientinnen besteht, wobei aber die Höhe des Risikos von der jeweiligen individuellen Strahlenempfindlichkeit abhängen kann. Um daher einen Zusammenhang zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und dem Normalgeweberisiko zu erkennen, müssen daher die Patientinnen entsprechend ihrer Strahlenempfindlichkeit stratifiziert werden (Dikomey et al. 2003).

In einer ersten Studie, die entsprechend dieser Kriterien durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass bei Aufteilung der Patientinnen in resistente, normale und empfindliche Patientinnen, für die letztere Gruppe ein deutlich höheres Risiko für eine späte Normalgewebereaktion besteht als für die Gruppe der normal empfindlichen und resistenten Patientinnen (Hoeller et al. 2003). Analoge Ergebnisse wurden von West et al. (West et al. 2001) und de Ruyck et al. (De Ruyck et al. 2005) berichtet. Insgesamt wird es daher heute generell akzeptiert, dass die individuelle Strahlenempfindlichkeit ein wichtiger Faktor für das Risiko einer Normalgewebereaktion nach einer Strahlentherapie ist.

2.6. Genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit

In den meisten bisher durchgeführten Untersuchungen wurde die individuelle Strahlenempfindlichkeit anhand von Lymphozyten bestimmt und der Parameter mit Hilfe chromosomaler Assays gemessen. Diese Untersuchungen sind sehr zeitaufwendig und jeweils auch großen Schwankungen unterlegen. Darüber hinaus haben sie den Nachteil, dass der Grund für eine erhöhte oder erniedrigte Strahlenempfindlichkeit nicht bekannt ist. Daher besteht schon seit langem ein großes Interesse daran, jeweils die beteiligten Gene zu kennen.

In einer vorangehenden Arbeit konnte in dem Labor gezeigt werden, dass die anhand von in-vitro bestrahlten Lymphozyten bestimmte Strahlenempfindlichkeit vor allem genetisch determiniert ist (Borgmann et al. 2007). Diese Untersuchungen waren an Blu-

tproben von 15 monozygoten Zwillingspaaren durchgeführt worden, und es zeigte sich innerhalb des Zwillingspaars jeweils eine große Übereinstimmung in der Strahlenempfindlichkeit.

Bei der Suche nach genetischen Markern stellte sich zunächst heraus, dass sich hierfür weder Proteine eignen (Kasten et al. 1999, Kasten-Pisula et al. 2007), noch der Nachweis von seltenen Mutationen (Borgmann et al. 2002).

2.6.1. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Aktuell werden vor allem sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) als geeignete genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit und damit des Normalgeweberisikos gesehen.

2.6.1.1. Allgemein

SNPs sind Polymorphismen einzelner Nukleotide in der DNA, d.h. Austausch einzelner Basen im Genom. Diese Unterschiede in einzelnen Basenpaaren, hervorgerufen durch Basenaustausch, führen zu einer Basensequenzveränderung. Zwei Drittel aller SNPs entstehen durch den Basenaustausch von Cytosin zu Thymin. Von einem SNP wird nur bei einer Allelfrequenz, die höher ist als ein Prozent, gesprochen.

Das humane Genom enthält ca. 10 Millionen SNPs, wobei SNPs statistisch ca. alle 300-400 Basenpaare im Humangenom auftreten und abhängig von ihrer Lokalisation funktionelle Konsequenzen haben können (Brookes 1999). 60 000 der bisher identifizierten SNPs liegen in codierenden Regionen und können, müssen aber nicht unbedingt

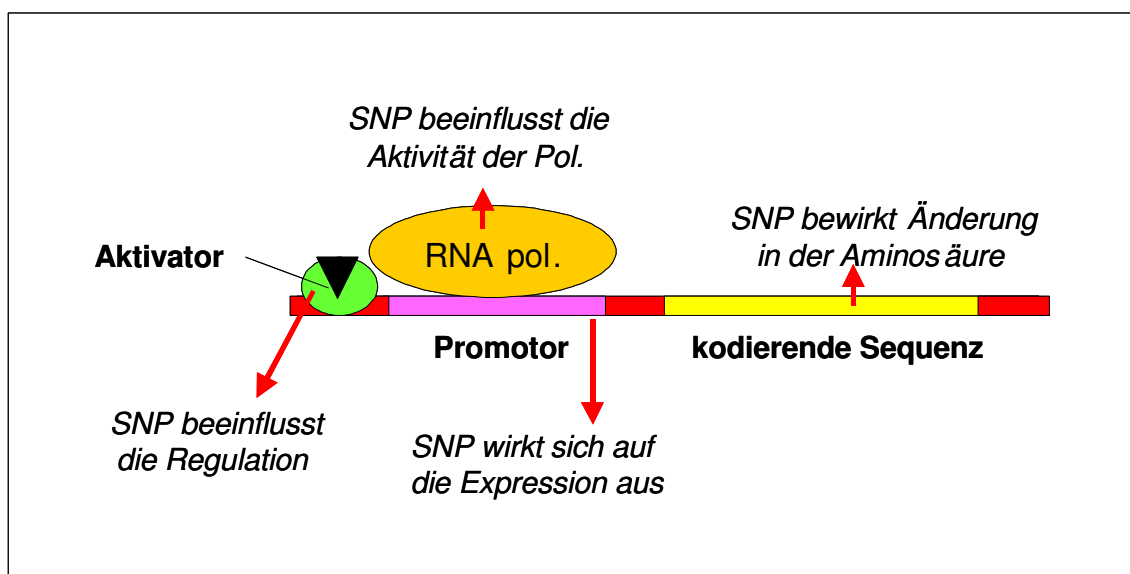


Abb.2.1: Schematische Darstellung der Auswirkungen eines SNPs.

zu einer Aminosäuren-Substitution führen. Insgesamt führen nur etwa 1 % der im humanen Genom vorliegenden SNPs in funktionelle Konsequenzen. Diese treten auf, wenn sich der SNP in einem Exon (sog. coding SNP) oder in einem regulatorischen Genabschnitt eines Introns (sog. regulatory SNP) befindet.

Ein SNP wird in der Regel durch eine Zahlen- und Buchstabenkombination beschrieben. Die Buchstaben stehen für eine der vier Basen und die Zahl gibt die Position des SNPs im Gen an. Bei der Bezeichnung des SNPs mit G2355A bedeutet dies, dass an der Position 2355 des Gens eine Guaninbase gegen eine Adeninbase ausgetauscht wird. Ein SNP, der einen Aminosäure-(AS)-Austausch zur Folge hat, kann ebenfalls über die geänderte AS-Abfolge im Protein angegeben werden. Dabei wird mit dem SNP Thr 222Met bzw. T 222 M, der SNP bezeichnet, bei dem an der Position 225 des Proteins ein Threonin gegen ein Methionin ausgetauscht wurde.

Der sogenannte diploide Chromosomensatz des Menschen besteht je zur Hälfte aus mütterlichen und väterlichen Allelen. Dementsprechend kann der Genotyp in Kombination mit dem Wildtyp (WT) in drei verschiedenen Varianten vorliegen: homozygot WT, WT / WT; heterozygot, SNP / WT; homozygot SNP, SNP / SNP.

Es wird vermutet, dass SNPs zu neunzig Prozent die Individualität des Menschen ausmachen. Damit könnten SNPs auch für die phänotypische Ausprägung eines Individuums von großer Bedeutung sein, wie u.a. auf Entwicklung, Alterung, Stoffwechsel, Metabolismus von Medikamenten und dem Risiko, an bestimmten Krankheiten zu erkranken (Stein et al. 2005)

Die überwiegende Mehrzahl der SNPs hat keine Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel und den Organismus. Solche SNPs werden „silent SNPs“ genannt. Sie kommen z.B. in Intron-Regionen vor oder der entsprechende Basenaustausch führt zur Codierung der gleichen Aminosäure, so dass dieser SNP bei der Proteinbiosynthese (PBS) keine Auswirkung auf die Zelle und Ihre Funktion hat.

Als „codogener SNP“ wird ein Polymorphismus bezeichnet, der zu einem Aminosäuren-Austausch im Protein führt. Der codogene SNP kann für die Zelle und den Gesamtorganismus entscheidende Konsequenzen haben. Z.B. ist das Faktor-5-Leiden auf einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Stelle 1691 im Gen für Faktor 5 zurückzuführen.

Ein „regulatory SNP“ (rSNP) befindet sich in einem regulatorischen Abschnitt des

Genoms. Dieser SNP kann in einer veränderten Genexpression und damit in einer modulierten Expression einzelner Proteine resultieren. Mechanismen des Zellstoffwechsels werden somit verändert, und auch Stoffwechselfvorgänge des Organismus können dadurch beeinträchtigt werden.

Funktionelle Folgen für SNPs, die sich in einem Intron befinden, wurden bisher eher von untergeordneter Bedeutung hinsichtlich ihrer Auswirkungen und Ausprägungen eingeschätzt. Inzwischen gibt es aber Studien, bei denen auch solche SNPs mit einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden wie z.B. die diabetische Nephropathie (Shimazaki et al. 2005), der essentielle Hypertonus (Sano et al. 2005), die Arthritis (Mototani et al. 2005), die Grave's disease (Hiratani et al. 2005), die Osteoporose (Liu et al. 2004) und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Chappell et al. 2004).

2.6.1.2. *Haplotypen und Allelfrequenzen*

Als Haplotypen wird eine Kombination von SNPs auf nur einem Chromosom bezeichnet. Es sind also Blöcke miteinander gekoppelter SNPs in einem Genom. Wenn diese genetischen Varianten gemeinsam, also in Abhängigkeit zueinander auftreten, dann wird diese Korrelation als Kopplungsungleichgewicht oder „Linkage Disequilibrium“ (LD) bezeichnet. Haplotypen stellen somit Gebiete des erhöhten Kopplungsungleichgewichtes LD dar.

Demgegenüber steht der Normalzustand, beschrieben als das Linkage Equilibrium (LE). Es beschreibt den Zustand, der zufälligen Kombination von Genen. Im LE gibt es keine bevorzugten Kombinationen zwischen den Genen. Das Vorliegen des LE entspricht im statistischen Sinne dem Vorliegen stochastischer Unabhängigkeit. Der Genort entspricht einem Faktor. Ein Allel entspricht einem Niveau, einer Ebene („level“).

2.6.1.3. *Bedeutung von SNPs auf die DNA-Reparatur*

Durch Polymorphismen in Reparaturgenen kann die DNA-Reparatur beeinträchtigt sein und zu einem erhöhten Wert an nicht oder falsch-reparierten DNA-Schäden führen, die letztendlich eine Schädigung des Normalgewebes zur Folge haben können. Einige Studien haben SNPs in bestimmten Regionen von DNA-Reparaturgenen untersucht, die zu einem Aminosäure-Austausch führen, und somit die Funktion des jeweiligen Proteins modulieren (Hadi et al. 2000, Hu et al. 2002, Lunn et al. 2000). Funktionsänderungen mit mehr oder weniger schweren Konsequenzen sind die Folge.

SNPs in Genen, die einen signifikanten Effekt auf die DNA-Reparaturkapazität haben, wurden auch schon mit verschiedenen Krebsarten, insbesondere mit Brustkrebs assoziiert (Goode et al. 2002). In diesem Zusammenhang sind vor allem Polymorphismen von der Xeroderma-pigmentosum Gruppe D (XPD) und der X-ray repair cross-complementing – Gruppe 1 (XRCC1) zu nennen, die in dem Nukleotidexzisionsreparaturmechanismus (NER) und in der Basenexzisionsreparatur (BER) involviert sind.

Bei diesen Untersuchungen zeigten sich aber auch Widersprüche zwischen *in-vitro*-Untersuchungen und klinischen Studien. So wurde in zahlreiche *in vitro*-Studien eine klare Beeinträchtigung der DNA-Reparatur durch bestimmte SNPs in XPD (Lunn et al. 2000, Spitz et al. 2001) und XRCC1 (Abdel-Rahman et al. 2000, Duell et al. 2000, Hu et al. 2001, Lunn et al. 1999, Matullo et al. 2001) gefunden. Klinische Studien zeigten aber für diese Polymorphismen hinsichtlich der Bedeutung beim Auftreten von Brustkrebs keine klare Assoziation (Duell et al. 2001, Figueiredo et al. 2004, Justenhoven et al. 2004, Shu et al. 2003).

2.6.1.4. Bedeutung von SNPs für die Normalgewebereaktion

Von Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) wurde für 41 Brustkrebspatientinnen gezeigt, dass einzelne Basensequenzveränderungen in den Genen XRCC1, XRCC3, SOD2 sowie TGF β 1 zu einem höheren Risiko einer Normalgewebereaktion (Fibrose) nach strahlentherapeutischer Behandlung führen können. Es wurde beobachtet, dass der SNP, T869C und C-509T im TGF β 1, T47C im SOD2, C18067T im XRCC3, sowie der SNP G28152A im XRCC1 Risikofaktoren für eine strahleninduzierte subkutane Fibrose nach Strahlentherapie darstellen (sog. „risk genes“). Bei Summierung der Riskallele zeigte sich eine klare Zunahme des Fibrosesrisikos in Abhängigkeit von der Zahl der Risikoallele. In weiteren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnte dies in einer nachfolgenden Studie aber nur noch für den Polymorphismus an der Position C-509T bestätigt werden (Andreassen et al. 2005) und in einer Gesamtstudie sogar für keinen der oben aufgezählten SNPs (Andreassen et al. 2006a). Auch für zahlreiche SNPs im ATM-Gen konnte keine entsprechende Assoziation beobachtet werden (Andreassen et al. 2006a).

Nicht nur für diese Arbeitsgruppe, sondern auch insgesamt ergibt sich heute für die verschiedenen SNPs ein sehr heterogenes Bild (Tab.1). So fanden Angele et al. (Angele et al. 2003) eine klare Assoziation für den SNP G5557A im ATM-Gen mit einem erhöh-

ten Normalgeweberisiko. Quarmy et al. (Quarmby et al. 2003) und de Ruyck et al. (De Ruyck et al. 2006) fanden eine entsprechende Assoziation für den SNP C-509T im TGF β 1. Von Moullan et al. (Moullan et al. 2003) wurde von solch einer Verbindung für die beiden SNPs G28152A und C194T im XRCC1 berichtet. Von Chang-Claude et al. (Chang-Claude et al. 2005) wurde keine klare Beziehung der untersuchten SNPs zu der Akutreaktion festgestellt. Es ist derzeit noch unklar, worauf diese Unterschiede in den Ergebnissen beruhen.

Tab.1: Assoziationen von SNPs mit Normalgewebereaktion

<i>Gen^a</i>	<i>SNP^b</i>	<i>Anzahl^c</i>	<i>Endpunkt^d</i>	<i>Assoziation^e</i>	<i>Referenz</i>
APEX	T149G	446 BC	Akut	G ist protektiv	Chang-Claude et al. 2005
	T2197G	41	Fibrose	Unklar	Andreassen et al. 2003
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
ATM	T378A	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C735T	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	T2119C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	T2572C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C2614T	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C3161G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C4148T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C4258T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	"	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C4473T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C4578T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	"	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	A5098G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	G5557A	41	Fibrose	A ist sensitiv	Andreassen et al. 2006
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	"	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	A5558T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	CIVS48+238G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	GIVS38-15C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	TIVS22-77C	254	Akut+Spät	T ist sensitiv	Angele et al. 2003
TIVS38-8C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003	
TIVS38C	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006	
TIVS10-6G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003	
OGG1	C326G	62Pat+150ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
SOD2	T47C	41	Fibrose	T vielleicht sens.	Andreassen et al. 2003
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C1183T	80	Spät	keine Ass.	Green et al. 2002
TGF β 1	G-800A	103	Fibrose	keine Ass.	Quarmby et al. 2003
	G-800A	87Gyn+140ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2006
	C-509T	103	Fibrose	A ist sensitiv	Quarmby et al. 2003
	C-509T	41	Fibrose	T ist sensitiv	Andreassen et al. 2003
	C-509T	26 Paare	Fibrose	T ist sensitiv	Andreassen et al. 2005
	C-509T	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006

	C-509T	87Gyn+140ND	Spät	T vielleicht sens.	Ruyck et al. 2006
	G25C	87Gyn+140ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2006
	C263T	87Gyn+140ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2006
	T869C	103	Fibrose	C ist sensitiv	Quarmby et al. 2003
	T869C	41	Fibrose	CC ist sensitiv	Andreassen et al. 2003
	T869C	26 Paare	Fibrose	C ist sensitiv	Andreassen et al. 2005
	T869C	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	G915C	103	Fibrose	keine Ass.	Quarmby et al. 2003
	G915C	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2003
	G915C	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	G915C	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
XPB	G312A	446 BC	Akut	keine Ass.	Chang-Claude et al. 2005
XPB	A751C	446 BC	Akut	keine Ass.	Chang-Claude et al. 2005
XRCC1	C28152A	41	Fibrose	A ist sensitiv	Andreassen et al. 2003
XRCC1	C28152A	26 pairs	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
XRCC1	C28152A	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
XRCC1	G27466T	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
XRCC1	C26304T	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
XRCC1	C194T	254	Akut+Spät	T ist sensitiv	Moullan et al. 2003
XRCC1	A280G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Moullan et al. 2003
XRCC1	C28152A	254	Akut+Spät	A ist protektiv	Moullan et al. 2003
XRCC1	C194T	446 BC	Akut	keine Ass.	Chang-Claude et al. 2005
XRCC1	G280A	446 BC	Akut	keine Ass.	Chang-Claude et al. 2005
XRCC1	G399A	446 BC	Akuz	A ist protektiv	Chang-Claude et al. 2005
XRCC1	C194T	62Pat+150 ND	Spät	T ist protektiv	Ruyck et al. 2005
XRCC1	G280A	62Pat+150 ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
XRCC1	G399A	62Pat+150 ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
XRCC1	G632A	62Pat+150 ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
XRCC3	C241T	62Pat+150 ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
	C18067T	41	Fibrose	T ist sensitiv	Andreassen et al. 2003
	"	26 pairs	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	A5'UTR 4.541G	62Pat+150 ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
	AIVS5G	62Pat+150 ND	Spät	G ist sensitiv	Ruyck et al. 2005

^a Gen, in dem der Polymorphismus untersucht wurde; ^b Lokalisation des SNPs; ^c Anzahl der untersuchten Patienten (Pat) sowie Normalspender (ND); ^d Endpunkte der Untersuchung;

2.6.2. Auswahl der SNPs

Für die Studie wurden SNPs in den fünf Genen TGF β 1, SOD2, ATM, XRCC1 und XPD untersucht, wobei in dieser Arbeit die Ergebnisse zu den Genen SOD2 und TGF β 1 dargestellt werden. Kriterium für die Auswahl dieser war zum einen die Tatsache, dass diese Gene beim Strahlenresponse einer Zelle und da insbesondere bei der Entwicklung der Fibrose eine zentrale Rolle einnehmen. Für die Gene wurde dann jeweils der häufigste SNP ausgewählt, von dem z.T. bekannt war, dass er einen funktionellen Einfluss hat.

2.6.2.1. SOD2

Das Gen SOD2 codiert für Superoxiddismutase. Nach ionisierender Strahlung ent-

stehen DNA-Schäden primär durch Ionisation des Wassers und damit durch die Bildung von so genannten reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Diese reagieren mit anderen Biomolekülen wie der DNA und schädigen diese. Durch die Wirkung der Superoxid-dismutase (SOD), die als Radikalfänger agiert, kann in den Zellen ein großer Teil der ROS wieder abgebaut werden. Sie ist also Bestandteil eines natürlichen Mechanismus zum Schutz vor oxidativen Schäden (McCord et al. 1969).

Es wurde vermutet, dass ein SNP in SOD2 dazu führt, dass freie Radikale nicht mehr effizient durch die SOD abgebaut werden. Eine Anreicherung von ROS würde DNA-Schäden in einem größeren Umfang verursachen. Somit könnte die Entwicklung der Fibrose hierdurch begünstigt werden. Für dieses Gen wurde der SNP C1183T ausgewählt, für den in einer anderen Arbeit eine Allelhäufigkeit von 55% gemessen wurde (Green et al. 2002).

2.6.2.2. *TGFβ1*

Das Gen TGFβ1 codiert für ein Zytokin. Wird DNA infolge von ionisierender Strahlung geschädigt, so bewirkt die hieraus ausgelöste Signaltransduktion eine Überexpression von Zytokinen bzw. eine verstärkte Aktivierung des TGFβ1-Proteins. Diese Aktivierung führt zu einer Entzündung im Gewebe und zu einer vermehrten terminalen Differenzierung von Fibroblasten, die wiederum letztlich die Bildung einer Fibrose begünstigt. Gleichzeitig wird die epitheliale Reparatur durch TGFβ1 inhibiert (Anscher et al. 1990, Barcellos-Hoff et al. 1996).

Für dieses Gen wurde der SNP C-509T ausgewählt. Für diese SNP wurde in anderen Arbeiten eine Allelhäufigkeit von 29 bis 36% gemessen (Andreassen et al. 2003, Andreassen et al. 2005, Andreassen et al. 2006a, De Ruyck et al. 2006, Quarmby et al. 2003).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patienten

In die Studie konnten insgesamt 69 postmenopausale Brustkrebspatientinnen eingeschlossen werden. Die Studie war zuvor von der Ethikkommission der Stadt Hamburg genehmigt worden. Alle Patienten hatten ihr Einverständnis zu diesen Untersuchungen gegeben. Das Durchschnittsalter der Patientinnen betrug 54,1 Jahre. Alle teilnehmenden Brustkrebspatientinnen wiesen das Stadium I/II auf und hatten sich in den Jahren 1988 bis 1999 einer brusterhaltenden Operation mit einer anschließenden adjuvanten Strahlentherapie an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unterzogen. Die mediane Referenzgesamtdosis betrug 55 Gy (Bereich 50-60 Gy). Hierbei wurden 61 (88%) der Patientinnen mit einer Gesamtdosis von 54 oder 55 Gy bestrahlt, und nur für 8 Patientinnen war eine niedrigere oder etwas höhere Dosis gewählt worden. Von allen wurden 27 Patientinnen mit Fraktionen zu 1,8-2 Gy und 42 Patientinnen mit Fraktionen à 2,5 Gy behandelt. Die Studie zeichnete sich somit insgesamt durch eine große Homogenität aus.

Das Ausmaß der Normalgewebereaktion wurde von den Ärzten PD. Dr. Ulrike Höller (Vivantis Klinikum, Neukölln) und PD. Dr. Dirk Rades (Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, UKE, Hamburg) anhand der LENT/SOMA-Skala bestimmt. Dabei beschränkten sich die Untersuchungen auf den Grad der Fibrose; 23 Patientinnen dieser Kohorte erhielten zusätzlich eine Hormonbehandlung mit Tamoxifen; 8 Patientinnen unterzogen sich einer begleitenden Chemotherapie. Die Follow-up time variierte zwischen 2-20 Jahren mit einem mittleren Follow-up von 11,5 Jahren.

3.2. Isolierung der DNA

3.2.1. DNA-Isolierung

Die sich in einem EDTA – Röhrchen befindenden Blutproben wurden bei 4 °C aufbewahrt. Für die Aufarbeitung wurden die Proben in ein 50 ml Falcon Röhrchen umgefüllt und mit 500 µl Proteinase K sowie 7 ml BQ1 versetzt. Anschließend wurden die Proben 10 sec mit einem Vortexer gut durchmischt und dann 20 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Hierdurch wurden die Proteinbestandteile vollständig zersetzt. Zwi-

schendurch wurden die Proben wiederholt durchmisch.

Nach Zugabe von 7 ml Ethanol wurden die Proben 10 sec durchmisch und danach 5 min auf Eis gestellt. Das Ethanol führt zur Ausfällung der DNA und ermöglicht somit, dass sich diese an der Membran des im darauffolgenden Schritt genannten Reaktionsgefäßes binden kann.

Anschliessend wurden 15 ml der Probe (Lysat) in ein durch eine Membran geteiltes Röhrchen (Nucleo Spin Blood XL Column) pipettiert und 3 min bei 4800 rpm (4000 g; swing-out-Rotor) zentrifugiert. Die DNA enthaltende Säule auf der Membran wurde in ein neues Tube überführt und der Durchfluss entsorgt.

Der Rest der Probe (Lysat) wurde nun erneut in ein durch eine Membran geteiltes Röhrchen (Nucleo Spin Blood XL Column) pipettiert und 3 min. bei 4800 rpm (4000 g; swing-out-Rotor) zentrifugiert. Die DNA enthaltende Säule wurde in ein neues Tube überführt und der Durchfluss entsorgt.

Die DNA enthaltende Säule wurde mit 7,5 ml BQ2 versetzt und dann 3 min bei 4800 rpm (4000 g; swing-out-Rotor) zentrifugiert. BQ2 ist ein Waschpuffer, der überflüssige Zellbestandteile von der Membran entfernt, so dass nur die aufgereinigte DNA an der Membran bindet. Die Säule, an die die gereinigte DNA gebunden war, wurde in ein neues Tube überführt und der Durchfluss entsorgt. Der zuletzt beschriebene Waschvorgang wurde zur Erhöhung des Reinheitsgrades wiederholt.

Zur Elutionssäule wurden 1000 µl BE-Puffer (auf 70 °C erhitzt) hinzugegeben. Dieser führt zur Ablösung der gebundenen DNA von der Membran. Nach 2 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde für weitere 2 min bei 4800 rpm (4000 g; swing-out-Rotor) zentrifugiert. Das Eluat wurde wiederholt auf die Säule gegeben und 2 min bei 4800 rpm (4000 g; swing-out-Rotor) zentrifugiert. Im Durchfluss befand sich das DNA Eluat. Für die Isolierung der genomischen DNA wurde das NucleoSpin Blood XL-Kit der Fa. Macherey – Nagel benutzt.

3.2.2. Bestimmung der DNA Konzentration

Von dem DNA-Eluat werden 5 µl mit 95 µl TE Puffer versetzt und die DNA Konzentration mit Hilfe des Photometers bestimmt. Ideal sollte die Extinktion $_{260/280} \sim 1,6 - 1,9$ betragen, was bedeuten würde, dass die DNA in ausreichender Konzentration und ohne störende Bestandteile, wie z.B. Proteine, RNA etc. vorliegt. Läge der Wert der Extinktion $_{260/280}$ unter 1,6, wäre der Proteinanteil zu hoch und die Probe nicht zur Weiter-

verarbeitung geeignet. Wäre der Wert zu hoch, deutete dies daraufhin, dass die Probe einen zu hohen RNA enthielte und wäre ebenfalls unbrauchbar. Die DNA wurde für weitere Anwendungen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Im Gegensatz zu lebenden Organismen kann der PCR-Prozess nur kurze DNA-Abschnitte bis zu ca. 10 kbp (10.000 Basenpaare) kopieren. Mit Hilfe bestimmter Verfahren können Fragmente bis zu einer Länge von 40 kb vervielfältigt werden. Eine menschliche Zelle enthält etwa drei Milliarden Basenpaare.

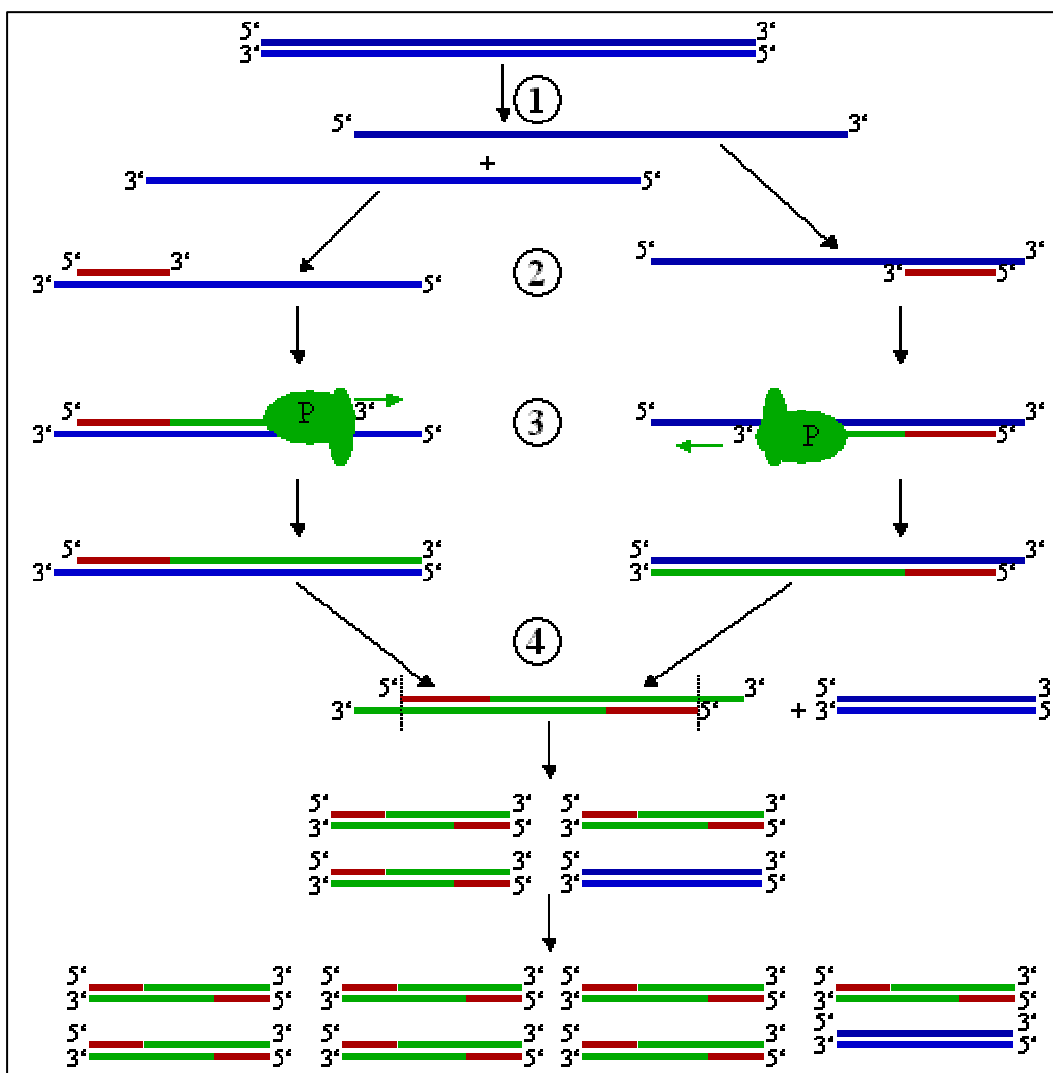


Abb.3.1: Genereller Ablauf einer Polymerasekettenreaktion

Die PCR benötigt mehrere grundlegende Komponenten: die DNA, die das zu vervielfältigende DNA Fragment enthält; zwei Oligonukleotide, die Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Fragments festlegen; eine hitzebeständige DNA Taq Polymerase; Nukleotide, die Bausteine für den von der Polymerase synthetisierten DNA-Strang sind. Außerdem wird eine Pufferlösung benötigt, die eine für die DNA Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellt. Die PCR findet in einem so genannten Thermocycler statt. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für die jeweiligen Schritt benötigt wird.

Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von 20 bis 35 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten (Abb.3.1). Bei der Denaturierung wird die DNA erhitzt, so dass sich die beiden DNA Stränge voneinander trennen (siehe Abb.3.1 PCR Schritt 1). Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen. Es ist ein sehr schneller Prozess, der schon bei Temperaturen von 70 °C beginnt. Deshalb ist es wichtig, die Denaturierungszeit so kurz wie möglich zu halten. Beim "Annealing" wird die Temperatur gesenkt (meist etwa 25 °C unter der Denaturierungstemperatur), um den Oligonukleotiden die Möglichkeit zu geben, mit der DNA zu hybridisieren (siehe Abb.3.1 PCR Schritt 2). Die "Annealing"-Temperatur richtet sich nach den Oligonukleotiden, die verwendet werden. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann dies dazu führen, dass die Oligonukleotide sich nicht oder an der falschen Stelle der Ausgangs-DNA anlagern. Schließlich füllt die DNA Polymerase (siehe Abb.3.1 PCR Schritt 3) die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Sie beginnt am angelagerten Oligonukleotid und folgt dann dem DNA-Strang. Für diese Elongation wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht, um eine optimale Zweitstrangsynthese zu ermöglichen. Am Ende des Zyklus (siehe Abb.3.1 PCR Schritt 4) ist die DNA-Menge verdoppelt worden.

Um ein optimales PCR Produkt zu erhalten, wurden die Konzentrationen von Oligonukleotiden, Magnesium Chlorid und DNA variiert. Zusätzlich fanden die puRe Taq PCR Beads der Fa. Amersham Biosciences Anwendung. Die puRe Taq PCR Beads enthalten 10 mM Tris – HCl, 50 mM KCl und 1,5 mM Mg Cl₂. An dem Thermocycler Robo Cycler[®] 40 Accessories, Fa. Stratagene[®] wurden ebenfalls die Zeiten, Temperatu-

ren und Zyklen der einzelnen PCR Abschnitte (Denaturierung, Annealing, Elongation) optimiert.

3.4. Gelelektrophorese

3.4.1. Prinzip der Methode

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode der Molekularbiologie, um verschiedene Arten von Molekülen, z.B. DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, zu trennen. Dabei wandert eine Mischung aus zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Dabei wandern kleine, negativ geladene Moleküle (Anionen) am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode.

Die Bestandteile des Gels, beispielsweise Agarose oder polymerisiertes Acrylamid, bilden ein engmaschiges Netzwerk, das die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert. Agarose Gele sind relativ großporig (150 nm bei 1%igem Gel) und eignen sich gut zur Trennung von DNA und hochmolekularen Proteinen. Polyacrylamid Gele weisen wesentlich kleinere Poren auf (3-6 nm). Die Porengröße hängt von der Agarosekonzentration oder der Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad ab. Im Idealfall wird die Elektrophorese beendet, wenn die kleinsten bzw. mobilsten Moleküle das Ende des Gels erreicht haben, weil dies die höchstmögliche Auftrennung der Moleküle garantiert.

Zur Auswertung des Gels nach der Elektrophorese wird das Gel mit Ethidiumbromid (EB) "gefärbt" und unter UV-Licht betrachtet. EB-Moleküle interkalieren zwischen die Basen der DNA bzw. RNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von EB verändert. Dies hat zur Folge, dass das interkalierte EB bei Anregung wesentlich stärker fluoresziert als freies EB. Das Fluoreszenzsignal des EB ist daher ein Indikator für die Menge der vorhandenen DNA bzw. RNA.

DNA-Moleküle gleicher Länge laufen in diskreten Zonen, die auch als Banden bezeichnet werden, dabei können in den verwendeten Kammern bis zu 15 Proben parallel untersucht werden. Mit Hilfe geeigneter Molekülmarker bekannter Größe kann durch

Vergleich die Größe der anderen Banden abgeschätzt werden.

3.4.2. Herstellung des Ethidiumbromid-Gels

Das Gel wurde aus 2 g Agarose (High Strength Analytical Grade Agarose der Fa. BIO RAD) und 100 ml (1%) TBE Puffer (Tris Borate – EDTA Buffer For Gel Electrophoresis der Fa. SIGMA) hergestellt, die in einem 250 ml Erlenmeyerkolben verrührt und dann in der Mikrowelle zum Kochen gebracht wurden. Das kochende Gel wurde 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt und dann mit 5 µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid Solution, 10 mg/ml der Fa. SIGMA) versetzt. Da Ethidiumbromid nicht UV beständig ist, wurden dieser und die folgenden Schritte bis zur Aufreinigung der DNA im Dunkeln durchgeführt. Anschließend wurde das warme noch flüssige Gel in den schon in der Elektrophoresekammer liegendem Gelschlitten, (bei eingelegtem Gelkamm) gegossen. Nach 30 min (Festigung des Gels) wurde die Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer (1%) aufgefüllt, bis das Gel komplett bedeckt war.

3.4.3. Vorbereitung der Proben

Die PCR-Produkte wurden nach 20 sec Zentrifugation bei 300 rpm mit 8 µl Loading Buffer (Nuclei Acid Sample Loading Buffer 5* der Fa. BIO RAD) versetzt und dann nach mehrmaligem Mischen (in der Pipettenspitze) in das Gel pipettiert. Der "Loading Buffer" sorgt dafür, dass die Proben im Gel bleiben und nicht in der flüssigen Pufferlösung, in dem das Gel liegt, miteinander vermischt werden. Zur Ermittlung der Basenpaargröße wurde in eine Geltasche 10 µl DNA-Leiter (AmpliSize™ Molecular Ruler 50 – 2000 bp Ladder von BIO RAD), versetzt mit 5 µl Loading Buffer pipettiert.

3.4.4. Elektrophorese und Auswertung

Die Elektrophorese erfolgte in zwei Phasen mit unterschiedlicher Spannung, die ineinander übergehen. Bei der ersten Phase wurde 15 min lang eine Spannung von 80 Volt angelegt, bis die Proben aus den Taschen liefen. Bei der zweiten Phase wurde 90 min lang eine Spannung von 120 Volt angelegt. Nach Beendigung der Gellaufzeit wurde das Gel auf einen UV-Tisch gelegt und entsprechend der Banden der DNA-Leiter (die einzelnen Banden entsprechen einer definierten Größe) ausgewertet und fotografiert. Anhand des Bildes können die Banden auf dem Gel mit Hilfe der verwendeten DNA-Leiter in Bezug auf seine Basenpaargröße abgeschätzt werden.

3.5. DNA-Elution

Um nur das während der PCR vervielfältigte DNA-Stück zu erhalten, wurde die spezifische Bande im Gel unter dem UV-Tisch mit Hilfe eines Skalpell und Pinzette ausgeschnitten und in ein Tube überführt. Das Tube wurde vorher ohne Gel und anschließend mit Gel Fragment gewogen.

Die Proben wurden mit 3 Volumeneinheiten QX1 Buffer und 10 µl QIAEX II (welcher vorher 30 sec gemischt wurde) versetzt und umgehend in einem Wasserbad für 10 min bei 50 °C inkubiert (zwischendurch wurde die Probe alle 2 min gut durchmischt). Dann wurde die Probe 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, wobei ein Sediment entstand. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Anschließend wurde die Probe mit 500 µl QX1 versetzt, für 10 sec gut durchmischt, so dass sich das Sediment löste. Anschließend wurde die Probe für 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, so dass ein neues Sediment entstand. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das neu entstandene Sediment wurde mit 500 µl PE versetzt, wiederum für 10 sec gut durchmischt, bis sich das Sediment löste und für 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, so dass wieder ein Sediment entstand. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Pellet wurde bei offenem Tube 15 min. luftgetrocknet. Danach wurde es mit 19 µl destilliertem Wasser versetzt, für 10 sec gut durchmischt und bei geschlossenem Reaktionsgefäß für 5 min stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, bis sich ein Sediment bildete. Im Überstand befand sich die aufgereinigte DNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Aufreinigung wurde das QIAEX II (150) Gel Extraction Kit verwendet, welches die DNA bindet, sammelt, wäscht und letztlich eluiert.

3.6. Restriktions – Fragment – Längen - Polymorphismus (RFLP)

3.6.1. Prinzip der Methode

Durch Restriktionsendonukleasen lässt sich ein Genom an spezifischen Stellen zerschneiden und so in DNA-Fragmente zerlegen. Restriktionsendonukleasen stammen ursprünglich aus bakteriellen Zellen, die damit in der Lage sind, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und die DNA-Helix an dieser Stelle zu schneiden. Bakterien nutzen diese Enzyme zum Abbau fremder DNA, während sie ihre eigene DNA an den Angriffspunkten durch Methylierung schützen. Die Schnittstellen dieser Restriktionsen-

zyme bestehen aus 4 – 8 Basenpaaren, die zentralsymmetrisch aufgebaut sind und als Palindrome bezeichnet werden. Ein Restriktionsenzym kann daher nur bei dieser Sequenz anbinden und einschneiden.

Diese hohe Spezifität der Restriktionsenzyme (RE) wird bei der Methode „Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus“ (RFLP) zum Nachweis von SNP's genutzt. Dabei gilt es zwischen zwei Strategien zu unterscheiden. Das RE kann zum einen so gewählt werden, dass es nur bei der Wildtypsequenz einschneidet, nicht aber, wenn die Sequenz durch einen SNP verändert wird. Zum anderen kann das RE aber auch so gewählt werden, dass es nur die durch den SNP veränderte Sequenz erkennt und einschneidet, während die Wildtypsequenz nicht eingeschnitten wird.

Um die Beurteilung des RE-Verdaus zu erleichtern, wird in der Regel die zu untersuchende DNA auf zwei Proben aufgeteilt und nur eine mit RE behandelt. Diese beiden Proben werden nebeneinander in das Gel pipettiert, um nach der Gelelektrophorese eine eindeutige Aussage treffen zu können, ob die Restriktionsendonukleasen geschnitten haben oder nicht.

3.6.2. RFLP bei SOD2

Vom aufgereinigten PCR Produkt wurden jeweils zwei mal 17 µl in zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Die zum Verdau bestimmte Probe wurde mit 2,5 µl NEB3 und 2,5 µl BSA versetzt. Anschließend wurde 3 µl des Restriktionsenzym BsaW1 (der Fa. MWG – Biotech AG) hinzugegeben. Diese Probe wurde dann bei 60 °C für 20 h inkubiert. Die zur Kontrolle bestimmte Probe wurde mit 8 µl H₂O versetzt, so dass die Gesamtmenge ebenfalls 25 µl entspricht. Die Inkubation erfolgte bei 5°C für 20 h. Anschließend wurde, wie oben (3.4.2.) beschrieben, ein Ethidiumbromidgel gegossen. Nach der Inkubation wurden die Proben, wie oben (3.4.3.) beschrieben, vorbereitet und dann nebeneinander ins Gelbett pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte wie oben (3.4.4.) aufgeführt.

3.6.3. RFLP bei TGFβ1

Vom aufgereinigten PCR Produkt wurden jeweils zwei mal 20 µl in zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Die zum Verdau bestimmte Probe wurde mit 3 µl NEB3 und 3 µl BSA versetzt. Anschließend wurde 1 µl des Restriktionsenzym Bsu36I (der Fa. MWG – Biotech AG) und 3 µl H₂O hinzugegeben. Diese Probe wurde dann bei 37 °C für 16 h

inkubiert. Die zur Kontrolle bestimmte Probe wurde mit 10 µl H₂O versetzt, so dass die Gesamtmenge ebenfalls 30 µl entspricht. Die Inkubation erfolgte bei 5°C für 16 h. Anschließend wurde, wie oben (3.4.2) beschrieben, ein Ethidiumbromidgel gegossen. Nach der Inkubation wurden die Proben, wie unter (3.4.3.) beschrieben vorbereitet, und dann nebeneinander ins Gelbett pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte wie unter (3.4.4.) beschrieben.

3.7. Geräte

- Thermomix 1480 (Wasserbad), Fa. Braun, Kronberg Deutschland
- Zentrifuge 5810R, Fa. Eppendorf, Hamburg Deutschland
- Vortexer VF2, Fa. Janke & Kunkel IKA[®]-Labortechnik, Staufen Deutschland
- Spectrophotometer UVIKON, Fa. Kontron Instruments, Mailand Italien
- Thermocycler Robo Cycler[®] 40 Accessories, Fa. Stratagene[®], San Diego USA
- Micromat (Mikrowelle), Fa. AEG, Nürnberg Deutschland
- SUB-CELL (Elektrophoresekammer, Gelschlitten, Gelkamm), Fa. BIO RAD Los Angeles USA
- Micro Computer Elektrophorese Power Supply E452, Fa. Consort, Turnhout Belgien
- CCD-Kamera RS1, Fa. Kaiser, Buchen Deutschland
- Waage AE 160, Fa. Mettler, Gießen Deutschland
- Magnetrührer mit Fisch RET, Fa. Janke & Kunkel IKA[®]-Labortechnik, Staufen Deutschland
- Hybridisierungsöfen Biometra OV2 Brutschrank, Fa. Janke & Kunkel, Staufen Deutschland
- Mini-Transiluminator, Fa. BIO RAD, Los Angeles USA
- Polaroid MP 4+Modell 44-16, Fa. KEMA KEUR, Arnheim Niederland
- Transiluminator, Fa. Fröbel Labortechnik, Lindau Deutschland

3.8. Puffer und Lösungen

- Nucleo Spin Blood XL-Kit von der Fa.: Macherey – Nagel (BE Puffer, Protein-kinase K, BQ1, BQ2, Ethanol, TE Puffer).
- DNA 200 ng für SOD2
- DNA 100 ng für TGFβ1

- Primer 5 pmol (SOD2 Primer, Fa. Biotech, Ebersberg Deutschland)
- Primer 5 pmol (TGFβ1 Primer, Fa Biotech, Ebersberg Deutschland)
- Mg Cl 3 μM
- Dest. Wasser (steril filtriert)
- Ethidiumbromid (Ethidiumbromid Lösung, 10 mg/ml der Fa. SIGMA, Thum Deutschland)
- TBE Puffer (1%): 68g TBE Puffer (Tris Borate – EDTA Buffer For Gel Electrophoresis der Fa. SIGMA) wird in 1 Liter aufgearbeitetes Wasser unter ständigem Rühren aufgelöst (4 Stunden).
- Agarose Gel (2%): 2 g Agarose (High Strength Analytical Grade Agarose der Fa. BIO RAD) wird 100 ml (1%) TBE Puffer (Tris Borate – EDTA Buffer For Gel Electrophoresis der Fa. SIGMA) hinzugegeben. In der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlung mit 5 μl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid Solution, 10 mg/ml der Fa. SIGMA) versetzt.
- Loading Buffer (Nuclei Acid Sample Loading Buffer 5* der Fa. BIO RAD)
- Ladder (Ampli Size TM Molecular Ruler 50 – 2000 bp Ladder, Fa.: BIO RAD)
- QIAEX II (150) Gel Extraction Kit , Fa.: QIAGEN (QX1 Buffer, QIAEX II, PE Buffer)
- BsaW1, NEB3, BSA (Fa.: MWG – Biotech AG) Bsaw1: 1,5 Units auf 3 μl aufgereinigtes Wasser, NEB3 2,5 μl, BSW 2,5 μl
- Bsu361, NEB3, BSA (Fa.: MWG – Biotech AG) Bsu361: 1,5 Units auf 3 μl aufgereinigtes Wasser, NEB3 2,5 μl, BSW 2,5 μl

4. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob für Brustkrebspatientinnen ein Zusammenhang zwischen bestimmten genetischen Veränderungen (SNPs) in ausgewählten Genen und dem Auftreten der Normalgewebereaktion sowie der individuellen Strahlenempfindlichkeit besteht. In den Voruntersuchungen waren zunächst die optimalen Bedingungen zur Bestimmung des SNPs zu erarbeiten (4.1), bevor in der Hauptuntersuchung diese SNPs gemessen und mit der Normalgewebereaktion bzw. der Strahlenempfindlichkeit verglichen wurden (4.2).

4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen

Für die DNA-Fragmente mussten jeweils die PCR Bedingungen optimiert werden.

4.1.1. SOD2

Für das SOD2-Fragment wurden folgende Primer der Firma Biotech verwendet:

SOD2 for 5´ -AGCCCAGCCTGCGTAGAC- 3´

SOD2 rev 5´ -TACTTCTCCTCGGTGACG- 3´

Die für dieses Fragment getesteten Bedingungen sind in Tab.2.1 aufgelistet.

Tab.4.1: Getestete PCR-Bedingungen für das Fragment des Gens SOD2

Ansatz	Destil. Wasser (µl)	MgCl ₂ (mM)	Primer (pM)	Genomische DNA (ng)	PCR Temp (°C)
1	4,05	3	5	200	56
2	4,05	3	5	200	58
3	4,05	3	5	200	60
4	4,05	3	5	200	62
5	4,05	3	5	200	64
6	4,05	3	5	200	66
7	4,05	3	5	200	68
8	4,05	3	5	200	70
9	12,05	3	10	200	56
10	12,05	3	10	200	58
11	12,05	3	10	200	60
12	12,05	3	10	200	62
13	11,05	3	15	200	56
14	11,05	3	15	200	58
15	11,05	3	15	200	60
16	11,05	3	15	200	62
17	11,05	3	15	200	64
18	11,05	3	15	200	66

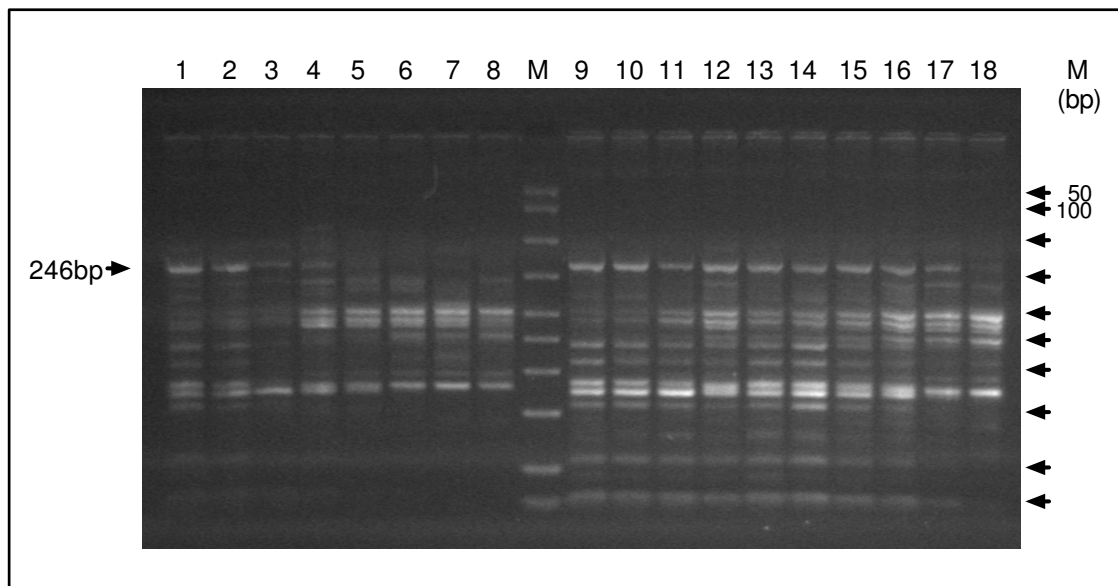


Abb.4.1: Gelelektrophorese zur Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen für das DNA-Fragment des SOD2-Gens. Die Ansätze erfolgten nach den in Tab. 4.1 aufgelisteten Bedingungen. Die mit „M“ markierte Bande definiert die Basenpaargröße.

Im Vergleich aller Banden zeigt sich bei Ansatz 10 die stärkste Bande beim Molekulargewicht von 246 Basenpaaren (bp). Entsprechend ergaben sich für dieses Fragment folgende optimalen Bedingungen bei Verwendung der puRe Taq PCR Beads: 200 ng DNA, 1,5 mM MgCl₂ und 10 pmol Primer (jeweils 10 pmol vorwärts und rückwärts). Die Probe wurde dann mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die besten PCR Bedingungen ergaben sich für den Denaturierungsschritt mit 30 sec bei 94 °C, für den Annealingschritt mit 30 sec bei 57 °C und für den Elongationsschritt mit 30 sec bei 72 °C. Diese Schritte wurden insgesamt 40 mal wiederholt (40 Zyklen). Vor Beginn der Zyklen wurde einmalig 5 min bei 94 °C denaturiert und nach den Zyklen einmalig 5 min bei 72 °C elongiert. Das nach der PCR vervielfältigte Fragment hat eine Größe von 246 bp.

4.1.2. TGFβ1

Für TGFβ1-Fragment wurden folgende Primer der Firma Biotech verwendet:

TGFβ1 for 5′ -CAGACTCTAGAGACTGTCAG- 3′

TGFβ1 rew 5′ -GTCACCAGAGAAAGAGGAC- 3′

Analoge Untersuchungen ergaben für die PCR optimale Bedingungen bei Verwendung der puRe Taq PCR Beads mit 100 ng DNA und 5 pmol Primer (jeweils 5 pmol

vorwärts und rückwärts hinzugegeben). Die Probe wurde dann mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR Bedingungen ergaben sich für den Denaturierungsschritt 45 sec. bei 95 °C, für den Annealingschritt 45 sec. bei 60 °C und für den Elongationsschritt 45 sec. bei 72 °C. Diese Schritte wurden insgesamt 35mal wiederholt (35 Zyklen). Vor Beginn der Zyklen wurde einmalig 5 min. bei 94 °C denaturiert. Das nach der PCR vervielfältigte Fragment hat eine Größe von 419 bp.

4.2. Genstatus der Patienten

Um den Genstatus zu ermitteln, wurde den Patientinnen Blut entnommen und daraus die genomische DNA isoliert. Anschließend wurde mittels RFLP-Methode der Allelstatus der SNPs in den beiden ausgewählten Genen (TGFβ1, C-509T und SOD2, Ala9Val) bestimmt. Um die Verlässlichkeit dieser Methode zu überprüfen, wurde der Genstatus von ausgewählten Patientinnen zusätzlich mittels der Sequenzierungsmethode ermittelt. In der Auswertung sollte der Genotyp einer Patientin in Bezug auf den untersuchten SNP mit der individuellen Ausbildung einer Fibrose, eingeteilt nach Graden, in strahlenresistente und strahlenempfindliche Phänotypen, verglichen werden. Dadurch sollte ein Zusammenhang zwischen Genstatus und individuelle Strahlenempfindlichkeit erkennbar werden.

4.2.1. TGFβ1

Die Abb 4.2 verdeutlicht den Nachweis des Genstatus für den SNP C-509T in TGFβ1-Gen mittels der RFLP Methode. Das Gel zeigt die Proben von 7 verschiedenen Patientinnen. Die mit „+“ gekennzeichneten Banden wurden mit dem Restriktionsenzym Bsu361 versetzt, welches bei entsprechendem Genstatus die DNA schneidet. Die mit „-“, gekennzeichneten Banden sind die Kontrollen ohne Zugabe des Restriktionsenzym. Die mit M gekennzeichnete Bande dient der Orientierung und zeigt definierte Nukleotidgrößen gemessen in Basenpaaren (bp).

Bei der Patientin 4 konnte durch das Restriktionsenzym das DNA-Fragment nahezu vollständig verdaut und in die zwei verkürzten Fragmente umgewandelt werden. Von dem ursprünglichen Fragment mit der Länge von 419 bp liegt nur noch ein kleiner Rest vor. Dieses Ergebnis zeigt an, dass bei der Patientin 4 offensichtlich beide Allele die Wildtyp-Form aufweisen und somit diese Patienten hinsichtlich des Genstatus als wt/wt

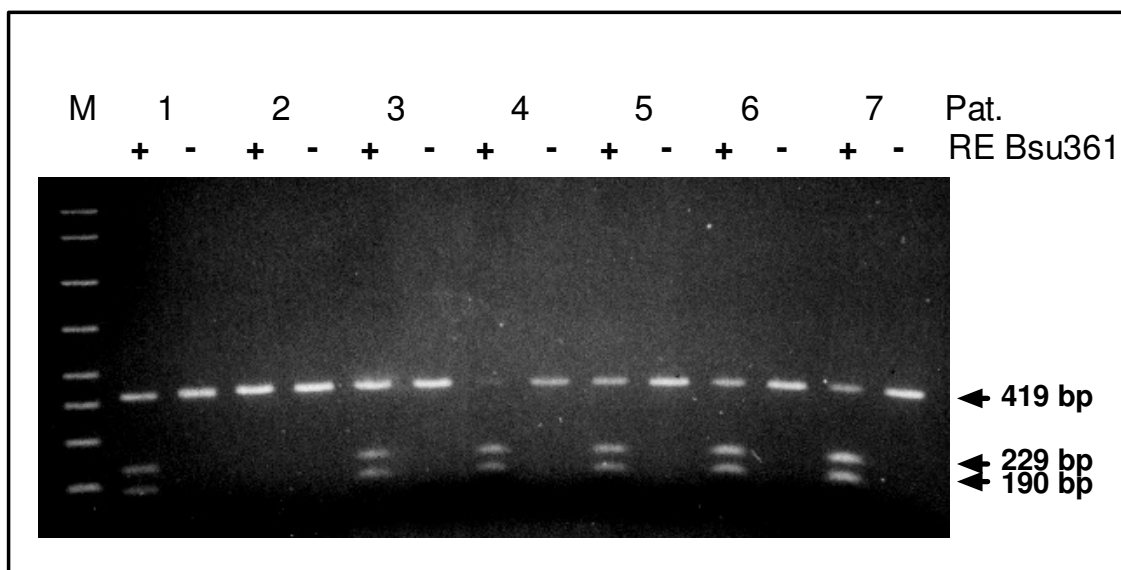


Abb.4.2: Nachweis des Allelstatus für TGFβ1 (C-509T) bei 7 Patientinnen mittels RFLP-Methode. Die Probe 4 zeigt einen Wildtyp-Status, die Probe 2 einen homozygoten SNP, und die Proben 1, 3, 5, 6 und 7 einen heterozygoten Genstatus. + = mit Enzym inkubiert; - = nicht mit Enzym inkubiert. M, Markerbanden.

einzustufen sind. Bei der Patientin 2 war hingegen kein Verdau durch das Restriktionsenzym festzustellen. Beide Allele müssen somit den SNP enthalten und hinsichtlich des Genstatus ist diese Patientin als SNP/SNP einzuordnen. Eine dazwischen liegende Reaktion wird für die Patientinnen 1, 3, 5, 6 und 7 beobachtet. Für diese Patientinnen beobachtet man nach Verdau immer noch eine deutliche Bande mit der ursprünglichen Länge. D.h. bei diesen Patientinnen liegt ein heterogener Status vor.

Tab.4.2: Häufigkeiten der untersuchten SNPs in den Genen TGFβ1 und SOD2 für die 69 untersuchten Patientinnen

Gen	Allelstatus ^a	Zahl der Patienten	Verteilung (%)	
			Studie	Europa ^b
TGFβ1 (C-509T)	ww: CC	24	35,5	35,2
	ws: CT	40	53,9	49,8
	ss: TT	5	10,6	15,0
SOD2 (C1183T)	ww: CC	27	37,8	40,9
	ws: CT	38	55,4	53,4
	ss: TT	4	6,8	5,7

^a Allelstatus; ww: Wildtyp/Wildtyp; ws: Wildtyp/SNP; ss: SNP/SNP

^b Europäische Normalbevölkerung (aus NCBI-Datenbank).

Das Ergebnis aller 69 Patientinnen ist in Tab.4.2 zusammengefasst. Insgesamt zeigten von 69 untersuchten Patientinnen 24 auf beiden Allelen des TGF β 1 einen Wildtyp-Status, 40 einen heterozygoten Status und 5 für beide Allele einen SNP (Tab.4.2). Bezogen auf die Gesamtzahl der Patientinnen ergibt dies Anteile von 35,5, 53,9 und 10,6%. Hieraus kann für diesen SNP eine Allelhäufigkeit von 37,6% berechnet werden. Dies entspricht weitgehend den Werten, wie sie in der NCBI-Datenbank für eine europäische Population angegeben werden (Zitate).

Analog wurden die Messungen für den Genstatus hinsichtlich des SNP's C1183T für SOD2 bestimmt. Hier ergeben sich z.T. für die drei Gruppen die Anteile von 37,8, 55,4 und 6,8%. Für die Allelhäufigkeit dieses SNP ergibt sich der Wert von 34,5%, was ebenfalls sehr gut mit den Werten einer europäischen Population übereinstimmt (Zitate).

4.3. Einfluss des Genstatus auf das Fibrosierisiko

Für alle 69 Brustkrebspatientinnen wurde die Normalgewebereaktion anhand der LENT/SOMA-Skala erhoben. Dabei wurde ausschließlich der Grad der Fibrose be-

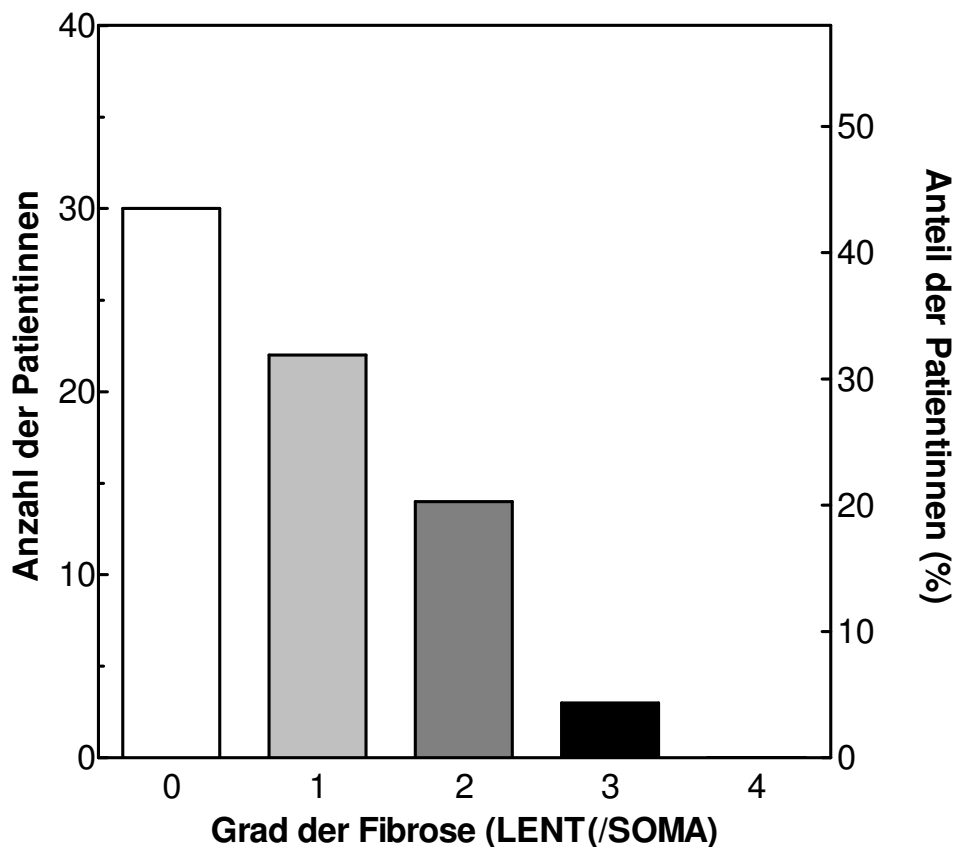


Abb 4.3: Verteilung des Fibrosegrades nach Strahlentherapie bei 69 Brustkrebspatientinnen. Erhebung des Fibrosegrades anhand der LENT/SOMA-Skala.

stimmt. Insgesamt ergibt sich die Verteilung, wie sie in Abb.4.3 dargestellt ist. Der überwiegende Teil der Patientinnen entwickelte keine oder nur eine niedergradige Fibrose (Grad 0 und 1). Bei 14 Patientinnen wurde eine Fibrose Grad 2 und bei 3 eine Fibrose Grad 3 bestimmt. Ein Fibrose Grad 4 entwickelte sich bei keiner der Patientinnen. Von den 69 Patientinnen erhielten 32 zusätzlich eine Tamoxifin Therapie und 8 eine Chemotherapie. Diese zusätzlichen Therapien hatten jedoch keine Auswirkungen auf eine Ausbildung einer Fibrose (Daten nicht gezeigt).

Für den Vergleich mit dem Genstatus wurden in den nachfolgenden Analysen die Patientinnen in den zwei Gruppen mit dem Fibrosegrad 0/1 bzw. 2/3 zusammengefasst. Diese haben jeweils die Anteile von 75 bzw. 25%.

Abb.4.4 stellt den Zusammenhang zwischen dem Status des SNP's C-509T im TGF β 1-Gens und dem Fibrosegrad dar. Für diese Analyse wurden die Patientinnen entsprechend ihres Allelstatus gruppiert und für diese Gruppe jeweils der Anteil der Patien-

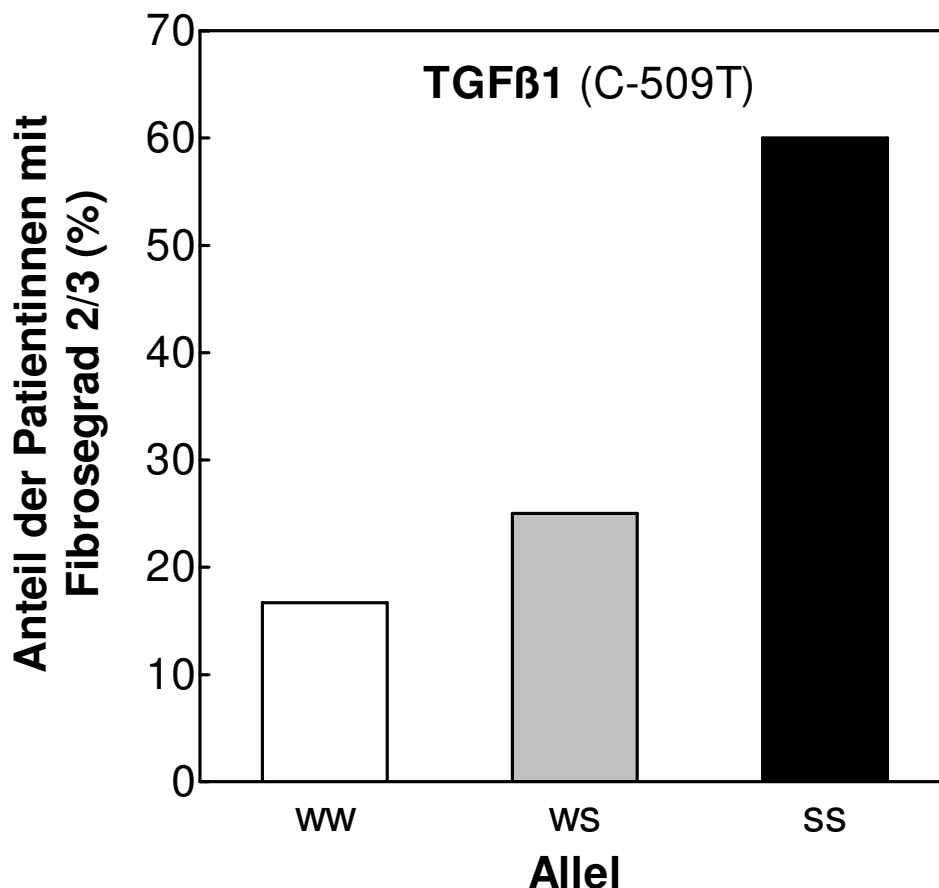


Abb.4.4: Einfluss des Genstatus des TGF β 1-Gens auf das Fibrosierisiko nach Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen. Der Genstatus wurde mittels RFLP bestimmt und die Fibrose mittels LENT/SOMA erhoben.

tinnen mit einer Fibrose vom Grad 2/3 berechnet. Von den 27 Patientinnen mit einem w/w-Status entwickelten im Mittel nur 17% eine Grad 2/3 Fibrose. Bei Patientinnen mit einem w/s-Status liegt dieser Anteil mit 25% bereits deutlich höher und erreicht bei Patientinnen mit s/s-Status sogar den Wert von 60%. Diese Daten deuten damit an, dass der SNP C-509T im TGF β 1-Gen das Risiko für eine Fibrose deutlich erhöht. Aufgrund der geringen Fallzahl der Patientinnen ist diese Zunahme aber nicht signifikant ($p=0.12$). Es wurde ebenfalls überprüft, ob die nach dem Allelstatus aufgeteilten Patientinnen sich hinsichtlich anderer Behandlungsparameter unterschieden. Hier zeigte sich aber weder für die Gesamtdosis noch für die Follow-up-Zeit ein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

Abb.4.5 zeigt den Zusammenhang für den SNP C1183T für SOD2. Hier ergibt sich ein vollständig gegenteiliges Ergebnis. Von den 27 Patientinnen mit wt/wt-Status entwi-

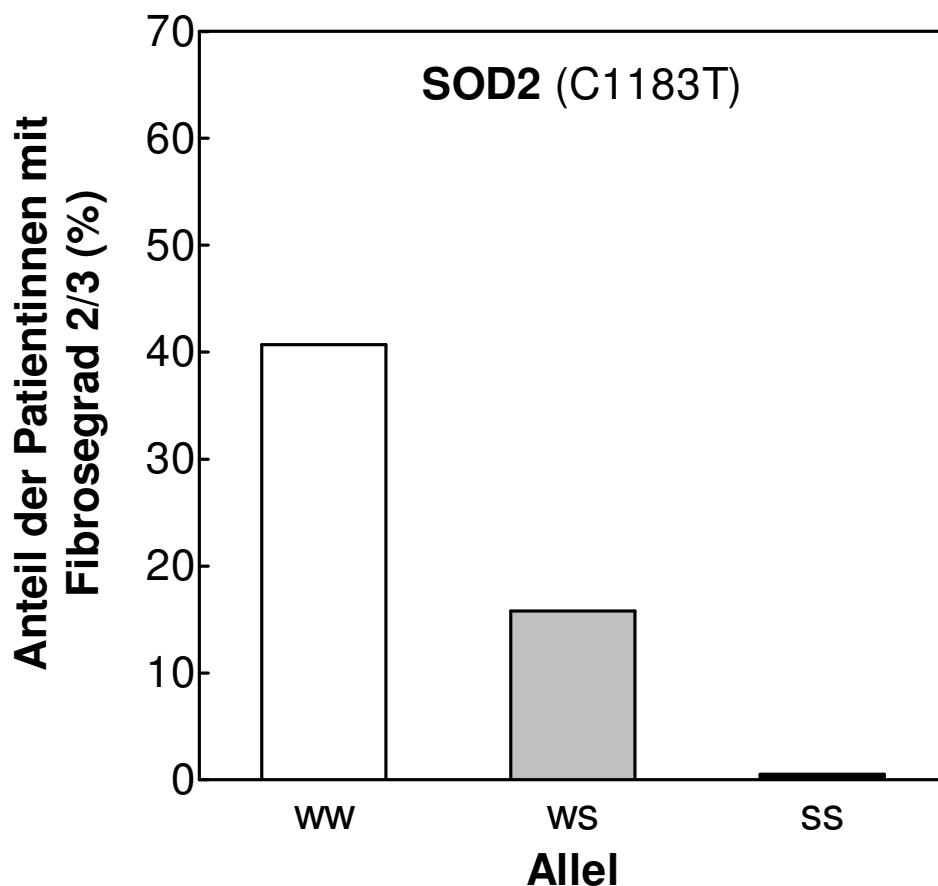


Abb.4.5: Bedeutung des Genstatus im SNP C1183T im SOD2-Gen für die Entstehung von Fibrose nach Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen. Der genstatus wurde mittels RFLP bestimmt und die Fibrose mittels LENT/SOMA erhoben.

ckelten 41% eine Fibrose mit dem Grad 2/3. Für Patientinnen mit dem wt/s-Status nimmt dieser Anteil auf 16% ab und von den 4 Patientinnen mit s/s-Status entwickelte keine eine Fibrose mit dem Grad 2/3. Diese Daten deuten an, dass der SNP C1183T im SOD2 sich protektiv auswirkt und damit der Wildtypstatus als Risikoallel zu bewerten ist. Dieser Trend war trotz der geringen Fallzahl signifikant ($p=0.01$). Es wurde wiederum überprüft, ob die nach dem Allelstatus aufgeteilten Gruppen sich hinsichtlich anderer Behandlungsparameter unterschieden. Wiederum zeigte sich weder für die Gesamtdosis noch für die Follow-up-Zeit ein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

4.4. Einfluss des Genstatus auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit

In einer vorangehenden Untersuchung (Hoeller et al. 2003) war für 49 der in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebspatientinnen die individuelle Strahlenempfindlichkeit

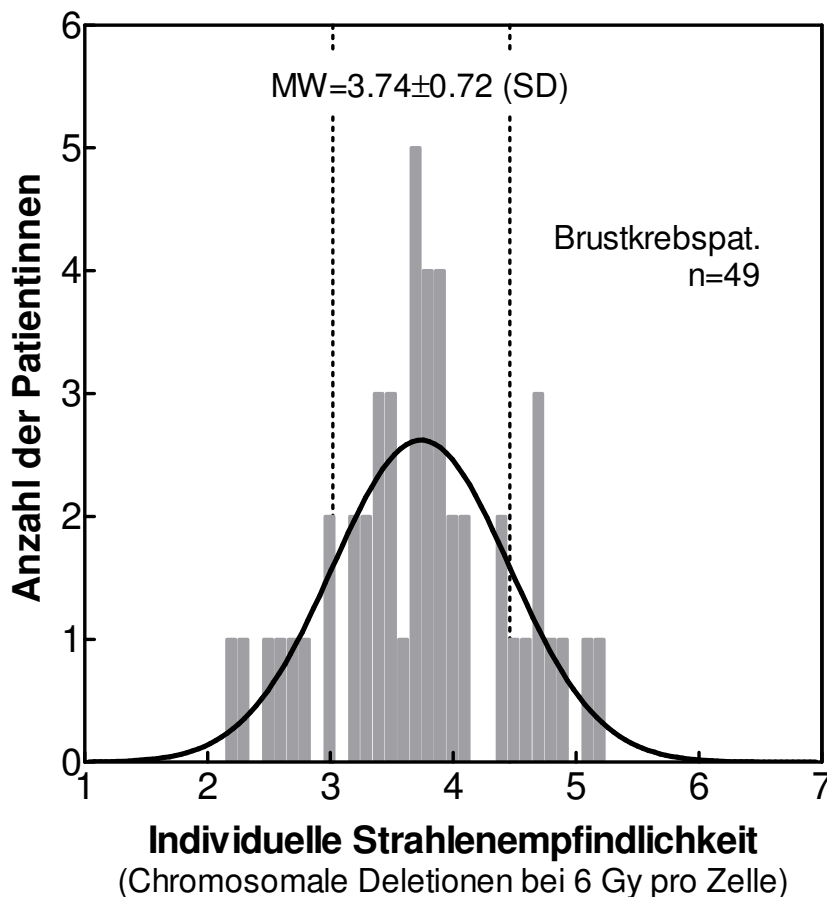


Abb.4.6: Verteilung der individuellen Strahlenempfindlichkeit bei 49 Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand in-vitro-bestrahlter Lymphozyten über die Zahl der chromosomalen Deletionen bestimmt (Hoeller et al. 2003)

bestimmt worden. Dieser Parameter war anhand der Zahl chromosomaler Deletionen der in den mit 6 Gy in-vitro bestrahlten Lymphozyten dieser Patientinnen bestimmt worden (Hoeller et al. 2003). Abb.4.6 zeigt die entsprechende Verteilung dieser Werte. Im Mittel wird ein Wert von 3.74 chromosomalen Deletionen gemessen mit einer Standardabweichung von 0.72. Für die 49 Patientinnen zeigte sich aber eine deutliche Variation mit Werten zwischen 2.2 und 5.2 chromosomalen Deletionen pro Zelle. Anhand dieser Werte werden die Patientinnen in die drei Gruppen „resistent“, „normal“ und „empfindlich“ aufgeteilt. Dabei wird eine Patientin als „resistent“ eingestuft, wenn die Zahl der chromosomalen Deletionen $< MW-SD=3,02$ ist; dagegen als „sensitiv“, wenn für den Wert gilt $> MW+SD=4,46$ und als „normal“ bei dazwischen liegenden Werten (Abb.4.6, gepunktete Linien). Auf Grund dieser Grenzen können 9 der 49 Patientinnen als „resistent“, 10 als „sensitiv“ und 30 als „normal“ hinsichtlich ihrer individuellen Strahlen-

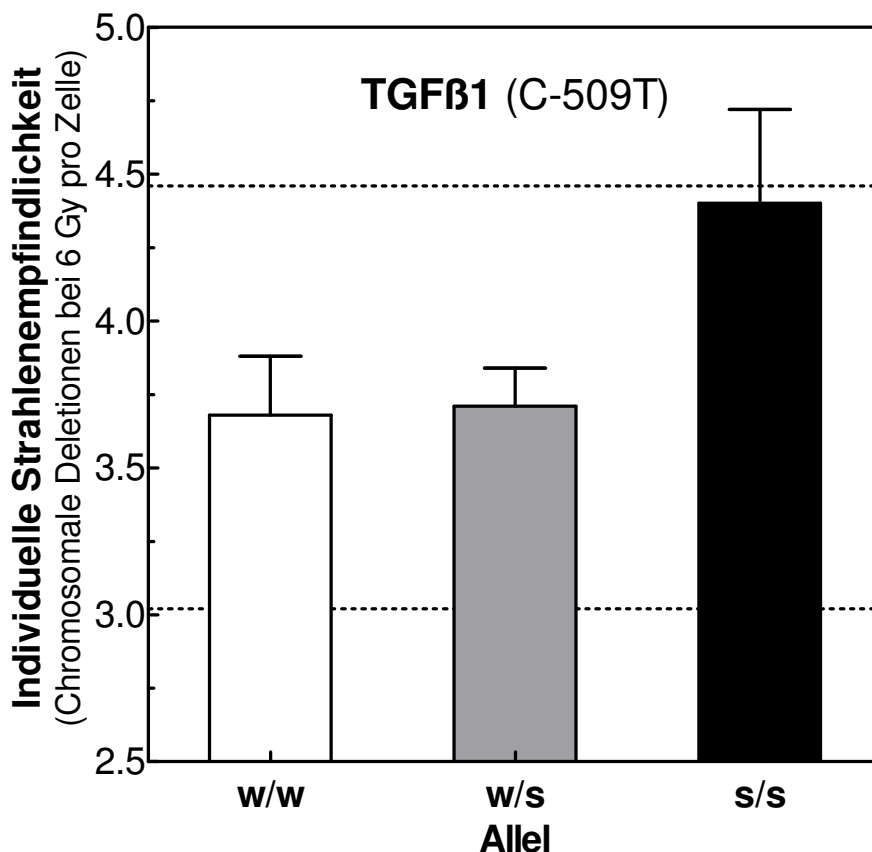


Abb.4.7: Einfluss des Status des TGF β 1-Gens auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit bei Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand in-vitro-bestrahlter Lymphozyten über die Zahl der chromosomalen Deletionen bestimmt (Hoeller et al., 2003). Die gepunkteten Linien geben die Grenzen aus Abb.4.6 wieder.

empfindlichkeit eingestuft werden.

Es war zu überprüfen, in welchem Zusammenhang für diese Untergruppe der Patientinnen der Status der beiden untersuchten Gene TGF β 1 und SOD2 mit der individuellen Strahlenempfindlichkeit steht. Abb.4.7 zeigt diesen Zusammenhang für den SNP C-509T im TGF β 1-Gen. Es ist zu erkennen, dass die Patientinnen mit einem SNP in beiden Allelen eine deutlich höhere individuelle Strahlenempfindlichkeit aufweisen als Patientinnen mit nur einem, bzw. keinem SNP. Während die Patientinnen mit einem Wildtypstatus in beiden Allelen eine mittlere Strahlenempfindlichkeit aufweisen, liegen die Patientinnen mit einem SNP in beiden Allelen im Mittel an der Grenze zwischen „normal“ und „sensitiv“.

Abb. 4.8 stellt den Einfluss des untersuchten Genstatus für SOD2 auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit dar. Auch hier ist eine klare Abhängigkeit zu erkennen, wonach

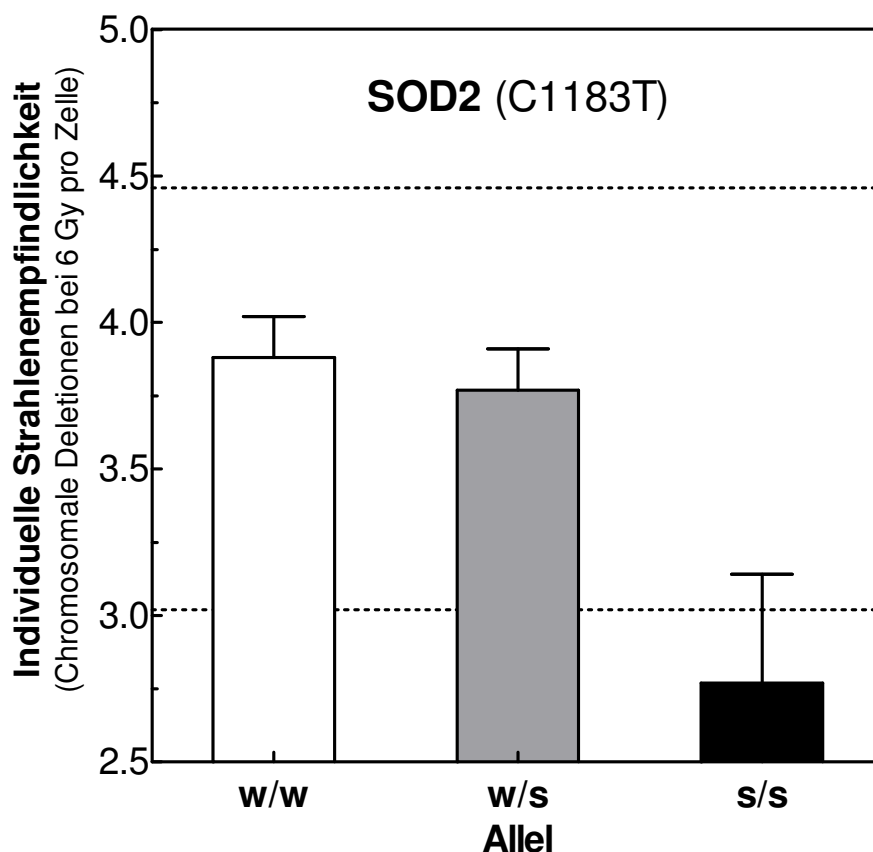


Abb.4.8: Einfluss des Status des SOD2-Gens auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit bei Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand in-vitro-bestrahlter Lymphozyten über die Zahl der chromosomalen Deletionen bestimmt (Hoeller et al. 2003). Die gepunkteten Linien geben die Grenzen aus Abb.4.6 wieder.

die Patientinnen mit dem w/w-Status die höchste Empfindlichkeit widerspiegeln, die Patientinnen mit w/s eine etwas geringere und die Patientinnen mit s/s-Status sogar eine sehr geringe Empfindlichkeit. Im Mittel sind diese Patientinnen als „resistent“ einzuordnen.

5. DISKUSSION

Mit dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob für Brustkrebspatientinnen ein Zusammenhang zwischen bestimmten Genvariationen (SNPs) und dem Fibrosiserisiko bzw. der individuellen Strahlenempfindlichkeit besteht. Diese Arbeit ist dabei Teil einer Studie, bei der insgesamt SNPs in den fünf Genen TGF β 1, SOD2, ATM, XRCC1 und XPD untersucht wurden. In dieser Arbeit sind die Ergebnisse zu den beiden Genen TGF β 1 und SOD2 dargestellt. Die Diskussion beinhaltet aber ebenfalls die gemeinsame Analyse aller Daten.

Die oben genannten Gene waren ausgewählt worden, weil bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt worden war, dass diese Gene für die Strahlenreaktion eines Gewebes und da vor allem für die Fibrose von entscheidender Bedeutung sind (Andreassen et al. 2003, Andreassen et al. 2005, Andreassen et al. 2006a, Bentzen et al. 1996, Bentzen 2006).

5.1. Allelhäufigkeit

Die Polymorphismen in diesen Genen wurden mit der PCR-RFLP-Methode nachgewiesen. Diese Methode hat sich bereits seit langem zum Nachweis von SNP etabliert und wurde bereits in vielen Untersuchungen angewandt (Angele et al. 2003, De Ruyck et al. 2006, Green et al. 2003, Quarmby et al. 2003).

Bei dieser Methode ist das Fragment, welches den SNP enthält, zunächst mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, um dann in einem zweiten Schritt mittels spezifischer Restriktionsenzyme das Vorhandensein des SNP zu überprüfen. Für die SNP in den Genen TGF β 1 und SOD2 wurden jeweils Restriktionsenzyme gewählt, die die Wildtypsequenz erkennen und einschneiden. Liegt ein SNP vor, kann demzufolge das Restriktionsenzym nicht an das DNA-Fragment binden, weshalb dieses in seiner Länge nicht verändert wird. Bei einem heterozygoten Genstatus wird dementsprechend nur das eine Gen eingeschnitten, während das andere intakt bleibt. Die Fragmente können dann mittels einer Gelelektrophorese getrennt werden, so dass jeder Probe eindeutig ein bestimmter Genstatus zuzuordnen ist (Abb.4.2).

Hinsichtlich des SNP C-509T im TGF β 1-Gen wurde insgesamt eine Allelhäufigkeit von 36% gefunden, was mit den in der Literatur veröffentlichten Werten von 29 bis

36% übereinstimmt (Andreassen et al. 2003, Andreassen et al. 2005, Andreassen et al. 2006b, De Ruyck et al. 2006, Quarmby et al. 2003). Für den SNP C1183T im SOD2 wurde eine Allelhäufigkeit von 34% gefunden. Von Green et al. (Green et al. 2003) wird diesbezüglich für eine Studie mit 75 Patientinnen mit 54% ein deutlich höherer Wert angegeben.

5.2. Fibrosierisiko und individuelle Strahlenempfindlichkeit

Für die 69 Brustkrebspatientinnen war zum einen als Spätreaktion die Fibrose bestimmt worden und zum anderen für eine Untergruppe von 49 Patientinnen die individuelle Strahlenempfindlichkeit.

Die Patientinnen waren zuvor mit einer brusterhaltenden Strahlentherapie in den Jahren 1988 bis 1999 behandelt worden. Die meisten (88%) der Patientinnen waren mit einer Gesamtdosis von 54 bis 55 Gy behandelt worden, wobei die Einzeldosen zwischen 1,8 und 2,5 variierten.

Der Grad der Fibrose war von zwei erfahrenen Ärzten der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Eppendorf erhoben worden. Grundlage für diese Entscheidung war die LENT/SOMA-Skala. Von den insgesamt 69 Patientinnen entwickelten in dem beobachteten Zeitraum nur 17 eine Fibrose vom Grad 2/3, 22 nur eine vom Grad 1 und sogar 30 keine detektierbare Hautreaktion. Diese Verteilung entspricht dem generell erwarteten Spektrum einer Fibrosereaktion für Brustkrebspatientinnen bei einer strahlentherapeutischen Behandlung in den Jahren 1980 bis 2000 (Borger et al. 1994, Hoeller et al. 2003).

Die individuelle Strahlenempfindlichkeit war für einen Teil (49) der Patientinnen dieser Untersuchung im Rahmen einer vorhergehenden Studie gemessen worden (Hoeller et al. 2003). Dieser Parameter war dabei anhand in-vitro bestrahlter Lymphozyten bestimmt worden, wobei die Zahl der chromosomalen Deletionen oder die Gesamtzahl der letalen Chromosomenschäden als Indikator der Strahlenempfindlichkeit gemessen wurde. In Versuchen mit „normalen“ humanen Hautfibroblasten war gezeigt worden, dass diese Zahl mit der entsprechenden Strahlenempfindlichkeit der Zelle korreliert (Borgmann et al. 2004).

Für die so bestimmte individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde für die 49 Patientinnen eine deutliche Variation von 2.2 bis 5.2 mit einem Mittelwert von 3.74 und einer

Standardabweichung von 0.72 gemessen. Hieraus ergibt sich für den Variationskoeffizienten ein Wert von $CV=19\%$, was den Werten aus anderen Arbeiten entspricht (Hoeller et al. 2003, Johansen et al. 1996, Oppitz et al. 2001).

5.3. Bedeutung der SNPs für Fibroserisiko und Strahlenempfindlichkeit

Diese Arbeit zeigte für die beiden untersuchten Polymorphismen eine deutliche Variation im Fibroserisiko. Dabei wurde für den Polymorphismus C-509T im TGF β eine Zunahme und für den SNP C1183T im SOD2-Gen eine Abnahme ermittelt (Abb.4.4 und 4.5). Aufgrund dieser Daten muß für das TGF β 1-Gen das Allel mit dem Nukleotid Thymidin an der Position -509 als Risikoallel eingestuft werden, während beim SOD2-Gen ein Risiko vorliegt, wenn sich an der Position 1183 ein Cytosin befindet.

Für den untersuchten Polymorphismus im TGF β 1-Gen wurden ähnliche Resultate auch in anderen Arbeiten beobachtet (Andreassen et al. 2003, Andreassen et al. 2005, De Ruyck et al. 2006, Quarmby et al. 2003). In einer neueren Arbeit finden Andreassen et al. (Andreassen et al. 2006a) jedoch keinen entsprechenden Zusammenhang für diesen SNP.

Für den SNP C1183T im SOD2-Gen war in einer Arbeit von Green et al. (Green et al. 2002) anhand von 75 Brustkrebspatientinnen keine Assoziation mit einer Spätreaktion beobachtet worden. Allerdings wurde die Normalgeweberaktion anhand von Photographien eingestuft, so dass es unklar ist, welche Hautreaktion diese Analyse bestimmt. Für den SNP T47C im SOD2 fanden Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) in einer ersten Arbeit eine Assoziation mit einem erhöhten Fibroserisiko, was aber in späteren Arbeiten (Andreassen et al. 2005, Andreassen et al. 2006a) nicht bestätigt werden konnte.

In dieser Arbeit wurde nicht nur die Bedeutung von Polymorphismen auf das Normalgeweberisiko bestimmt, sondern erstmalig auch parallel deren Bedeutung für die individuelle Strahlenempfindlichkeit. Hier zeigte sich ebenfalls je nach Allelstatus eine deutliche Variation des Parameters, wobei wiederum ganz gegensätzliche Abhängigkeiten beobachtet wurden. Während der untersuchte SNP beim TGF β 1-Gen mit einer Zunahme der Strahlenempfindlichkeit assoziiert war, zeigte sich beim SOD2 eine deutliche Abnahme der Strahlenempfindlichkeit. Damit entsprechen diese Beobachtungen genau den Abhängigkeiten, wie sie für das Fibroserisiko beobachtet wurden. Diese Ergebnisse

lassen den Schluss zu, dass die beiden Polymorphismen über ihren Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit letztendlich das Fibrosiserisiko bestimmen.

Das TGF β 1-Protein ist nach Bestrahlung ganz entscheidend an der Bildung der Fibrose beteiligt (Rodemann et al. 1996). Gleichzeitig wird die epitheliale Reparatur durch TGF β 1 inhibiert (Anscher et al. 1990, Barcellos-Hoff et al. 1996). Grainger et al. (Grainger et al. 1999) beschrieb erstmalig eine erhöhte Serumkonzentration von TGF β 1 bei Vorhandensein des SNP C-509T. Dies könnte eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit zur Folge haben, da sie zumindest in Zellkultur mit zunehmendem Level an TGF β 1 ansteigt (Von Pfeil et al. 2002). Studien an Nagetieren zeigten zudem, dass es bei einer Verringerung bzw. Inhibition der TGF β 1 Kaskade auch zu einer Verringerung der Normalgewebereaktion nach Bestrahlung kommt. Wenn die Produktion während der Bestrahlung von TGF β 1 verringert wird, wird die zellschädigende Zytokin-Kaskade, welche für Entzündung und Zellmatrixveränderung verantwortlich ist (Flanders et al. 2003, Kang et al. 2003, Xavier et al. 2004) geblockt.

Das SOD2-Protein ist an der Regulierung der Sauerstoffradikale beteiligt. Es wird generell angenommen, dass Strahlung u.a. über eine vermehrte Bildung von ROS das Gewebe schädigt. Es gibt verschiedene antioxidaktive Enzyme wie Katalasen, Glutathionperoxydase und Superoxiddismutasen, die den ROS entgegenwirken. Von den drei Typen an Superoxiddismutasen ist MnSOD, welches hauptsächlich in Mitochondrien lokalisiert ist, der wichtigste Radikalfänger. In der Studie von Mantymaa et al. (Mantymaa et al. 2000) wurde postuliert, dass ein intaktes SOD2 die Mitochondrienmembran vor Zerstörung schützt, da es als Radikalfänger ROS eliminiert. Inhibition von SOD2 führt zu einer Erhöhung der ROS und somit zur Schädigung der Mitochondrienmembran und zusätzlich zur Apoptose von Tumorzellen (Huang et al. 2000). Nach Bestrahlung steigt die MnSOD2 Konzentration an. Zelllinien, in die das SOD2-Gen, welches für MnSOD kodiert, vor Bestrahlung transferiert wurde, zeigten eine höhere Strahlenresistenz (Zhang et al. 1999). Dem entspricht die Beobachtung von Takada et al. (Takada et al. 2002) an Ovarkarzinomzellen, dass eine Überexpression von SOD2 mit einer erhöhten Strahlenresistenz einhergeht.

Auch das Normalgewebe wird durch SOD2 vor der Wirkung einer Bestrahlung geschützt. So zeigten Mäuse, denen vor einer Bestrahlung mit 14 Gy eine intertracheale Injektion von MnSOD verabreicht wurden, eine deutlich höhere Überlebensrate, als

Mäuse ohne diese Injektion (Carpenter et al. 2005, Epperly et al. 2005).

Der in unserer Studie untersuchte SNP C1183T verändert die Struktur des Proteins, so dass der Transport in das Mitochondrium behindert wird (Shimoda-Matsubayashi et al. 1996). Es wird vermutet, dass dadurch intermitochondriale ROS Eliminierung reduziert wird und dies zu einer erhöhten Zellschädigung führen sollte. Aufgrund dieser Daten sollte dieser SNP mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit einhergehen. Tatsächlich wird in dieser Arbeit erstmalig eine Abnahme der Strahlenempfindlichkeit und eine damit einhergehende Abnahme im Fibrosiserisiko beobachtet. Damit weisen die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass der Polymorphismus auch andere bisher noch ungeklärte Auswirkungen auf die Funktion des MnSOD2 hat, welche sich insgesamt protektiv auf die Zelle auswirken.

5.4. Kombinationsanalyse der SNP's

Parallel zu dieser Arbeit wurde in einer zweiten Arbeit die Bedeutung von Polymorphismen in den Genen ATM, XRCC1 und XPD untersucht.

Für den SNP G5557A im ATM-Gen wurde eine Abnahme im Fibrosiserisiko und ebenfalls eine Abnahme in der Strahlenempfindlichkeit ermittelt, so dass für das ATM-Gen die Wildtypsequenz mit einem Guanin an der Position 5557 als Risikofaktor einzustufen ist. D.h. auch für diesen SNP kann angenommen werden, dass er über die Modifikation der Strahlenempfindlichkeit das Fibrosiserisiko beeinflusst.

Für den SNP A751C des XRCC1-Gens wird dagegen für das Fibrosiserisiko eine Zunahme, dagegen aber für die Strahlenempfindlichkeit eine Abnahme gefunden. D.h. obwohl der SNP zu einer Abnahme der Strahlenempfindlichkeit führt, wird für das Fibrosiserisiko eine Zunahme beobachtet. Dieses Ergebnis deutet an, dass sich dieser SNP im XRCC1-Gen auch auf andere Prozesse auswirken muss, die letztendlich trotz verminderter Strahlenempfindlichkeit zu einem erhöhten Fibrosiserisiko führen.

Für den SNP A-C, exon 23 im XPD wurde keine eindeutige Assoziation mit dem Fibrosiserisiko beobachtet. Im Vergleich zum w/w-Status zeigten Patientinnen mit einem heterozygoten Status ein leicht vermindertes Risiko, dagegen Patientinnen mit einem SNP in beiden Allelen ein geringfügig erhöhtes Risiko. Mittelt man diese beiden Gruppen, so wird das gleiche Risiko wie für Patientinnen mit einem w/w-Status erkannt. Das gleiche Ergebnis zeigt sich, wenn für die Assoziation des SNP's mit der individuellen

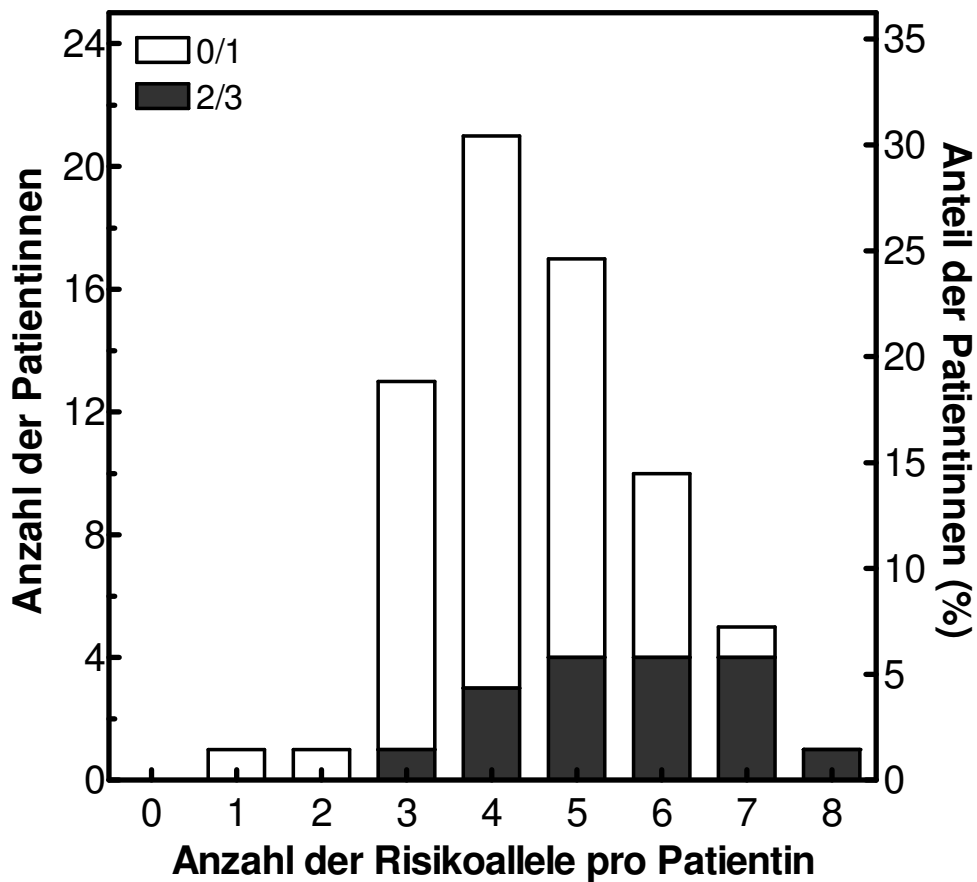


Abb.5.1: Verteilung der Risikoallele aus Tab.5.1 in Brustkrebspatientinnen. Die weiße Säule zeigt die Zahl der Patientinnen mit einer Fibrose vom Grad 0/1 und die schwarze Säule die Patientinnen mit einer Fibrose Grad 2/3.

Strahlenempfindlichkeit. Aufgrund vorliegender Ergebnisse wird angenommen, dass dieser SNP des XPD-Gens weder für das Fibrosierisiko noch für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Bedeutung ist.

Insgesamt ergeben sich somit aufgrund dieser und der parallel durchgeführten Arbeit für die Polymorphismen in den fünf untersuchten Gene die in Tab.5.1 aufgelisteten Risikoallele.

Tab.5.1: Risikoallele in den Genen TGFβ1, SOD2, ATM, XRCC1 und XPD^a

<i>Gen</i>	<i>Polymorphismus</i>	<i>Risikoallel</i>
TGFβ1	C-509T	T
SOD2	C1183T	C
ATM	G5557A	G
XRCC1	G-A, exon 10	A
XPD	A-C, exon 23	Kein Allel

^a Daten stammen aus dieser Arbeit sowie aus der parallel durchgeführten Promotionsarbeit von Frau Stud.med. Inga Böckelmann.

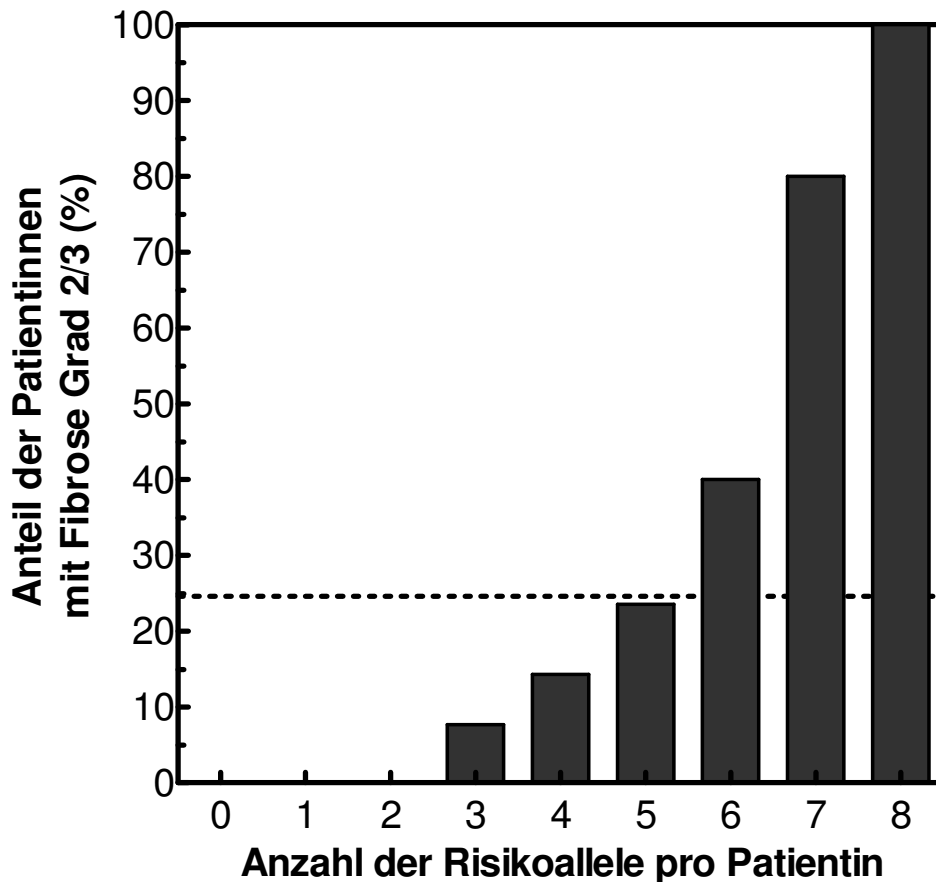


Abb.5.2: Zusammenhang zwischen der Zahl der Risikoallele in den Genen TGF β 1, SOD2, ATM und XRCC1 und dem Fibroserisiko für Brustkrebspatientinnen. Der Mittelwert für die Entstehung einer Fibrose beträgt 24,6%.

Abb. 5.1. zeigt die Verteilung für die Zahl der Risikoallele für die 69 untersuchten Patientinnen. Aufgrund der vier identifizierten Risikoallele können wegen des doppelten Chromosomensatzes bei einer Patientin maximal 8 Risikoallele vorliegen. Dies ist nur bei einer der Patientinnen der Fall. Es gibt keine Patientin ohne ein Risikoallel. Bei jeweils einer Patientin wird nur ein, bzw. werden zwei Risikoallele gemessen. Insgesamt zeigt sich eine Variation die gut, mit einem Mittelwert von 5 Risikoallelen, durch eine Normalverteilung beschrieben werden kann.

Die weißen und schwarzen Säulen geben jeweils die Zahl der Patientinnen an, für die entweder eine Fibrose vom Grad 0/1 bzw. 2/3 festgestellt wurde. Es ist klar zu erkennen, dass eine Fibrose vom Grad 2/3 vor allem bei Patientinnen mit einer hohen Anzahl

an Risikoallelen beobachtet wird. Bei 7 Risikoallelen zeigen vier von fünf Patientinnen eine Fibrose vom Grad 2/3. Berechnet man für jede Anzahl an Risikoallelen den Anteil der Patientinnen mit Fibrose Grad 2/3 an allen Patientinnen, so ergibt sich der Zusammenhang, wie er in Abb.5.2 dargestellt ist. Hier zeigt sich eindeutig und hoch signifikant ($p < 0.001$) die klare Zunahme des Fibrosierisikos in Zusammenhang mit der Anzahl der Risikoallele. Im Mittel war für die 69 untersuchten Patientinnen ein Fibrosierisiko von 24,6% festgestellt worden. Für Patientinnen mit bis zu vier Risikoallelen liegt dieses Risiko mit maximal 14% deutlich darunter. Ab sechs Risikoallelen liegt es hingegen mit einem Risiko von 40% bereits deutlich darüber und erreicht bei sieben und acht Allelen sogar die Werte von 80 und 100%. Auch wenn aufgrund der geringen Zahl der Patientinnen mit dieser hohen Anzahl an Risikoallelen dieses klare Ergebnis mit einer gewissen Einschränkung zu betrachten ist, zeigen diese Daten doch insgesamt sehr deutlich, dass bei Verwendung geeigneter Risikoallele Patientinnen mit einem extrem hohen, aber auch extrem niedrigen Fibrosierisiko zu identifizieren sind.

Mit der Abb.5.1 konnte erstmalig basierend auf den Daten der beiden hier zusammengefassten Arbeiten für Brustkrebspatientinnen eine Verteilung der Risikoallele gezeigt werden. Die Erkenntnis, dass diese Daten sehr gut durch eine Normalverteilung beschrieben werden kann, entspricht der Beobachtung, dass auch für andere Indikatoren, denen eine Bedeutung bei der Entwicklung von Normalgewebereaktionen nach Strahlentherapie zugesprochen wird, eine derartige Verteilung gefunden wird. Sie zeigt auch, dass es nicht eine Subgruppe an Patientinnen mit einem deutlich erhöhten Risiko, sondern eine Verteilung mit einem kontinuierlich ansteigenden Risiko gibt.

Eine ähnliche Abhängigkeit von der Zahl der Risikoallele war zuvor bereits von Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) ebenfalls für Brustkrebspatientinnen erkannt worden. Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, dieses klare und überzeugende Ergebnis dieser beiden Arbeiten durch weitere Studien zu bestätigen und auch für andere Tumorentitäten zu untersuchen. Diese Untersuchungen könnten damit einen wichtigen Schritt zur Individualisierung der Strahlentherapie hinsichtlich der Normalgewebereaktionen leisten und damit ganz wesentlich zum Fortschritt dieser Therapie beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für 69 Brustkrebspatientinnen überprüft, ob Variationen (SNPs) in den Genen TGF β 1 (C-509T) und SOD2 (C1183T) einen Einfluss auf das Fibroserisiko nach Strahlentherapie haben. Zusätzlich sollte für eine Untergruppe von 49 Patientinnen geklärt werden, ob diese SNPs ebenfalls die individuelle Strahlenempfindlichkeit beeinflussen.

Der Nachweis der SNPs erfolgte mit der „Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus“-Methode. Hierfür wurden mittels PCR die entsprechenden DNA-Fragmente vervielfältigt und dann über Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen der jeweilige Allelstatus bestimmt.

Hinsichtlich des untersuchten SNPs im TGF β 1-Gen wiesen von den 69 untersuchten Patientinnen insgesamt 24 in beiden Allelen einen Wildtypstatus (w/w) auf, 40 einen heterozygoten Status und 5 in beiden Allelen einen SNP. Beim SOD2-Gen waren es 27 mit w/w, 38 mit w/s und 4 mit s/s. Diese Zahlen entsprechen den Verteilungen, wie man sie in der normalen Bevölkerung findet.

Von den 69 Brustkrebspatientinnen dieser Studie haben nach einer Strahlentherapie 17 (24,6%) eine Fibrose vom Grad 2/3 entwickelt. Für die in dieser Arbeit untersuchten SNPs wurde eine deutlich Assoziation mit dem Auftreten der Fibrose festgestellt. So lag für Patientinnen mit einem w/w-Status im TGF β 1 das Fibroserisiko nur bei 16%, dagegen für Patientinnen mit s/s-Status bei 60%. Hinsichtlich des SOD2 nahm für Patientinnen mit w/w-Status das Fibroserisiko von 41% auf 0% bei s/s-Status ab. Aufgrund dieser Ergebnisse kann beim TGF β 1-Gen der SNP als Risikofaktor eingestuft werden, während beim SOD2-Gen dies für den Wildtypstatus gilt.

Für eine Untergruppe von 49 Patientinnen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass hinsichtlich der Bedeutung der SNP die gleiche Abhängigkeit für die individuelle Strahlenempfindlichkeit besteht. Dieses Ergebnis deutet damit an, dass ein Einfluss der beiden SNP's auf das Fibroserisiko über die Variation der Strahlenempfindlichkeit besteht.

In einer parallel durchgeführten Arbeit konnten für das XRCC1-Gen der SNP (G-A, exon 1) als Risikofaktor und für das ATM-Gen der SNP (G5557A) als protektives Allel identifiziert werden. Während für den SNP G-A, exon 23 des XPD-Gens keine Assoziation festgestellt wurde.

Insgesamt ergibt damit die gemeinsame Auswertung beider Arbeiten, dass hinsich-

tlich des Fibroserisikos bei einer Brustkrebspatientin wegen des doppelten Chromosomensatzes maximal acht Risikoallele vorliegen können. Für diese Zahl wird eine Variation gefunden, die sich sehr gut mit einer Normalverteilung mit einem Mittelwert von 5 Risikoallelen beschreiben lässt. Das Fibroserisiko steigt dabei mit der Zahl der Risikoallele von 0 % bei 0 bis 2 Risikoallelen auf 100% bei 8 Risikoallelen an. Dieses Ergebnis unterstreicht damit das große Potential von genetischen Markern wie SNP zur prädiktiven Bestimmung der Normalgewebereaktion nach Strahlentherapie.

7. LITERATUR

Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA (2000) The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett* 159:63-71

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J et al. (2005) TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother Oncol* 75:18-21

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M et al. (2003) Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 69:127-35

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M et al. (2006a) Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM--a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol* 82:577-86

Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J et al. (2006b) ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64:776-83

Angele S, Romestaing P, Moullan N et al. (2003) ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res* 63:8717-25

Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL (1990) Transforming growth factor-beta 1 expression in irradiated liver. *Radiat Res* 122:77-85

Barcellos-Hoff MH (2005) Integrative radiation carcinogenesis: interactions between cell and tissue responses to DNA damage. *Semin Cancer Biol* 15:138-48

Barcellos-Hoff MH, Dix TA (1996) Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 10:1077-83

Begg AC, Russell NS, Knaken H et al. (1993) Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 64:393-405

Bentzen SM (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6:702-13

Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol* 4:68-80

Bentzen SM, Skoczylas JZ, Overgaard M et al. (1996) Radiotherapy-related lung fibrosis enhanced by tamoxifen. *J Natl Cancer Inst* 88:918-22

Borger JH, Kemperman H, Smitt HS et al. (1994) Dose and volume effects on fibrosis after breast conservation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:1073-81

Borgmann K, Dede M, Wrona A et al. (2004) For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:445-52

Borgmann K, Haeberle D, Doerk T et al. (2007) Genetic determination of chromosomal

radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes. *Radiother Oncol* 83:196-202

Borgmann K, Roper B, El-Awady R et al. (2002) Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol* 64:141-52

Brock WA, Tucker SL, Geara FB et al. (1995) Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:1371-9

Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177-86

Budach W (1997) [Genetic predisposition and radiation sensitivity of tumors]. *Strahlenther Onkol* 173:469-79

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (2004) *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*, 3. Aufl., Urban & Fischer, Berlin Kiel Birmingham

Burger A, Loffler H, Bamberg M et al. (1998) Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 73:401-8

Burnet NG, Nyman J, Turesson I et al. (1992) Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339:1570-1

Burnet NG, Nyman J, Turesson I et al. (1994) The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother Oncol* 33:228-38

Carpenter M, Epperly MW, Agarwal A et al. (2005) Inhalation delivery of manganese superoxide dismutase-plasmid/liposomes protects the murine lung from irradiation damage. *Gene Ther* 12:685-93

Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL et al. (2005) Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:4802-9

Chappell S, Guetta-Baranes T, Batowski K et al. (2004) Haplotypes of the alpha-1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. *Hum Mutat* 24:535-6

De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K et al. (2006) TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:1240-8

De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K et al. (2005) Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1140-9

Delanian S, Lefaix JL (2004) The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 73:119-31

Denham JW, Hauer-Jensen M, Peters LJ (2001) Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:1105-6

Dikomey E, Borgmann K, Peacock J et al. (2003) Why recent studies relating normal

tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56:1194-200

Dorr W, Kraft M (1997) Effects of ageing and X-irradiation on the diurnal rhythm of mouse urinary bladder capacity. *Urol Int* 58:153-9

Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS et al. (2001) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:217-22

Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ et al. (2000) Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21:965-71

Epperly MW, Tyurina YY, Nie S et al. (2005) MnSOD-plasmid liposome gene therapy decreases ionizing irradiation-induced lipid peroxidation of the esophagus. *In Vivo* 19:997-1004

Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L et al. (2004) Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:583-91

Flanders KC, Major CD, Arabshahi A et al. (2003) Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol* 163:2247-57

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1513-30

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M et al. (1999) Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 8:93-7

Green EK, Elvidge GP, Owen MJ et al. (2003) Mutational analysis of two positional candidate susceptibility genes for bipolar disorder on chromosome 12q23-q24: phenylalanine hydroxylase and human LIM-homeobox LHX5. *Psychiatr Genet* 13:97-101

Green H, Ross G, Peacock J et al. (2002) Variation in the manganese superoxide dismutase gene (SOD2) is not a major cause of radiotherapy complications in breast cancer patients. *Radiother Oncol* 63:213-6

Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K et al. (2000) Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res* 28:3871-9

Hakenjos L, Bamberg M, Rodemann HP (2000) TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol* 76:503-9

Hart RM, Kimler BF, Evans RG et al. (1987) Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13:1237-40

Henne-Bruns D, Düring M, Kremer B (2003) *Duale Reihe Chirurgie*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart

Herrmann T, Baumann M, Voigtmann L et al. (1997) Effect of irradiated volume on lung damage in pigs. *Radiother Oncol* 44:35-40

Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH et al. (2001) Normal tissue radiobiology: from the

laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:353-65

Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S et al. (2005) Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2898-903

Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M et al. (2003) Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 69:137-44

Hu G, Modrek B, Riise Stensland HM et al. (2002) Efficient discovery of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Pharmacogenomics J* 2:236-42

Hu JJ, Smith TR, Miller MS et al. (2001) Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22:917-22

Huang P, Feng L, Oldham EA et al. (2000) Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 407:390-5

Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J et al. (1996) Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother Oncol* 40:101-9

Jones LA, Scott D, Cowan R et al. (1995) Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. *Int J Radiat Biol* 67:519-28

Jung M, Dritschilo A (2001) NF-kappa B signaling pathway as a target for human tumor radiosensitization. *Semin Radiat Oncol* 11:346-51

Justenhoven C, Hamann U, Pesch B et al. (2004) ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:2059-64

Kang SK, Rabbani ZN, Folz RJ et al. (2003) Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:1056-66

Kasten-Pisula U, Windhorst S, Dahm-Daphi J et al. (2007) Radiosensitization of tumour cell lines by the polyphenol Gossypol results from depressed double-strand break repair and not from enhanced apoptosis. *Radiother Oncol* 83:296-303

Kasten U, Plottner N, Johansen J et al. (1999) Ku70/80 gene expression and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) activity do not correlate with double-strand break (dsb) repair capacity and cellular radiosensitivity in normal human fibroblasts. *Br J Cancer* 79:1037-41

Liu PY, Lu Y, Long JR et al. (2004) Common variants at the PCOL2 and Sp1 binding sites of the COL1A1 gene and their interactive effect influence bone mineral density in Caucasians. *J Med Genet* 41:752-7

Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R et al. (2000) XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21:551-5

Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL et al. (1999) XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 59:2557-61

Mantymaa P, Siitonen T, Guttorm T et al. (2000) Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *Br J Haematol* 108:574-81

Matullo G, Palli D, Peluso M et al. (2001) XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22:1437-45

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-55

Mototani H, Mabuchi A, Saito S et al. (2005) A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 14:1009-17

Moullan N, Cox DG, Angele S et al. (2003) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1168-74

Müller RP, Seegenschmiedt MH, Höffken K, Junginger T, Sauer HJ (1997) LENT-SOMA-Kriterien: Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapiefolgen in der Onkologie, *Deutsches Ärzteblatt Ausgabe 37*, 97(37)

Oppitz U, Baier K, Wulf J et al. (2001) The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol* 77:105-10

Peacock J, Ashton A, Bliss J et al. (2000) Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* 55:173-8

Peters LJ (1990) The ESTRO Regaud lecture. Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. *Radiother Oncol* 17:177-90

Peters LJ, Wendt CD (1990) Tumor volume as a predictor of radiocurability--a drop in the bucket? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19:497-8

Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF et al. (1990) An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol* 63:624-8

Quarmby S, Fakhoury H, Levine E et al. (2003) Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol* 79:137-43

Ramsay J, Birrell G (1995) Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:339-44

Reiser M, Kuhn FP, Debus J (2002) *Duale Reihe Radiologie*, Thieme, Stuttgart

Rodemann HP, Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 35:83-90

Rodemann HP, Binder A, Burger A et al. (1996) The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int Suppl* 54:S32-6

Rudat V, Dietz A, Conradt C et al. (1997) In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer. *Radiother Oncol* 43:181-8

- Rudat V, Dietz A, Nollert J et al. (1999) Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 53:233-45
- Sano M, Kuroi N, Nakayama T et al. (2005) Association study of calcitonin-receptor-like receptor gene in essential hypertension. *Am J Hypertens* 18:403-8
- Shimazaki A, Kawamura Y, Kanazawa A et al. (2005) Genetic variations in the gene encoding ELMO1 are associated with susceptibility to diabetic nephropathy. *Diabetes* 54:1171-8
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T et al. (1996) Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 226:561-5
- Shu XO, Cai Q, Gao YT et al. (2003) A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1462-7
- Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT et al. (1980) Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6:1573-5
- Spitz MR, Wu X, Wang Y et al. (2001) Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 61:1354-7
- Stein MB, Fallin MD, Schork NJ et al. (2005) COMT polymorphisms and anxiety-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 30:2092-102
- Streffler C (1997) [Genetic predisposition and radiation sensitivity of normal tissue]. *Strahlenther Onkol* 173:462-8
- Takada Y, Hachiya M, Park SH et al. (2002) Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance. *Mol Cancer Res* 1:137-46
- Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992) Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer* 28A:1783-91
- Turesson I (1990) Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19:1569-74
- Turesson I, Nyman J, Holmberg E et al. (1996) Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36:1065-75
- Vinh-Hung V, Verschraegen C (2004) Breast-conserving surgery with or without radiotherapy: pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 96:115-21
- Von Pfeil A, Hakenjos L, Herskind C et al. (2002) Irradiated homozygous TGF-beta1 knockout fibroblasts show enhanced clonogenic survival as compared with TGF-beta1 wild-type fibroblasts. *Int J Radiat Biol* 78:331-9
- Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB et al. (1976) Inherent cellular radiosensitivity of human tumors of varying clinical curability. *AJR Am J Roentgenol* 127:1027-32

West CM, Davidson SE, Elyan SA et al. (2001) Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:10-5

West CM, Davidson SE, Hendry JH et al. (1991) Prediction of cervical carcinoma response to radiotherapy. *Lancet* 338:818

West CM, Elyan SA, Berry P et al. (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 68:197-203

Woods WG, Byrne TD, Kim TH (1988) Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* 62:2341-5

Xavier S, Piek E, Fujii M et al. (2004) Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem* 279:15167-76

Zhang HJ, Yan T, Oberley TD et al. (1999) Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res* 59:6276-83

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. E. Dikomey danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Onkologischen Zentrums des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. E. Dikomey und Frau Dr. K. Borgmann sowie Herrn Dr. O. Zschenker danke ich für die Betreuung seitens der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Dikomey im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie danke ich für die freundliche Aufnahme und das Engagement und die Geduld bei der Vermittlung der fachlichen Inhalte.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Frau Alexandra Zilinski und Frau Nadja Ring für ihre sehr gute technische Unterstützung und insbesondere für die Isolierung der Genomischen DNA sowie die Unterstützung bei der Umrechnung der Stoffkonzentrationen in Mol.

Meiner Familie und meinen Freunden und insbesondere meiner Ehefrau sowie meinem Sohn danke ich für die seelische Unterstützung, die Geduld und die Nachsicht.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Borgmann und Herrn Dr. Oliver Zschenker die meine Arbeit mit großem Interesse betreut haben und mir auf dem Gebiet der Strahlenbiologie einen sehr interessanten Einblick verschaffen konnten. Für mich sind beide die besten Doktormutter/Doktorvater der Welt, da sie in allen Situationen unterstützend und motivierend zur Stelle waren und ich mir keine perfektere Betreuung meiner Doktorarbeit hätte vorstellen können. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dankeschön.

9. LEBENSLAUF

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit mit dem Titel „Bedeutung von Einzelnukleotidpolymorphismen in den Genen TGF β und SOD2 bei Brustkrebspatientinnen für die Fibrose nach Strahlentherapie“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Ich erkläre, dass ich keine anderen als die in der Doktorarbeit angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre, dass ich die Arbeit erstmalig und nur an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf eingereicht habe und keinen entsprechenden Doktorgrad besitze.

Der Inhalt der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung ist mir bekannt.

Sonko Borstelmann

Hamburg, den 08.02.2010