

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Onkologischen Zentrums

Leitung: Prof. Dr. med. Cordula Petersen

Bedeutung von Einzelnukleotidpolymorphismen in den Genen ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD und XRCC1 bei Brustkrebs- patientinnen für die Erythementstehung als Akutreaktion nach Strahlentherapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

KATHARINA DERDA

aus Pulawy/Polen

Hamburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 03.05.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Annette Raabe

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Kerstin Borgmann

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. Kerstin Kutsche

Inhaltsverzeichnis

1.	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	3
2.	EINLEITUNG	5
2.1	Das Mammakarzinom	6
2.2	Die Rolle der Strahlentherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms	7
2.3	Wirkmechanismus ionisierender Strahlung	9
2.4	Nebenwirkungen der Strahlentherapie	9
2.5	Klinische Einteilung der strahlenbedingten Normalgewebeschäden	10
2.6	Pathogenese akuter Strahlenreaktionen am Beispiel des Erythems	11
2.6.1	Klassifizierung der akuten Hautreaktionen	13
2.7	Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen	14
2.8	Genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit	16
2.8.1	Einzelnukleotidpolymorphismen	17
2.8.2	Bedeutung von SNPs für die DNA-Reparatur	19
2.8.3	Bedeutung von SNPs für die Normalgewebereaktion	20
2.8.4	Auswahl der SNPs	21
2.8.5	Konfundierende Faktoren	29
2.8.6	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	30
3.	MATERIAL UND METHODEN	34
3.1	Beschreibung des Patientinnenkollektivs	34
3.1.1	Therapie	34
3.1.2	Beurteilung der Normalgewebereaktion	36
3.2	Genotypisierung mittels PCR-RFLP-Methode	36
3.2.1	Beschreibung der verwendeten Techniken	37
3.3	Genotypisierung mittels MALDI-TOF	40
3.4	Experimentelles Vorgehen bei der Untersuchung der einzelnen Gene ..	41
3.5	Statistische Verfahren	43
3.6	Geräte	43
3.7	Puffer und Lösungen	43
4.	ERGEBNISSE	45
4.1	Optimierung der Methoden	45
4.1.1	Aufreinigung des PCR-Produktes	45
4.1.2	Optimierung des Nachweises des C1183T-Polymorphismus des SOD2-Gens	47

4.1.3	Optimierung des Nachweises des G3991A-Polymorphismus des XRCC1-Gens	48
4.1.4	Etablierung des Nachweises des A105G-Polymorphismus des GSTP1-Gens ..	49
4.2	Genstatus der Patientinnen.....	51
4.2.1	Überprüfung der Genotypfrequenzen auf Hardy-Weinberg-Verteilung	52
4.3	Einfluss des Genstatus auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit.....	54
4.4	Einfluss des Genstatus auf das Erythemrisiko	57
4.4.1	Erythemhäufigkeit nach Strahlentherapie.....	57
4.4.2	Genstatus der untersuchten SNPs.....	59
4.5	Konfundierender Faktor Brustvolumen.....	61
4.5.1	Identifizierung der Risikoallele.....	62
5.	DISKUSSION.....	65
5.1	Allelhäufigkeit	65
5.2	Erythem als Endpunkt	67
5.3	Bedeutung der SNPs für das Erythemrisiko	70
5.3.1	Bedeutung des Polymorphismus C509T im TGFB1-Gen für das Erythemrisiko	71
5.3.2	Bedeutung des Polymorphismus G751T im XPD-Gen für das Erythemrisiko ...	72
5.3.3	Bedeutung der Kombination von Risikoallelen für das Erythemrisiko	73
5.4	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit als Determinante des Erythemrisikos	75
5.5	Bedeutung der SNPs für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit	76
6.	ZUSAMMENFASSUNG	77
6.1	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	78
	LITERATURVERZEICHNIS	I
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XVI
	TABELLENVERZEICHNIS	XVIII
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIX
	LEBENS LAUF	XXII
	DANKSAGUNG	XXIII
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XXIV

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Durch Strahlentherapie kann heute eine Vielzahl an Tumorerkrankungen geheilt werden. Die bei dieser Therapie maximal einsetzbare Dosis wird durch das Auftreten von akuten und späten Normalgewebereaktionen begrenzt. Für das Auftreten dieser Reaktionen werden selbst nach identischen Therapieschemata große Variationen beobachtet. Diese Variationen werden hauptsächlich auf Unterschiede in der individuellen Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt [Bentzen 1997, Fillipi et al. 2006].

Die individuelle Strahlenempfindlichkeit ist genetisch determiniert [Fillipi et al. 2006, Borgmann et al. 2007]. Für die Unterschiede in der individuellen Strahlenempfindlichkeit werden vor allem genetische Veränderungen, wie sie durch Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) verursacht werden, verantwortlich gemacht. In bisherigen Untersuchungen wurde hauptsächlich der Einfluss verschiedener Risikogene auf das Fibrosisiko strahlentherapeutisch behandelter Brustkrebspatientinnen untersucht [Andreasen et al. 2003, de Ruyck et al. 2006, Zschenker et al. 2010], wobei insbesondere die Gene ATM, SOD2, TGFB1, XPD und XRCC1 als Risikogene der späten Normalgewebereaktion beschrieben wurden.

Neben der Fibrose als Spätreaktion der Bestrahlung spielt die akute Strahlenreaktion eine klinisch bedeutende Rolle. Zum einen, da ausgeprägte akute Nebenwirkungen Therapieunterbrechungen zur Folge haben können, womit in vielen Fällen eine Verringerung der Heilungschance einhergeht [Duncan et al. 1996, Hopewell et al. 2003]. Des Weiteren nimmt die klinische Bedeutung akuter Nebenwirkungen mit der Entwicklung moderner Bestrahlungstechniken zu, in deren Rahmen höhere Einzeldosen appliziert werden können, wie zum Beispiel IMRT oder Protonen- bzw. Schwerionentherapie sowie beim Einsatz aggressiver Fraktionierungsschemata (CHART). Insbesondere erlangt die Untersuchung des akuten Nebenwirkungsrisikos besondere klinische Relevanz, da sie mit dem Auftreten einer Fibrose korreliert und somit als Prädiktor der Spätreaktion zu werten ist [Tucker et al. 1992, Bentzen et al. 1993, Turesson et al. 1996, Bernier et al. 1998, Jereczek-Fossa et al. 2002, Lopez et al. 2005, Perera et al. 2005, Heemsbergen et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit das Auftreten von Akutreaktionen mit der Häufigkeit von SNPs korreliert, welche bereits bezüglich ihrer Assoziation mit Spätkomplikationen nach Strahlentherapie untersucht wurden. Diese Arbeit stellt somit ein Folgeprojekt bereits abgeschlossener Untersuchungen zur Charakterisierung der genetischen Determinanten der klinischen Strahlenempfindlichkeit dar. Die

Fragestellung des Projekts wurde in dieser Arbeit um den Aspekt der genetischen Determinante der individuellen Strahlenempfindlichkeit erweitert. Es wurde überprüft, inwieweit neben der klinischen auch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit durch die untersuchten SNPs determiniert ist. Dieses wurde dadurch ermöglicht, dass im Rahmen einer früheren Untersuchung [Hoeller et al. 2003, Borgmann et al. 2008] die zelluläre Strahlenempfindlichkeit des untersuchten Kollektivs mit Hilfe chromosomaler Untersuchungen bestimmt wurde, und nun mit den Genotypisierungsergebnissen korreliert werden konnte.

Die Untersuchungen wurden an Blutproben von 83 Brustkrebspatientinnen durchgeführt, die zuvor strahlentherapeutisch behandelt wurden. Diese Patientinnen zeigten dabei große Unterschiede in den akuten Normalgewebereaktionen. Zu prüfen ist, ob die Unterschiede der klinischen bzw. der zellulären Strahlenempfindlichkeit durch genetische Variationen in Form von SNPs beeinflusst werden.

Insgesamt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Bedeutung folgender sechs Polymorphismen untersucht: ATM (G5557A, rs1801516), GSTP1 (A105G, rs1695), SOD2 (C1183T, rs4880), TGFB1 (C509T, rs1800469), XPD (G751T, rs13181) und XRCC1 (G399A rs25487).

2. Einleitung

Für die therapeutische Behandlung von malignen Tumoren ist die Strahlentherapie neben der Chirurgie von essentieller Bedeutung. Im Gegensatz zur medikamentösen Therapie (Chemo- und Hormontherapie) ist ihre Wirkung auf eine lokale Region begrenzt.

Das Ziel der Strahlentherapie ist die Vernichtung des malignen Gewebes eines lokal begrenzten Tumors. Die insgesamt erforderliche Strahlendosis von in der Regel 60-70 Gy (Grey) wird über mehrere Sitzungen „fraktioniert“ verteilt und ist abhängig von der Entität und dem Volumen des Tumors sowie von der Strahlensensibilität des Normalgewebes.

Strahlentherapie kann kurativ sowie palliativ eingesetzt werden. Im kurativen Ansatz unterscheidet man die neoadjuvante Bestrahlung, vor der Operation, mit dem Ziel einer Tumorverkleinerung, zum Beispiel beim Rektumkarzinom [Roh et al. 2009], von der adjuvanten Bestrahlung, nach einer Operation. Durch adjuvante Bestrahlung kann das Risiko eines Rezidivs gesenkt werden, zum Beispiel nach brusterhaltender Operation des Mammakarzinoms [Williamson et al. 2010]. Aber auch bei Hirn-, HNO- oder gynäkologischen Tumoren ist eine postoperative Bestrahlung oft indiziert. Des Weiteren können manche Tumore durch eine alleinige Strahlentherapie zur vollständigen Rückbildung gebracht werden, zum Beispiel Hauttumore oder Prostatakarzinome [Veness et al. 2003, Iğdem et al. 2010]. Eine weitere Einsatzmöglichkeit ist die zusätzliche „konsolidierende“ Bestrahlung nach vorangegangener Chemotherapie, zum Beispiel bei Lungenkarzinomen und Lymphomen [Li et al. 2010]. Des Weiteren wird die Kombination der Strahlen- mit einer Chemotherapie (Radiochemotherapie) zur Verbesserung der Ergebnisse, zum Beispiel bei Rektum-, Ösophagus- und Bronchialkarzinomen verwendet.

Aber auch wenn eine Heilung nicht möglich ist, kann durch eine palliative Bestrahlung häufig eine Linderung der Beschwerden erreicht und die Lebensqualität verbessert werden, zum Beispiel bei schmerzhaften Skelettmetastasen [Meeuse et al. 2010] oder zur Verhinderung neurologischer Probleme bei Wirbelsäulen- und Hirnmetastasen [Mariya et al. 2010].

2.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Mitteleuropa mit einem Anteil von 23 % der häufigste maligne Tumor der Frau. Etwa jede achte Frau erkrankt in ihrem Leben an einem Mammakarzinom und etwa 15 % aller Karzinomtodesfälle gehen auf diese Erkrankung zurück. In Deutschland erkranken jährlich etwa 45.000 Frauen an Brustkrebs. Das Brustkrebsrisiko ist für Männer um den Faktor 150 geringer. Die Häufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu und erreicht mit 55 Jahren ihren Gipfel. Nach dem 76. Lebensjahr fällt die Inzidenz wieder ab. Die Mortalität ist regional sehr unterschiedlich. In Europa und den USA beträgt sie 20/100.000, in Asien oder Mexiko lediglich 5/100.000. Diese Unterschiede sind durch regional unterschiedliche Risikofaktoren wie Genstatus, Hormonkonzentration, Ernährung und Alter bedingt [Bühling et al. 2004].

Verschiedene genetische Besonderheiten in mehreren Genen, zum Beispiel in p53, bcl-2, c-myc und c-myb, sind für ein höheres Mammakarzinomrisiko verantwortlich. Noch eindrucksvoller ist die genetische Disposition bei den Genen BRCA 1 und BRCA 2, die zu einem 85 % höheren Risiko der Entwicklung eines Mamma- und Zervixkarzinoms führen kann [Bühling et al. 2004].

Die verlängerte oder erhöhte Zufuhr von endogenen und exogenen Hormonen, wie Östrogen, erhöht das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Dementsprechend sind eine frühe Menarche sowie eine späte Menopause, eine späte Schwangerschaft und orale Kontrazeptiva entscheidende Risikofaktoren [Kelsey et al. 1993].

Ein hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren und ein regelmäßiger Alkoholkonsum erhöhen ebenfalls das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken [Tretli 1989, Ziegler et al. 1996, Huang et al. 1997; Longnecker 1994, Smith-Warner et al. 1998].

Das Mammakarzinom wird histologisch nach dem Ausgangsgewebe in duktales (65 %) und lobuläres (10–15 %) Karzinom eingeteilt, der Rest sind Mischformen. Darüber hinaus erfolgt die Einteilung in invasiv und nicht invasiv wachsend. Davon abgegrenzt wird das *carzinoma in situ*, aus welchem in 30 % der Fälle ein invasiv wachsendes Karzinom entsteht. Zu den nicht invasiven gehört das intraductale Karzinom (DCIS, 70 %). Es wächst innerhalb des Drüsengangepithels und die Prognose ist nach operativer Entfernung sehr gut. Es wird in 5 Haupttypen unterschieden (Komedokarzinom, solides, kribriiformes, micropapilläres und papilläres Karzinom). Eine andere Form des DCIS ist der Morbus Paget, bei dem es zu chronischen ekzemartigen Hauteffloreszenzen um den Warzenvorhof kommt. Bei dem lobulären Carcinoma in situ (CLIS) zeigt sich eine atypische Wucherung, die die Azini eines oder mehrerer Läppchen ausfüllt.

Es wächst häufig multizentrisch (in 30 % kontralateraler Befall). Innerhalb von 20 Jahren gehen 30 % in ein invasives lobuläres Karzinom über. Hier ist das Wachstum diffus und infiltrativ, wobei die Tumorzellen häufig die Milchgänge ummauern. Das invasive ductale Karzinom (IDK) ist das häufigste Mammakarzinom (85 %). Es handelt sich um ein einheitliches Zellmuster, welches zu 25 % eine anders differenzierte Histologie aufweist (medullär, tubulär, muzinös), welche die Prognose beeinflusst [Bühling et al. 2004]. Weitere klassische Prognosefaktoren sind die Tumorgröße, der axilläre Lymphknotenstatus, das histologische Grading sowie der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus [Henne-Bruns et al. 2003].

Eine Tumorausbreitung erfolgt bei entsprechender Entität lokal, regional oder über Fernmetastasierung. Die lokale Ausbreitung innerhalb der Brust erfolgt über direkte Infiltration des Nachbargewebes oder entlang der Drüsengänge. Es gibt auch eine lokale lymphatische- und Gefäßausbreitung. Unter der regionalen Tumorausbreitung wird die Metastasierung in die axillären, supraclavikulären und innerhalb der Mamma sich befindenden Lymphknoten verstanden. Dabei ist die Anzahl der befallenen und nicht befallenen Lymphknoten entscheidend für die Prognose. Bei der Fernmetastasierung werden vor allem Knochen, Lunge und Leber befallen. Auch Hirnhaut- und Peritonealmetastasen sind nicht selten.

2.2 Die Rolle der Strahlentherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms

Der Behandlungsplan des Mammakarzinoms umfasst die Chirurgie, die adjuvante Strahlentherapie sowie die adjuvante bzw. neoadjuvante Chemo- und/oder Hormontherapie. In Abhängigkeit von Größe und Ausdehnung des Primärtumors auf benachbarte Strukturen (Tis, T1-T4), vom Lymphknotenbefall (N1-N3) und von Fernmetastasierung (M0, M1) findet die moderne Therapie des Mammakarzinoms stadienangepasst und individualisiert statt.

Für die überwiegende Anzahl der Patientinnen stellt der chirurgische Eingriff die erste und wichtigste Therapiemaßnahme dar. Etwa 70 % der Brustkrebspatientinnen können heutzutage brusterhaltend operiert werden, das heißt der bis zu 3 cm große Tumorknoten (Stadium T1) wird einschließlich eines 2 cm Sicherheitsrandsaums im gesunden Gewebe entfernt oder der befallene Brustdrüsenquadrant reseziert. Anschließend werden die axillären Lymphknoten (mind. 10) entfernt. Alternativ kann bis Stadium T1 und klinisch freier Axilla der erste Lymphknoten des Abflussgebiets, der zuvor radioaktiv markiert wurde (Sentinel- bzw. Wächter-Lymphknoten) entnommen werden. Erst wenn

dieser befallen ist, werden die restlichen axillären Lymphknoten entfernt [Müller 2006/7]. Nach brusterhaltender Chirurgie ist die Bestrahlung obligat. Der Verzicht auf Nachbestrahlung würde innerhalb von fünf Jahren bei bis zu 40 % der Patientinnen zu einem erneuten Tumorwachstum (Lokalrezidiv) führen. Die Rate der Lokalrezidive wäre somit um das fünf- bis sechsfache erhöht [Schmidt-Matthiesen und Hepp 1998]. Beim kleinen Mammakarzinom hat sich das brusterhaltende Konzept weltweit als Standardtherapie durchgesetzt. Dieses ist auf Studien zurückzuführen, die keinen Unterschied in der Prognose für Patientinnen nach brusterhaltender Operation mit anschließender Strahlenbehandlung im Vergleich zu Patientinnen mit einer modifizierten radikalen Mastektomie zeigen konnten [Findlay et al. 1985, Sarrazin et al. 1989, Veronesi 1989, Blichert-Toft et al. 1992].

Nach einem brusterhaltenden Eingriff werden die belassene Brust und in Abhängigkeit des Befalls die regionalen Lymphknoten mit mindestens 50 Gy bestrahlt. Diese Dosis wird großflächig, fraktioniert in fünf Wochen appliziert (in der Regel 5 x 2 Gy/Woche). Im Bereich des ehemaligen Tumorbettes wird dann in einem deutlich kleineren Feld die Dosis in Form eines Boostes durch zusätzliche Applikation von 10 Gy in Fraktionen à 2 Gy angereichert. Durch die adjuvante Strahlenbehandlung kann die Rate an Rezidiven deutlich gesenkt und somit die Prognose der betroffenen Patientinnen deutlich verbessert werden [Montague et al. 1980]. Dass eine verbesserte lokoregionale Tumorkontrolle sich direkt in ein verbessertes Gesamtüberleben transformieren lässt, konnte ebenfalls in einer Studiengruppe an mehr als 3000 Patientinnen belegt werden [Kreienberg et al. 2002].

Kann die Brust nicht erhaltend operiert werden, wird die eingeschränkt radikale Mastektomie durchgeführt. Die ultraradikale Mastektomie, die noch vor 20 Jahren als Standard angesehen wurde, wird heute nur noch in wenigen Fällen angewendet. In diesen Fällen wird die Thoraxwand postoperativ mit hohen Dosen (60 Gy) bestrahlt, um das Auftreten von Lokalrezidiven im Narbenbereich zu verhindern. Bei lokaler oder allgemeiner Inoperabilität des Tumors wird die Strahlentherapie als primäre Maßnahme angewendet. Dazu ist eine hohe Tumordosis notwendig. Diese wird durch eine kombinierte perkutane und interstitielle Bestrahlung erreicht. Im klinischen Alltag wird heute bei allen High-risk-Mammakarzinomen eine Kombination von Radio-, Polychemo- und Hormontherapie durchgeführt [Müller 2006/7]. Diese Kombination hat den Vorteil, dass neben der lokalen Wirkung auch eventuell vorhandene Mikrometastasen vernichtet werden. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die lokoregionäre Strahlentherapie sowohl nach brusterhaltender Operation als auch nach Ablatio, in Kombination mit und

ohne Zytostatika, darauf abzielt, das Rezidivrisiko und die Metastasierung zu verringern.

2.3 Wirkmechanismus ionisierender Strahlung

Aufgrund ihrer hohen Energie sind ionisierende Strahlen in der Lage, chemische Bindungen aufzubrechen oder strukturelle Veränderungen an Atomen oder Molekülen hervorzurufen. In der Strahlentherapie wird Quantenstrahlung eingesetzt, zu der neben Photonenstrahlung auch Gamma- und Röntgenstrahlung gehören. Es handelt sich dabei um eine elektromagnetische Wellenstrahlung deren Wechselwirkung mit Materie zu freien elektrisch geladenen Sekundärteilchen führt, welche ihre Energie an die durchstrahlte Materie abgeben. Dabei entstehen unter anderem DNA-Doppelstrangbrüche, welche entweder eine letale oder eine nicht-letale Schädigung der betroffenen Zelle bewirken können.

Sogenannte instabile, letale Chromosomenaberrationen, die durch terminale, interstielle Deletionen oder auch dizentrische Chromosomen charakterisiert sind, bewirken letztlich die Inaktivierung der betroffenen Zelle. Charakteristisch für die zelluläre Strahlenwirkung ist, dass die Zelle ihre reproduktive Integrität nicht unmittelbar, sondern erst nach einigen Mitosen verliert. Aus diesem Grund entscheidet die Zellumsatzrate des betroffenen Gewebes maßgeblich über die Latenzzeit bis zum Auftreten eines strahleninduzierten Gewebeschadens. Stabile, nicht letale Schäden führen hingegen nicht zur Zellinaktivierung, sondern können an die Tochterzelle weitergegeben werden und somit letztlich eine onkogene Transformation vermitteln.

2.4 Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Neben der erwünschten Zerstörung des Tumorgewebes kommt es bei der Strahlentherapie auch zu einer Schädigung des Normalgewebes, da die Strahlung auf dem Weg zum Tumor Normalgewebe durchdringen muss. Auch wenn das Risiko der Normalgewebeschädigung als Folge der Fortschritte in der strahlentherapeutischen Praxis in den letzten Jahrzehnten deutlich reduziert werden konnte, zum Beispiel durch verbesserte Fixierung während der Bestrahlung, Verwendung mehrerer Strahlenfelder sowie durch Optimierung der Fraktionierung, kommt es dennoch zum Auftreten von Intoleranzreaktionen des gesunden Gewebes. Die Bestrahlungsdosis richtet sich daher nicht nur nach der Dosis, die nötig ist, um den Tumor zu zerstören, sondern auch nach der Dosis, die vom Normalgewebe im Bestrahlungsfeld noch toleriert werden kann, ohne dass

Komplikationen auftreten. Die Toleranzdosis ist ein gemittelter Erfahrungswert, bei dem maximal 5 % der Strahlentherapiepatienten eine überdurchschnittliche und rund 1 % eine starke radiogene Nebenwirkung entwickeln.

2.5 Klinische Einteilung der strahlenbedingten Normalgewebeschäden

Die strahleninduzierten Schäden des Normalgewebes werden klinisch nach dem Zeitpunkt des Auftretens einer Strahlenreaktion in akute und späte Normalgewebeschäden eingeteilt.

Akutreaktionen treten vor allem in Geweben mit hohem Zellumsatz wie zum Beispiel Epithelien und Knochenmark auf. Typischerweise treten die akuten Nebenwirkungen während und bis zu sechs Wochen nach der Therapie in Erscheinung, wobei definitionsgemäß die Grenze auf 90 Tage nach Bestrahlungsbeginn festgelegt wurde [Hermann et al. 2006]. Die akuten Strahlenreaktionen klingen nach Beendigung der Bestrahlung in der Regel vollständig ab und bedürfen meistens keiner weiteren Therapie. Als eine Ausnahme dieser Regel ist die so genannte „consequential late damage“ anzusehen, bei der es aufgrund eines besonders schweren akuten Schadens zu einer narbigen Ausheilung kommen kann [Dörr und Hendry 2001]. Zu den akuten Effekten zählt der „Strahlenkater“ mit Störungen des Appetits, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl. Weitere typische Akutreaktionen sind unter anderem das Erythem, die Mukositis, die Dermatitis sowie die Ösophagitis. Besonders häufig treten akute Nebenwirkungen an der Haut auf. Sie erstrecken sich über ein Spektrum von einfachen Hautreaktionen (Rötung, Überwärmung) über Ulzerationen bis hin zur Nekrose.

Unter späten Nebenwirkungen werden alle Nebenwirkungen zusammengefasst, die später als 90 Tage, teilweise erst Jahre nach der Strahlentherapie, auftreten. Sie zeigen einen progredienten, irreversiblen Verlauf und können nur selten medikamentös beeinflusst werden. Die betroffenen Gewebe zeichnen sich dabei in der Regel durch eine geringe proliferative Aktivität aus. Als typische Strahlenspätbeschäden im Rahmen der brusterhaltenden Therapie werden die Fibrose der Brust, Strahlenödeme im Bereich des Arms, Hautnekrosen, eine schmerzhafte Myositis der Brustmuskulatur, Radionekrosen der Rippen, Armplexusläsionen, Pleuraergüsse und Perikardfibrose beschrieben [Sauer und Dunst 1989]. Weitere typische späte Reaktionen sind Telean-

giektasien, Strahlenulcus sowie Retraktion und Atrophie der belassenen Mamma [Reiser et al. 2006].

2.6 Pathogenese akuter Strahlenreaktionen am Beispiel des Erythems

Als akute Normalgewebereaktion nach Bestrahlung entwickelt sich häufig im bestrahlten Hautbezirk das Erythem. Entsprechend des Zeitpunktes des Auftretens kann es in Früh-, Mittel- und Spät- bzw. Haupterythem unterteilt werden [Miescher 1924].

Bei einer konventionell fraktionierten Therapie mit 2 Gy pro Fraktion und fünf Fraktionen pro Woche treten nach etwa zwei Wochen die ersten erythematösen Veränderungen auf. Anschließend entwickelt sich in der Regel das ödematöse Haupterythem. Bei weiterer Bestrahlung kommt es zur Epilation und Desquamation (Radiodermatitis sicca), des Weiteren zu einer Permeabilitätsstörung der Gefäße und zur Blasenbildung (Radiodermatitis acuta bullosa). Im nächsten Stadium bewirkt die zunehmende Epitheliolyse den Austritt seröser Flüssigkeit, welches als Radiodermatitis exsudativa oder -acuta erosiva bezeichnet wird. Entwickeln sich Ulzerationen, spricht man von Radiodermatitis gangraenosa, welche häufig unter Narbenbildung abheilt.

Aus Sicht der klassischen zellulären Radiobiologie kann die akute Strahlenreaktion als eine Anzahl gut definierter Schritte beschrieben werden: Induktion, Progression, Manifestation von Gewebeschaden und Restoration.

Die Pathogenese der akuten Strahlenreaktion beruht auf einer Störung der proliferativen Organisation des Zellumsatzes, welcher durch ein sensibles Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zelluntergang gekennzeichnet ist [Herrmann et al. 2006].

Durch ionisierende Strahlen kommt es neben der Inaktivierung von Funktionszellen in Geweben zusätzlich zu einer Proliferationsstörung der Stammzellen. In der Haut handelt es sich dabei um die Basalzellschicht. Ab einer Gesamtdosis von 25 Gy kommt es zu einem zunehmenden Untergang der Basalzellen mit niedrigster Dichte bei ca. 50 Gy.

Da die Elimination der alten Funktionszellen durch zum Beispiel Abrieb fortbesteht, wird die klinische Symptomatik durch den Mangel an Zellnachschub hervorgerufen, sobald die Anzahl differenzierter Funktionszellen ein kritisches Niveau erreicht [Herrmann et al. 2006]. Folge ist die Destruktion und Abflachung der Epidermis, was sich als Radiodermatitis sicca manifestiert. Nach Beendigung der Bestrahlung kommt es,

aufgrund eines erhöhten mitotischen Index, zu einer vollständigen Regeneration der Basalzeldichte. Bei sehr weit fortgeschrittenem Epitheldefekt ist eine vollständige Regeneration nicht möglich, so dass sich eine exsudative Radiodermatitis entwickelt. Dabei ist die Entzündung stärker ausgeprägt und es bilden sich Fibrinbeläge auf der Oberfläche [Fajardo und Berthrong 1981, Bernstein et al. 1993]. Die exsudative Radiodermatitis ist aber dank Fraktionierung und Mehrfeldertechnik heutzutage seltener geworden.

Für die klinische Ausbildung des Erythems spielt die Dicke der Epidermis eine wesentliche Rolle. Somit sind die Reaktionen an Handflächen und Fußsohlen am geringsten, gefolgt von Bauch-, Brusthaut und den Innenseiten der Extremitäten. Am empfindlichsten sind die vorderen Anteile des Halses, die Ellenbeugen und die Kniekehlen.

Bevor eine strahleninduzierte Dermatitis klinisch manifest wird, lässt sich ein transepidermaler Wasserverlust (TEWL) nachweisen, der auf eine epidermale Barrierefunktionsstörung zurückzuführen ist. Diesen Effekt konnten Schmuth et al. (2001) nach fraktionierter Radiotherapie mit 50 bis 60 Gy für Brustkrebspatientinnen nachweisen. Der TEWL stieg ab Tag elf, noch vor Auftreten eines Erythems, erreichte an Tag 27 sein Maximum und normalisierte sich am 66. Tag. Dies kann bedeuten, dass die Bestrahlung eine funktionelle Störung der Keratinozyten bewirkt, mit der Folge einer abnormen extrazellulären Matrix und einer mangelhaften epidermalen Lipidproduktion. Die Barrierefunktionsstörung könnte eine veränderte Zytokinsynthese mit nachfolgender Anregung der Entzündungsreaktion auslösen.

Auf molekularer Ebene spielt die intrazelluläre Bildung von Sauerstoffradikalen eine große Rolle, welche durch die ionisierende Strahlung induziert wird. Die Sauerstoffradikale und ihre Intermediate scheinen eine Entzündungsreaktion auszulösen, welche für die Gewebeschädigung ursächlich ist. Es kommt zu chemischen und biologischen Veränderungen von intra- und extrazellulären Strukturen, die Auswirkungen auf diverse zelluläre Bestandteile wie zum Beispiel Nukleinsäuren, Proteine, Lipide, Kohlenhydrate aber auch auf transkriptionelle Mechanismen haben. Durch diese Vorgänge kann es zu chromosomalen Aberrationen und Zelltod oder zu einer Veränderung der Membranpermeabilität durch Lipidperoxidation, und in Folge dessen zu einem osmotisch bedingten Anschwellen der Zellen kommen [Hanning et al. 2000]. Auch Hopewell (1990), Bernstein et al. (1993) und Archambeau et al. (1995) konnten eine initiale lokale Entzündungsreaktion im Bestrahlungsfeld mit erhöhter Kapillarpermeabilität beobachten und diskutierten als Ursache die Aktivierung proteolytischer Enzyme. An diesen initialen, reaktiven Prozessen sind unterschiedliche Enzyme und Zytokine beteiligt. Wang et

al. (2002) konnten eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beobachten, welcher durch die Bildung der Sauerstoffradikale bedingt wurde. Eine nachfolgende Induktion von MnSOD über TNF α und IL-1, die eine Eliminierung der Sauerstoffradikale bewirken soll, wird von Xu et al. (1999) diskutiert. Des Weiteren konnte nach Hochvoltbestrahlung von Mäusehaut eine Überexpression von TNF α , IL-1 und NO-Synthase nachgewiesen werden [Schaue et al. 2005]. Diese Reaktionen konnten durch antiinflammatorische Wirkstoffe supprimiert und somit die feuchte Desquamation verringert werden [Hildebrandt et al. 2002, Schaue et al. 2005].

2.6.1 Klassifizierung der akuten Hautreaktionen

Die übliche Einteilung der akuten Hautreaktionen nach Bestrahlung erfolgt anhand der RTOG-Skala [<http://www.rtog.org/members/toxicity/acute.html#skin>], aufgestellt von der Radiation Therapy Oncology Group[®] (RTOG[®]), einer seit 40 Jahren bestehenden Organisation in Philadelphia, welche sich die Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit und der Lebensqualität von Krebspatienten als Ziel gesetzt hat (Tabelle 2.1).

Grad 1	<ul style="list-style-type: none"> - folliculäres geringfügiges Erythem - trockene Desquamation - verminderte Schweißsekretion
Grad 2	<ul style="list-style-type: none"> - empfindliches und glänzendes Erythem - diffus feuchte Desquamation - mäßiges Ödem
Grad 3	<ul style="list-style-type: none"> - konfluente, feuchte Desquamation - narbiges Ödem
Grad 4	<ul style="list-style-type: none"> - Ulzeration - Hämorrhagie - Nekrose

Tabelle 2.1: Einteilung der akuten Hautreaktionen anhand der RTOG-Skala

Zur Erfassung mehrerer Nebenwirkungen der Haut kann das daran angelehnte CTC-System [common toxicity criteria, National Cancer Institute, 1999], mit möglichen Modifikationen [Twardella et al. 2003] herangezogen werden. Die Klassifizierung kann aber auch mittels spektrophotometrischer Hautanalysen erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass Ergebnisse der spektrophotometrischen Analyse der Haut mit den mittels RTOG- Klassifizierungssystems beobachteten Nebenwirkungen korrelieren [Momm et

al. 2005]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das RTOG-Einteilungssystem sich gut zur Klassifizierung der akuten Hautreaktionen und insbesondere des Hauterythems nach Strahlentherapie eignet.

2.7 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 Grail on Radiobiology“ wurde die Suche nach solchen Parametern zur Prädiktion des Normalgeweberisikos auf eine Strahlentherapie bezeichnet [Peters 1990].

Solch eine 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 Therapedosis maximal eine Strahlendosis erlaubt, bei der 5 % der Patienten eine schwere Nebenwirkung entwickeln. Daraus geht aber auch hervor, dass 95 % der Patienten 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 Patienten mit einem erhöhten Normalgeweberisiko identifiziert werden, so könnte für diese Patienten durch Reduktion der Dosis die Zahl der schweren Nebenwirkungen vermindert werden. Andererseits könnten die Heilungschancen für die anderen Patienten durch Steigerung der Dosis erhöht werden.

Die Normalgewebereaktion ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig [West und Hendry 1991, Herrmann und Baumann 2006]. 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 [Turesson 1990, Bentzen und Overgaard 1993, Turesson et al. 1996, Dörr 1997]. Jedoch können auch bei identischem Fraktionierungsschema und Strahlendosis deutliche Unterschiede auftreten. Dieses wurde von Tucker et al. (1992) und Turesson et al. (1996) 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, systoli-

scher Blutdruck und Medikamentenapplikation) waren 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 Patienten mit dem Syndrom Ataxia teleangiectasia. Diese Patienten zeigten nach einer Bestrahlung eine ausgeprägte Normalgewebereaktion, was auf eine extrem hohe zelluläre Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt werden konnte [Hart et al. 1987]. Andere Syndrome wie Bloom-Syndrom, Fanconi-Anämie, Li-Fraumeni-Syndrom, Naevusbasalzell-Syndrom, Neurofibromatose, Nijmegen-Syndrom und Retinoblastom zeigten ähnliche Zusammenhänge [Peters 1990, Streffer 1997].

Auch die Untersuchungen von Woods et al. (1988) und 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 Patienten deutlich über der von gesunden Spendern liegt. Von Burnet et al. (1992) wurde erstmalig gezeigt, dass nicht nur bei Patienten mit bestimmten Syndromen, sondern vermutlich bei allen Patienten das Ausmaß der Normalgewebereaktion durch die genetisch determinierte, individuelle Strahlenempfindlichkeit bestimmt wird. Diese Annahme basierte auf der Analyse von sechs Patienten, bei denen das Ausmaß der Teleangiektasie bzw. des Hauterythems mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit korrelierte. In Studien von Weichselbaum (1976) und Smith et al. (1980) war dieser Zusammenhang nicht beobachtet worden. Durch Untersuchungen von Johansen et al. (1996) mit 31 Brustkrebspatientinnen konnte die von Burnet et al. (1994) aufgestellte Hypothese bestätigt werden. In der Studie von Johansen et al. (1996) zeigten Patienten mit einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit im Mittel ein größeres Risiko, eine Fibrose zu entwickeln, als solche mit einer geringen Empfindlichkeit. Auch Ramsay und Birrell (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. (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. (1997; 1999) für die akuten bzw. späten Nebenwirkungen sowie Peacock et al. (2000) für späte Normalgewebereaktionen. Auch Begg et al.

(1993) konnten keine Beziehung zwischen der individuellen Strahlenempfindlichkeit und den akuten Nebenwirkungen der Haut finden.

Von Dikomey et al. (2003b) 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 Patienten mit einer besonders erhöhten individuellen Strahlenempfindlichkeit schwere akute oder späte Normalgewebereaktionen entwickeln. Von Jung et al. (2001) ist aber gezeigt worden, dass dieses Risiko nicht nur für eine Untergruppe, sondern für alle Patienten 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 die Patienten entsprechend ihrer Strahlenempfindlichkeit stratifiziert werden [Dikomey et al. 2003b].

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

2.8 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 zeitaufwändig und 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, die jeweils beteiligten Gene zu kennen.

In einer vorangehenden Arbeit konnte 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 Blutproben von

15 monozygoten Zwillingspaaren durchgeführt worden. Dabei zeigte sich innerhalb der Zwillingspaare jeweils eine große Übereinstimmung in der Strahlenempfindlichkeit.

Bei der Suche nach genetischen Markern wurde deutlich, dass Proteine hierfür nicht geeignet sind [Kasten et al. 1999, Kasten-Pisula et al. 2007]. Einen wichtigen Ansatzpunkt brachte die Mutationsanalyse von Genen, welche für eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit eine Rolle spielen könnten. Ein in diesem Zusammenhang häufig diskutiertes Gen ist das ATM-Gen [Appleby et al. 1997, Clarke et al. 1998, Iannuzzi et al. 2002, Cesaretti et al. 2005], wobei die homozygote Mutation jedoch selten und die Datenlage inkonsistent ist. Weitere zu dieser Fragestellung untersuchte Gene sind BRCA1 und 2 [Gaffney et al. 1998, Leong et al. 2000, Pierce et al. 2000, Buchholz et al. 2002, Xia und Powell 2002]. Auch Mutationen in den Genen DNA-Ligase IV und Fanconi-Anämie wurden für besonders strahlenempfindliche Patienten beschrieben [Riballo et al. 1999, Marcou et al. 2001].

Aufgrund der Seltenheit von zum Funktionsverlust führenden Mutationen in den relevanten Genen, wurden die Studien auf die Untersuchung von Polymorphismen einzelner Basen, den sogenannten Einzelnukleotidpolymorphismen erweitert, wie sie auch in dieser Arbeit in Bezug auf die Ausprägung des Erythems untersucht und diskutiert werden. Sie werden aktuell als geeignete genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit und damit des Normalgewebeerisikos angesehen.

2.8.1 Einzelnukleotidpolymorphismen

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, Single Nukleotid Polymorphisms) sind Polymorphismen einzelner Nukleotide in der DNA, somit handelt es sich um Austausch einzelner Basen im Genom. Diese Unterschiede in einzelnen Basenpaaren führen zu einer Basensequenzveränderung. Zwei Drittel aller SNPs entstehen durch den Basenaustausch von Cytosin zu Thymin. Eine Mutation wird dann definitionsgemäß als SNP bezeichnet, wenn die Allelfrequenz mindestens ein Prozent beträgt, und es sich somit nicht um eine einmalige Mutation, sondern um ein vererbbares Merkmal handelt.

Das gesamte humane Genom enthält ca. 10 Millionen SNPs, womit SNPs statistisch ca. alle 300 - 400 Basenpaare im humanen Genom 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 zu einer Aminosäuresubstitution führen. Insgesamt resultiert nur etwa

1 % der im humanen Genom vorliegenden SNPs in funktionellen Konsequenzen. Diese treten auf, wenn sich der SNP in einem Exon oder in einem regulatorischen Genabschnitt eines Introns befindet, diese werden als „coding SNPs“ von den „regulatory SNPs“ unterschieden.

Ein SNP wird in der Regel durch eine Buchstaben- und Zahlenkombination beschrieben: Die Buchstaben stehen für eine der vier Basen und die Zahl gibt die Position des SNPs im Gen an. Die Bezeichnung des SNPs G2355A bedeutet, dass an der Position 2355 des Gens eine Guaninbase gegen eine Adeninbase ausgetauscht wird.

Das „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) hat mit der „Single Nucleotide Polymorphism Database“ (dbSNP) eine Plattform geschaffen [Wheeler et al. 2007], auf der alle Informationen zu genetischen Variationen zusammengetragen sind und abgerufen werden können [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>]. Die NCBI fasst alle Informationen, welche sich auf eine spezielle Variation beziehen, zusammen und vergibt für diese refSNP-Nummern (rs-Nr), die zur Zitierung eines speziellen SNPs dienen und Überschneidungen oder Widersprüche in der Nomenklatur verhindern sollen.

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

Es wird vermutet, dass SNPs zu mehr als 90 % die Individualität des Menschen ausmachen. Damit könnten SNPs auch für die phänotypische Ausprägung eines Individuums von großer Bedeutung sein, wie unter anderem für 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 als „silent SNPs“ bezeichnet. Sie kommen zum Beispiel in Intron-Regionen vor, oder der entsprechende Basenaustausch führt zur Codierung der gleichen Aminosäure, so dass dieser SNP bei der Proteinbiosynthese keine Auswirkung auf die Zelle und Ihre Funktion hat.

Als „codogener SNP“ wird ein Polymorphismus bezeichnet, der zu einem Aminosäure-Austausch im Protein führt. Der codogene SNP kann für die Zelle und den Gesamtorganismus entscheidende Konsequenzen haben. Zum Beispiel ist die Laktase-Persistenz durch den SNP C13910T im LCT-Gen bedingt. Der Austausch eines einzel-

nen Basenpaares ist dafür verantwortlich, ob Laktose vom Organismus gespalten werden kann oder nicht.

Ein „regulatory SNP“ 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 so verändert, und auch Stoffwechselvorgänge 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 zum Beispiel 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].

2.8.2 Bedeutung von SNPs für 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, Lunn et al. 2000, Hu et al. 2002]. Funktionsänderungen mit mehr oder weniger schweren Konsequenzen sind die Folge.

SNPs in Genen, die einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität haben, wurden bereits mit verschiedenen Krebsarten, insbesondere mit Brustkrebs, in Verbindung gebracht [Goode et al. 2002]. In diesem Zusammenhang sind vor allem Polymorphismen im Xeroderma-pigmentosum D-Gen (XPD) und im X-ray-repair cross-complementing-1-Gen (XRCC1) zu nennen, die in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und in der Basenexzisionsreparatur (BER) involviert sind.

Bei diesen Untersuchungen zeigten sich jedoch Widersprüche zwischen *in-vitro*- und klinischen Studien. So wurde in zahlreichen *in-vitro* Studien eine klare Beeinträchtigung der DNA-Reparatur durch bestimmte SNPs im XPD- [Lunn et al. 2000, Spitz et al.

2001] und XRCC1-Gen [Lunn et al. 1999, Abdel-Rahman et al. 2000, Duell et al. 2000, Matullo et al. 2001, Hu et al. 2001] gefunden. In klinischen Studien zeigte sich allerdings hinsichtlich der Bedeutung beim Auftreten von Brustkrebs keine klare Assoziation [Shu et al. 2003, Justenhoven et al. 2004, Figueiredo et al. 2004].

2.8.3 Bedeutung von SNPs für die Normalgewebereaktion

Von Andreassen et al. (2003) wurde für 41 Brustkrebspatientinnen gezeigt, dass einzelne Basensequenzveränderungen in den Genen XRCC1, XRCC3, SOD2 sowie TGFB1 zu einem erhöhten Risiko einer Normalgewebereaktion (Fibrose) nach strahlentherapeutischer Behandlung führen können. Er konnte nachweisen, dass der SNP T869C und C509T im TGFB1-, T47C im SOD2-, C18067T im XRCC3- sowie der SNP G28152A im XRCC1-Gen Risikofaktoren für eine strahleninduzierte subkutane Fibrose nach Strahlentherapie darstellen (sogenannte „risk genes“). Bei Summierung der Risikoallele zeigte sich eine klare Zunahme des Fibrosiserisikos. In weiteren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnte dieses in einer nachfolgenden Studie aber nur noch für den Polymorphismus C509T im TGFB1-Gen bestätigt werden [Andreassen et al. 2005a] und in einer Gesamtstudie sogar für keinen der oben aufgezählten SNPs [Andreassen et al. 2006b]. Auch für zahlreiche SNPs im ATM-Gen konnte keine entsprechende Assoziation gefunden werden [Andreassen et al. 2006a].

Dies gilt auch für andere untersuchte SNPs. So fanden Angele et al. (2003) eine klare Assoziation für den SNP G5557A im ATM-Gen mit einem erhöhten Normalgeweberisiko. Quarmby et al. (2003) fanden eine entsprechende Assoziation für den SNP C509T im TGFB1-Gen. Von Moullan et al. (2003) wurde von solch einer Verbindung für die beiden SNPs G28152A und C194T im XRCC1-Gen berichtet. Im Gegensatz dazu konnte durch Chang-Claude et al. (2005) für keinen der untersuchten SNPs eine klare Beziehung festgestellt werden. In den vorausgegangen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten die polymorphen Allele der SNPs G399A im XRCC1-Gen sowie C509T im TGFB1-Gen sowie die Wildtyp-Allele in den SNPs G5557A im ATM-Gen und C11183T im SOD2-Gen als Risikofaktor für Fibroseentstehung definiert werden [Zschenker et al. 2010].

2.8.4 Auswahl der SNPs

Für die vorliegende Studie wurden SNPs in den sechs Genen ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD und XRCC1 untersucht. Kriterium für die Auswahl war zum einen die Tatsache, dass diese Gene bei der zellulären Strahlenantwort, insbesondere im DNA-Reparaturmechanismus, eine bedeutende Rolle spielen. Zum anderen kommen die ausgewählten SNPs in der europäischen Normalbevölkerung ausreichend häufig vor. Darüber hinaus werden diese Polymorphismen, wie bereits beschrieben, in der Literatur als nebenwirkungsassoziiert diskutiert.

2.8.4.1 ATM

ATM (ataxia teleangiectasia mutated) ist das erste Gen, welches infolge einer starken Hautreaktion nach Strahlentherapie vor mehr als 30 Jahren erwähnt wurde [Gotoff et al. 1967, Morgan et al. 1968]. Das ATM-Gen befindet sich auf Chromosom 11q22-23 und kodiert für ein ungewöhnlich großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 350 kDa. Dieses Protein ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert und durch seine Sequenz als eine Kinase und als Mitglied einer Proteinfamilie von Zellzyklusregulatoren gekennzeichnet. Das ATM-Protein hat eine essentielle Funktion bei der Reparatur von DNA-Schäden, indem es das Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen erkennt und anschließend eine Reihe von Effektorsubstraten, darunter das Tumorsuppressorprotein p53, phosphoryliert. Dieses Signal führt zum Zellzyklusarrest und die notwendigen Reparaturprozesse werden eingeleitet. Neben der Steuerung des Zellzyklus ist es für die Apoptose von zentraler Bedeutung [Nakanishi et al. 2006].

Zusammen mit Erkrankungen wie dem Nijmegen Breakage Syndrom, der Ligase IV Defizienz, der MRE11- und Rad50-Defizienz gehört die Ataxia teleangiectasia zu den Radiosensitivitätssyndromen des Menschen. Beim Ausfall des für die DNA-Schadensabwehr zentralen ATM-Gens kommt es zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung. Die betroffenen Patienten zeigen vermehrt Immundefekte und Neoplasien des lymphoretikulären Systems [Schindler et al. 1987, Shiloh et al. 1997].

Aufgrund der zentralen Bedeutung dieses Gens hinsichtlich DNA-Schadenserkenung und Zellzyklussteuerung liegt die Annahme nahe, dass Polymorphismen in diesem Gen Effekte nach Strahlentherapie bedingen.

Die Datenlage dazu ist jedoch uneindeutig. Bei der Suche nach ATM-Mutationen bei Patienten mit schweren Nebenwirkungen nach Bestrahlung waren weder Appleby et al. (1997) noch Clarke et al. (1998) erfolgreich. Bremer et al. (2003) fanden kein erhöhtes Risiko für akute oder späte Nebenwirkungen bei zehn heterozygoten Trägerinnen von ATM-Mutationen. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie mit 46 Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden, dass bestimmte genetische ATM-Varianten in Hinblick auf die Strahlenempfindlichkeit von großer Bedeutung sind [Iannuzzi et al. 2002]. Es wurde berichtet, dass alle untersuchten Patientinnen, die den Fibrosegrad 3/4 entwickelten oder eine Weichteilnekrose zeigten, eine ATM-missense-Mutation aufwiesen. Eine andere Studie fand eine signifikante Assoziation zwischen homozygoten Trägerinnen des SNPs G5557A und einer adversen Reaktion auf Strahlentherapie [Angele et al. 2003]. Außerdem waren unter den strahlenempfindlichen Brustkrebspatientinnen homozygote Trägerinnen des Polymorphismus überrepräsentiert. Auch Andreassen et al. (2006a) konnten einen signifikanten Anstieg des Fibrosesrisikos nach Bestrahlung bei Patientinnen mit heterozygotem oder homozygotem Auftreten des G5557A-Polymorphismus beobachten.

2.8.4.2 GSTP 1

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) sind multifunktionelle Enzyme, die eine Schlüsselrolle in der zellulären Detoxifizierung einnehmen. Es sind verschiedene GST-Klassen (GST-A, GST-T, GST-M, GST-P, GST-K, GST-Z) bekannt. GSTs schützen die Zelle durch Konjugation toxischer Substanzen mit Glutathion. Die Glutathionkonjugate sind in der Regel weniger toxisch und besitzen eine bessere Wasserlöslichkeit als die ursprünglichen Substanzen, wodurch die Exkretion erleichtert wird. Allerdings entstehen im Verlauf des Detoxifizierungsprozesses auch reaktive Zwischenstufen, die toxisch wirken können. Endogene Substrate der GSTs sind verschiedene Produkte des oxidativen Stoffwechsels, aber auch verschiedene Arzneistoffe und Xenobiotika, wie organische Halogenide, Alkene, Epoxide und Benz(a)pyrene.

Die zytotoxischen Effekte der Bestrahlung werden unter anderem durch die Bildung von Hydroxyl- und reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species) vermittelt, welche in der Lage sind, Proteine und DNA zu schädigen. Da die GSTs vor oxidativem Stress schützen, könnte eine durch Polymorphismen verursachte Änderung ihrer Aktivität, zu einem höheren Risiko für strahleninduzierte Schäden führen.

Ambrosone et al. (2006) konnten bereits eine Assoziation zwischen dem Auftreten des Polymorphismus A105G im GSTP1-Gen und einem erhöhten Risiko für akute Normalgewebereaktionen nach Bestrahlung nachweisen. Für späte Reaktionen wie Fibrose und Teleangiektasien beobachteten Zschenker et al. (2010) sowie Kuptsova et al. (2008) eher einen protektiven Effekt.

2.8.4.3 SOD2

Superoxiddismutasen sind Metalloproteine, welche die Reaktion von Sauerstoffradikalen zu H₂O₂ und O₂ katalysieren und somit als Radikalfänger fungieren. Das SOD2-Gen codiert für die Mangan-Superoxiddismutase, welche in den Mitochondrien vorkommt und somit für Abwehr hochreaktiver Radikale von zentraler Bedeutung ist. In diesem Gen wurden mehrere Polymorphismen beschrieben. Der C47T-Polymorphismus wird zum Beispiel in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativen Stress, zellulären Alterungsprozessen, Herzerkrankungen und Arteriosklerose diskutiert. Darüber hinaus werden mit diesem Polymorphismus neurodegenerative Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und ein erhöhtes Krebsrisiko unter Schadstoffbelastung assoziiert.

Auch durch ionisierende Strahlung werden infolge einer Ionisation von Wasser reaktive Sauerstoffradikale (ROS) gebildet. Diese reagieren mit anderen Biomolekülen wie der DNA und schädigen diese. Durch die Wirkung der Superoxiddismutase 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].

In einem von Green et al. (2002) untersuchten Kollektiv von 41 Brustkrebspatientinnen konnte für den A9V-SNP im SOD2-Gen keine Assoziation mit dem Risiko von späten Nebenwirkungen nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Andreassen et al. (2003) konnten für den SNP C47T eine Assoziation mit einem erhöhten Fibrosiserisiko beobachten, jedoch war die Anzahl der Patientinnen mit homozygot-polymorphem Genotyp zu gering, so dass lediglich ein Vergleich von Patientinnen mit originaler und heterozygoter Allelfrequenz möglich war, wodurch die Aussage dieser Studie geschwächt wird. In weiteren Studien dieser Arbeitsgruppe 2005 und 2006 konnte der Einfluss dieses Polymorphismus nicht bestätigt werden. Auch hinsichtlich des C1183T Polymorphismus ist die Datenlage uneindeutig. Während Burri et al. (2008) den polymorphen Genotyps dieses SNPs mit einem erhöhten Fibrosiserisiko assoziieren konnten, war in einer Untersuchung von Kuptsova et al. (2008) das entsprechende Wildtyp-Allel

mit einem erhöhten Nebenwirkungsrisiko korreliert. Zschenker et al. (2010) konnten keinerlei Assoziation feststellen, sodass auch für diesen Polymorphismus keine Einschätzung bezüglich des Einflusses auf die klinische Strahlenempfindlichkeit möglich ist.

2.8.4.4 TGFB1

Der Wachstumsfaktor TGFB1 stellt ein wichtiges profibrogenes Zytokin dar. Seine Funktionen sind vielfältig und liegen in Bereichen der zellulären Differenzierung, Entwicklung, Immunmodulation, Wundheilung, Knochen- und Knorpelbildung, Fibroseentwicklung, Arteriosklerose, Angiogenese und Karzinogenese.

Für zahlreiche Zellen ist TGFB1 ein starker Wachstumsinhibitor, wobei er vom Zelltyp, den umgebenden Faktoren und der eigenen Konzentration abhängig ist. Zum Beispiel können hohe TGFB1-Konzentrationen die stimulierenden Wachstumseigenschaften vom Platelet Derived Growth Factor (PDGF) hemmen, niedrige hingegen eine proliferationsfördernde Wirkung erzielen.

Das humane TGFB1-Gen liegt auf Chromosom 19q13 [Fujii et al. 1986]. TGFB wird von den meisten Zellen als inaktives Zytokin in Form des sogenannten *latent TGFB-complex* sezerniert, der in dieser Form nicht in der Lage ist, an zelluläre Rezeptoren zu binden [Yingling et al. 1995]. Verantwortlich dafür ist die nichtkovalente Bindung des als Dimer sezernierten TGFB an das latency-associated protein (LAP) und die über Disulfidbrücken bestehende Bindung dieses Komplexes an das latent TGF- β binding protein (LTBP) [Miyazono et al. 1988]. Die aktive Form von TGFB erscheint als 25 kDa großes Homodimer, welches über Disulfidbrücken verbunden ist [Kanzaki et al. 1990, Nicola 1995], nachdem es von dem 75 kDa großen TGFB-LAP-Komplex dissoziiert ist [Wakefield et al. 1988]. Der Mechanismus dieser Aktivierung wird durch proteolytische Prozesse erklärt [Lyons und Moses 1990]. In Säugetierzellen lassen sich insgesamt drei von fünf Isoformen nachweisen: TGFB1, TGFB2 und TGFB3. Dabei interagiert freies TGFB an den Zelloberflächen mit zwei von drei vorhandenen Arten der TGFB-Rezeptoren Typ I, Typ II und Typ III. Freies TGFB bindet mit hoher Affinität an den TGFB Typ II-Rezeptor, der als transmembranäres Protein mit einer zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase-Domäne vorliegt. Zunächst geht der Typ II-Rezeptor eine Komplexbildung mit dem Typ I-Rezeptor ein [Wrana et al. 1992]. Diese Heteromerisierung ist notwendig, um die Signalkaskade intrazellulär fortzusetzen, die über sogenannte

SMAD-Proteine gewährleistet wird [Massagué 1998]. Dabei vermittelt TGFB1 seine Signale in den meisten Zellen über den TGFB-Rezeptor 1, welcher auch als ALK5 (activin-receptor-like-kinase 5) bezeichnet wird. In Endothelzellen bindet er zudem auch an den ALK1-Rezeptor (Abbildung 1). Anschließend werden Signalkaskaden über sogenannte Smad-Proteine aktiviert, von denen es zwei Klassen gibt. Über den ALK5-Rezeptor werden die Smad-Proteine 2 und 3 aktiviert, über ALK1 Smad 1 und 5. Die aktivierten Smad-Proteine bilden Komplexe mit Smad 4, diese wandern in den Zellkern und steuern dort die Genexpression diverser Gene [Mallet et al. 2006]. Das LAP ist ein Produkt der N-terminalen Region des TGFB1-Gens, wobei TGFB1 sowie LAP unabhängige Promotoren aufweisen, welche aber simultan transkribiert werden [Rifkin 2005].

Bisher sind acht Polymorphismen dieses Gens bekannt. Sieben davon wurden von Cambien et al. (1996) durch Single Strandet Conformational Polymorphisms (SSCP)-Analysen entdeckt. Drei von ihnen sind in der Promoterregion lokalisiert, darunter auch der SNP C509T, der in unserer Studie Betrachtung findet.

Viele Arbeiten konnten bisher eine Korrelation zwischen dem Auftreten dieses Polymorphismus und einem höheren Risiko für Fibroseentstehung nach Bestrahlung nachweisen [Quarmby et al. 2003, Andreassen et al. 2003/05, De Ruyck et al. 2006, Giotooulos et al. 2007, Zschenker et al. 2010].

Eine mögliche Erklärung hierfür bieten Anscher et al. (1990) sowie Barcellos-Hoff und Dix (1996). Kommt es aufgrund von ionisierender Strahlung zu einer DNA-Schädigung, bewirkt die dadurch ausgelöste Signaltransduktion eine Überexpression von Zytokinen, beziehungsweise eine verstärkte Aktivierung des TGFB1-Proteins. Diese Aktivierung führt zu einer Entzündung im Gewebe und zu einer vermehrten terminalen Differenzierung von Fibroblasten, die wiederum die Bildung einer Fibrose begünstigt. Gleichzeitig wird die epitheliale Reparatur durch TGFB1 inhibiert.

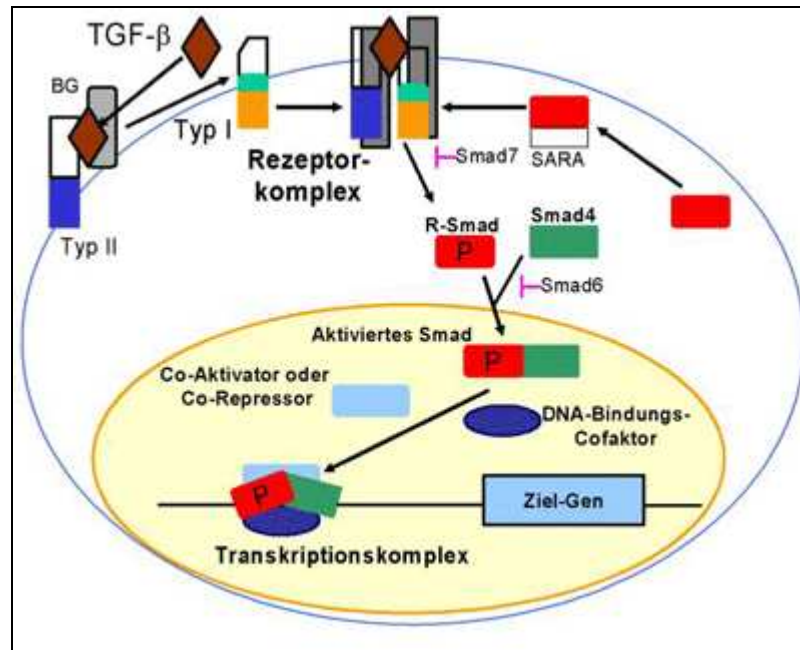


Abbildung 2.1: Zellulärer Signalweg von TGF β

TGF- β bindet an seinen membranständigen Typ-2-Rezeptor und ermöglicht dadurch die Anlagerung des Typ 1-Rezeptors. Dann aktiviert TGF- β die Kinasefunktion des Typ 2-Rezeptors mit nachfolgender Stimulation der Kinasefunktion des Typ 1-Rezeptors. Die so genannten Rezeptor-Smad-Proteine (Smad 2 und Smad 3) binden an den Rezeptorkomplex und werden durch den Typ 1-Rezeptor phosphoryliert. Das Smad-Ankerprotein SARA unterstützt die Anlagerung der R-Smads. Die phosphorylierten R-Smad-Proteine bilden einen Komplex mit dem kooperativen Smad 4. Dieser ist in der Lage, in den Zellkern einzudringen. Hier lagern sich die aktivierten R-Smads an DNA-Promotoren und/oder Transkriptionsfaktoren an und steuern Transkriptionsprozesse. Die inhibitorischen Smad-Proteine (Smad 6 und Smad 7) antagonisieren die Anlagerung der R-Smads an den Rezeptorkomplex oder an Smad 4.

(Quelle: http://www.dermotopics.de/german/ausgabe_1_02_d/images_1_02_d/TGF-2.gif)

2.8.4.5 XPD

Das XPD-Gen wurde erstmals im Zusammenhang mit der Erbkrankheit Xeroderma Pigmentosum beschrieben. Bei dieser Krankheit liegt eine autosomal-rezessive Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung vor [van Steeg und Kraemer 1999]. Die Betroffenen haben dabei ein besonders hohes Risiko (Faktor > 1.000) für die Entstehung von Hauttumoren, wie Basalzell-, Plattenepithelkarzinomen und malignen Melanomen [Mocellin et al. 2009].

Das XPD-Gen codiert für ein Protein, welches als ATP-abhängige 5'-3'-Helikase funktioniert und von zentraler Bedeutung für die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist [Egly et al. 2001].

Die NER wird bei helikalen Distorsionen der DNA aktiv und ist das DNA-Reparatursystem mit dem größten Läsionsspektrum [de Boer und Hoeijmakers 2000].

Neben der Bedeutung der NER bei DNA-Schäden, die zum Beispiel durch Benzpyrene, Aflatoxine und Cisplatin entstehen, ist das Reparatursystem für UV-Licht induzierte DNA-Fotoprodukte von größter Wichtigkeit [Lindahl und Wood 1999, Wood 1999, de Boer und Hoeijmakers 2000]. Darüber hinaus wird vermutet, dass die NER bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach Einwirkung ionisierender Strahlung beteiligt ist [Wood et al. 1993, Leadon et al. 1993].

Die NER ist ein Mehrschrittprozess mit über 20 beteiligten Proteinen [Wood et al. 2001]. Die XP-Proteine spielen dabei eine führende Rolle. Man unterscheidet folgende Schritte: Schadenserkennung, Demarkierung, Inzision, Heraustrennung, Lückenschluß und Ligation [de Boer und Hoeijmakers 2000]. Zunächst werden DNA-Schäden durch das XPC- und XPE- Protein detektiert und durch XPA verifiziert. Anschließend werden beide DNA-Stränge mittels der Helikaseaktivitäten der XPB- und XPD-Proteine voneinander getrennt. Danach erfolgt die Inzision zu beiden Seiten des DNA-Schadens durch die XPG- und XPF-Proteine mit Endonukleaseaktivität. Der den Schaden tragende DNA-Abschnitt wird herausgelöst und die entstandene Lücke durch Neusynthese aufgefüllt und ligiert [de Boer und Hoeijmakers 2000, Wood et al. 2001].

Des Weiteren ist das XPD-Protein an der Initiation der Transkription, der Aktivierung von bestimmten Stoffwechselschritten und der Einleitung der Apoptose durch Kooperation mit p53 beteiligt.

Mutationen im XPD-Gen manifestieren sich somit nicht immer als Vollbild der Erkrankung Xeroderma Pigmentosum, sondern können in Form von Syndromen wie der Trichothio Dystrophie oder dem Cockayne's Syndrom beim Menschen auftreten [Lehmann 2003].

Nur wenige Studien haben bisher die Beziehung zwischen Polymorphismen im XPD-Gen und der DNA-Reparaturkapazität untersucht. Zwei Polymorphismen werden in der Literatur beschrieben, die zu einem Aminosäuren-Austausch führen, in Codon 312 (Asparaginsäure→Asparagin) und in Codon 751 (Lysin→Glutamin) [Shen et al. 1998]. Die XPD-Variante Lysin751Glutamin wurde vermehrt in Kombination mit XRCC1 im Zusammenhang mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit diskutiert [Chang-Claude et al. 2005]. Isoliert betrachtet konnte jedoch in Hinblick auf eine Akutreaktion keine Assoziation gefunden werden. Parshad et al. (1993) konnten eine erhöhte Anzahl an Chromatidaberrationen in Lymphozyten mit einem mutierten XP-Protein nach ionisierender Strahlung beobachten, welches auf die Wichtigkeit der XPD-Proteine in der Reparatur von strahleninduzierten Schäden hinweist. In einer kleinen Studie mit Brust-

krebspatientinnen konnte ein protektiver Effekt des Polymorphismus beobachtet werden. Individuen, die homozygot für das Wildtyp-Allel waren, wiesen einen höheren Grad an Chromatidaberrationen auf, als solche mit einem polymorphen Allel [Lunn et al. 2000]. Die Chromatidaberrationen wurden dabei als Maß für die Strahlenempfindlichkeit gesehen [Borgmann et al. 2002]. In einer anderen Studie von Vodicka et al. (2004) wurde gezeigt, dass bei 337 gesunden Individuen, die den Polymorphismus aufwiesen, die Anzahl an Einzelstrangbrüchen nach Bestrahlung mit 5 Gy für 10 Minuten geringer war als bei den Wildtyp-Allel-Trägern.

2.8.4.6 XRCC1

Das Gen XRCC1 ist auf dem Chromosom 19q13.2 lokalisiert [Lamerdin et al. 1995] und ist von zentraler Bedeutung bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, welche häufig durch ionisierende Strahlung verursacht werden. XRCC1 codiert für ein multidomänes Gerüstprotein, welches eine wichtige Rolle in der Basenexzisionsreparatur (BER) einnimmt, indem es mit der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP, Detektion von DNA-Schäden), Ligase 3 (DNA-Ligation und Reparatur) und Pol β , PNK und APE (Endprozessing und Lückenfüllung) interagiert, diese zusammenführt und auch teilweise reguliert [Hoeijmakers 2001].

Polymorphismen in XRCC1 könnten demzufolge in einer fehlerhaften bzw. eingeschränkten BER resultieren. Drei häufige SNPs wurden bisher beschrieben, die jeweils zu einer Aminosäuren-Sequenzänderung führen: Arginin194Tryptophan, Arginin280Histidin und Arginin399Glutamin. Letzterer wird ebenfalls in dieser Studie untersucht. Ladiges et al. (2003) beschreiben ebenfalls einen SNP in Exon 10, der mit einer verminderten Basenexzisionsreparatur assoziiert ist.

Der in dieser Studie untersuchte Polymorphismus Arginin399Glutamin wurde bereits bezüglich der Nebenwirkungen nach Strahlentherapie untersucht. Chang-Claude et al. (2005) beschreiben eine nicht-signifikante, aber tendenziell protektive Wirkung der Arginin399Glutamin-Variante bei Patienten im Hinblick auf akute Nebenwirkungen. Auch Andreassen et al. (2003) definieren die Wildtypsequenz mit Arginin an Position 399 als Risikoallele, das besonders im homozygoten Zustand (Arg/Arg-Genotyp) für ein höheres Risiko, eine Fibrose zu entwickeln, steht. Für andere SNPs im XRCC1-Gen konnten Andreassen et al. (2006b) keine signifikanten Effekte beobachten. Eine Assoziation zwischen dem Polymorphismus Arginin399Glutamin und einem höheren Risiko für die Entwicklung einer adversen Reaktion in der Strahlentherapie bei Brustkrebspatientin-

nen konnten Thompsen und West (2000) finden. De Ruyck et al. (2005a) konnten hingegen in einer Studie mit 62 Patientinnen keine Assoziation zwischen Polymorphismus und Risiko für eine Spätreaktion feststellen.

2.8.5 Konfundierende Faktoren

Von besonderer Bedeutung bei der Interpretation von Ergebnissen zum Einfluss von genetischen Faktoren auf das klinische Ergebnis einer Therapie ist die Berücksichtigung so genannter konfundierender Faktoren (englisch: confounding factors), welche direkt oder indirekt den untersuchten Endpunkt zu beeinflussen vermögen. Zu den konfundierenden Faktoren zählen anerkanntermaßen Parameter der Behandlung, wie Gesamtdosis, Dosis pro Fraktion, Gesamtbehandlungszeit, Zielvolumen, Fraktionierung, Chemotherapie oder auch begleitende Erkrankungen, wie von Hölscher et al. (2006) für Bindegewebserkrankungen beschrieben wurde. Bezüglich der Akuttoxizität nach Bestrahlung der Brust werden, neben den oben genannten therapiebezogenen, als patientenbezogene konfundierende Faktoren der Lebensstil, Rauchgewohnheiten, Alter, Infektionen der OP-Wunde sowie das Brustvolumen [Fernando et al. 1996b] diskutiert. Besondere Bedeutung wird dabei dem Brustvolumen und dem Körpergewicht beigemessen. Generell korrelieren beide Parameter, da übergewichtige Frauen in der Regel auch größere Brustvolumina aufweisen. Zum einen kommt es bei diesen Patientinnen unterhalb der Brust, aufgrund der Topologie und Strahlungsanordnung, zu Inhomogenitäten der Dosisverteilung, da die überschüssige Haut im Bereich der Brustfalte einen Boluseffekt bewirkt. Die höhere Dosis belastet die Hautoberfläche [Harper et al. 2004], welches in einer Erhöhung der Hauttoxizität von übergewichtigen Strahlentherapiepatientinnen resultiert [Pollock et al. 1999]. Zum anderen ist Übergewicht und Fettsucht mit einer Erhöhung des systemischen oxidativen Stresses verbunden [Ahn et al. 2006]. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass Biomarker von oxidativen oder auch Entzündungsprozessen bei übergewichtigen Patienten erhöht sind [Davi et al. 2002, Keaney et al. 2003]. Darüber hinaus produzieren Fettzellen als Reaktion auf Lipopolysaccharide, Catecholamine oder intrazelluläre Triglyceride Cytokine, wie Interleukin und $\text{TNF}\alpha$, welche ihrerseits neutrophile und eosinophile Leukozyten zur Produktion von reaktiven oxygen species (ROS) anregen [Fenster et al. 2002].

Für das in der vorliegenden Studie untersuchte Patientinnenkollektiv konnte in einer vorangegangenen Studie ebenfalls das Brustvolumen als hochsignifikanter konfundierender Parameter des akuten Erythems identifiziert werden [Borgmann et al. 2008].

2.8.6 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Aus populationsgenetischen Überlegungen ist zu fordern, dass das Verhältnis von homozygoten und heterozygoten Individuen eines bestimmten Gens nicht zufällig, sondern einer als „Hardy-Weinberg-Gleichgewicht“ bezeichneten Verteilung folgt. Diese, aus der Populationsgenetik stammende Gesetzmäßigkeit, wurde nach ihren Beschreibern, dem Mathematiker G. H. Hardy und dem Arzt W. Weinberg benannt. Sie formulierten Anfang des 20. Jahrhunderts unabhängig voneinander auf Grundlage der Vererbungslehre, dass sowohl die Genotyp- als auch die Allelfrequenz eines Merkmales innerhalb einer „idealen“ Population, welche keinem genetischen Drift oder Selektionsdruck ausgesetzt ist, über die Generationen konstant bleibt.

Wenn ein Merkmal wie zum Beispiel die Blutgruppe, oder wie im vorliegenden Fall ein SNP, bei der Partnerwahl unbeachtet bleibt, wird dieses Merkmal in dem betreffenden Genpool gleichmäßig verteilt sein. Allein geographische Grenzen können bei der Verteilung ein Hindernis darstellen, sodass bei dem Vergleich von Allelfrequenzen die ethnische Zugehörigkeit der untersuchten Population berücksichtigt werden muss.

Betrachtet man die Allele eines Merkmalpaares „A“ und „a“, so sind diese in einer Population mit unterschiedlicher Häufigkeit vorhanden. Definitionsgemäß wird die Häufigkeit des Allels „A“ mit dem Wert p und die des Allels „a“ mit dem Wert q beschrieben. Da alle Individuen entweder das Allel „A“ oder „a“ besitzen ergibt sich für deren Verteilung in einer Population die Gleichung:

$$p + q = 1 \quad \text{(Gleichung 1)}$$

Da die Erbinformation diploid vorliegt, können die Allele in den Kombinationen „AA“, „Aa“ und „aa“ auftreten, wobei diese mit den Häufigkeiten p^2 , $2pq$ bzw. q^2 in einem Kollektiv vertreten sind. Zur Veranschaulichung dieses Sachverhaltes sei ein Beispiel angeführt, bei dem in einer Population das Allel „A“ mit 70 % und das Allel „a“ mit 30 % vertreten ist. Die Häufigkeiten der möglichen Genotypen sind in Form eines Kombinationsquadrates in Abbildung Y dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit des Genotypes „AA“ (gelb) entspricht der Wahrscheinlichkeit der Kombination des Allels „A“ vom Vater mit dem Allel „A“ der Mutter, in diesem Falle:

$$p^2 = A^2 = 0.7 \times 0.7 = 0.49 \quad \text{(Gleichung 2)}$$

Analog dazu ergibt sich für den Genotyp aa (weiß) die Wahrscheinlichkeit:

$$q^2 = a^2 = 0.3 \times 0.3 = 0.09 \quad \text{(Gleichung 3)}$$

Der Genotyp „Aa“ (grün) kommt immer dann zustande, wenn die Allele „A“ und „a“ kombiniert werden, wobei diese jeweils vom Vater oder der Mutter stammen können, sodass bei gleichem Genotyp die Kombination „aA“ und „Aa“ vorliegen kann, mit der Wahrscheinlichkeit:

$$2pq = (A \times a) + (a \times A) = (0.9 \times 0.3) + (0.3 \times 0.9) = 0.42 \quad \text{(Gleichung 4)}$$

Allgemein lässt sich die Gesamthäufigkeit P der einzelnen Genotypen durch folgende Gleichung beschreiben:

$$P = p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad \text{(Gleichung 5)}$$

		Genpool (weiblicher Anteil)										
		P						q				
		A	A	A	A	A	A	A	a	a	a	
Genpool (männlicher Anteil)	p	A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
		A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
		A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
		A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
		A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
		A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
		A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	Aa	Aa	Aa
q	a	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aa	aa	aa	
	a	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aa	aa	aa	
	a	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aa	aa	aa	

Abbildung 2.2: Darstellung der Häufigkeiten der Genotypen „AA“, „Aa“ und „aa“ im Kombinationsquadrat

Die Häufigkeiten für die Allele „A“ (Pp) bzw. Allel „a“ (Pq) in einer Gesamtpopulation berechnen sich aus Gleichung 5:

$$P_p = p^2 + (pq)/2 \quad \text{(Gleichung 6)}$$

$$P_q = q^2 + (pq)/2 \quad \text{(Gleichung 7)}$$

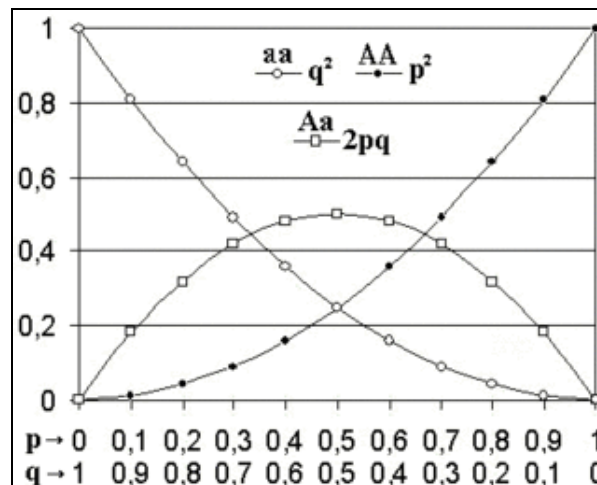


Abbildung 2.3: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für zwei Allele: die horizontale Achse zeigt die beiden Allelfrequenzen p und q, die vertikale Achse zeigt die Genotypfrequenzen. Die drei möglichen Genotypen sind durch unterschiedliche Zeichen dargestellt

(Quelle: www.wikipedia.de)

Bei einer Allelhäufigkeit von 70 % für das Allel „A“ ($P_p=0.7$) und 30 % für das Allel „a“ ($P_q=0.3$) ergibt sich, wie oben dargestellt, rechnerisch eine ideale Verteilung von: „AA“ = 0.49, „Aa“ = 0.42 und „aa“ = 0.09. Eine Verringerung der Allelfrequenz P_p auf 0.3 ist mit einer Erhöhung der Allelfrequenz P_q auf 0.7 verbunden. Infolge dessen verändern sich die Genotypfrequenzen dahingehend, dass „aa“ mit 0.09 seltener, dafür aber „AA“ mit 0.49 häufiger wird. Dieser Zusammenhang lässt sich graphisch veranschaulichen und ist in Abbildung 2.3 dargestellt, in der die Häufigkeiten der verschiedenen Genotypfrequenzen „AA“, „Aa“ und „aa“ für die möglichen Allelfrequenzen aufgezeichnet sind. Die Darstellung verdeutlicht, dass eine Zunahme im Allel „A“ zwangsläufig zu einer Zunahme des Genotypes „AA“ und einer Abnahme des Genotypes „aa“ führt. Der heterozygote Genotyp „Aa“ nimmt zunächst mit der Zunahme eines Allels zu. Liegen aber beide Allele mit einer Häufigkeit von 50 % vor, ist keine weitere Zunahme des heterozygoten Genotypes möglich, da die Zunahme der Häufigkeit des Allels „A“ zwangsläufig die Abnahme der Häufigkeit des Allels „a“ verbunden ist. Diese Gesetzmäßigkeit des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts führt zu der zwingenden Schlussfolgerung, dass in einer Population der Anteil der heterozygoten Individuen nicht mehr als 50 % betragen kann. Die beiden wesentlichen Forderungen, die sich durch die Anwendung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts auf die Genotypfrequenzen-Verteilungen untersuchter Populationen ergeben, sind:

- Der Anteil der heterozygoten Individuen darf nicht mehr als 50 % betragen.
- Die Genotypen „AA“, „Aa“ und „Aa“ müssen nach Gleichung 5 in dem Verhältnis $A^2: 2Aa: a^2$ verteilt sein.

Während der Anteil der heterozygoten Individuen direkt bestimmt wird, muss die zweite Forderung mit Hilfe geeigneter statistischer Methoden überprüft werden. Dabei lässt sich der sogenannte Chi-Quadrat (χ^2)-Test anwenden, da ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der (χ^2)-Verteilung entspricht. Wie in der Statistik üblich, wird dabei die sogenannte Nullhypothese entweder verworfen oder angenommen. Die Nullhypothese ist die in diesem Fall zugrundeliegende Annahme, dass ein Merkmal der Chi-Quadrat-Verteilung bzw. der Hardy-Weinberg-Verteilung entspricht. Ob ein signifikanter Unterschied zwischen dem erwarteten und beobachteten Wert besteht und wie groß dieser ist, wird mit Hilfe des p-Wertes angegeben. Es besteht ein signifikanter Befund gegen die Nullhypothese, wenn p kleiner als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau ist. Üblicherweise wird ein Signifikanzniveau von 0.05 festgelegt, was bedeutet, dass mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ein tatsächlicher Unterschied zwischen dem gemessenen und erwarteten Wert besteht. Zu berücksichtigen ist, dass solche Tests generell nur für einen getesteten Parameter gelten. Werden mehrere Parameter getestet, so muss berücksichtigt werden, dass ein Signifikanzniveau von 5 % bedeutet, dass in einem von zwanzig Fällen ein zufälliger Befund als statistisch signifikanter Unterschied fehlinterpretiert wird. Um dieses zu vermeiden, muss in solchen Fällen nach Bonferoni das Signifikanzniveau der Anzahl getesteter Parameter angepasst werden [Holm 1979].

Ein p-Wert von 1.0 bedeutet, dass die Werte optimal dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen, während ein Wert von kleiner 0.05 darauf verweist, dass die Genotypverteilung nicht dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entspricht. Es wird generell empfohlen, Genotypisierungsdaten auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu überprüfen, da dies als Qualitätskontrolle der Genotypisierungsmethode verwendet werden kann [Balding 2006]. Eine Abweichung von dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht kann aber auch biologische Ursachen haben, wie Inzucht, Stratifizierung oder Selektion der untersuchten Population. Darüber hinaus kann es ein Ausdruck eines krankheitsassoziierten Zusammenhangs sein [Wittke-Thompson et al. 2005].

3. Material und Methoden

3.1 Beschreibung des Patientinnenkollektivs

Die Studie wurde mit 83 Mammakarzinom-Patientinnen durchgeführt, welche nach vorausgegangener Chirurgie eine protokollierte Radiotherapie ohne adjuvante Chemotherapie erhielten. Die akuten Nebenwirkungen des Normalgewebes wurden therapiebegleitend bestimmt. Es wurden nur Patientinnen in die Studie einbezogen, die eine Gesamtdosis von 60.4 Gy erhielten. Weitere Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie waren ein Mindestalter von 18 Jahren, ein kuratives Therapieziel, und es musste die erste Radiotherapie der Patientin sein.

Nach Zustimmung der Berliner Ethikkommission und eingeholtem Einverständnis der Patientinnen wurde von Dezember 2002 bis Dezember 2005 bei jeder Patientin vor der Strahlentherapie, am Simulationstermin, eine periphere venöse Blutentnahme durchgeführt und die Blutproben zur Erstellung von DNA-Isolaten sowie Lymphozytenpräparationen verwendet

3.1.1 Therapie

Je nach Lokalisation des Tumors wurde entweder die rechte oder die linke Brust bestrahlt. Bei einigen Patientinnen erfolgte die Bestrahlung bilateral. Sie wurde standardisiert durchgeführt. Zur Schonung von gesundem Gewebe wurde eine 3D CT-gestützte Radiotherapie durchgeführt und die Brust zur Homogenisierung der Dosis mit Tangentialfeldern und Keilfiltern behandelt. Die Zieldosis lag bei 50.4 Gy. Sie wurde fraktioniert gegeben. Jede Patientin erhielt insgesamt 28 Fraktionen mit je 1.8 Gy/Fraktion innerhalb eines Zeitraums von durchschnittlich 42 Tagen. Nur 6 Patientinnen wurden mit einer Strahlentherapie von 25 Fraktionen mit je 2 Gy/Fraktion behandelt. Dabei betrug die Zieldosis 50 Gy. 58 Patientinnen (67 %) erhielten einen Boost von insgesamt 10 Gy. Dieses wurde in 5 Fraktionen à 2 Gy verabreicht. Drei Patientinnen (3 %) erhielten in 5 Fraktionen à 1.8 Gy/ Fraktion einen Boost von insgesamt 9 Gy. 26 Patientinnen (30 %) erhielten keinen Boost.

Eine adjuvante Hormontherapie bekamen insgesamt 75 Patientinnen. Diese fand bei 71 Patientinnen in Form einer Einzelmedikation (Tamoxifen, Anastrozol oder Exemestan), bei 4 Patientinnen als Kombinationstherapie (Tamoxifen + GnRH-Analagon

oder Anastrozol + GnRH-Analogon) statt. Sie wurde entweder simultan zur Bestrahlung oder danach durchgeführt. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei 61 Jahren.

Tabelle 3.1: Charakteristika der Brustkrebspatientinnen

	Anteil der Brustkrebspatientinnen (%)				
	Gesamt	RTOG0	RTOG1	RTOG2	RTOG3
Histologie^a					
inv.dukt. ^{a1}	65 (75)	1(2)	28 (43)	31 (48)	5 (8)
inv.lob. ^{a2}	8 (9)	0 (0)	5 (63)	3 (37)	0 (0)
d cis ^{a3}	4 (5)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0 (0)
muz. ^{a4}	4 (5)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	0 (0)
sonst. ^{a5}	6 (7)	0(0)	4 (67)	2 (33)	0 (0)
T-Klass.^b					
Cis ^{b1}	4 (5)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0 (0)
T1 ^{b2}	45 (52)	1 (2)	21 (47)	19 (42)	4 (9)
T1c ^{b3}	21 (24)	0 (0)	9 (43)	11 (52)	1 (5)
T2 ^{b4}	17 (20)	0 (0)	8 (47)	9 (53)	0 (0)
N-Klass.^c					
N0 ^{c1}	73 (84)	1 (1)	33 (45)	34 (47)	5 (7)
N1 ^{c2}	8 (9)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	0 (0)
Keine Axilla-OP ^{c3}	6 (7)	0 (0)	3 (50)	3 (50)	0 (0)
Bestrahlung^d					
Dosis/Fraktion ^{d1}					
2 Gy	6 (7)	0 (0)	2 (33)	4 (67)	0 (0)
1.8 Gy	81 (93)	1 (1)	38 (47)	37 (46)	5 (6)
ED Boost ^{d2}					
2Gy	58 (67)	1 (2)	32 (55)	22 (38)	3 (5)
1.8Gy	3 (3)	0 (0)	1 (33)	2 (67)	0 (0)
Kein Boost ^{d3}	26 (30)	0 (0)	8 (31)	16 (62)	2 (7)
Hormontherapie^e					
Keine	12 (14)	1 (8)	6 (50)	5 (42)	0 (0)
Tamoxifen	64 (74)	0 (0)	33 (52)	28 (44)	3 (5)
Anastrozol	6 (7)	0 (0)	2 (33)	3 (50)	1 (17)
Exemestan	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Komb. ^{e1}	4 (5)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	1 (25)

^a Histologie: ^{a1} invasives duktales Karzinom, ^{a2} invasives lobuläres Karzinom, ^{a3} duktales Carcinoma in situ, ^{a4} muzinöses Karzinom (Gallertkarzinom), ^{a5} sonstige Karzinome (papilläres, adenoid-zystisches, medulläres oder tubuläres Karzinom)

^b T-Klassifikation: ^{b1} Carcinoma in situ, ^{b2} Tumor < 1 cm, ^{b3} Tumor 1-2 cm, ^{b4} Tumor 2-5 cm

^c N-Klassifikation: ^{c1} kein Lymphknotenbefall, ^{c2} befallene, bewegliche homolaterale axilläre Lymphknoten, ^{c3} Lymphknoten-Status unbekannt

^d Bestrahlung: ^{d1} 25 Fraktionen mit 2 Gy/Fraktion bzw. 28 Fraktionen mit 1.8 Gy/Fraktion (ICRU50),

^{d2} Einzeldosis Boost, ^{d3} es fand keine zusätzliche Bestrahlung statt.

3.1.2 Beurteilung der Normalgewebereaktion

Die Beurteilung der akuten Normalgewebereaktion nach der Radiotherapie wurde bei allen Patientinnen von vier verschiedenen Ärzten durchgeführt und erfolgte mittels der RTOG-Skala (siehe Kapitel 2.6.1). Es wurde die Entstehung von Erythemen und Pigmentationsveränderungen der gesamten Brust nach Applikation von 50 Gy, vor Gabe des Boosts untersucht. Dabei wurden folgende vier Kategorien unterschieden: Grad 0 bedeutet, dass die Patientinnen keinerlei Haut- oder Pigmentationsveränderungen aufwiesen. Patientinnen mit Grad 1 bzw. Grad 2 zeigten dagegen leichte bzw. mittelschwere Normalgewebereaktionen, während Patientinnen, die nach der Strahlentherapie ein schweres Erythem entwickelten mit Grad 3 gekennzeichnet wurden. Lokale Hautveränderungen bei 50 Gy, zum Beispiel im Bereich der Umschlagsfalten, wurden separat untersucht.

3.2 Genotypisierung mittels PCR-RFLP-Methode

Bei dieser Methode wird mit Hilfe des sogenannten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus sowohl das Vorliegen eines SNPs als auch der individuelle Genotyp bestimmt. Dazu wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mittels PCR vervielfältigt und mit geeigneten Restriktionsendonukleasen inkubiert. Während des Restriktionsverdau wird das PCR-Fragment enzymatisch aufgespalten, wobei je nach Restriktionsenzym entweder die originale- oder die polymorphe Sequenz als Erkennungssequenz gilt.

Zur Untersuchung von SNPs ist die RFLP eine ideale Methode, da ein SNP eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym schaffen oder entfernen kann. Das Ergebnis wird durch elektrophoretische Auftrennung des Ansatzes dargestellt.

Als Beispiel ist das Ergebnis für das TGFB1-Gen in Abbildung 3.1 gezeigt. Das spezifische Restriktionsenzym BSU36I schneidet die 419 bp große Originalsequenz in zwei Fragmente der Größe 229 bp und 190 bp. Nach elektrophoretischer Auftrennung sind auf dem Gel zwei Banden zu sehen. Ein SNP in diesem Bereich entfernt die Schnittstelle, so dass bei Vorliegen des SNPs auch nach Verdau nur eine Bande vorhanden ist. Ist der SNP auf nur einem der zwei Allele vorhanden, wird ein Teil des PCR-Fragments geschnitten, der andere nicht, so dass drei Banden erscheinen.

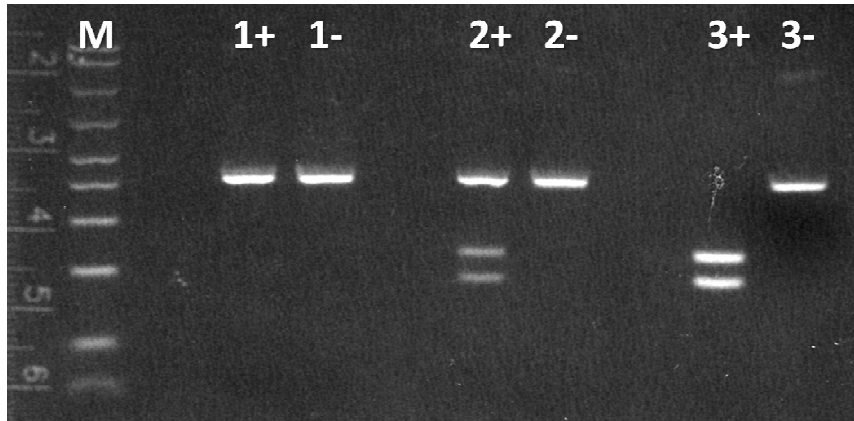


Abbildung 3.1: Dargestellt sind die Ergebnisse der Genotypisierung für drei Patientinnen im TGFB1-Gen

M = Kontrollmarker, + = Probe nach Verdau mit Restriktionsenzym, - = Kontrolle ohne Verdau. Pat. Nr.1: homozygot SNP, Pat. Nr.2: heterozygot, Pat. Nr.3: homozygot Wildtyp

3.2.1 Beschreibung der verwendeten Techniken

3.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird eingesetzt, um einen definierten Abschnitt eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Die PCR benötigt mehrere grundlegende Komponenten: die Ursprungs-DNA, die das zu vervielfältigende DNA-Fragment enthält; zwei Oligonukleotide (Primer), die komplementär zur Start- und Endsequenz sind und Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Fragments festlegen, eine hitzebeständige DNA-Taq-Polymerase sowie Nucleotide, welche die vier verschiedenen Basen für den von der Polymerase synthetisierten DNA-Strang zur Verfügung stellen.

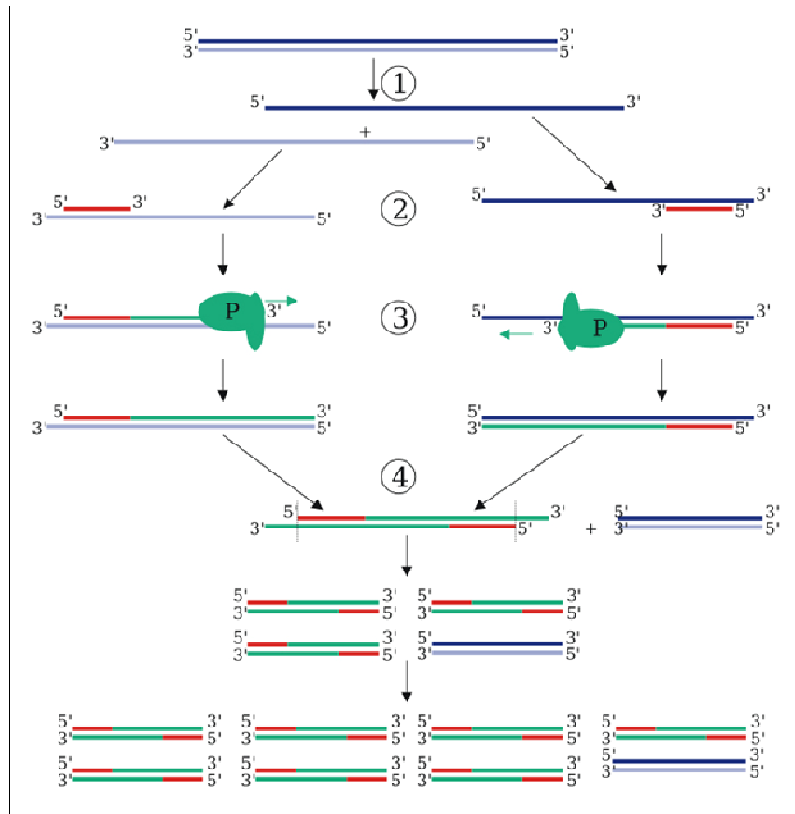


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Ketten-Reaktion

Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von 20 bis 35 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. Bei der Denaturierung wird die DNA erhitzt, so dass sich die beiden DNA Stränge voneinander trennen (siehe Abbildung 3.2 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. Beim "Annealing" wird die Temperatur gesenkt (meist etwa 25 °C unter der Denaturierungstemperatur), um den Primern die Möglichkeit zu geben, mit der DNA zu hybridisieren (siehe Abbildung 3.1 PCR Schritt 2). Die "Annealing"-Temperatur richtet sich nach den verwendeten Primern. 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 Abbildung 3.1 PCR Schritt 3) die fehlenden Stränge mit Nucleotiden auf. Sie beginnt am angelagerten Primer 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 Abbildung 3.1 PCR Schritt 4) ist die DNA-Menge verdoppelt worden.

3.2.1.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode der Molekularbiologie zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Dabei wandert eine Mischung der zu trennenden DNA-Fragmente unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel. Die negativ geladene DNA wandert in Richtung der Anode, wobei sich die DNA-Bruchstücke in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel bewegen.

Um die aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, wird dem Gel ein DNA-Farbstoff zugegeben, welcher mit der DNA reagiert, wodurch sich das Anregungsspektrum verändert. Unter UV-Beleuchtung stellt sich die DNA dadurch als kompakte fluoreszierende Bande dar, die sich fotografisch dokumentieren lässt.

Durch zeitgleiches Mitlaufen geeigneter Marker, welche DNA-Fragmente definierter Größe beinhalten, kann die Größe der entstandenen DNA-Fragmente durch direkten Vergleich der Kontrollbanden bestimmt werden.

3.2.1.3 Aufreinigung des PCR-Produktes

Nach Ablauf der PCR-Reaktion enthält der experimentelle Ansatz neben dem amplifizierten Genabschnitt noch unverbrauchte dNTPs, Primerreste sowie einzelsträngige DNA, die im Rahmen der Reaktion entstanden ist. Damit diese Komponenten den weiteren Verlauf des Verfahrens nicht stören, ist es notwendig das PCR-Produkt aufzureinigen und nur das spezifische PCR-Produkt weiterzuführen. Für die Aufreinigung des PCR-Produktes stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Im Labor etabliert war zunächst die Methode der DNA-Elution aus Gelbanden mittels des QIAEX II (150) Gel Extraction Kit (Fa. QIAGEN). Dabei wird zunächst das PCR-Produkt in einem Agarose-Gel aufgetrennt, unter Sicht auf einem UV-Tisch die Gelbande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Alternativ zu diesem Verfahren stehen enzymatische Aufreinigerungsverfahren zur Verfügung, bei denen mit Hilfe von speziellen Exonukleasen und Phosphatasen einzelsträngige DNA sowie verbliebene Nukleotide enzymatisch abgebaut werden. Beide Verfahren wurden angewendet und verglichen (siehe Kapitel 4.1.1).

3.2.1.4 Restriktionsverdau

Durch Restriktionsendonukleasen lässt sich ein Genom an spezifischen Stellen zerschneiden und so in DNA-Fragmente zerlegen. Restriktionsendonukleasen stammen ursprünglich aus Bakterien, die in der Lage sind, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und die DNA-Helix an dieser Stelle zu schneiden. Sie nutzen diese Nukleasen zum Abbau fremder DNA, während sie ihre eigene DNA an den Angriffspunkten durch Methylierung schützen. Die Schnittstellen dieser Restriktionsenzyme bestehen aus 4 - 8 Basenpaaren, die zentralsymmetrisch aufgebaut sind und als Palindrome bezeichnet werden. Ein Restriktionsenzym kann nur an eine definierte Basensequenz binden und diese einschneiden. Diese hohe Spezifität der Restriktionsenzyme wird bei der Methode „Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus“ (RFLP) genutzt, indem durch Wahl des geeigneten Restriktionsenzymen entweder nur die Wildtyp- oder die polymorphe Sequenz des zu untersuchenden SNPs geschnitten wird.

Experimentell wird dabei so vorgegangen, dass in einer Doppelbestimmung eine Probe mit dem entsprechenden Restriktionsenzym versetzt wird, während die Kontrolle kein Enzym enthält. Nach Inkubation von mehreren Stunden werden die Proben in ein Agarose-Gel pipettiert, und nach elektrophoretischer Auftrennung die Verdauprodukte sichtbar gemacht. Während die enzymhaltige Probe, je nach Genotyp ein, zwei oder drei DNA-Banden zeigt, dient die enzymfreie Kontrolle der Überprüfung der Spezifität der Reaktion.

3.3 Genotypisierung mittels MALDI-TOF

Das Verfahren **MALDI-TOF** (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation- **T**ime **O**f **F**light) dient zur Massenanalyse von chemischen Verbindungen. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Moleküle zunächst in eine Matrix (meist ein Benzoesäurederivat) eingebettet. Durch Laserbeschuss verdampft die Matrix explosionsartig und die zu untersuchenden Moleküle werden mitgerissen und ionisiert. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Ihre Flugzeit ist dabei von ihrer Masse und Ladungszahl abhängig und wird als Time-Of-Flight (TOF) von einem Massenspektrometer ausgewertet.

Der Vorteil dieser Messmethode ist die schnelle Analyse eines vergleichsweise großen Massenbereichs.

3.4 Experimentelles Vorgehen bei der Untersuchung der einzelnen Gene

Die SNPs in den Genen ATM (G5557A) und XPD (G751T) wurden mittels MALDI-TOF untersucht. Die PCR-RFLP-Methode konnte in diesen Fällen nicht angewendet werden, da die genetische Nachbarschaft dieser SNPs für diese Methode ungünstig ist.

Der Genotyp für die anderen SNPs der Untersuchung wurde mit der PCR-RFLP-Methode bestimmt. Die DNA der Patientinnen war bereits isoliert und wurde bei -20°C gelagert. Die Proben wurden zunächst aufgetaut und die benötigten DNA-Sequenzen mittels PCR durch ein für jedes Gen spezifisches Temperaturprofil vervielfältigt. Die PCR-Methode für GSTP1 musste zunächst etabliert werden, die PCR-Bedingungen für XRCC1 und SOD2 wurden optimiert. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (6 µl Ethidiumbromid auf 100 ml Agarosegel) auf die Bandengröße kontrolliert. Die Elektrophorese wurde fünf Minuten bei 90 V und weitere 90 Minuten bei 120 V durchgeführt. Für die Gene GSTP1 und TGFB1 erfolgte die Kontrolle nur bei den ersten zwanzig Proben. Da die Ergebnisse zuverlässig waren, konnte im weiteren Verlauf auf diese Kontrolle verzichtet werden. Für die Gene XRCC1 und SOD2 erfolgte die Kontrolle kontinuierlich, da die PCR-Programme optimiert wurden und die Sicherheit der Methode überprüft und dokumentiert werden sollte. Anschließend wurden die PCR-Proben aufgereinigt, so dass letztendlich die gewünschte DNA-Sequenz vorlag. Für TGFB1 verwendeten wir dabei zunächst das QUIAEX II (150) Gel Extraction Kit (Fa. QIAGEN). Die Ergebnisse waren mit dieser Methode häufig uneindeutig, sodass die Aufreinigung mit Exo-SAP IT (Fa. USB Corporation Cleveland, Ohio USA) nach erfolgreicher Testung im weiteren Verlauf bevorzugt wurde. Die bis dato untersuchten Proben wurden mit dieser Methode ein weiteres Mal untersucht. Dabei wurden zu je fünf µl PCR-Produkt zwei µl Exo Sap-IT gegeben. Anschließend erfolgte bei 37°C über 15 Minuten die Aufreinigung, durch weitere 15 Minuten bei 80°C wurde die Reaktion gestoppt. Nach Auskühlen der Proben wurden diese mit je einem spezifischen Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers inkubiert. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese zur Darstellung der Verdauungsprodukte in einem 2 %igen Agarosegel mit Gelstar (6 µl Gelstar auf 100 ml Agarosegel), fünf Minuten bei 90 V und weitere 90 Minuten bei 120 V. Die Ergebnisse wurden eruiert und dokumentiert. Die Details des experimentellen Vorgehens sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

	GSTP1		SOD2			TGFB1			XRCC1		
PCR	95°C 5 min		94°C 5min			95°C 2 min			94°C 5 min		
	95°C 30 sec		94°C 30 sec			95°C 45 sec			94°C 30 sec		
	60°C 30 sec	35 Zyklen	57°C 30 sec	40 Zyklen		60°C 45 sec	35 Zyklen		65°C 60 sec		34 Zyklen
	72°C 30 sec		72°C 30 sec			72°C 45 sec			72°C 60 sec		
	72°C 5 mit		72°C 5min						72°C 5 min		
PCR-Produkt	176 bp		246 bp			419 bp			615 bp		
Gelelektrophorese zur Darstellung des PCR-	nein			ja			nein			ja	
ExoSAP-IT	10 µl + 25 µl PCR-Produkt			6 µl + 15 µl PCR-Produkt			10 µl + 25 µl PCR-Produkt			6 µl + 15 µl PCR-Produkt	
Restriktionsenzym (RE)	BsmA I	schneidet SNP	BsaWI	schneidet SNP		BSU36I	schneidet Wildtyp		MSP1	schneidet Wildtyp	
Verdauansatz	µl			µl			µl			µl	
PCR-Produkt	15			10			16			10	
10x BSA	0			2			2,5			0	
NEB3 Puffer	2,5	3 h bei 56°C	NEB2 Puffer	2	24h bei 60°C	NEB3 Puffer	2,5	24h bei 37°C	NEB2 Puffer	2	24h bei 37°C
RE	0,3 µl (1.5 U)			0,5			1 µl (10 U)			2 µl	
dest	ad 25 µl			ad 20 µl			ad 25 µl			ad 20 µl	
Verdauprodukte(bp)											
WT	176			246			190, 229			376, 239	
he	176, 91, 85			246, 164, 82			190, 229, 419			615, 376, 239	
hoSNP	91, 85			164, 82			419			615	

Tabelle 3.2: Protokolle für die RFLP-Untersuchung der Polymorphismen in den Genen GSTP1, SOD2, TGFB1 und XRCC1

3.5 Statistische Verfahren

Mit Ausnahme der Bestimmung der „relative excess heterozygosity“ wurden alle statistischen Berechnungen mit Hilfe der Software graphpad prism 4.0 durchgeführt. Die Bestimmung der „relative excess heterozygosity“ erfolgte freundlicherweise durch Frau Dipl. Inform. Silke Szymczak (Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, Universität Lübeck) mittels eines zu diesem Zweck erstellten Softwareprogramms.

3.6 Geräte

- Thermomix 1480 (Wasserbad), Firma Braun, Kronberg Deutschland
- Zentrifuge 5810R, Firma Eppendorf, Hamburg Deutschland
- Vortexer VF2, Firma Janke & Kunkel IKA[®]-Labortechnik, Staufen Deutschland
- Spectrophotometer UVIKON, Firma Kontron Instruments, Mailand Italien
- Thermocycler Robo Cycler[®] 40 Accessories, Firma Stratagene °San Diego USA
- Micromat (Mikrowelle), Firma AEG, Nürnberg Deutschland
- SUB-CELL (Elektrophoresekammer, Gelschlitten, Gelkamm), Firma BIO RAD Los Angeles USA
- Micro Computer Elektrophorese Power Supply E452, Firma Consort, Turnhout Belgien
- CCD-Kamera RS 1, Firma Kaiser, Buchen Deutschland
- Waage AE 160, Firma Mettler, Giessen Deutschland
- Magnetrührer mit Fisch RET, Firma Janke & Kunkel IKA[®]-Labortechnik, Staufen Deutschland
- Hybridisierungsöfen Biometra OV2 Brutschrank, Firma Janke & Kunkel, Staufen Deutschland
- Mini-Transiluminator, Firma BIO RAD, Los Angeles USA
- Polaroid MP 4+Mode1144-16, Firma KEMA KEUR, Arnhem Niederland
- Transiluminator, Firma Fröbel Labortechnik, Lindau Deutschland

3.7 Puffer und Lösungen

- Nucleo Spin Blood XL-Kit, Firma Macherey - Nagel (BE Puffer, Proteinkinase K, BQ1, BQ2, Ethanol, TE Puffer)
- SOD2 Primer, Firma Biotech
- TGFB1 Primer, Firma Biotech
- Destilliertes Wasser (steril filtriert)
- Ethidiumbromid (Ethidiumbromid Lösung, 10mg/ml), Firma SIGMA
- TBE Puffer (1%): 68g TBE Puffer (Tris Borate - EDTA Buffer For Gel Electrophoresis) Firma SIGMA
- Agarose Gel (2%): 2g Agarose (High Strength Analytical Grade Agarose Firma BIO RAD) wird 100ml (1%) TBE Puffer vermengt, in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlung mit 5g Ethidiumbromid versetzt.
- Loading Buffer (Nuclei Acid Sample Loading Buffer 5*), Firma: BIO RAD

- Ladder (AmpliSize™ Molecular Ruler 50 - 2000bp Ladder), Firma: BIO RAD
- QIAEX II (150) Gel Extraction Kit, Firma: QIAGEN
- BsaWI, NEB3, BSA, Firma MWG - Biotech AG BsaWI : 1,5 Units auf 3g aufgereinigtes Wasser, NEB3 2,5g, BSW 2,5g
- ExoSAP-IT der Firma USB Corporation Cleveland, Ohio USA
- Bsu361, NEB3, BSA (Firma: MWG - Biotech AG) Bsu361: 1,5 Units aufgereinigtes Wasser, NEB3 2,5g, BSW 2,5g

4. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit die Polymorphismen in den Genen ATM (G1853A), GSTP1 (A105G), SOD2 (C1183T), TGFB1 (C509T), XPD (G751T) und XRCC1 (G399A) mit dem Risiko eines schweren Erythems nach Strahlentherapie assoziiert sind, mit dem Ziel mögliche Risikoallele der akuten Normalgewebereaktion zu identifizieren.

In Voruntersuchungen wurden zunächst die Methoden der Genotypisierung optimiert, und diese dann zur individuellen Bestimmung des Genotyps der untersuchten Polymorphismen eingesetzt.

4.1 Optimierung der Methoden

4.1.1 Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Aufreinigung des PCR-Produktes mittels des QIAEX II (150) Gel Extraktion Kit, Firma QIAGEN war bereits im Labor etabliert, führte aber zu DNA-Verlusten, wodurch die Signale im Gel oft zu schwach für eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse waren.

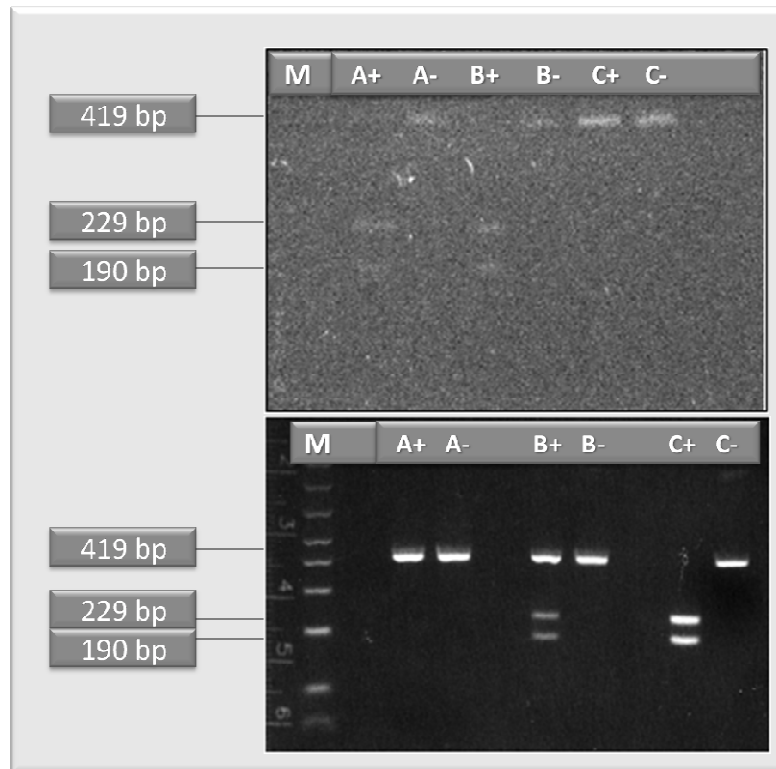


Abbildung 4.1: Darstellung der Restriktionsverdau-Produkte nach DNA-Elution mittels QIAEX (oben) und enzymatischer Aufreinigung mittels ExoSAP-IT (unten) für je drei Patienten (A, B, C) und den SNP C509T im TGFB1-Gen
 + = Verdau, - = Kontrolle, M = Marker

Als Alternative wurde ein enzymatisches Aufreinigungsverfahren getestet, bei dem mit Hilfe von speziellen Exonukleasen und Phosphatasen einzelsträngige DNA sowie verbliebene Nukleotide enzymatisch abgebaut werden.

Für die neue Methode wurde das Produkt ExoSAP-IT der Firma USB Corporation, Cleveland, Ohio USA verwendet. Es beinhaltet zwei hydrolytische Enzyme: Exonuclease I und Shrimp Alkaline Phosphatase in einem speziellen Buffer. Exonuclease I entfernt ungenutzte einzelsträngige Primer und einzelsträngige DNA-Reste. Shrimp Alkaline Phosphatase entfernt die übrigen dNTPs aus dem PCR-Ansatz.

Die Anwendung von ExoSAP-IT führte zu erheblich deutlicheren Signalen und somit zu eindeutigen Ergebnissen. Die bis dato häufig notwendigen Doppelbestimmungen entfielen, was insgesamt zu einer deutlichen Reduzierung des experimentellen Aufwands führte.

Ein Vergleich zweier typischer Gele zur Darstellung der Verdauungsprodukte nach Elution mittels QIAEX beziehungsweise nach Aufreinigung mittels ExoSAP-IT ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Während oben das Ergebnis der Genotypisierung dreier Proben des Gens TGFB1 nach Elution mit QIAEX dargestellt ist, sieht man unten das Ergebnis der

gleichen Proben nach Aufreinigung mit ExoSAP-IT. Nach der Elution mit QIAEX waren die Signale im Gel durch den DNA-Verlust so schwach, dass eine hohe Belichtung notwendig war, um die Banden sichtbar zu machen. Die Interpretation der Ergebnisse war sehr schwierig. Nach Verwendung von ExoSAP-IT ergaben sich so deutliche Signale, dass sogar mit geringerer Belichtung eine kontrastreiche Darstellung der Banden möglich und die Ergebnisse der Genotypisierung eindeutig zu erkennen waren.

4.1.2 Optimierung des Nachweises des C1183T-Polymorphismus des SOD2-Gens

Die Methode zur Untersuchung des Polymorphismus im SOD2-Gen war im Labor bereits etabliert. Bei Durchführung der PCR nach dem vorliegenden Protokoll kam es jedoch zur Bildung vieler unspezifischer Banden, die den weiteren experimentellen Verlauf erheblich störten. Abbildung 4.2 zeigt die Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen, in der 18 verschiedene Ansätze getestet wurden (Lane 1-18).

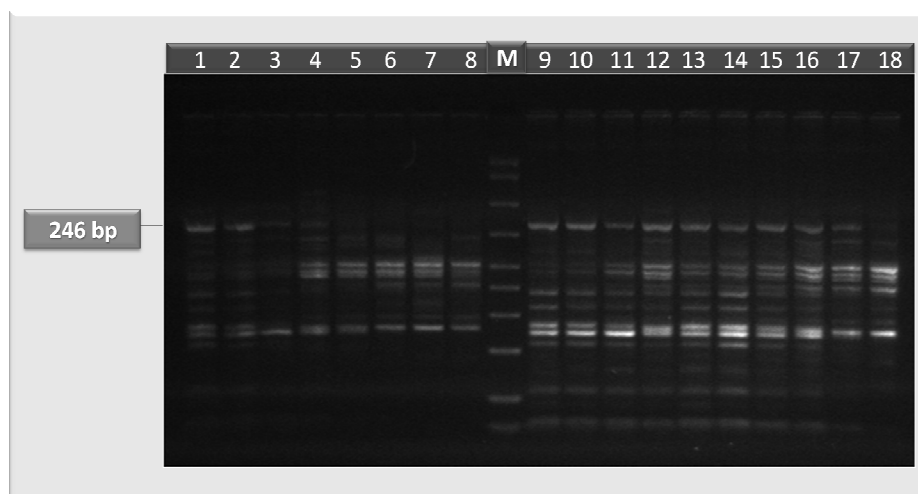


Abbildung 4.2: Gelelektrophorese zur Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen für das DNA-Fragment des SOD2-Gens mit MgCl₂ im Ansatz

Da sich im Vergleich aller Banden bei Ansatz 10 die stärkste Bande beim Molekulargewicht von 246 bp zeigte, wurden zunächst folgende optimalen Bedingungen für den PCR-Ansatz definiert: 200 ng DNA, 1,5 mM MgCl₂ und 10 pmol Primer (jeweils 10 pmol vorwärts und rückwärts). Durch systematisches Austesten der verschiedenen Komponenten der PCR-Reaktion ließ sich feststellen, dass der Verzicht auf Magnesiumchlorid zu einem optimalen Ergebnis der PCR-Reaktion führt. Abbildung 4.3 zeigt das Ergeb-

nis der PCR nach Optimierung der Methode. In Probe 1 und 2 wurden für den Ansatz je 100 ng DNA und 5 pmol Primer (jeweils 5 pmol vor- und rückwärts) verwendet, bei Probe 1a und 2a waren es 200 ng DNA und jeweils 10 pmol Primer. In allen vier Reaktionen zeigt sich eine deutliche Bande bei 246 bp, der Marker links im Bild dient zur Kontrolle. Im weiteren Verlauf wurden für den Ansatz je 100 ng DNA und jeweils 5 pmol Primer (vor- und rückwärts) verwendet.

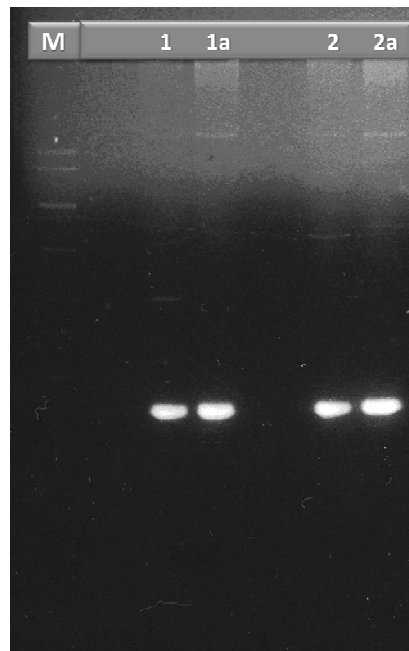


Abbildung 4.3: Gelelektrophorese, zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für das DNA-Fragment des SOD2-Gens ohne Magnesiumchlorid im Ansatz

M=Marker, 1,2:100 ng DNA, je 5 pmol Primer, 1a, 2a: 200 ng DNA, je 10 pmol Primer

4.1.3 Optimierung des Nachweises des G3991A-Polymorphismus des XRCC1-Gens

Bei der Untersuchung des Polymorphismus im XRCC1-Gen konnte das gewünschte DNA-Fragment nur in einigen Proben amplifiziert werden. Die Menge des PCR-Produktes war jedoch immer unterschiedlich, so dass die Bandendicke stark variierte. Die Ergebnisse waren nicht reproduzierbar. Nach Durchführung einer Gradienten-PCR konnte eine optimale Annealing-Temperatur von 65°C identifiziert werden. In Abbildung 4.4 ist die Gradienten-PCR für das Fragment des XRCC1-Gens dargestellt. Links im Bild sind die Banden des Markers zur Kontrolle der Bandengröße, rechts daneben die PCR-Produkte bei Annealing-Temperaturen von 71°C, 69°C, 67°C, 65°C, 63°C, 61°C, 59°C und 57°C zu erkennen. Desweiteren wurde das PCR-Programm um einen „final extension“ Schritt von 5 Minuten bei 72°C ergänzt.

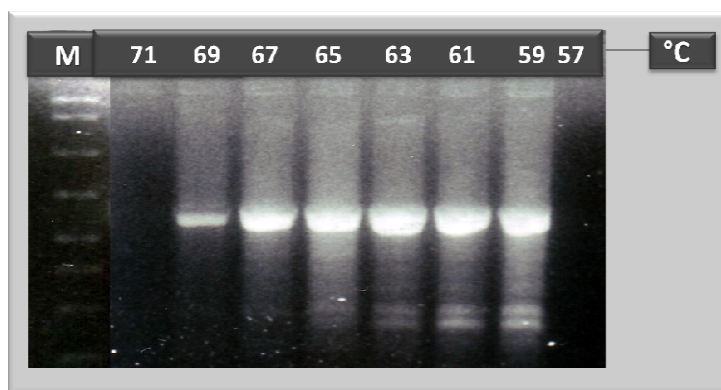


Abbildung 4.4: Darstellung des PCR-Produkts des XRCC1-Gens, nach Durchführung einer Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 71°C bis 57°C
M=Marker

Durch die Veränderungen des experimentellen Protokolls konnten konstante optimale Ergebnisse erreicht werden. In Abbildung 4.5 ist das PCR-Produkt von fünf verschiedenen Patientenproben (1-5) nach Optimierung der Methode dargestellt. Das gewünschte DNA-Fragment mit der Größe von 615 bp konnte in allen Proben amplifiziert werden.

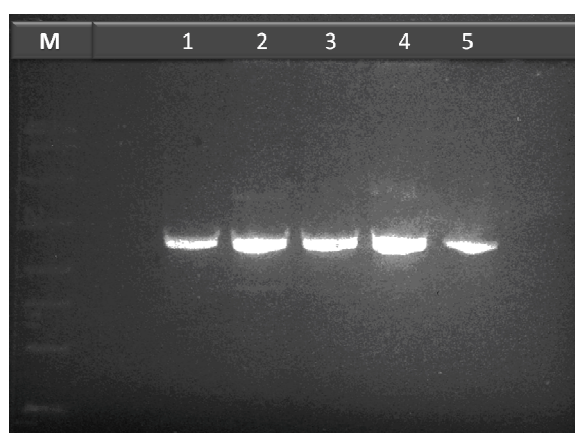


Abbildung 4.5: Darstellung des PCR-Produkts des XRCC1-Gens bei fünf Patientenproben (1-5) nach Optimierung der Methode
Die Größe des PCR- Produkts beträgt 615 bp, M=Marker

4.1.4 Etablierung des Nachweises des A105G-Polymorphismus des GSTP1-Gens

Das GSTP1-Gen wurde durch die Arbeitsgruppe bisher nicht untersucht. Nach Vorlage eines experimentellen Protokolls konnte die Methode etabliert werden. Abbildung 4.6 zeigt die Gradienten-PCR für das 176 bp große Fragment des GSTP1-Gens mit Annealing-Temperaturen von 71°C bis 57°C.

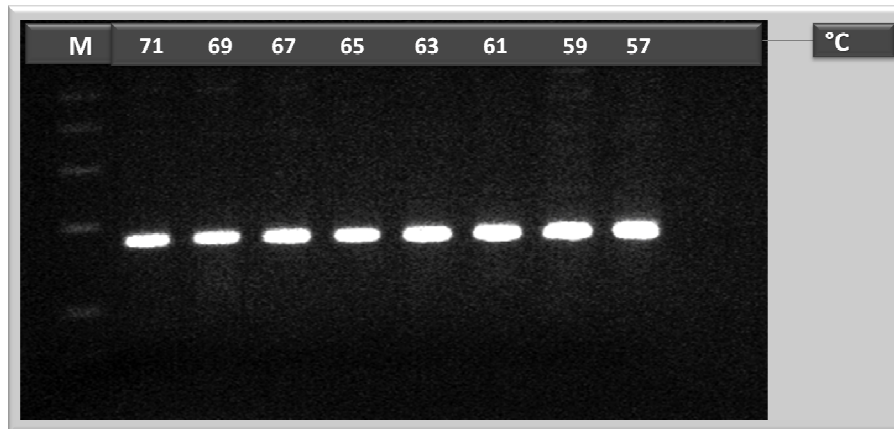


Abbildung 4.6: Darstellung des PCR-Produkts des GSTP1-Gens, nach Durchführung einer Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 71°C bis 57°C
M=Marker

Demnach hat sich eine optimale Temperatur von 60°C ergeben. Die weiteren PCR-Bedingungen sind in Tabelle 3.2 angegeben. Der Verdau mit dem entsprechenden Enzym Bsm1 (1,5 U) erfolgte über 3 Stunden bei 56°C. Das Enzym schneidet das polymorphe Allel. In Abbildung 4.7 ist das Ergebnis des Verdau für drei Proben (Pat 1, 2, 3) dargestellt. Die Probe Pat1+ wurde nicht durch das Enzym geschnitten, die Bandengröße beträgt 176 bp (siehe Marker Lane 1), es handelt sich um den Wildtyp. Hinsichtlich der Probe Pat 2+ lassen sich drei Banden erkennen (176, 91, 85 bp), womit ein heterozygoter Zustand vorliegt. Die Probe Pat3+ wurde vollständig geschnitten und somit als homozygot SNP identifiziert (- ist jeweils die Kontrolle ohne Enzym).

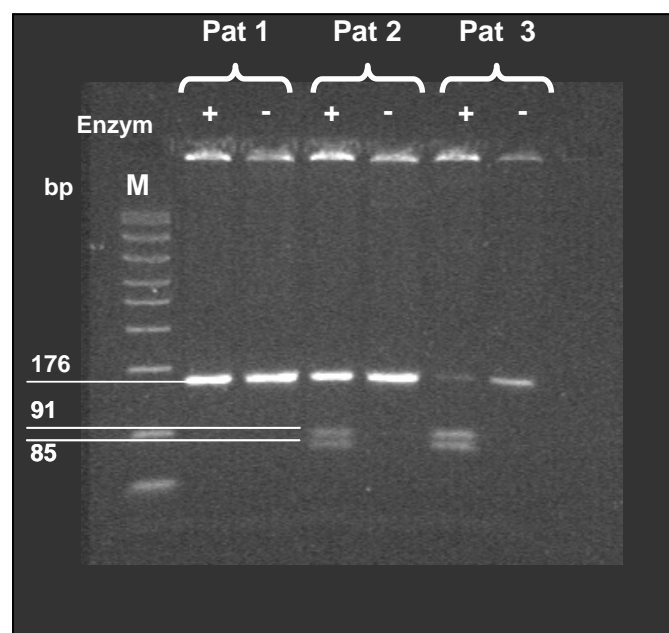


Abbildung 4.7: Dargestellt sind die Ergebnisse der Genotypisierung für drei Patientinnen im GSTP1-Gen

M = Kontrollmarker, + = Probe nach Verdau mit Restriktionsenzym, - = Kontrolle ohne Verdau.
Pat. 1: Wildtyp, Pat. 2: heterozygot, Pat. 3: homozygot SNP

4.2 Genstatus der Patientinnen

Zur Bestimmung des Genstatus wurde den Patientinnen im Rahmen einer früheren Untersuchung Blut entnommen und die genomische DNA isoliert. Da diese bei 4°C stabil ist, konnte anhand dieser gelagerten Proben der Allelstatus der SNPs bestimmt werden, wobei die Gene ATM (G1853A) und XPD (G751T) mittels MALDI-TOF und GSTP1 (A105G), SOD2 (C11183T), TGFB1 (C509T) und XRCC1 (G399A) mittels RFLP-Methode analysiert wurden.

In der Auswertung sollte der Genotyp einer Patientin in Bezug auf den untersuchten SNP mit dem individuellen Auftreten eines schweren Erythems verglichen werden. Dadurch sollte ein Zusammenhang zwischen Allelstatus und individueller klinischer Strahlenempfindlichkeit erkennbar werden.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Genotypisierung aller untersuchten SNPs

Gene (co- don) rs nr	Methode	Genotyp	n	Anteil	Allelfrequenz		HWE	relative excess het- erozygosity
					major	minor	p	(95%CI)
ATM (5557) rs1801516	MALDI- TOF	GG	63	0,76	0,87	0,13	0,6	0.802 (0.345 - 1.861)
		GA	18	0,22				
		AA	2	0,02				
GSTP1 (105) rs1695	RFLP	AA	37	0,45	0,67	0,33	0,8	1.104 (0.672 - 1.815)
		AG	38	0,45				
		GG	8	0,1				
SOD2 (1183) rs4880	RFLP	CC	19	0,23	0,55	0,45	0,02	1.798 (1.135 - 2.849)
		CT	52	0,63				
		TT	11	0,13				
TGFB1 (509) rs1800469	RFLP	CC	29	0,35	0,59	0,41	1	0.993 (0.636 - 1.548)
		CT	40	0,48				
		TT	14	0,17				
XPD (751) rs13181	MALDI- TOF	GG	34	0,12	0,65	0,35	1	1.03 (0.641 - 1.657)
		GT	38	0,46				
		TT	10	0,41				
XRCC1 (399) rs25487	RFLP	GG	36	0,43	0,63	0,37	0,07	0.735 (0.464 - 1.164)
		GA	33	0,4				
		AA	14	0,17				

Das Ergebnis der Genotypisierung aller Patientinnen ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Es muss darauf hingewiesen werden, dass im Falle von SOD2 und XPD die Genotypisierung in einer Probe nicht möglich war. Dort liegt das Ergebnis für nur 82 Patienten vor.

Im Falle des G/A Polymorphismus im ATM-Gen weisen 63 Patientinnen (76 %) auf beiden Allelen die Originalbase 'G' auf, 18 (22 %) sind diesbezüglich heterozygot mit je einem 'G' und einem polymorphen 'A'-Allel, und nur 2 % der Patientinnen sind homozygot für das polymorphe A-Allel. Im Vergleich dazu liegt der Anteil homozygot polymorpher Patientinnen für die SNPs in den Genen GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD und XRCC1 zwischen 9 % und 17 %. Der Anteil heterozygoter Patientinnen, welcher entsprechend der Hardy-Weinberg-Verteilung nicht mehr als 50 % betragen kann, liegt mit Ausnahme des SOD2-Polymorphismus zwischen 22 % bei ATM und 48 % bei TGFB1. Der Wert von 63 % im Falle des SOD2-Gens weist auf eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht hin (siehe Kapitel 2.8.5).

4.2.1 Überprüfung der Genotypfrequenzen auf Hardy-Weinberg-Verteilung

Zur Veranschaulichung der Übereinstimmung der einzelnen Genotypfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bietet sich das graphische Verfahren des sogenannten Definetti-Plots an. In dieser Form der Darstellung (Abbildung 4.8) wird der Anteil der heterozygoten Individuen als Funktion der Frequenz des häufigeren Allels (englisch: major allele) dargestellt.

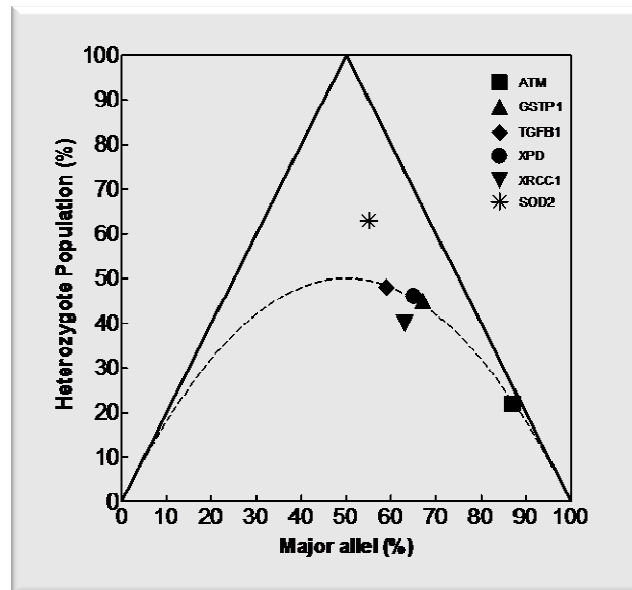


Abbildung 4.8: Definetti-Plot zur Darstellung der Übereinstimmung der Genotypfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In dem dadurch entstehendem Dreieck, welches rechts und links durch eine Diagonale begrenzt wird, welche die Häufigkeit des Genotyps AA bzw. aa beschreibt, ergibt sich ein parabolischer Verlauf (gestrichelte Linie) für die im optimalen Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindlichen Genotypfrequenzen. Diese Darstellung veranschaulicht die gute Übereinstimmung der Genotypfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die SNPs in den Genen ATM, GSTP1, TGFB1 und XPD, während der Wert für den SNP im XRCC1-Gen eine geringfügige, der für den SNP im SOD2-Gen eine deutliche Abweichung zeigt. Zur abschließenden Bewertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Bestimmung der „relative excess heterozygosity“ eine Abweichung der Daten von der Hardy-Weinberg-Verteilung statistisch geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Für die Genotypverteilung der SNPs in den Genen TGFB1 und XPD ergab sich ein p-Wert von 1.0, was auf eine ideale Übereinstimmung der Daten mit dem geforderten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht hinweist. Auch für Verteilungen der SNPs in den Genen ATM, GSTP1 und XPD wurden p-Werte über 0.05 bestimmt, somit kann keine Abweichung dieser Daten nachgewiesen werden. Als Maß der Abweichung dient bei dieser Analyse die „relative excess heterozygosity“, welche den numerischen Wert von 1.0 umschließen muss. Einzig für die Verteilung der SNPs im SOD2-Gen wurde mit einem p-Wert von 0.02 eine statistisch signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nachgewiesen. In diesem Fall liegt sowohl die „relative excess heterozygosity“ mit einem Wert von 1.8, wie auch ihre 95%-

Vertrauensbereiche (1.14 ... 2.85), deutlich über 1.0, was als mathematischer Ausdruck der im Definetti-Plot (Abbildung 4.8) bereits dargestellten Abweichung zu verstehen ist.

In der Bewertung des Einflusses der untersuchten Polymorphismen auf das Erythemrisiko wurde daher der SOD2 (C1183T)-Polymorphismus aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da die Ursache der beobachteten Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht möglicherweise in der Nachweismethode oder in nicht bekannten Faktoren zum Beispiel in der genetischen Nachbarschaft des untersuchten SNPs liegt. Somit sind Assoziationen dieses Genotyps mit klinischen oder zellulären Endpunkten nicht aussagekräftig.

4.3 Einfluss des Genstatus auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit

In einer vorangehenden Untersuchung [Borgman et al. 2007] wurde für das in dieser Arbeit untersuchte Patientinnenkollektiv die individuelle Strahlenempfindlichkeit bestimmt. Dazu wurden periphere Lymphozyten mit Phytohämagglutinin A stimuliert, und nach in-vitro Bestrahlung mit 6 Gy durch Zugabe von Colchicin während der Zellteilung in der Metaphase arretiert. Anhand dieser Präparate können strahleninduzierte chromosomale Deletionen in den Lymphozyten quantifiziert werden. In Abbildung 4.9 sind die Ergebnisse der Auszählung als Histogramm dargestellt. Im Mittel wurden durch Bestrahlung mit 6 Gy 3.59 (MW) chromosomale Deletionen pro Zelle (SD = 0.57) induziert.

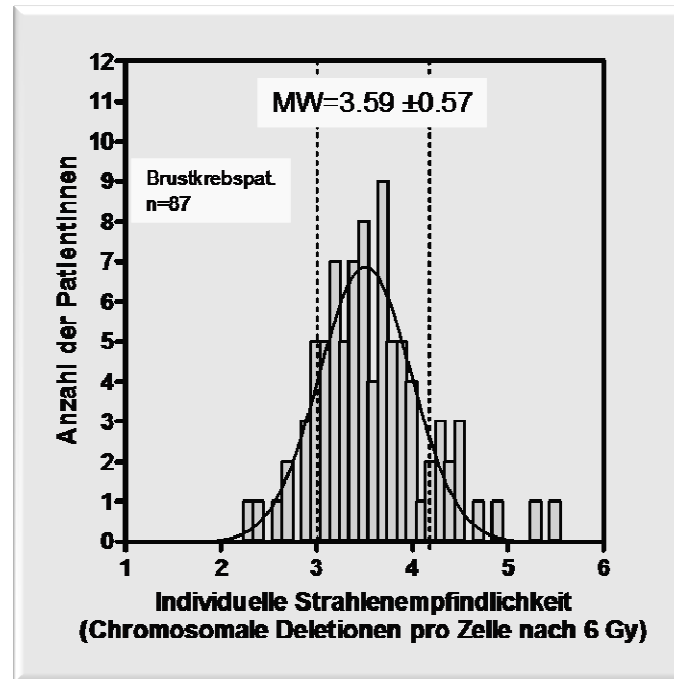


Abbildung 4.9: Individuelle Strahlenempfindlichkeit 87 Brustkrebspatientinnen bestimmt mittels G0/1-Assay. Aufgetragen ist die Häufigkeit chromosomaler Deletionen pro Zelle nach *in vitro* Bestrahlung mit 6Gy [Hoeller et al. 2003].

Betrachtet man die gesamte Verteilung zeigen sich deutliche Variationen mit Werten zwischen 2.2 und 5.5 Deletionen pro Zelle. Anhand dieser Verteilung wurden die Patientinnen in die drei Gruppen eingestuft: "resistent" (Zahl der Deletionen kleiner als der Mittelwert (MW) - Standardabweichung (SD) = 3.19), "normal" (-im Bereich $MW \pm SD = 3.02-4.16$) und "sensitiv" (-größer als $MW + SD = 4.46$).

6 (12 %) Patientinnen wurden als resistent und 9 (18 %) als sensitiv bezüglich ihrer zellulären Strahlenempfindlichkeit charakterisiert. Somit war in dieser Arbeit die Möglichkeit gegeben, den Bezug zwischen Genotyp und zellulärer Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen.

Eine gendosisabhängige Korrelation konnte ausschließlich für die Polymorphismen im TGFB1- und im XPD-Gen nachgewiesen werden. Die Analyse zeigt, dass im Falle des TGFB1-Polymorphismus die Patientinnen mit einem heterozygoten (CT) bzw. homozygot polymorphen Genotyp (TT) eine Erhöhung ihrer individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit aufweisen (Abbildung 4.10).

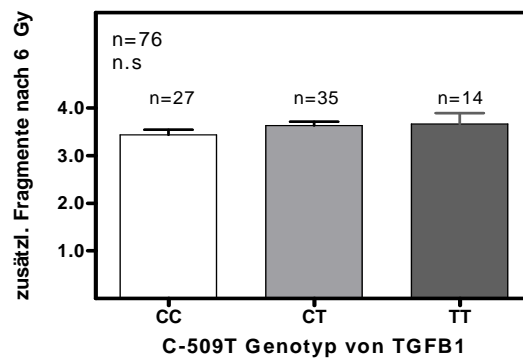


Abbildung 4.10: Einfluss des Polymorphismus im TGFB1-Gen auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde mittels G0/1-Assay untersucht, und die Zahl zusätzlicher DNA-Fragmente nach in-vitro Bestrahlung peripherer Lymphozyten mit 6 Gy bestimmt.

Während der Wildtyp (CC) im Mittel 3.43 (SD=0.11) zusätzliche Fragmente aufweist, steigt dieser Wert über 3.63 (SD=0.08) auf 3.66 (SD=0.23) für die Gruppe von 14 Patientinnen mit dem homozygot polymorphen Genotyp an. Diese Unterschiede erreichen keine statistische Signifikanz ($p=0.24$, Post test for linear trend).

Demgegenüber nimmt die zelluläre Strahlenempfindlichkeit mit der Häufigkeit des polymorphen Allels im XPD-SNP ab. Dies ist analog zu Abbildung 4.10 in Abbildung 4.11 dargestellt. Den geringsten Wert an zusätzlichen Fragmenten von 3.39 (SD=0.1) wurde für den homozygot polymorphen Genotyp (TT) bestimmt, während Patientinnen des GG-, bzw. GT-Genotyps im Mittel 3.69 (SD=0.18) bzw. 3.71 (SD=0.1) zusätzliche Fragmente aufwiesen. Diese geringen Unterschiede erlangen aber aufgrund der kleinen Fallzahlen keine statistische Signifikanz ($p=0.31$, Post test for linear trend).

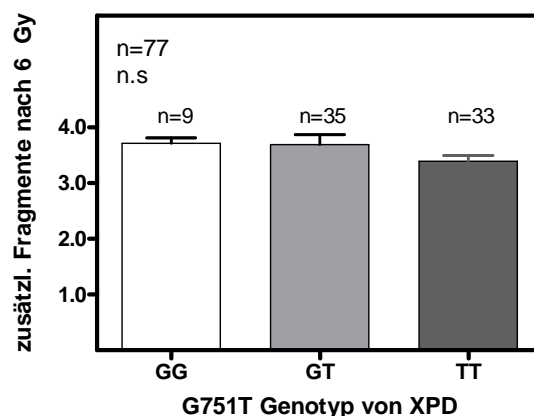


Abbildung 4.11: Einfluss des Polymorphismus im XPD-Gen auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde mittels G0/1-Assay untersucht, und die Zahl zusätzlicher DNA-Fragmente nach in-vitro Bestrahlung peripherer Lymphozyten mit 6 Gy bestimmt.

4.4 Einfluss des Genstatus auf das Erythemrisiko

4.4.1 Erythemhäufigkeit nach Strahlentherapie

Für alle 83 Brustkrebspatientinnen wurde die Normalgewebereaktion anhand der RTOG-Skala erhoben. Dabei wurde ausschließlich die Entwicklung eines Erythems bewertet. Das Ergebnis ist in Form eines Histogrammes in Abbildung 4.12 dargestellt.

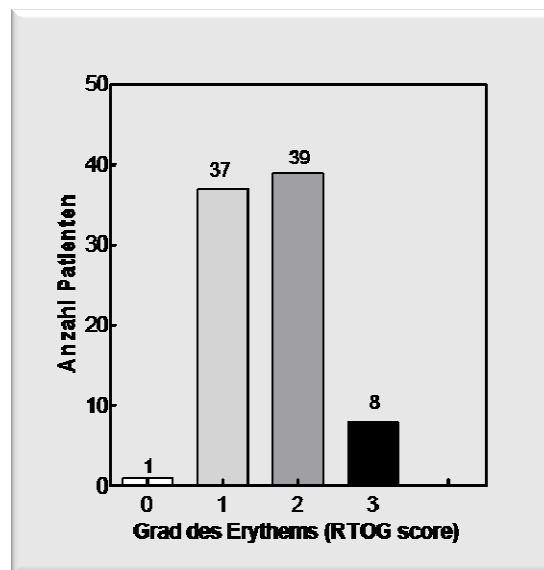


Abbildung 4.12: Häufigkeit des Auftretens eines Erythems Grad 0 bis 3 im untersuchten Patientinnenkollektiv

Während nur eine Patientin erythemfrei blieb, entwickelten 37, 39 bzw. 8 Patientinnen ein Erythem des Grades 1, 2 bzw. 3. Insgesamt entwickelten 45 von 83 Patientinnen (53 %) ein Erythem Grad 2 oder Grad 3. Diese wurden für die weitere Auswertung zusammengefasst und als Patientinnen mit schweren Erythem (Grad 2/3) der Gruppe mit keinen bzw. leichten Erythem (Grad 0/1) (47 %) gegenübergestellt.

Da das Brustvolumen, wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben, als konfundierender Faktor für die Ausprägung eines strahleninduzierten Erythems identifiziert wurde [Borgmann et al. 2008], ist es notwendig, dieses bei der Bestimmung des Einflusses der untersuchten Genotypen auf das Erythemrisiko zu berücksichtigen. Aus diesem Grund muss das Erythemrisiko in Abhängigkeit des Brustvolumens bewertet werden. Die Häufigkeitsverteilung der Brustvolumina der untersuchten Patientinnen ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Bei einer Varianzbreite von 143 cm³ bis 2546 cm³ betrug das mediane Brustvolumen 750 cm³. Abbildung 4.14 vergleicht das Erythemrisiko für Patientinnen mit gro-

ßem bzw. kleinem Brustvolumen, wobei der Medianwert von 750 cm^3 als Grenzwert gewählt wurde. Es zeigt sich, dass das Risiko eines schweren Erythems für die Patientinnen mit großem Brustvolumen mit 66 % deutlich über dem der Patientinnen mit geringem Brustvolumen (45 %) liegt. Der Einfluss des Brustvolumens erreicht mit einem p-Wert von 0.048 statistische Signifikanz (Pearson's Chi-Quadrat).

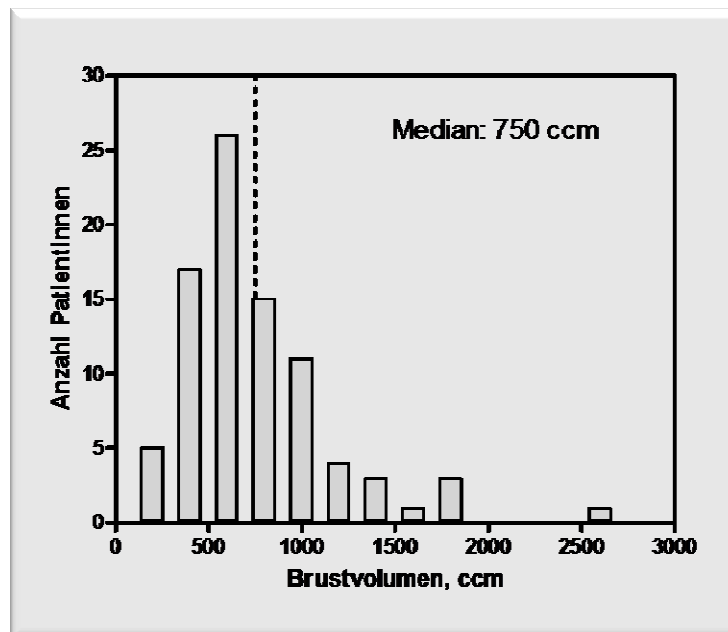


Abbildung 4.13: Häufigkeitsverteilung der Brustvolumina der 83 Brustkrebspatientinnen

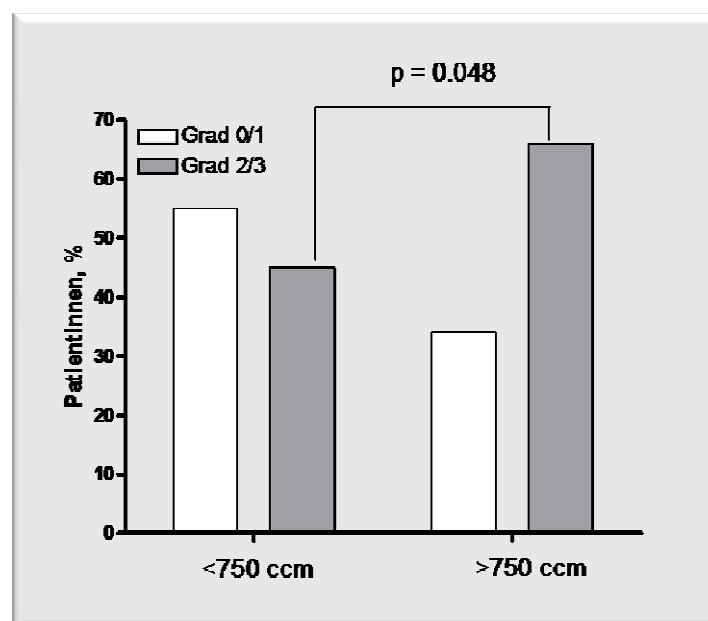


Abbildung 4.14: Häufigkeit eines leichten bzw. schweren Erythems unter Berücksichtigung der Brustvolumina

4.4.2 Genstatus der untersuchten SNPs

Der Genotyp für die verschiedenen Polymorphismen wurde für jede Patientin individuell bestimmt, die Patientinnen entsprechend der drei möglichen Genotypen gruppiert und das Risiko eines schweren Erythems für die unterschiedlichen Genotypen ermittelt. Das Ergebnis ist für die fünf in der Auswertung verbliebenen Polymorphismen in den Panels A bis E der Abbildung 4.15 dargestellt, wobei jeweils für die verschiedenen Genotypen (homozygot Wildtyp: weiße Balken, heterozygot: graue Balken, homozygot polymorph: schwarze Balken) der Anteil an Patientinnen mit einem schweren Erythem Grad 2/3 aufgetragen ist. Für die SNPs im TGFB1-Gen (C509T) sowie im XPD-Gen (G751T) konnte eine Assoziation mit dem Erythemrisiko beobachtet werden. Für den TGFB1-Polymorphismus nahm das Risiko von 50 % über 56 % auf 64 % zu, während im Falle des XPD-SNPs nicht das polymorphe, sondern das Wildtyp-Allel mit dem höheren Risiko assoziiert war. In diesem Fall nahm das Erythemrisiko von 64 % auf 47 % ab. Für die SNPs in den Genen ATM, (Panel A), GSTP1 (Panel B) und XRCC1 (Panel E) wurde keine systematische alleldosisabhängige Assoziation mit dem Erythemrisiko beobachtet. Zur Beurteilung der Güte der Assoziation ist die zum Teil geringe Anzahl an Patientinnen mit dem entsprechenden Genotyp (Tabelle 4.1 Spalte 4) zu beachten. Eine statistische Signifikanz konnte aufgrund der sehr geringen Fallzahlen nicht nachgewiesen werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Genotypisierung in einigen Fällen aufgrund unzureichender Qualität der verwendeten genomischen DNA nicht möglich war. Somit konnte für die untersuchten Polymorphismen im XPD- und SOD2-Gen nur bei 82 Patientinnen ein Ergebnis ermittelt werden.

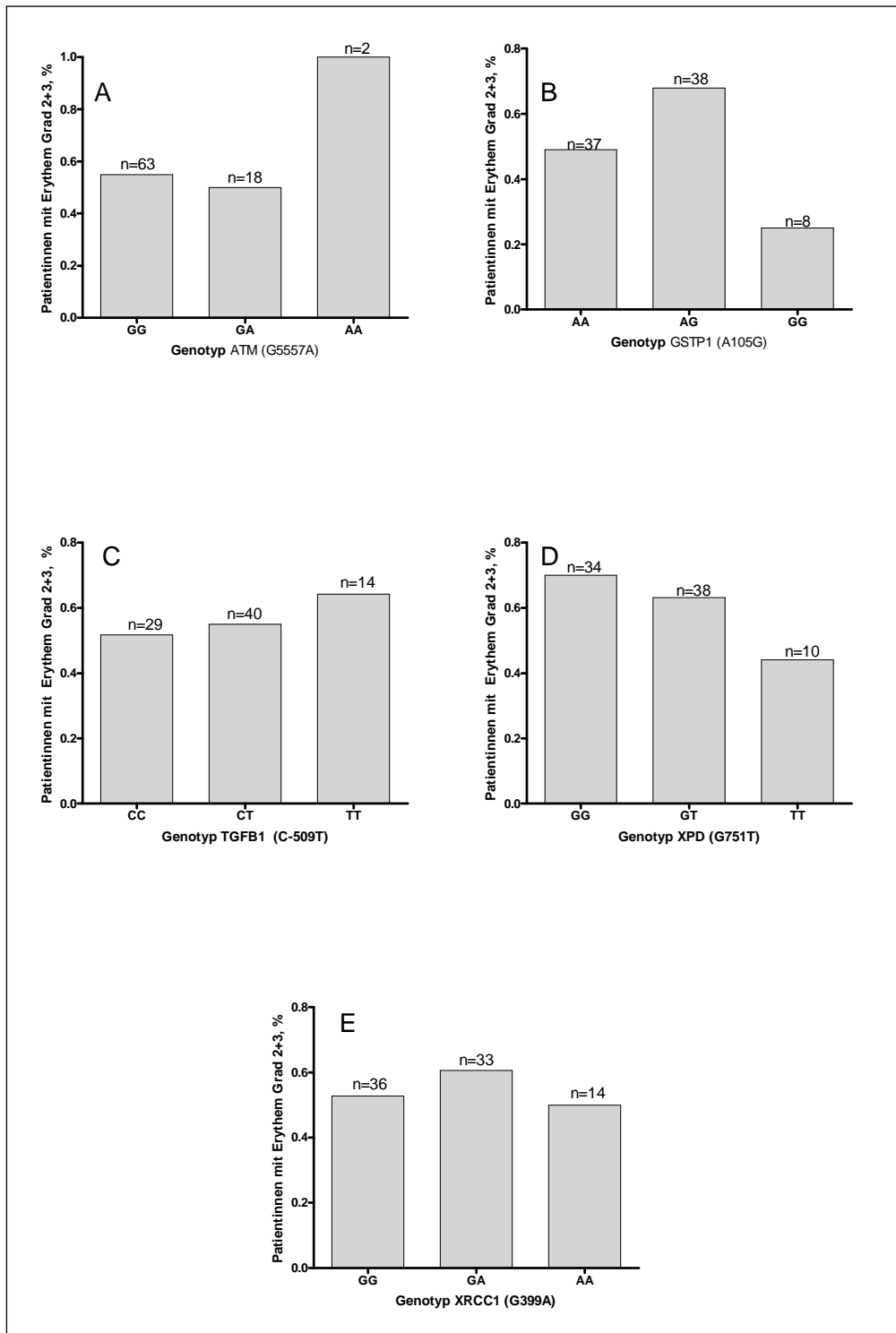


Abbildung 4.15: Einfluss des Genotyps der Polymorphismen ATM (G5557A), GSTP1 (A105G), TGFB1 (C509T), XPD (G751T) und XRCC1 (G399A) auf das Risiko eines schweren Erythems nach Strahlentherapie. Aufgetragen ist jeweils für die verschiedenen Genotypen der prozentuale Anteil der Patientinnen mit einem Erythem Grad 2/3.

4.5 Konfundierender Faktor Brustvolumen

Wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben, wurde in einer vorangegangenen Arbeit der Arbeitsgruppe für das untersuchte Patientinnenkollektiv das Brustvolumen der Patientinnen als wichtiger konfundierender Faktor identifiziert. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die vorliegenden Daten nach dem Brustvolumen zu stratifizieren. Wie in Abbildung 4.13 dargestellt, beträgt das mittlere Brustvolumen des Patientinnenkollektivs 750 cm^3 (SD=44.1). Dieser Wert wurde zur Stratifizierung des Kollektivs verwendet, da anhand der Ergebnisse von Borgmann et al. (2008) erwartet werden muss, dass der Einfluss der Strahlenempfindlichkeit insbesondere für Patientinnen mit einem kleineren Brustvolumen besteht. Abbildung 4.16 zeigt den Vergleich der Korrelation des Erythemrisikos mit dem Genotyp für die Polymorphismen im TGFB1- bzw. im XPD-Gen für das Gesamtkollektiv (Panel A und C) sowie für das Kollektiv der Patientinnen mit Brustvolumina kleiner als 750 cm^3 (Panels B und D). Zumindest für den TGFB1-Polymorphismus verstärkt sich der Einfluss des Genstatus. Während im Gesamtkollektiv das Risiko von 50 % auf 64 % mit dem Vorhandensein des T-Allels zunimmt, nimmt das Risiko der Patientinnen mit den kleineren Brustvolumina von 26 % auf 83 % zu. Dieser Effekt ist im Falle des XPD-Polymorphismus weniger deutlich ausgeprägt.

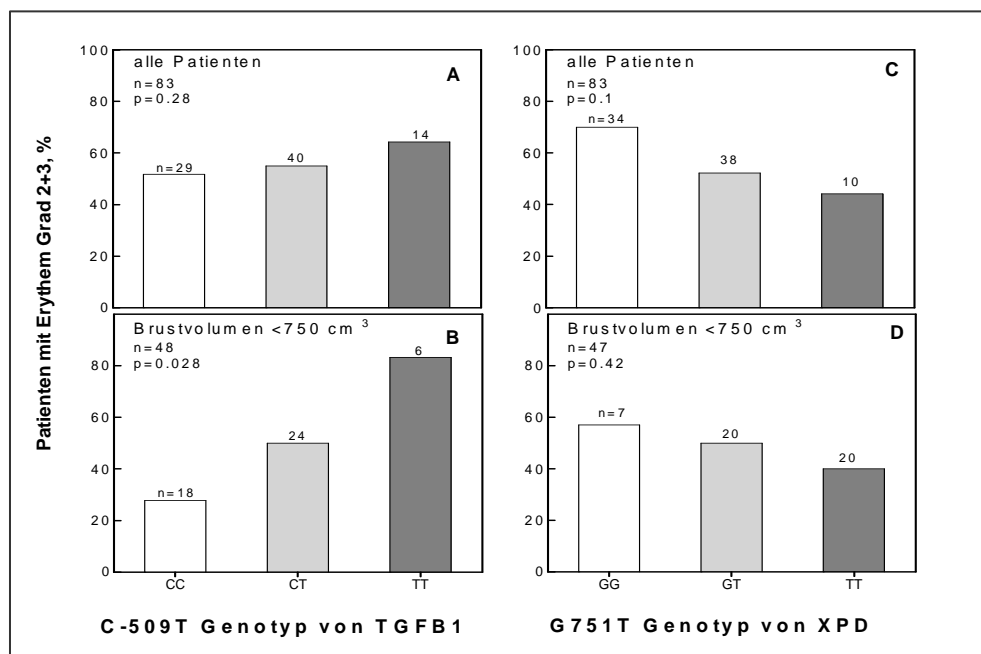


Abbildung 4.16: Einfluss des Genotyps der Polymorphismen C509T des TGFB1-Gens (Panel A und B) sowie G751T des XPD-Gens (Panel C und D) auf das Erythemrisiko nach Strahlentherapie. Aufgetragen ist für die verschiedenen Genotypen der prozentuale Anteil der Patientinnen am Gesamtkollektiv (Panel A und C) sowie für die Patientinnen mit einem Brustvolumen $< 750 \text{ cm}^3$ (Panel B und D), welche ein Erythem Grad 2 bzw. 3 entwickelten.

4.5.1 Identifizierung der Risikoallele

Wie in Abbildung 4.16 dargestellt, korreliert das Risiko eines schweren Erythems mit dem Genstatus des TGFB1(C509T)- sowie des XPD (G751T)-Polymorphismus. Doch während im Falle des TGFB1-SNPs das polymorphe T-Allel mit einem erhöhten Erythemrisiko verbunden ist, ist es im Falle des XPD-Gen das den Wildtyp charakterisierende G-Allel. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich als Risikoallele für ein strahleninduziertes Erythem das T-Allel des TGFB1(C509T)-Polymorphismus sowie das G-Allel des XPD (G751T)-Polymorphismus identifizieren. Für die weiteren untersuchten Polymorphismen in den Genen ATM, GSTP1 und XRCC1 ließen sich keine Risikoallele identifizieren. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 4.2. zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Übersicht der als Risikoallele für das strahleninduzierte Erythem identifizierten Genotypen der untersuchten Polymorphismen

Gen	SNP	Risiko-Allel
TGFB1	C509T	T
XPD	G751T	G
XRCC1	G399A	kein Effekt
ATM	G5557A	kein Effekt
GSTP1	A105G	kein Effekt

Da jedes Allel doppelt vorhanden ist, können individuell maximal vier Risikoallele vorliegen. Das wäre der Fall, wenn eine Patientin sowohl den homozygot polymorphen T-Genotyp im TGFB1-Gen, als auch den homozygoten A-Genotyp im ATM-Gen aufweist. Eine entsprechende Analyse des Patientinnenkollektivs bezüglich der Anzahl der vorhandenen Risikoallele ergab die in Abbildung 4.17A dargestellte Verteilung. Nur eine von 83 Patientinnen wies die maximal mögliche Anzahl von vier möglichen Risikoallelen auf, während jeweils 14 (17 %) kein bzw. ein Risikoallel besaßen und für den überwiegenden Anteil von 29 (34 %) bzw. 26 (30 %) der Patientinnen ein bzw. zwei Risikoallele nachgewiesen wurden.

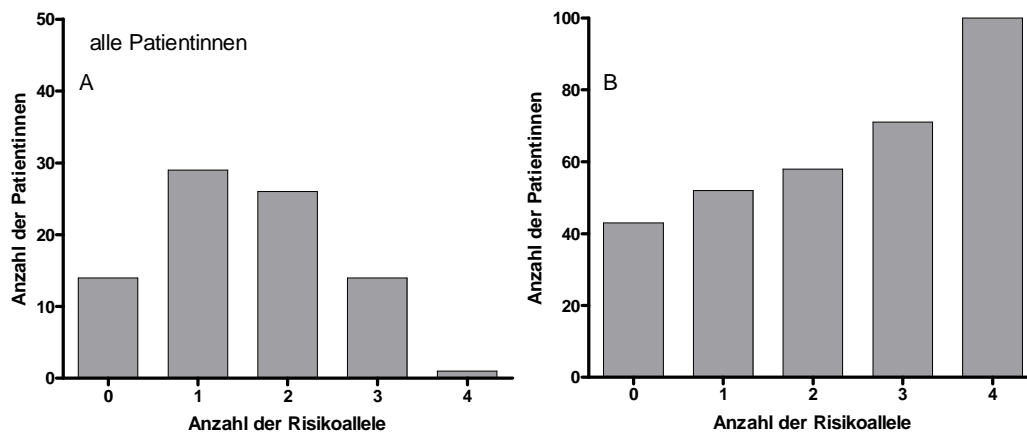


Abbildung 4.17 A: Verteilung der Risikoaallele des TGFB1 C509T (T-Allel)- und des XPD-G751T (G-Allel)-Polymorphismus für alle Patientinnen. B: Anteil der Patientinnen mit schwerem Erythem in Abhängigkeit der vorhandenen Risikoaallele.

Der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Risikoaallele und dem Erythemrisiko der Patientinnen ist in Abbildung 4.17 B dargestellt. Aufgetragen ist das prozentuale Risiko der Patientinnen ein schweres Erythem zu entwickeln, wobei die Patientinnen entsprechend der Anzahl vorliegender Risikoaallele gruppiert wurden. Patientinnen welche kein Risikoallel besitzen entwickeln zu 40 % ein strahleninduziertes Erythem. Dieses nimmt für ein bis vier Risikoallele auf einen Maximalwert von 100 % zu, wobei berücksichtigt werden muss, dass es sich dabei um eine Einzelbeobachtung handelt, da nur eine Patientin alle vier Risikoallele aufwies. Die Zunahme des Risikos mit der Anzahl der Risikoallele ist stärker ausgeprägt, wenn in der Analyse nur die Patientinnen mit einem mittleren Brustvolumen von weniger als 750 cm³ berücksichtigt werden (Abbildung 4.18 A, B). In diesem Fall nimmt das Erythemrisiko von 20 % auf 100 % zu, wobei die zum Teil sehr geringen Fallzahlen (Abbildung 4.18 A) zu Schwankungen im resultierenden Histogramm führen (Abbildung 4.18 B). Der Anstieg des Erythemrisikos nimmt bei Berücksichtigung innerhalb der Patientinnen mit den kleineren Brustvolumina von 20 % auf Werte zwischen 60 % und 100 % zu, während im Gesamtkollektiv das Risiko in der Gruppe der Patientinnen ohne jegliche Risikoallele mit 40 % doppelt so hoch war.

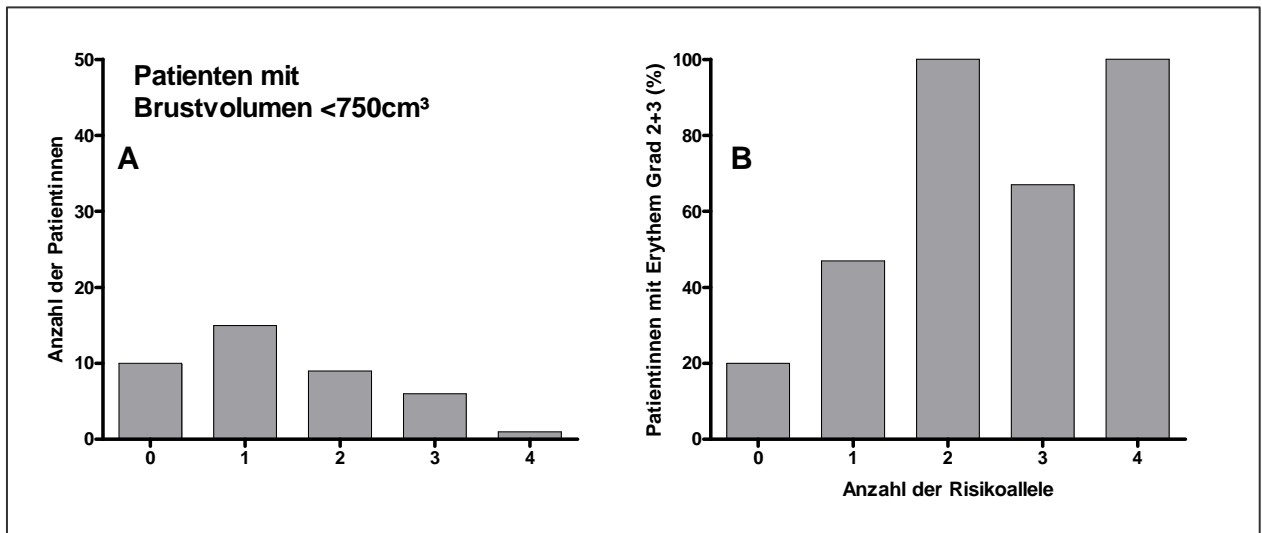


Abbildung 4.18 A: Verteilung der Risikoallele des TGFB1 C509T (T-Allel)- und des XPD-G751T (A-Allel)-Polymorphismus für 50 Brustkrebspatientinnen mit einem Brustvolumen <math><750\text{ cm}^3</math>. **B:** Anteil der Patientinnen mit schwerem Erythem und Brustvolumina <math><750\text{ cm}^3</math> in Abhängigkeit der vorhandenen Risikoallele.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Risikoallele der akuten Normalgewebe-reaktion zu identifizieren. Diesbezüglich wurde der Einfluss von Polymorphismen in den Genen ATM (G5557A), GSTP1 (A105G), SOD2 (C1183T), TGFB1 (C509T), XPD (G751T) und XRCC1 (G399A) auf das Risiko eines schweren Erythems nach Strahlentherapie untersucht. Diskutiert wurde ebenfalls der Einfluss dieser Polymorphismen auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, welche bereits in einem vorangegangenen Projekt für das untersuchte Patientinnenkollektiv bestimmt wurde.

5.1 Allelhäufigkeit

Mit Ausnahme der Polymorphismen im ATM- und XPD-Gen wurden die SNPs mit der PCR-basierten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Methode nachgewiesen. Diese Methode hat sich bereits seit langem zum Nachweis von SNPs bewährt und wurde bereits in vielen Untersuchungen verwendet [Angele et al. 2003, Green et al. 2002, Quarmby et al. 2003, de Ruyck et al. 2006]. Bei dieser Methode ist das Fragment, welches die polymorphe Base 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 SNPs in den Genen TGFB1 und XRCC1 wurden Restriktionsenzyme gewählt, die jeweils 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 ein Allel geschnitten, während das andere intakt bleibt. Die Fragmente können dann mittels Gelelektrophorese getrennt werden, sodass in jeder Probe bei optimaler Probenbearbeitung der Genotyp bestimmbar wird (Abbildung 3.1). Die für den Nachweis der SNPs in den Genen GSTP1 und SOD2 verwendeten Enzyme schneiden hingegen die polymorphe Basensequenz. Vorteil der PCR-RFLP Methode ist, dass sie keine aufwendige apparative Ausstattung benötigt. Als Nachteil kann die Begrenzung der möglichen Probenmengen angesehen werden. Probengrößen von weniger als hundert Einzelproben können dennoch problemlos mit der PCR-RFLP bewältigt werden.

Eine alternative Sequenzierungsmethode stellt das MALDI-TOF Verfahren dar (Kapitel 3.3). Der Vorteil dieser Messmethode ist die schnelle Analyse einer vergleichsweise großen Probenmenge. Darüber hinaus ist die genetische Nachbarschaft einiger SNPs

in bestimmten Genen für die RFLP-Methode ungünstig und führt zu Fehlinterpretationen, wie im Beispiel des SNPs im ATM-Gen, in dessen direkter Nachbarschaft ein weiterer Polymorphismus (rs180151) beschrieben ist (www.ncbi.nlm.nih.gov), sodass in diesem Falle die Genotypisierung mittels MALDI-TOF durchgeführt wurde.

Die Häufigkeiten der polymorphen Allele in der Gruppe der Brustkrebspatientinnen betrug für die Gene ATM, GSTP1 SOD2, TGFB1, XPD und XRCC1 13 %, 33 %, 45 %, 41 %, 35 % bzw. 37 % (siehe Tabelle 4.1). Das zentrale Institut für Datenverarbeitung und -speicherung, das National Center for Biotechnology Information (NCBI), veröffentlicht die aktuellsten Daten aller weltweit arbeitenden Arbeitsgruppen bezüglich der SNP-Analyse verschiedenster Populationen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Der Vergleich mit den dort publizierten Allelfrequenzen zeigt generelle Übereinstimmung (ATM 17 % - 23 %, GSTP1: 37 % - 39 %, SOD2 40 % bis 44 %, TGFB1 26 % - 31 %, XPD 33 % - 40 % XRCC1 33 % bis 38 %) wobei auffällt, dass die Allelfrequenz im SOD2-SNP (rs 4880) auch dort mit 40 % bis 44 % angegeben ist, wobei aber keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht dokumentiert wird. Diese scheint für die untersuchte Patientengruppe spezifisch zu sein und rechtfertigt den Ausschluss der Daten bezüglich dieses Polymorphismus von der weiteren Analyse. Die Publikationen, welche sich ausschließlich mit dem Einfluss dieser Polymorphismen auf das Nebenwirkungsrisiko nach Bestrahlung beschäftigen, berichten vergleichbare Allelhäufigkeiten [Quarmby et al. 2003, Andreassen et al. 2003, 2005, 2006, de Ruyck et al. 2005b].

Die mit der RFLP-Methode ermittelte Genotypverteilung des SNPs C1183T im SOD2-Gen wurde mittels MALDI-TOF überprüft, da überdurchschnittlich viele Individuen als heterozygot klassifiziert wurden und die Genotypverteilung nicht im geforderten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lag ($p=0.02$). Die Doppelbestimmung bestätigt jedoch die ursprünglichen Ergebnisse. Eine Erklärung für die hohe Anzahl heterozygoter Individuen sind möglicherweise „Copy Number Variations“, wie sie die in der „Database of Genomic Variants“ (www.projects.tcag.ca/varations) für das SOD2-Gen beschrieben werden. Copy Number Variations zeichnen sich durch mehrere Kopien desselben Gens aus, welche aber innerhalb eines Individuums polymorph ausgeprägt sein können. Dieses führt dazu, dass homozygote Genotypen fälschlicherweise als heterozygot interpretiert werden.

Aktuell sind für das SOD2-Gen drei Copy-Number-Variations mit Häufigkeiten von 4 % bis 74 % dokumentiert. Bei einer Prävalenz von bis zu 74 % ist davon auszugehen, dass diese Variationen im untersuchten Kollektiv der Brustkrebspatientinnen zu einer

Fehlbestimmung des Genotyps führten. Aus diesem Grund wurde dieses Gen aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Im Falle des XRCC1-Gens betrug der p-Wert 0.07, womit der Trend zu einer statistisch signifikanten Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht deutlich wird. Die Anzahl der als heterozygot klassifizierten lag mit 39 % aber in einem Bereich, der mit den Gesetzen von Hardy-Weinberg durchaus vereinbar ist. Da für dieses Gen keinerlei Copy Number Variations beschrieben werden, könnte solch eine Abweichung als krankheitsassoziiert interpretiert werden [Balding 2006]. Um Unsicherheiten auszuschließen, wurde jedoch auch dieses Gen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Hinsichtlich des Polymorphismus im ATM-Gen wurden in dieser Arbeit 75.28 % der Patientinnen als Wildtyp, 22.47 % als Heterozygot und 2.25 % als homozygot SNP typisiert. Mit einem p-Wert von 1 liegt diese Verteilung optimal im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Jedoch wird in direkter genetischer Nachbarschaft des untersuchten SNPs ein weiterer Polymorphismus beschrieben (TTTACTCCAA [A/G][A/T TACAAATGAA), der bei Untersuchung mittels PCR-RFLP zu Fehlinterpretationen führen könnte, so dass eine Überprüfung der Ergebnisse mittels MALDI-TOF nötig war. Die Doppelbestimmung ergab aber auch in diesem Falle identische Ergebnisse, welche mit europäischen Kontrollkollektiven vergleichbar waren.

Die von uns bestimmten Genotypverteilungen bezüglich des TGFB1-, XPD- und GSTP1-Gens entsprechen denen der publizierten Vergleichskollektive, wobei hinsichtlich des GSTP1-Gens ein von Edvardsen (2007) publiziertes Kollektiv von 272 Brustkrebspatientinnen sogar eine nahezu identische Verteilung aufweist.

5.2 Erythem als Endpunkt

Die im Rahmen einer Strahlentherapie maximal einsetzbare Dosis wird durch das Risiko von Normalgewebereaktionen begrenzt. Für das Auftreten dieser Nebenwirkungen werden selbst nach identischen Therapieschemata große Variationen beobachtet. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die Strahlenempfindlichkeit von diversen genetischen Faktoren beeinflusst wird [Rogers et al. 2000, Marcou et al. 2001, Burnet und Peacock 2002]. Eines der aktuellen Forschungsziele ist die Entwicklung prädiktiver Tests zur Identifizierung besonders strahlensensitiver Patienten und die Individualisierung der Therapie in dem Sinne, dass sensitive Patienten durch Dosisreduktion geschont und die Heilungsrate in normalsensitiven und resistenten Patienten durch Dosissteigerung erhöht werden kann [Tucker et al. 1993, Brock et al. 1995, Bentzen 1997,1999; Mackay und Hendry 1999, Russell und Begg 2002]. Da insbesondere die

späten Normalgewebereaktionen, wie zum Beispiel eine Fibrose, die Lebensqualität erheblich beeinflussen können, wurden viele Untersuchungen im Hinblick auf diesen Endpunkt durchgeführt. Ein wesentliches Problem dabei ist, dass sich die Spätreaktionen über einen sehr langen Zeitraum entwickeln. Nach der Analyse zahlreicher klinischer Studien konnten Jung et al. (2001) nachweisen, dass das Risiko strahlenbedingter später Normalgewebereaktionen lebenslang erhalten bleibt. Dies bedeutet, dass es im Gegensatz zu akuten Normalgewebereaktionen für späte Komplikationen kein Zeitfenster der Inzidenzen gibt, sondern dass der individuelle Patient ein lebenslanges Risiko trägt diese Komplikationen zu erleiden. Die Schwere der Komplikation ist dabei von therapie relevanten wie auch individuellen genetischen Parametern determiniert.

Tabelle 5.1: Arbeiten, in denen der Zusammenhang zwischen akuten und späten Normalgewebereaktionen untersucht wurde

Author	Tumor	No.	Acute	Late	Association
Bentzen and Overgaard 1991	Brust	229	Erythem	Fibrose, Telangiektasie	Korr. zwischen Erythem und Telangiekt. aber nicht Fibrose
Turesson et al. 1996	Brust	402	Erythem	Telangiektasie	Korr zwischen Erythem und Telangiektasie
Perera et al. 2005	Brust	39	Erythem	Pigmentierung, Telangiektasie	Korr. zwischen Erythem und Telangiekt. oder Pigment.
Bentzen et al. 1993	Brust	229	Erythem	Fibrose, Telangiektasie	Keine Korr. zwischen Telangiekt. und Fibrose
Tucker et al. 1992	Brust	254	Erythem	Telangiektasie	Keine Korr. zwischen Erythem und Telangiektasie
Lopez et al. 2005	Brust	108	Erythem	Telangiektasie	Keine Korr. zwischen Erythem und Telangiektasie
Bernier et al. 1998	Kopf/Hals	325	Mucositis	Ulceration, Fibrose, etc.	Korr. zwischen Mucositis und Fibrose
Jerezek-Fossa et al. 2002	Endometrium	317	Kompl. in Darm und Blase	RTOG in Darm und Blase	Korr. zwischen Akut- und Spätreaktion für Darm aber nicht für Blase
Heemsbergen et al. 2006	Prostata	553	Proktitis	Blutung, späte Proktitis, gesteigerte Stuhlfrequenz, Inkontinenz	Korr. zwischen Proktitis und Spätreaktion
Zeilefsky et al. 2008	Prostata	1571	Kompl. in Darm und Blase	Blutung, späte Proctitis,	Korr. zwischen Akut- und Spätreaktion für Darm und Blase

Als Folge dessen kann nicht per definitionem eine maximale Nachbeobachtungszeit für die Inzidenz später Normalgewebereaktionen festgelegt werden. Um diese zu quantifizieren werden sinnvolle alternative Endpunkte benötigt, welche mit der späten Normalgewebetoxizität korrelieren und in einem klinisch relevanten Zeitfenster bestimmt wer-

den können. Akutreaktionen wären als Endpunkt insofern geeigneter, da sie definitionsgemäß innerhalb von 90 Tagen nach Beendigung der Therapie auftreten und eine Bewertung der Nebenwirkungsinzidenz wesentlich früher ermöglichen. Unter der Voraussetzung, dass das Risiko von Akut- und Spätreaktionen korreliert, kann die Inzidenz der akuten Nebenwirkung somit auch als Parameter des Risikos später Komplikationen angesehen werden. Die Korrelation zwischen der Inzidenz akuter und später Nebenwirkungen wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht. Einen Überblick bietet Tabelle 5.1. Auch wenn nicht jede Untersuchung eine Korrelation von akuter und später Normalgewebetoxizität nachweisen kann, ist dies in der überwiegenden Mehrzahl der Studien (7/10) der Fall. Somit ist davon auszugehen, dass generell das Risiko der Akutreaktion mit dem einer späten Komplikation korreliert, auch wenn die Pathogenese insbesondere der späten Komplikationen von einer Vielzahl bisher unbekannter Faktoren bestimmt wird, welche eine zwangsläufige Korrelation beider Symptomatiken zu stören scheint.

Generell weist die Datenlage aber darauf hin, dass die Risiken von Akut- und Spätreaktionen korrelieren [Zelevsky et al. 2008]. Somit beschränken sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht nur auf das Risiko akuter Nebenwirkungen, sondern können auch bezüglich des Risikos der klinisch relevanteren späten Nebenwirkungen diskutiert werden.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Ergebnisse ist, wie in Kapitel 2.8.4 beschrieben, das Brustvolumen. In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass größere Brustvolumina mit einem höheren Risiko für Normalgewebereaktionen verbunden sind [Fernando et al. 1996, Harper et al. 2004]. Auch in dieser Arbeit wurde das Brustvolumen als wichtiger konfundierender Faktor berücksichtigt. Dabei zeigte sich, dass Frauen mit größeren Brustvolumina generell stärkere Normalgewebereaktionen zeigten. Bei den Frauen mit kleineren Brustvolumina war hingegen der Einfluss der Risikoallele größer. Das hiermit nachweislich genetisch determinierte Risiko strahleninduzierter Normalgewebereaktionen wirkt sich somit nur bei Patientinnen aus, die nicht schon aufgrund anderer individueller Risiken, wie Fettleibigkeit oder großem Brustumfang ein höheres Risiko besitzen. Aus diesem Grund ist es unverzichtbar konfundierende Faktoren zu erkennen, im Patientenkollektiv zu erfassen und dieses in der Analyse entsprechend zu stratifizieren. Es ist davon auszugehen, dass zukünftige Untersuchungen weitere konfundierende Faktoren identifizieren werden, wie beispielsweise Lebensstil, umweltbedingte Faktoren, Wechselwirkung mit Medikamenten und/oder altersbedingte Prozesse. Dabei ist auszugehen, dass auch diese nicht alleinig, sondern in Kombination miteinander wirken können.

5.3 Bedeutung der SNPs für das Erythemrisiko

In Abbildung 4.15 wird die Inzidenz eines schweren Erythems für die verschiedenen Genotypen dargestellt. Einzig die Polymorphismen im TGFB1- und XPD-Gen lassen eine Korrelation mit dem Erythemrisiko erkennen. Hinsichtlich der anderen untersuchten SNPs besteht entweder keine Abhängigkeit mit der Alleldosis (GSTP1- und XRCC1-Polymorphismus) oder die Zahl an Patientinnen mit entsprechendem Genotyp ist zu gering (ATM-Polymorphismus).

In der Literatur wird der Einfluss des untersuchten SNPs im ATM-Gen auf das Nebenwirkungsrisiko kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten sprechen für eine Korrelation dieses Polymorphismus mit höherer Strahlenempfindlichkeit und/oder einem erhöhten Risiko für Normalgewebereaktionen nach Bestrahlung. Andreassen et al. (2005a) berichten von einer nicht signifikanten Überrepräsentation des G5557A-Polymorphismus bei Patientinnen mit deutlichen Veränderungen der Brust nach postoperativer Bestrahlung. Des Weiteren wiesen die Autoren (2006) nach, dass Patientinnen mit dem G5557A-Polymorphismus schon bei niedrigeren Bestrahlungsdosen eine Fibrose dritten Grades entwickelten als Patientinnen mit einem Wildtyp-Status. Jedoch wurden in dieser Studie heterozygote Patientinnen und solche mit homozygotem SNP-Status gemeinsam ausgewertet. Auch Angele et al. berichteten (2003) von einem Zusammenhang zwischen dem G5557A-Polymorphismus und erhöhter Strahlenempfindlichkeit. Andere Studien bestätigen diesen Zusammenhang nicht [Appleby et al. 1997, Clarke et al. 1998, Bremer et al. 2003]. Allen Arbeiten liegt generell ein gemeinsames Problem zugrunde. Wie in Tabelle 4.1 aufgeführt, ist dieser Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von 13 % in Europa relativ selten. In dem von uns untersuchten Datensatz wiesen nur zwei von 83 Patientinnen zwei polymorphe Allele auf. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wäre die Untersuchung eines wesentlich größeren Patientinnenkollektivs erforderlich. Somit kann das ATM-Gen, nach den bisherigen Ergebnissen, nur als potentielles Kandidaten-Gen betrachtet werden.

Auch für das GSTP1-Gen lässt sich kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Erythemgrad nachweisen. Während die heterozygot polymorphen Patientinnen mit dem größten Risiko belastet sind, ist das für Patienten mit Wildtyp niedriger und für die homozygoten SNP-Trägerinnen am geringsten. Auch in der Literatur existieren diesbezüglich kontroverse Aussagen. Während Ambrosone et al. (2006) von einer Assoziation zwischen dem Auftreten des Polymorphismus A105G im GSTP1-Gen und einem erhöhten Risiko für akute Normalgewebereaktionen nach Bestrahlung berichten, be-

bachten Zschenker et al. (2010) sowie Kuptsova et al. (2008) einen protektiven Effekt für späte Reaktionen wie Fibrose und Teleangiektasien.

Als Risikoallele der strahleninduzierten Erythems wurde in der vorliegenden Untersuchung einzig das polymorphe T-Allel des TGFB1-Polymorphismus C509T sowie das den Wildtyp charakterisierende G-Allel des XPD-Polymorphismus G751T identifiziert (Tabelle 4.2). Diese werden im Folgenden diskutiert.

5.3.1 Bedeutung des Polymorphismus C509T im TGFB1-Gen für das Erythemrisiko

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem T-Allel des TGFB1-Polymorphismus und dem Erythemrisiko nachgewiesen werden. Der Anteil der Patientinnen mit einem Erythem 2/3 Grades nahm von 50 % bei Wildtyp-Patientinnen über 56 % bei Heterozygoten auf 64 % bei Patientinnen zu, die auf beiden Allelen den Polymorphismus aufwiesen (Abbildung 4.16 Panel A). Somit wurde das polymorphe Allel T als Risikoallel definiert.

Wie in Kapitel 2.8.3.4 beschrieben, handelt es sich bei dem Wachstumsfaktor TGFB1 um ein profibrogenes Zytokin mit multiplen Funktionen in den Bereichen der zellulären Differenzierung, Entwicklung, Immunmodulation, Wundheilung, Knochen- und Knorpelbildung, Fibroseentwicklung, Arteriosklerose, Angiogenese und Karzinogenese.

Für zahlreiche Zellen ist TGFB1 ein starker Wachstumsinhibitor, wobei er vom Zelltyp, den umgebenden Faktoren und der eigenen Konzentration abhängig ist. Zum Beispiel können hohe TGFB1-Konzentrationen die stimulierenden Wachstumseigenschaften vom Platelet Derived Growth Factor (PDGF) hemmen, niedrige hingegen eine proliferationsfördernde Wirkung erzielen.

Der SNP C509T im TGFB1-Gen gilt als wichtiger Faktor für inter-individuelle Variationen im TGFB1-Plasmalevel. In einer Zwillingsstudie konnten Grainger et al. (1999) für homozygote Individuen eine Erhöhung des TGFB1-Plasmalevels um den Faktor 2 nachweisen. Der SNP liegt in einer negativen regulatorischen Region des TGFB1-Promoters [Kim et al.1989]. Als Hauptregulatoren der TGFB1-Expression wird unter anderem das Aktivator Protein AP1 diskutiert, welches nur dann an den TGFB1-Promotor bindet, wenn Cytosin an der Stelle 509 vorliegt [Shah et al. 2006]. Es wird diskutiert, dass AP1 als suppressiver Transkriptionsfaktor die Aktivität des TGFB1-Promotors verringert. Liegt das polymorphe T-Allel vor, kann AP1 nicht binden, die Promoteraktivität wird nicht supprimiert und es kommt zu einer Erhöhung von TGFB1

im Plasma, welche u.a. zu verschiedenen Störungen des Immunsystems und zur Karzinomentstehung führen kann [Letterio et al. 1998, Blobe et al. 2000].

Wie in der Literatur beschrieben, liegt der C509T- Polymorphismus im Promotorbereich des LAP Proteins [Grainger et al. 1999, Shah et al. 2006]. Dieses Protein ist Bestandteil des TGFB1-Proteinkomplexes und wird zusammen mit dem TGFB1-Effektorprotein sezerniert, welches erst durch Aktivierung aus dem latenten Proteinkomplex in eine biologisch aktive Form überführt werden muss. Es kann spekuliert werden, dass durch den C509T-SNP nicht notwendigerweise das biologisch aktive TGFB1-Protein verändert, sondern der Prozess der Aktivierung des signalübermittelnden TGFB1-Pathways modifiziert wird. Inwieweit das biologisch aktive TGFB1-Protein oder aber die am latenten Proteinkomplex beteiligten TGFB1-Protein-Komponenten durch den C509T-SNP beeinflusst werden, ist bislang nicht geklärt. Ein Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit kann sowohl direkt über das aktive TGFB1 vermittelt sein, als auch über die Modifikation der an der Aktivierung beteiligten Proteine und nachgeschalteten Signalkaskaden [Kirshner et al. 2006].

Darüber hinaus gilt es aber zu berücksichtigen, dass Veränderungen im TGFB1-Gehalt im Plasma auch durch andere Faktoren, wie zum Beispiel Bestrahlung oder aber generell durch Stress induziert werden [Randall et al. 1995,1996; Krüse et al. 1999]. Des Weiteren demonstrieren Kanamoto et al. (2000) Konzentrationsveränderungen in 38 Proteinen durch TGFB1, unter anderem von Caspase1, welches durch das TGFB1-Signal verringert exprimiert wird. Da dieses Protein an der Reifung proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist [Nicholson und Thornberry, 1997], kann möglicherweise der TGFB1 C509T-Polymorphismus die Prozesse der Entzündungsantwort stören, wodurch sich der Einfluss des SNPs auf das Erythemrisiko erklären ließe.

5.3.2 Bedeutung des Polymorphismus G751T im XPD-Gen für das Erythemrisiko

Das XPD-Gen (Xeroderma Pigmentosum Deficient-Gen) gehört zu einer Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, welche an der Nukleotidexzisionsreperatur (NER) beteiligt sind. Das Genprodukt von XPD agiert als ATP-abhängige 5´-3´-Helikase in Verbindung mit dem TFII (Transkriptionsfaktor)-Komplex und spielt eine wichtige Rolle in der NER, ist aber auch an der Initiation der Transkription und an der Apoptose beteiligt [Wang et al. 1996].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein protektiver Effekt des G751T-Polymorphismus im XPD-Gen auf das Erythemrisiko beobachtet. Während 64 % der Patientinnen des Wildtyp-Genotyps GG ein schweres Erythem entwickelten, waren es in der Gruppe der Patientinnen mit zwei polymorphen Allelen (TT) nur 47 %. Die Bedeutung dieses Polymorphismus für das Risiko strahleninduzierter Nebenwirkungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einigen Arbeiten wurde keine Korrelation zwischen den Genotypen und der Reparaturkapazität beobachtet [Møller et al. 2000]. Andere Autoren konnten eine verminderte Reparaturkapazität bzw. ein erhöhtes Krebsrisiko in Individuen mit dem polymorphen TT Allel nachweisen [Sturgis et al. 2002]. In einigen Studien wurde ein signifikanter Einfluss des Genotyps auf die DNA-Reparatur bei Krebspatienten beobachtet, während der Einfluss in gesunden Kontrollgruppen nicht signifikant war [Spitz et al. 2001]. Einen protektiven Effekt der XPD-Variante konnten Chang-Claude et al. (2005) nachweisen. In jener Arbeit wurde die Assoziation zwischen SNPs in Reparaturgenen (XRCC1, APE1 und XPD) und akuten Nebenwirkungen nach Bestrahlung bei Brustkrebspatientinnen untersucht. Dabei zeigten Individuen mit dem TT-Genotyp im XPD-Gen eine verminderte klinische Strahlenempfindlichkeit, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Lunn et al. (2000) stellten fest, dass Individuen mit dem GG-Genotyp eine höhere Anzahl an Chromatidaberrationen aufweisen als Individuen mit dem polymorphen Allel TT. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung das häufige Allel G verändere das Proteinprodukt so, dass es zu einer suboptimalen Reparatur von DNA-Schäden kommt, wie sie zum Beispiel durch Strahlenbelastung induziert werden. Die biochemischen Mechanismen, welche in den Varianten eine effektivere DNA-Reparatur bedingen könnten, wurden bislang nicht gefunden.

Auch wenn eine Rolle der verschiedenen Polymorphismen für das Nebenwirkungsrisiko nach Strahlentherapie beschrieben werden kann, ist die Bedeutung der SNPs für die molekularen und zellulären Prozesse bislang nur unzureichend geklärt. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung ergeben sich eine Reihe von Fragestellungen, insbesondere bezüglich der Bedeutung von TGFB1 für die klinische und zelluläre Strahlenempfindlichkeit, welche in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden sollten.

5.3.3 Bedeutung der Kombination von Risikoallelen für das Erythemrisiko

Wie in den Abbildungen 4.17 und 4.18 verdeutlicht, nimmt das Erythemrisiko mit der Anzahl der Risikoallele zu. Das Risiko steigt von 40 % ohne-, auf 100 % bei vier Risi-

koallelen. Wie zu erwarten ist dieser Effekt deutlicher, wenn das Patientenkollektiv bezüglich des als konfundierend nachgewiesenen Brustvolumens stratifiziert wird. Das Risiko nimmt in diesem Fall von 20 % auf 100 % zu, wobei schon bei zwei Risikoallelen ein 100 %iges Risiko erreicht wird. Die Ergebnisse sind dennoch vorsichtig und nur als Hinweis auf den zu erwartenden Effekt zu interpretieren, da die geringen Fallzahlen zu Schwankungen führen und zwischen zwei und vier Risikoallelen keine stringente Alledosisabhängigkeit demonstriert werden konnte.

Generell stimmen diese Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen überein. So berichten eine Reihe von Untersuchungen eine Zunahme des Nebenwirkungsrisikos mit der Anzahl an definierten Risikoallelen. Auch in der analog durchgeführten Studie der Arbeitsgruppe zum Einfluss von Polymorphismen auf das Fibrosesrisiko [Zschenker et al. 2010] konnte die Zunahme des Risikos mit steigender Anzahl der Risikoallele nachgewiesen werden. In der aktuellen Literatur wird mit genereller Übereinstimmung darauf hingewiesen, dass an der Pathogenese komplexer klinischer Endpunkte, wie Erythem oder Fibrose, eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse und Signalwege beteiligt sind, wodurch die Anzahl der möglichen determinierenden Faktoren als sehr umfangreich einzuschätzen ist. Daraus folgt, dass ein einzelner Polymorphismus zwangsläufig nur einen geringen Effekt haben kann, diese Effekte sich aber aufsummieren können und somit möglicherweise die Kombination einzelner SNPs über die Stärke des resultierenden Effektes bestimmt. Aus diesen Überlegungen ergibt sich eine Anpassung der experimentellen Strategien. So hat sich in den letzten Jahren die Ansicht durchgesetzt, dass der sogenannte „candidate-gene-approach“, dem auch die vorliegende Arbeit folgt, durch Untersuchungen von SNPs in funktionellen Netzwerken beziehungsweise durch „whole-genome-wide-association-studies“ Ergänzung finden müssen. Letztere bringen aber erhebliche methodische und insbesondere statistische Herausforderungen mit sich. Diesen zu begegnen ist Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsvorhaben. Mit dem Zusammenschluss aller auf dem Gebiet tätigen internationalen Arbeitsgruppen im „Radiogenomic Consortium“ ist aktuell eine Plattform entstanden, die eine effektive Zusammenarbeit ermöglichen soll, mit dem Ziel umfassende Daten zu erheben und die komplexen Zusammenhänge der genetisch determinierten Strahlenempfindlichkeit aufzuklären [West et al. 2010].

5.4 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit als Determinante des Erythemrisikos

Die Strahlenempfindlichkeit der Brustkrebspatientinnen wurde im Rahmen dieser Arbeit bezüglich des klinischen Endpunktes des schweren Erythems beurteilt. Darüber hinaus wurde im Rahmen einer früheren Studie [Hoeller et al. 2003] auch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der Patientinnen mittels des G0/1-Assays bestimmt (Abbildung 4.10/11). Die Berechtigung diesen Parameter als Surrogatmarker der Strahlenempfindlichkeit anzusehen, ergibt sich aus umfangreichen Untersuchungen der Arbeitsgruppe an humanen Hautfibroblasten von Normalspendern, anhand derer eine eindeutige Korrelation strahleninduzierter chromosomaler Aberrationen und dem klonogenen Überleben nachgewiesen werden konnte [Borgmann et al. 2004]. Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit variierte innerhalb der Brustkrebspatientinnen deutlich, wobei das Maß der Variationen den Werten anderer Studien entspricht [Johansen et al. 1996, Oppitz et al. 2001, Hoeller et al. 2003]. Im Rahmen einer weiteren Untersuchung der Arbeitsgruppe konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und dem Erythemrisiko nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Zusammenhänge müssen genetische Variationen, welche die zelluläre Strahlenempfindlichkeit beeinflussen, für die Variationen der klinischen Strahlenempfindlichkeit verantwortlich gemacht werden. Der experimentelle Nachweis dieses Zusammenhangs war unter anderem Ziel der vorliegenden Arbeit. Das negative Ergebnis ist insofern überraschend, da zum einen eine Assoziation der untersuchten Polymorphismen mit dem klinischen Endpunkt nachgewiesen, die Vermittlung dieser Prozesse über die zelluläre Strahlenempfindlichkeit aber nicht dokumentiert werden konnte. Dieses kann darin begründet sein, dass die untersuchte Anzahl an Patienten zu gering war. Das untersuchte Patientinnenkollektiv überzeugt durch seine sehr strengen Einschlusskriterien und in der nahezu identischen Dosis für alle Patientinnen. Die Variabilität der applizierten Dosis ist ein Parameter, der in den allermeisten vergleichbaren Untersuchungen mit wesentlich größeren Schwankungen versehen ist, sodass die Größe des verwendeten Patientinnenkollektivs nicht als kritischer limitierender Faktor für die Güte der vorliegenden Untersuchung angesehen werden kann. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass die Strategie des „candidate gene approach“ im Vorfeld nicht die relevanten genetischen Variationen identifiziert hat. Die untersuchten SNPs wurden zwar in der Literatur als nebenwirkungsassoziiert beschrieben, doch beziehen sich die Ergebnisse größtenteils auf klinische und nicht zelluläre Endpunkte. Zukünftige Untersuchungen werden diesbezüglich benötigt, um diejenigen Polymorphismen zu identifizieren, die maßgeblich die zelluläre Strahlenempfindlichkeit determinieren. Wie aber

schon für die Pathogenese der klinischen Endpunkte beschrieben, ist anzunehmen, dass auch in den komplexen Pathways, welche an der Entstehung und Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden beteiligt sind, nicht einzelne SNPs von entscheidender Bedeutung sind, sondern Kombinationen von SNPs, in Wechselwirkung mit genetischen Varianten in benachbarten Signalwegen, die die individuelle Strahlenempfindlichkeit determinieren.

5.5 Bedeutung der SNPs für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Im Gegensatz zum klinischen Endpunkt des Erythemrisikos konnte keine eindeutige Assoziation zwischen dem Vorhandensein der untersuchten SNPs und der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden. Obwohl, wie in den Abbildungen 4.15 und 4.16 dargestellt, der TT-Genotyp des 509T-Polymorphismus im TGFB1-Gen bzw. der GG-Genotyp des SNPs im XPD-Gen maximale Werte der als Indikator der zellulären Strahlenempfindlichkeit bestimmten zusätzlichen DNA-Fragmente nach 6 Gy erreichen. Dieses Ergebnis folgt generell der Erwartung, dass eben diese Genotypen, welche mit einer erhöhten klinischen Empfindlichkeit assoziiert sind, sich auch durch eine maximale zelluläre Strahlenempfindlichkeit auszeichnen. Jedoch erreichen die Ergebnisse keine statistische Signifikanz ($p=0.24$ bzw. 0.45 , Post test for linear trend). Die Unterschiede der zellulären Strahlenempfindlichkeit zwischen den verschiedenen Genotypen sind zu gering ausgeprägt, um die klinische Assoziation mit dem entsprechenden Genotyp plausibel erklären zu können. Offensichtlich werden die Unterschiede der klinischen Strahlenempfindlichkeit nicht maßgeblich durch den Einfluss der untersuchten Polymorphismen determiniert. Es gilt in zukünftigen Studien zu klären, welche genetischen Varianten für die Unterschiede der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeiten verantwortlich sind, wobei wie bereits ausgeführt, besonderer Schwerpunkt auf Polymorphismen in funktionellen Netzwerken gelegt werden sollte, da auch dieser Endpunkt durch die Kombination mehrerer relevanter SNPs determiniert sein kann [de Ruyck et al. 2005, Alsbeih et al. 2007].

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit steht in direktem Zusammenhang mit vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Identifizierung klinisch relevanter Parameter, welche zur Charakterisierung der individuellen Strahlenempfindlichkeit genutzt werden können. Während sich frühere Arbeiten auf die Untersuchung zellulärer Endpunkte konzentrierten, wurden im Rahmen dieser Arbeit genetische Variablen als Determinanten der Strahlenempfindlichkeit untersucht.

Als Endpunkt der individuellen Strahlenempfindlichkeit wurden sowohl die klinischen Symptome des akuten schweren Erythems nach Strahlentherapie als auch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit erfasst. Letztere wurden bereits in früheren Studien bestimmt und im Rahmen der vorliegenden Untersuchung bezüglich der genetischen Determinanten interpretiert.

Die Studie umfasste insgesamt 83 Patientinnen, welche mit einer brusterhaltenden, kurativen Strahlentherapie behandelt wurden. Die Evaluation der akuten Nebenwirkungen erfolgte mittels des RTOG-Klassifizierungssystems, wobei ausschließlich das Hauterythem nach einer Gesamtdosis von 50.4 Gy als objektiv messbare Nebenwirkung berücksichtigt wurde. Von den Patientinnen entwickelten 55 % ein Erythem Grad 2 oder 3, was generell der klinischen Erfahrung entspricht. Als wichtige Einflussgröße für die Akuttoxizität wurde das Brustvolumen in diesem Patientinnenkollektiv identifiziert.

Als genetische Determinanten wurden Einzelnukleotidpolymorphismen untersucht. Dabei wurden, dem "candidate-gene-approach" folgend, SNPs in Genen ausgewählt, welche an der Entstehung beziehungsweise der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind und für die bereits in der Literatur eine Assoziation mit dem Nebenwirkungsrisiko nach Strahlentherapie dokumentiert wurde. Dies waren die SNPs: ATM (G5557A, rs1801516), GSTP1 (A105G, rs1695), SOD2 (C1183T, rs4880), TGFB1 (C509T, rs1800469), XPD (G751T, rs13181) und XRCC1 (G399A rs25487). Die gleichen SNPs waren bereits im Rahmen einer früheren Studie der Arbeitsgruppe bezüglich ihres Einflusses auf strahlenbedingte Spättoxizitäten nach Strahlentherapie untersucht worden. Somit kann die vorliegende Arbeit erstmalig Aussagen bezüglich des Einflusses der untersuchten SNPs treffen, nicht nur in Bezug auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, sondern auch auf das akute und späte klinische Nebenwirkungsrisiko.

Die Genotypisierung der Patientinnen erfolgte mittels PCR-basierter RFLP-Methode beziehungsweise, wenn diese aus technischen Gründen nicht anwendbar war, mittels

MALDI-TOF. In einem methodischen Teil der Arbeit wurden wesentliche Optimierungen der angewendeten Methoden erarbeitet. Insbesondere bezüglich der Aufreinigung der PCR-Produkte und der PCR-Protokolle konnten wesentliche Fortschritte erzielt werden, welche in die Laborpraxis übernommen wurden.

Die Ergebnisse bezüglich der Genotyp-Verteilungen entsprachen für vier der untersuchten SNPs den aus der Literatur bekannten Verteilungen eines europäischen Kontrollkollektivs. Die Genotypverteilungen der Polymorphismen im SOD2- bzw. im XRCC1-Gen entsprachen nicht dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und wurden bei der Analyse der Daten nicht weiter berücksichtigt.

Während die Genotyp-Verteilung der Polymorphismen im ATM- und GSTP1-Gen keine Assoziation mit dem Erythemrisiko zeigten, konnten für den SNP im TGFB1-Gen das polymorphe T-Allel sowie für den SNP im XPD-Gen das nicht-polymorphe G-Allel als Risikoallel des strahleninduzierten Erythems identifiziert werden. Die weitere Analyse ergab, dass das Nebenwirkungsrisiko mit der Anzahl an Risikoallelen zunimmt. Diese Beobachtung findet Bestätigung in der aktuellen Literatur.

Bezüglich des Einflusses der untersuchten SNPs auf die individuelle zelluläre Strahlenempfindlichkeit zeigte sich überraschenderweise keine signifikante Korrelation. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum einen die Relevanz von SNPs für das Risiko strahleninduzierter Nebenwirkungen bestätigt werden, zum anderen konnte erstmals dokumentiert werden, dass klinische und zelluläre Strahlenempfindlichkeit nicht über dieselben genetischen Varianten vermittelt werden. Damit zeigt diese Arbeit erstmalig, dass die individuelle zelluläre Strahlenempfindlichkeit nicht über dieselben Polymorphismen vermittelt wird, welche die klinische Strahlenempfindlichkeit determinieren.

6.1 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die individuelle Strahlenempfindlichkeit findet ihre Ausprägung einerseits in der zellulären Strahlenempfindlichkeit aller somatischen Zellen eines Individuums und andererseits in der Schwere klinischer Symptome strahleninduzierter Nebenwirkungen. Als Maß der individuellen Strahlenempfindlichkeit dient die an Lymphozyten experimentell quantifizierbare zelluläre Strahlenempfindlichkeit. Deren Variationen folgen innerhalb eines Kollektivs einer Normalverteilung und sind somit durch einen kontinuierlichen Verlauf geprägt. Die Einordnung eines individuellen Patienten als "strahlensensitiv" bzw. "resistent" geschieht somit in Relation zum Mittelwert eines Kollektivs.

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist nachweislich genetisch determiniert [Borgmann et al. 2007] und mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit streng assoziiert [Hoeller et

al. 2003]. Dieser Zusammenhang bietet die Grundlage der vorliegenden Arbeit in welcher SNPs als genetische Determinanten der zellulären Strahlenempfindlichkeit sowie der akuten Radiotoxizität untersucht wurden. Die Ergebnisse ergänzen vorangegangene Untersuchungen, in denen die genetischen Determinanten strahleninduzierter Spätnebenwirkungen untersucht wurden.

Zusammenfassend kann nun festgestellt werden, dass die untersuchten SNPs die zelluläre Strahlenempfindlichkeit nicht maßgeblich determinieren und dass der Polymorphismus C509T im TGFB1-Gen, sowohl an der Ausprägung der akuten- als auch der späten Radiotoxizität beteiligt ist.

Bezüglich der Bedeutung von SNPs als Indikatoren der klinischen Strahlenempfindlichkeit zeigt sich, dass die komplexen klinischen Symptome als Summe des Effektes zahlreicher genetischer Varianten zu betrachten sind. Somit sind nicht einzelne SNPs als Vermittler der klinischen Strahlenempfindlichkeit anzusehen, vielmehr werden Kombinationen von SNPs für die verschiedenen phänotypischen Unterschiede verantwortlich zu machen sein.

Wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass der C509T-SNP des TGFB1-Gens mit dem Erythemrisiko assoziiert ist. Da dieser SNP auch mit dem Risiko radiogener Spätnebenwirkungen assoziiert ist, sind weitere experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung dieses Polymorphismus für die Strahlenempfindlichkeit wünschenswert. Diese sollten von der Aufklärung der Bedeutung von TGFB1 für die zelluläre sowie klinische Strahlenempfindlichkeit begleitet werden.

Zur systematischen Untersuchung dieser Fragestellung bieten sich *in-vitro* Experimente an, in denen geklärt werden muss, inwieweit der C509T-Polymorphismus die TGFB1-Protein- sowie Genexpression und darüberhinaus die zelluläre Strahlenempfindlichkeit *in vitro* beeinflusst. Weiterführende Experimente zu diesen Fragestellungen wurden als direkte Folge der hier dargestellten Erkenntnisse initiiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S, El-Badawy SA, Khaled HM, Seifeldin IA, Levin B. (2000). Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.* 159(1):79-86.
- Ahn J, Ambrosone CB, Kanetsky PA, Tian C, Lehman TA, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Chang-Claude J. (2006). Polymorphisms in genes related to oxidative stress (CAT, MnSOD, MPO, and eNOS) and acute toxicities from radiation therapy following lumpectomy for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 12(23):7063-70.
- Alsbeih GH, Medhat ES Najla AH, Muneera AB, Khaled AH, Nasser AR. (2007). Radiosensitivity of human fibroblasts is associated with amino acid substitution variants in susceptible genes and correlates with the number of risk alleles. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 68(1): 229–235.
- Ambrosone CB, Tian C, Ahn J, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Chang-Claude J. (2006). Genetic predictors of acute toxicities related to radiation therapy following lumpectomy for breast cancer: a case-series study. *Breast Cancer Res.* 8(4):R40.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J. (2003). Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol.* 69(2):127-35.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J, Herskind C, Haviland J, Owen R, Homewood J, Bliss J, Yarnold J. (2005a). TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother Oncol.* 75(1):18-21.
- Andreassen CN. (2005b). Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? *Acta Oncol.* 44(8):801-15.
- Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, Overgaard M, Herskind C, Cesaretti JA, Atencio DP, Green S, Formenti SC, Stock RG, Rosenstein BS. (2006a). ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 64(3):776-83.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sørensen FB, Overgaard J. (2006b). 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(8):577-86.
- Angèle S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, Jongmans W, Cox DG, Pisani P, Gérard JP, Hall J. (2003). ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res.* 63(24):8717-25.
- Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL. (1990). Transforming growth factor-beta 1 expression in irradiated liver. *Radiat Res.* 122(1):77-85.
- Archambeau JO, Penzer R and Wassermann T. (1995). Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 31, 1171-85.
- Appleby JM, Barber JB, Levine E, Varley JM, Taylor AM, Stankovic T, Heighway J, Warren C, Scott D. (1997). Absence of mutations in the ATM gene in breast

- cancer patients with severe responses to radiotherapy. *Br J Cancer*. 76(12):1546-9.
- Balding DJ. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 7(10):781-91. Review.
- Barcellos-Hoff MH, Dix TA. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol*. 10(9):1077-83.
- Begg AC, Russell NS, Knaken H, Lebesque JV. (1993). Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 64(4):393-405.
- Bentzen SM, Overgaard M. (1991). Relationship between early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy. *Radiother Oncol*. 20(3):159-65.
- Bentzen SM, Overgaard M. (1993). Early and late normal tissue injury after postmastectomy radiotherapy. *Recent Results Cancer Res*. 130:59-78. Review.
- Bentzen SM. (1997). Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol*. 43(2):121-31. Review.
- Bentzen SM, Hendry JH. (1999). Variability in the radiosensitivity of normal cells and tissues. Report from a workshop organised by the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology in Edinburgh, UK, 19 September 1998. *Int J Radiat Biol*. 75(4):513-7.
- Bernstein EF, Sullivan FJ, Mitchell JB, Salomon GD and Glatstein E. (1993). Biology of chronic radiation effect in tissues and wound healing. *Clin Plast Surg*. 20, 453-53.
- Bernier J, Thames HD, Smith CD, Horiot JC. (1998). Tumor response, mucosal reactions and late effects after conventional and hyperfractionated radiotherapy. *Radiother Oncol*. 47(2):137-43.
- Blichert-Toft M, Rose C, Andersen JA, Overgaard M, Axelsson CK, Andersen KW, Mouridsen HT. (1992). Danish randomized trial comparing breast conservation therapy with mastectomy: six years of life-table analysis. Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst Monogr*. (11):19-25.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 342(18):1350-8. Review.
- Borgmann K, Röper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J. (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(2):141-52.
- Borgmann K, Dede M, Wrona A, Brammer I, Overgaard J, Dikomey E. (2004). For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 58(2):445-52.
- Borgmann K, Haeberle D, Doerk T, Busjahn A, Stephan G, Dikomey E. (2007). Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes. *Radiother Oncol*. 83(2):196-202.
- Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Röper B, Brackrock S, Petersen C, Szymczak S, Ziegler A, Feyer P, Alberti W, Dikomey E. (2008). Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 71(1):256-64.
- Bremer M, Klöpffer K, Yamini P, Bendix-Waltes R, Dörk T, Karstens JH. (2003). Clinical radiosensitivity in breast cancer patients carrying pathogenic ATM gene mu-

- tations: no observation of increased radiation-induced acute or late effects. *Radiother Oncol.* 69(2):155-60.
- Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, Peters LJ. (1995). Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 32(5):1371-9.
- Brookes AJ. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234(2):177-86. Review.
- Buchholz TA, Wu X, Hussain A, Tucker SL, Mills GB, Haffty B, Bergh S, Story M, Geara FB, Brock WA. (2002). Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Int J Cancer* 97(5):557-61.
- Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. (1992). Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339(8809):1570-1.
- Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH. (1994). The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother Oncol.* 33(3):228-38.
- Burnet NG, Peacock JH. (2002). Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol.* 62(3):350-1; author reply 351-2.
- Burri RJ, Stock RG, Cesaretti JA, Atencio DP, Peters S, Peters CA, Fan G, Stone NN, Ostrer H, Rosenstein BS. (2008). Association of single nucleotide polymorphisms in SOD2, XRCC1 and XRCC3 with susceptibility for the development of adverse effects resulting from radiotherapy for prostate cancer. *Radiat Res.* 170(1):49-59.
- Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Auflage.* Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München - Jena
- Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. (1996). Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 28(5):881-7.
- Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S, Atencio DA, Bernstein JL, Stone NN, Wallenstein S, Green S, Loeb K, Kollmeier M, Smith M, Rosenstein BS. (2005). ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 61(1):196-202.
- Chappell S, Guetta-Baranés T, Batowski K, Yiannakis E, Morgan K, O'Connor C, MacNee W, Kalsheker N. (2004). Haplotypes of the alpha-1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. *Hum Mutat.* 24(6):535-6.
- Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Ambrosone CB. (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(13):4802-9.
- Clarke RA, Goozee GR, Birrell G, Fang ZM, Hasnain H, Lavin M, Kearsley JH. (1998). Absence of ATM truncations in patients with severe acute radiation reactions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 41(5):1021-7.

- Davì G, Guagnano MT, Ciabattoni G, Basili S, Falco A, Marinopiccoli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. (2002). Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA*. 288(16):2008-14.
- de Boer J, Hoeijmakers JH. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 21(3):453-60.
- De Ruyck K, Wilding CS, Van Eijkeren M, Morthier R, Tawn EJ, Thierens H. (2005a). Microsatellite polymorphisms in DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 in patients with gynecological tumors: association with late clinical radiosensitivity and cancer incidence. *Radiat*. 164(3):237-44.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, De Ridder L, Thierens H. (2005b). 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(4):1140-9.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Bacher K, Vral A, De Neve W, Thierens H. (2006). TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 65(4):1240-8.
- Department of Genetics and Genomic Biology, MaRS Centre - East Tower, 101 College Street, Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada. Database of Genomic Variants - The Centre for Applied Genomics, <http://projects.tcag.ca/variation/>[Stand: 17.12. 2010, 12:45 Uhr]
- Dikomey E, Borgmann K, Brammer I, Kasten-Pisula U. (2003a). Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology* 193(1-2):125-35.
- Dikomey E, Borgmann K, Peacock J, Jung H. (2003b). 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(4):1194-200.
- Dörr W. and Hendry J. (2001). Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol*. 61, 223-31.
- Dörr W. (1997). Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *Int J Radiat Biol*. 72(6):635-43.
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT. (2000). Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*. 21(5):965-71. Erratum in: *Carcinogenesis* 2000 Jul;21(7):1457.
- Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Wiencke JK, Kelsey KT. (2002). A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 62(16):4630-6.
- Duncan W, MacDougall R.H and Kerr G.R. et al. (1996). Adverse effect of treatment gaps in the outcome of radiotherapy for laryngeal cancer, *Radiother Oncol*. 41 pp. 203–207.
- Edvardsen H, Kristensen VN, Grenaker Alnaes GI, Bøhn M, Erikstein B, Helland A, Børresen-Dale AL, Fosså SD. (2007). Germline glutathione S-transferase variants in breast cancer: relation to diagnosis and cutaneous long-term adverse ef-

- fects after two fractionation patterns of radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 67(4):1163-71.
- Egly JM. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIH: from transcription to clinic. *FEBS Lett.* 498(2-3):124-8. Review.
- Fajardo, L. F. and Berthrong, M. (1981). Radiation injury in surgical pathology. Part III. Salivary glands, pancreas and skin. *Am J Surg Pathol.* 5, 279-96.
- Fenster CP, Weinsier RL, Darley-Usmar VM, Patel RP. (2002). Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes Res.*10(9):964-8.
- Fernando IN, Powles TJ, Ashley S, Grafton D, Harmer CL, Ford HT. (1996). An acute toxicity study on the effects of synchronous chemotherapy and radiotherapy in early stage breast cancer after conservative surgery. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 8(4):234-8.
- Fernando IN, Ford HT, Powles TJ, Ashley S, Glees JP, Torr M, Grafton D, Harmer CL. (1996b). Factors affecting acute skin toxicity in patients having breast irradiation after conservative surgery: a prospective study of treatment practice at the Royal Marsden Hospital. *Clin Oncol. (R Coll Radiol).* 8(4):226-33.
- Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L, Andrulis IL, Ozcelik H. (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(4):583-91.
- Findlay PA, Lippman ME, Danforth D Jr, McDonald H, d'Angelo T, Gorrell CR, Gerber NL, Schain W, Lichter AS. (1985). Mastectomy versus radiotherapy as treatment for stage I-II breast cancer: a prospective randomized trial at the National Cancer Institute. *World J Surg.* 9(5):671-5.
- Fillipi AR, Franco P, Ricardi U. (2006). Is clinical radiosensitivity a complex genetically controlled event? *Tumori.* 92(2):87-91.
- Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. (1986). Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet.* 12(3):281-8.
- Gaffney DK, Brohet RM, Lewis CM, Holden JA, Buys SS, Neuhausen SL, Steele L, Avizonis V, Stewart JR, Cannon-Albright LA. (1998). Response to radiation therapy and prognosis in breast cancer patients with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Radiother Oncol.* 47(2):129-36.
- GD-Gesellschaft für Dermopharmazie e.V. Dermotherapie Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF β).
http://www.dermotopics.de/german/ausgabe_1_02_d/transformwachs_01_02_d.htm [Stand: 17.12. 2010, 12:45 Uhr]
- Giotopoulos G, Symonds RP, Foweraker K, Griffin M, Peat I, Osman A, Plumb M. (2007). The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br J Cancer* 96(6):1001-7. Epub 2007 Feb 27.
- Goode EL, Dunning AM, Kuschel B, Healey CS, Day NE, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PP. (2002). Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study. *Cancer Res.* 62(11):3052-7. PMID: 12036913.
- Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ. Ataxia telangiectasia. (1967). Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am J Dis Child.* 114(6):617-25.

- Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. (1999). Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.*8(1):93-7.
- Green H, Ross G, Peacock J, Owen R, Yarnold J, Houlston R. (2002). Variation in the manganese superoxide dismutase gene (SOD2) is not a major cause of radiotherapy complications in breast cancer patients. *Radiother Oncol.* 63(2):213-6.
- Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM 3rd. (2000). Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res.* 28(20):3871-9.
- Hanning J, Zhang D, Canaday DJ, Beckett MA, Astumian RD, Weichselbaum RR and Lee RC. (2000). Surfactant sealing of membranes permeabilized by ionizing radiation. *Radiat Res.* 154, 171-7.
- Harper JL, Franklin LE, Jenrette JM, Aguero EG. (2004). Skin toxicity during breast irradiation: pathophysiology and management. *South Med J.* 97(10):989-93. Review.
- Hart RM, Kimler BF, Evans RG, Park CH. (1987). Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*13(8):1237-40.
- Heemsbergen WD, Peeters ST, Koper PC, Hoogeman MS, Lebesque JV. (2006). Acute and late gastrointestinal toxicity after radiotherapy in prostate cancer patients: consequential late damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 66(1):3-10. Epub 2006 Jul 11.
- Henne-Bruns D, Düring M., Kremer B. (2003). *Duale Reihe CHIRURGIE.* Thieme Verlag, Stuttgart
- Hermann T, Baumann M. Dörr W. (2006). *Klinische Strahlenbiologie –kurz und bündig-*, 4. Auflage, Elsevier Urban und Fischer, München, Jena
- Hildebrandt G, Maggiorella L, Rodel F, Rodel V, Willis D and Trott KR. (2002). Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 78, 315-25.
- Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S, Shimizu A, Iwatani Y, Akamizu T. (2005). Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(5):2898-903.
- Hoeijmakers JH. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas* 38(1):17-22; discussion 22-3. Review.
- Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeiy A, Bajrovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E. (2003). Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.* 69(2):137-44.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65–70).
- Hopewell JW. (1990). The skin: its structure and response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 57, 751-73.
- Hopewell JW, Nyman J, Turesson I. (2003). Time factor for acute tissue reactions following fractionated irradiation: a balance between repopulation and enhanced radiosensitivity. *Int J Radiat Biol.* 79(7):513-24.

- Hölscher T, Bentzen SM, Baumann M. (2006). Influence of connective tissue diseases on the expression of radiation side effects: a systematic review. *Radiother Oncol.* 78(2):123-30. Epub 2006 Jan 30. Review.
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22(6):917-22.
- Hu XF, Zhang XR, Xue A, Cao XR. (2002). Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the patients with persistent vegetative state in the Chinese. *Yi Chuan Xue Bao* 29(9):757-60.
- Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. (1997). Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA.* 278(17):1407-11.
- Iannuzzi CM, Atencio DP, Green S, Stock RG and Rosenstein BS. (2002). ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase of irradiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 52, 606-13.
- İğdem S, Spiegel DY, Efstathiou J, Miller RC, Poortmans PM, Koca S, Kiliç-Unsal D, Okkan S, Zietman A. (2010) Prostatic duct adenocarcinoma: clinical characteristics, treatment options, and outcomes - a Rare Cancer Network study. *Onkologje* 33(4):169-73.
- Jereczek-Fossa BA, Jassem J, Badzio A. (2002). Relationship between acute and late normal tissue injury after postoperative radiotherapy in endometrial cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 52(2):476-82.
- Jung H, Beck-Bornholdt HP, Svoboda V, Alberti W, Herrmann T. (2001). Quantification of late complications after radiation therapy. *Radiother Oncol.* 61(3):233-46.
- Jones B, Tan LT, Dale RG. (1995). Derivation of the optimum dose per fraction from the linear quadratic model. *Br J Radiol.* 68(812):894-902.
- Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M. (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(2):101-9.
- Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, Harth V, Rabstein S, Baisch C, Vollmert C, Illig T, Ko YD, Brüning T, Brauch H. (2004). ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(12):2059-64.
- Kanamoto T, Hellmann U, Helldin CH and Souchelnytskyi, S. (2002). Funktional proteomics of transforming growth factor- β 1-stimulated Mv1Lu stimulated cells: Rad 51 as a target of TGF β 1- dependent regulation of DNA repair. *The EMBO Journal* Vol.21 No. 5 pp. 1219-1230.
- Kanzaki T, Olofsson A, Morén A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L, Helldin CH. (1990). TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61(6):1051-61.
- Kasten U, Plottner N, Johansen J, Overgaard J, Dikomey E. (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(7-8):1037-41.

- Kasten-Pisula U, Tastan H, Dikomey E. (2005). Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol.* 81(6):409-19.
- Kasten-Pisula U, Windhorst S, Dahm-Daphi J, Mayr G, Dikomey E. (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(3):296-303.
- Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ; Framingham Study. (2003). Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(3):434-9. Epub 2003 Jan 30.
- Kelsey-JL, Horn-Ross-PL. (1993). Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiol-Rev.* 15(1): 7-16.
- Kim SJ, Denhez F, Kim KY, Holt JT, Sporn MB, Roberts AB. (1989). Activation of the second promoter of the transforming growth factor-beta 1 gene by transforming growth factor-beta 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. *J Biol Chem.* 264(32):19373-8.
- Kirshner J, Jobling MF, Pajares MJ, Ravani SA, Glick AB, Lavin MJ, Koslov S, Shiloh Y, Barcellos-Hoff MH. (2006). Inhibition of transforming growth factor-beta1 signaling attenuates ataxia telangiectasia mutated activity in response to genotoxic stress. *Cancer Res.* 66(22):10861-9. Epub 2006
- Kreienberg RV, Möbius V, Alt D (2002) Management des Mammakarzinoms. Ein Leitfaden für die Praxis. 2. Auflage Springer, Berlin Heidelberg New York
- Krüse JJ, Bart CI, Leer JW, Wondergem J. (1999). Detection and quantitative measurement of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene expression using a semi-nested competitive PCR assay. *Cytokine* 11(2):179-85.
- Kuptsova N, Chang-Claude J, Kropp S, Helmbold I, Schmezer P, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Onel K, Ambrosone CB. (2008). Genetic predictors of long-term toxicities after radiation therapy for breast cancer. *Int J Cancer* 122(6):1333-9.
- Ladiges W, Wiley J, MacAuley A. (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 124(1):27-32.
- Lamerdin JE, Montgomery MA, Stilwagen SA, Scheidecker LK, Tebbs RS, Brookman KW, Thompson LH, Carrano AV. (1995). Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics* 25(2):547-54.
- Leadon SA, Cooper PK. (1993). Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22):10499-503.
- Lehmann AR. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochemie* 85(11):1101-11. Review.
- Leong T, Whitty J, Keilar M, Mifsud S, Ramsay J, Birrell G, Venter D, Southey M, McKay M. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 cancer predisposition genes in radiation hypersensitive cancer patients. (2000). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 48(4):959-65.
- Letterio JJ, Roberts AB. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 16:137-61.

- Li J, Dai CH, Shi SB, Bao QL, Yu LC, Wu JR. (2010). Induction concurrent chemoradiotherapy compared with induction radiotherapy for superior sulcus non-small cell lung cancer: a retrospective study., *Asia Pac J Clin Oncol.* 6(1):57-65.
- Lindahl T, Wood RD. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286(5446):1897-905. Review.
- Liu PY, Lu Y, Long JR, Xu FH, Shen H, Recker RR, Deng HW. (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(10):752-7.
- Longnecker M. (1994). Alcoholic beverage consumption in relation to risk: meta analysis and review. *Cancer Causes Control*, 5: 73 - 82
- López E, Guerrero R, Núñez MI, del Moral R, Villalobos M, Martínez-Galán J, Valenzuela MT, Muñoz-Gámez JA, Oliver FJ, Martín-Oliva D, Ruiz de Almodóvar JM. (2005). Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Res.*7(5):R690-8. Epub 2005 Jul 1.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA. (1999). XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res.* 59(11):2557-61.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA. (2000). XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21(4):551-5.
- Lyons RM, Moses HL. (1990). Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 187: 467-473.
- M. Müller, Chirurgie für Studium und Praxis 2006/7 Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen (Broschiert) Seite?
- Mackay RI, Hendry JH. (1999). The modelled benefits of individualizing radiotherapy patients' dose using cellular radiosensitivity assays with inherent variability. *Radiother Oncol.* 50(1):67-75.
- Mallet C, Vittet D, Feige JJ, Bailly S. (2006). TGFbeta1 induces vasculogenesis and inhibits angiogenic sprouting in an embryonic stem cell differentiation model: respective contribution of ALK1 and ALK5. *Stem Cells* 24(11):2420-7.
- Marcou Y, D'Andrea A, Jeggo PA, Plowman PN. (2001). Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol.* 60(1):75-9.
- Mariya Y, Sekizawa G, Matsuoka Y, Seki H, Sugawara T. (2010). Outcome of Stereotactic Radiosurgery for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Metastatic to The Brain. *J Radiat Res (Tokyo)*. [Epub ahead of print]
- Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Vineis P. (2001). XRCC1, XRCC3, XPD genepolymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22(9):1437-45.
- Massagué J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67: 753-791.
- McCord JM, Fridovich I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244(22):6056-63.

- Meeuse JJ, van der Linden YM, van Tienhoven G, Gans RO, Leer JW, Reyners AK; for the Dutch Bone Metastasis Study Group. (2010). Efficacy of radiotherapy for painful bone metastases during the last 12 weeks of life: results from the Dutch Bone Metastasis Study. *Cancer*. [Epub ahead of print]
- Miescher G. (1924). Das Röntgenerythem. *Strahlentherapie* 16, 333-371.
- Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH. (1988). Latent high molecular complex of transforming growth factor-beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem*. 263: 6407-6415.
- Mocellin S, Verdi D, Nitti D. (2009). DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis* 30(10):1735-43. Epub 2009 Aug 25. Review.
- Møller P, Wallin H, Dybdahl M, Frenz G, Nexø BA. (2000). Psoriasis patients with basal cell carcinoma have more repair-mediated DNA strand-breaks after UVC damage in lymphocytes than psoriasis patients without basal cell carcinoma. *Cancer Lett*. 151(2):187-92.
- Momm F, Bartelt S, Haigis K, Grosse-Sender A, Witucki G. (2005). Spectrophotometric skin measurements correlate with EORTC/RTOG-common toxicity criteria *Strahlenther Onkol*. 181(6):392-5.
- Montague ED, Fletcher GH. (1980). The curative value of irradiation in the treatment of nondisseminated breast cancer. *Cancer* 46(4 Suppl):995-8.
- Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW. (1968). Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *Am J Dis Child*. 116(5):557-8.
- Mototani H, Mabuchi A, Saito S, Fujioka M, Iida A, Takatori Y, Kotani A, Kubo T, Nakamura K, Sekine A, Murakami Y, Tsunoda T, Notoya K, Nakamura Y, Ikegawa S. (2005). A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 14(8):1009-17.
- Moullan N, Cox DG, Angèle S, Romestaing P, Gérard JP, Hall J. (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12(11 Pt 1):1168-74.
- Müller M, (2006/7), *Chirurgie für Studium und Praxis*, 8. Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
- Nakanishi M, Shimada M, Niida H. (2006). Genetic instability in cancer cells by impaired cell cycle checkpoints. *Cancer Sci*. 97(10):984-9.
- National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. The Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> [Stand: 17.12. 2010, 12:45 Uhr], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> [Stand: 17.12. 2010, 12:45 Uhr]
- Nicholson DW, Thornberry NA. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 22(8):299-306.
- Nicola NA. Structural aspects of cytokine/receptor interactions. (1995). *Ann N Y Acad Sci*. 766:253-62. Review.
- Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M (2001). The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol*. 77(1):105-10.
- Parshad R, Tarone RE, Price FM, Sanford KK. (1993). Cytogenetic evidence for differences in DNA incision activity in xeroderma pigmentosum group A, C and D cells after X-irradiation during G2 phase. *Mutat Res*. 294(2):149-55.

- Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J. (2000). Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol.* 55(2):173-8.
- Peters LJ. (1990). Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. *Radiother Oncol.* 17(3):177-90.
- Perera F, Chisela F, Stitt L, Engel J, Venkatesan V. (2005). TLD skin dose measurements and acute and late effects after lumpectomy and high-dose-rate brachytherapy only for early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 62(5):1283-90.
- Pierce LJ, Strawderman M, Narod SA, Oliviotta I, Eisen A, Dawson L, Gaffney D, Solin LJ, Nixon A, Garber J, Berg C, Isaacs C, Heimann R, Olopade OI, Haffty B, Weber BL. (2000). Effect of radiotherapy after breast-conserving treatment in women with breast cancer and germline BRCA1/2 mutations. *J Clin Oncol.* 18(19):3360-9.
- Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. (1990). An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol.* 63(752):624-8.
- Pollock R, Rivera VM. (1999). Regulation of gene expression with synthetic dimerizers *Methods Enzymol.* 306:263-81.
- Quarmby S, Fakhoury H, Levine E, Barber J, Wylie J, Hajeer AH, West C, Stewart A, Magee B, Kumar S. (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(2):137-43.
- Ramsay J, Birrell G. (1995). Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 31(2):339-44.
- Randall K, Coggle JE. (1995). Expression of transforming growth factor-beta 1 in mouse skin during the acute phase of radiation damage. *Int J Radiat Biol.* 68(3):301-9.
- Randall K, Coggle JE. (1996). Long-term expression of transforming growth factor TGF beta 1 in mouse skin after localized beta-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 70(3):351-60.
- Reiser M, Kuhn FP, Debus J, Duale Reihe – Radiologie, 2. Auflage 2006, Thieme Verlag, Stuttgart
- Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA. (1999). Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol.* 9(13):699-702.
- Rifkin DB. (2005). Latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteins: orchestrators of TGF- β availability *J. Biol. Chem.* 280,7409-7412.
- Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF. (2000). Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol.* 57(2):143-54.
- Roh MS, Colangelo LH, O'Connell MJ, Yothers G, Deutsch M, Allegra CJ, Kahlenberg MS, Baez-Diaz L, Ursiny CS, Petrelli NJ, Wolmark N. (2009). Preoperative multimodality therapy improves disease-free survival in patients with carcinoma of the rectum: NSABP R-03, *J Clin Oncol.* 27(31):5124-30.
- RTOG® 1818 Market Street, Suite 1600 Philadelphia, PA 19103-3604. Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria.

- <http://www.rtog.org/members/toxicity/acute.html#skin> [Stand: 17.12. 2010, 12:45 Uhr]
- Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ, Flentje M. (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(2):181-8.
- Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, Wannemacher M. (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(3):233-45.
- Russell NS, Begg AC. (2002). Editorial radiotherapy and oncology 2002: predictive assays for normal tissue damage. *Radiother Oncol.* 64(2):125-9.
- Sano M, Kuroi N, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Kokubun S. (2005). Association study of calcitonin-receptor-like receptor gene in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 18(3):403-8.
- Sarrazin D, Lê MG, Arriagada R, Contesso G, Fontaine F, Spielmann M, Rochard F, Le Chevalier T, Lacour J. (1989). Ten-year results of a randomized trial comparing a conservative treatment to mastectomy in early breast cancer., *Radiother Oncol.* 14(3):177-84.
- Sauer R, Dunst J (1989) Risikoadaptierte Strahlenbehandlung des Mammakarzinoms. In: Schmidt-Matthiesen H (Hrsg) *Spezielle gynäkologische Onkologie II*, 2. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, S 254
- Schaue D, Jahns J, Hildebrandt G and Trott KR. (2005). Radiation treatment of acute inflammation in mice. *Int J Radiat Biol.* 81, 657-67.
- Shiloh Y. (1997). Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet.* 31:635-62.
- Schindler D, Seyschab H, Poot M, Hoehn H, Schinzel A, Fryns JP, Tommerup N, Rabinovitch PS. (1987). Screening test for ataxia telangiectasia. *Lancet.* 2(8572):1398-9.
- Schmidt-Matthiesen H, Hepp H. (1998) *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 9. Auflage, Schattauer, Stuttgart
- Schmuth M, Sztankay A, Weinlich G, Linder DM, Wimmer MA, Fritsch PO and Fritsch E. (2001). Permeability barrier function of skin exposed to ionizing radiation. *Arch Dermatol.* 137, 1019-23.
- Shah R, Hurley CK, Posch, PE. (2006). A molecular mechanism for the differential regulation of TGF- β 1 expression due to the common SNP- 509 C-T (c. -1347C > T). *Hum Gent* 120:461-469.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 58(4):604-8.
- Shimazaki A, Kawamura Y, Kanazawa A, Sekine A, Saito S, Tsunoda T, Koya D, Babazono T, Tanaka Y, Matsuda M, Kawai K, Iizumi T, Imanishi M, Shinosaki T, Yanagimoto T, Ikeda M, Omachi S, Kashiwagi A, Kaku K, Iwamoto Y, Kawamori R, Kikkawa R, Nakajima M, Nakamura Y, Maeda S.(2005). Genetic variations in the gene encoding ELMO1 are associated with susceptibility to diabetic nephropathy. *Diabetes* 54(4):1171-8.
- Shu XO, Cai Q, Gao YT, Wen W, Jin F, Zheng W. (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(12):1462-7.

- Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD. (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(11):1573-5.
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA.* 279(7):535.
- Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q. (2001). Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res.* 61(4):1354-7.
- Stein MB, Fallin MD, Schork NJ, Gelernter J. (2005). COMT polymorphisms and anxiety-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 30(11):2092-102.
- Streffer C. (1997). Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben. *Strahlenther Onkol.* 173(9):462-8.
- Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Eicher SA, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. (2002). XPD/ERCC2 EXON 8 Polymorphisms: rarity and lack of significance in risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 38(5):475-7.
- Thompson LH, West MG. (2000). XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res.* 459(1):1-18. Review.
- Tretli S. (1989). Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway. *Int J Cancer.* 44(1):23-30.
- Tucker SL, Turesson I, Thames HD. (1992). Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer.* 28A(11):1783-91.
- Turesson I. (1990). Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19(6):1569-74.
- Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Odén A. (1996). Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 36(5):1065-75.
- Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Chang-Claude J. (2003). Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol.* 69(2):145-53.
- van Steeg H, Kraemer KH. (1999). Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today.* 5(2):86-94.
- Veness M, Richards S. (2003). Role of modern radiotherapy in treating skin cancer. *Australas J Dermatol.* 44(3):159-66; quiz 167-8.
- Veronesi U. (1989). Surgery limited to the breast for breast carcinoma, *Fortschr. Med.* 107(35):748-51.
- Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K. (2004). Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 25(5):757-63. Epub 2004 Jan 16.

- Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. (1988). Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem.*, 263: 7646-7654.
- Wang XW, Vermeulen W, Coursen JD, Gibson M, Lupold SE, Forrester K, Xu G, Elmore L, Yeh H, Hoeijmakers JH, Harris CC. (1996). The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.* 10(10):1219-32.
- Wang T, Zhang X. and Li JJ. (2002). The Role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol.* 2, 1509-20.
- Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB. (1976). In vitro radiosensitivity of human dipliod fibroblasts derived from patients with unusual clinical responses to radiation. *Radiology* 121(2):479-82.
- West CM, Hendry JH, Scott D, Davidson SE, Hunter RD. (1991). 25th Paterson Symposium--is there a future for radiosensitivity testing? *Br J Cancer* 64(1):197-9.
- West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D. (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(2):197-203.
- West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, Hunter RD. (2001). Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51(1):10-5.
- West CM, West C, Rosenstein BS, Alsner J, et al. (2010). Establishment of a Radiogenomics Consortium *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 76(5):1295-6.
- Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, et al. (2007). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information". *Nucleic Acids Res.* 35.
- Wikimedia Foundation Inc. P.O. Box 78350 San Francisco, CA 94107-8350, United States of America. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.
<http://de.wikipedia.org/wiki/Hardy-Weinberg-Gleichgewicht> [Stand: 17.12. 2010, 12:45 Uhr]
- Williamson D, Dinniwell R, Fung S, Pintilie M, Done SJ, Fyles AW. (2010). Local control with conventional and hypofractionated adjuvant radiotherapy after breast-conserving surgery for ductal carcinoma in-situ. *Radiother Oncol.* [Epub ahead of print]
- Wittke-Thompson JK, Pluzhnikov A & Cox, NJ. (2005). Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 967-986.
- 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(11):2341-5.
- Wood RD, Aboussekhra A, Biggerstaff M, Jones CJ, O'Donovan A, Shivji MK, Szymkowski DE. (1993). Nucleotide excision repair of DNA by mammalian cell extracts and purified proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 58:625-32.
- Wood RD. (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochemie* 81(1-2):39-44. Review.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. (2001). Human DNA repair genes. *Science* 291(5507):12849.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-b receptor. *Nature* 370: 341-347.

- Xia F, Powell SN. (2002). The molecular basis of radiosensitivity and chemosensitivity in the treatment of breast cancer. *Semin Radiat Oncol.* 12(4):296-304. Review.
- Xu Y, Kinningham KK, Devalaraja NM, Yeh CC, Majima H, Kasarskis E J and St Clair DK. (1999). An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human superoxide manganese dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *DNA Cell Biol.* 18, 709-22.
- Yingling JM, Wang XF, Bassing CH. (1995). Signaling by the transforming growth factor-beta receptors. *Biochim Biophys Acta* 12421: 115-136.
- Zeleftsky MJ, Levin EJ, Hunt M, et al. (2008). Incidence of late rectal and urinary toxicities after 3-dimensional radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 70: 1124-1129. 2008; 70: 1124-1129.
- Ziegler RG, Hoover RN, Nomura AM, West DW, Wu AH, Pike MC, Lake AJ, Horn-Ross PL, Kolonel LN, Siiteri PK, Fraumeni JF Jr. (1996). Relative weight, weight change, height, and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 88(10):650-60.
- Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, Borstelmann S, Szymczak S, Wellek S, Rades D, Hoeller U, Ziegler A, Dikomey E, Borgmann K (2010). Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother Oncol.* [Epub ahead of print].

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Zellulärer Signalweg von TGFB.....	26
Abbildung 2.2: Darstellung der Häufigkeiten der Genotypen „AA“, „Aa“ und „aa“ im Kombinationsquadrat	31
Abbildung 2.3: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für zwei Allele: die horizontale Achse zeigt die beiden Allelfrequenzen p und q, die vertikale Achse zeigt die Genotypfrequenzen. Die drei möglichen Genotypen sind durch unterschiedliche Zeichen dargestellt	32
Abbildung 3.1: Dargestellt sind die Ergebnisse der Genotypisierung für drei Patientinnen im TGFB1-Gen.....	37
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Ketten- Reaktion	38
Abbildung 4.1: Darstellung der Restriktionsverdau-Produkte nach DNA-Elution mittels QIAEX (oben) und enzymatischer Aufreinigung mittels ExoSAP-IT (unten) für je drei Patienten (A, B, C) und den SNP C509T im TGFB1-Gen.....	46
Abbildung 4.2: Gelelektrophorese zur Bestimmung der optimalen PCR- Bedingungen für das DNA-Fragment des SOD2-Gens mit MgCl ₂ im Ansatz.....	47
Abbildung 4.3: Gelelektrophorese, zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für das DNA-Fragment des SOD2-Gens ohne Magnesiumchlorid im Ansatz.....	48
Abbildung 4.4: Darstellung des PCR-Produkts des XRCC1-Gens, nach Durchführung einer Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 71°C bis 57°C	49
Abbildung 4.5: Darstellung des PCR-Produkts des XRCC1-Gens bei fünf Patientenproben (1-5) nach Optimierung der Methode	49
Abbildung 4.6: Darstellung des PCR-Produkts des GSTP1-Gens, nach Durchführung einer Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 71°C bis 57°C	50
Abbildung 4.7: Dargestellt sind die Ergebnisse der Genotypisierung für drei Patientinnen im GSTP1-Gen.....	50
Abbildung 4.8: Definetti-Plot zur Darstellung der Übereinstimmung der Genotypfrequenzen mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	53
Abbildung 4.9: Individuelle Strahlenempfindlichkeit 87 Brustkrebspatientinnen bestimmt mittels G0/1-Assay. Aufgetragen ist die Häufigkeit chromosomaler Deletionen pro Zelle nach in vitro Bestrahlung mit 6Gy [Hoeller et al. 2003].	55
Abbildung 4.10: Einfluss des Polymorphismus im TGFB1-Gen auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde mittels G0/1-Assay untersucht, und die Zahl zusätzlicher DNA-Fragmente nach in-vitro Bestrahlung peripherer Lymphozyten mit 6 Gy bestimmt.....	56
Abbildung 4.11: Einfluss des Polymorphismus im XPD-Gen auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde mittels G0/1-Assay untersucht, und die Zahl zusätzlicher DNA-Fragmente nach in-vitro Bestrahlung peripherer Lymphozyten mit 6 Gy bestimmt.....	56

Abbildung 4.12: Häufigkeit des Auftretens eines Erythems Grad 0 bis 3 im untersuchten Patientinnenkollektiv.....	57
Abbildung 4.13: Häufigkeitsverteilung der Brustvolumina der 83 Brustkrebspatientinnen	58
Abbildung 4.14: Häufigkeit eines leichten bzw. schweren Erythems unter Berücksichtigung der Brustvolumina	58
Abbildung 4.15: Einfluss des Genotyps der Polymorphismen ATM (G5557A), GSTP1 (A105G), TGFB1 (C509T), XPD (G751T) und XRCC1 (G399A) auf das Risiko eines schweren Erythems nach Strahlentherapie. Aufgetragen ist jeweils für die verschiedenen Genotypen der prozentuale Anteil der Patientinnen mit einem Erythem Grad 2/3.....	60
Abbildung 4.16: Einfluss des Genotyps der Polymorphismen C509T des TGFB1-Gens (Panel A und B) sowie G751T des XPD-Gens (Panel C und D) auf das Erythemrisiko nach Strahlentherapie. Aufgetragen ist für die verschiedenen Genotypen der prozentuale Anteil der Patientinnen am Gesamtkollektiv (Panel A und C) sowie für die Patientinnen mit einem Brustvolumen < 750 cm ³ (Panel B und D), welche ein Erythem Grad 2 bzw. 3 entwickelten.....	61
Abbildung 4.17 A: Verteilung der Risikoallele des TGFB1 C509T (T-Allel)- und des XPD- G751T (G-Allel)-Polymorphismus für alle Patientinnen. B: Anteil der Patientinnen mit schwerem Erythem in Abhängigkeit der vorhandenen Risikoallele.	63
Abbildung 4.18 A: Verteilung der Risikoallele des TGFB1 C509T (T-Allel)- und des XPD- G751T (A-Allel)-Polymorphismus für 50 Brustkrebspatientinnen mit einem Brustvolumen <750 cm ³ . B: Anteil der Patientinnen mit schwerem Erythem und Brustvolumina <750 cm ³ in Abhängigkeit der vorhandenen Risikoallele.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Einteilung der akuten Hautreaktionen anhand der RTOG-Skala.....	13
Tabelle 3.1: Charakteristika der Brustkrebspatientinnen	35
Tabelle 3.2: Protokolle für die RFLP-Untersuchung der Polymorphismen in den Genen GSTP1, SOD2, TGFB1 und XRCC1	42
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Genotypisierung aller untersuchten SNPs	51
Tabelle 4.2: Übersicht der als Risikoallele für das strahleninduzierte Erythem identifizierten Genotypen der untersuchten Polymorphismen	62
Tabelle 5.1: Arbeiten, in denen der Zusammenhang zwischen akuten und späten Normalgewebereaktionen untersucht wurde	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ATM	ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
APE	apurinic/aprimidinic endonuclease
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CHART	continuous hyperfractionated accelerated radiation therapy
CLIS	lobuläres Carcinoma in situ
DCIS	intraductales Carzinoma in situ
DNA	Desoxyribo Nucleid Acid
ED	Einzeldosis
G	Guanin
GnRH	Gonadotropin-releasing hormon
Gy	Grey
GST	Glutathion-S-Transferase
IDK	invasives ductale Karzinom
IL	Interleukin
IMRT	Intensity-Modulated Radiation Therapy
LAP	latency-associated protein
M	Matastase
MALDI TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight
MRE11	Meiotic recombination 11
Mn SOD	Mangan-Superoxiddismutase
MW	Mittelwert
N	nodulus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF	Nekrosefaktor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platates Derived Growth Faktor
PNK	Polynukleotide Kinase
Pol β	DNA Polymerase β
rs-Nr	refSNP-Nummer

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
ROS	reactive oxygen species
RTOG [®]	Radiation Therapy Oncology Group [®]
SD	Standard Deviation
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
NF	Nekrosefaktor
T	Thymin
TEWL	Transepidermal Water Loss
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNM	Tumor, Nodulus, Metastase
TGF	Transforming Growth Factor
Tis	Tumor in situ
TOF	Time Of Flight
WT	Wildtyp
XPD	Xeroderma-pigmentosum Deficiencie
XRCC	X-ray-repair cross-complementing

Physikalische Einheiten:

C	Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
Min	Minute
Mol	Mol
s	Sekunde
U	Units

Präfixe physikalischer Einheiten:

k	Kilo	(10^3)
c	Zenti	(10^{-2})
m	Milli	(10^{-3})
μ	Mikro	(10^{-6})
n	Nano	(10^{-9})
p	Piko	(10^{-12})

LEBENS LAUF

DANKSAGUNG

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Annette Raabe für die wunderbare Betreuung, das Engagement, die tatkräftige Unterstützung und ihre hilfreiche Motivation. Danke für das Lob und die Kritik, die mich in dieser Arbeit wie auch in der persönlichen Entwicklung bereichert haben.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Ekkehard Dikomey für die Ermöglichung dieser Arbeit, die hilfreichen Anregungen und die investierte Zeit in die Auswertung der Ergebnisse bedanken.

Ich danke Frau Dr. Kerstin Borgmann für ihre Unterstützung, die Ratschläge, die Hilfe bei der Organisation und Bereitstellung der Ergebnisse ihrer Studien, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Ich danke Frau Alexandra Zielinski für die Einführung in die Laborarbeit, die Sorgfalt und Zuverlässigkeit mit der sie mich bei der praktischen Durchführung der Experimente unterstützt hat.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors für die Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Ich danke meiner Familie, die mich immer unterstützt und motiviert hat

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Katharina Derda

Hamburg