

Aus dem Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie
(Leiter Prof. Dr. Ekkehard Dikomey)
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
(Direktorin Prof. Dr. Cordula Petersen)
des Onkologischen Zentrums
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**BEDEUTUNG VON EINZELNUKLEOTIDPOLYMORPHISMEN IN DEN
GENEN XRCC1, XPD UND ATM BEI BRUSTKREBSPATIENTINNEN
FÜR DIE FIBROSE NACH STRAHLENTHERAPIE**

Dissertation

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

INGA KATHLEEN BÖCKELMANN

Aus Hamburg, Deutschland
Hamburg, den 30.08.2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 17.05.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuß, 1. Gutachter: PD Dr. A. Raabe

Prüfungsausschuß, 2. Gutachter: Prof. Dr. C. Petersen

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	5
2. EINLEITUNG	6
2.1. Das Mammakarzinom	6
2.2. Nebenwirkung der Strahlentherapie	9
2.3. Quantifizierung von akuten und späten Nebenwirkungen	10
2.4. Fibrose	11
2.5. Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen	13
2.6. Genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit	16
2.6.1. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	17
2.6.1.1. <i>Allgemein</i>	17
2.6.1.2. <i>Haplotypen und Allelfrequenzen</i>	19
2.6.1.3. <i>Bedeutung von SNPs auf die DNA-Reparatur</i>	19
2.6.1.4. <i>Bedeutung von SNPs für die Normalgewebereaktion</i>	20
2.6.2. Auswahl der SNPs	22
2.6.2.1. <i>XPB</i>	22
2.6.2.2. <i>XRCC1</i>	25
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1. Patienten	30
3.2. Isolierung der DNA	30
3.2.1. DNA-Isolierung	30
3.2.2. Bestimmung der DNA Konzentration	31
3.3. Polymerase Kettenreaktion	32
3.4. Gelelektrophorese	34
3.4.1. Prinzip der Methode	34
3.4.2. Herstellung des Ethidiumbromid-Gels	35
3.4.3. Vorbereitung der Proben	35
3.4.4. Elektrophorese und Auswertung	35
3.5. DNA-Elution	36
3.6. Restriktions – Fragment – Längen - Polymorphismus (RFLP)	36
3.6.1. Prinzip der Methode	36
3.6.2. RFLP bei XPB	37
3.6.3. RFLP bei XRCC1	37
3.7. DNA-Sequenzierung	38
3.7.1. Kettenabbruch-Synthese	38
3.8. Geräte	40
3.9. Puffer und Lösungen	40
4. ERGEBNISSE	42

4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen	42
4.1.1. XPD	42
4.1.2. XRCC1	43
4.2. Genstatus der Patienten	43
4.3. Einfluss des Genstatus auf das Fibroserisiko	47
4.4. Einfluss des Genstatus auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit	50
5. DISKUSSION	54
5.1. Allelhäufigkeit	54
5.2. Fibroserisiko und individuelle Strahlenempfindlichkeit	55
5.3. Bedeutung der SNPs für Fibroserisiko	56
5.4. Bedeutung der SNPs für Strahlenempfindlichkeit	57
5.5. Kombinationsanalyse der SNPs	59
6. ZUSAMMENFASSUNG	63
7. LITERATURANGABEN	65
8. DANKSAGUNG	73
9. LEBENS LAUF	74
10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	75

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

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

Die individuelle Strahlenempfindlichkeit ist genetisch determiniert. Für Unterschiede in dieser Strahlenempfindlichkeit werden vor allem genetische Veränderungen, wie sie durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) verursacht werden, verantwortlich gemacht. Für bestimmte SNPs in sogenannten Risikogenen konnte bereits ein Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für späte Normalgewebereaktionen gezeigt werden.

Diese Hypothese soll ebenfalls in dieser Arbeit überprüft werden. Die Untersuchungen sollen dabei an Blutproben von 69 Brustkrebspatientinnen durchgeführt werden, die zuvor strahlentherapeutisch behandelt worden sind. Diese Patienten zeigten dabei große Unterschiede in den späten Normalgewebereaktionen, und es soll mit dieser Arbeit geklärt werden, ob diese Unterschiede mit dem Auftreten von SNPs in bestimmten Genen erklärt werden können.

Insgesamt soll in diesem Projekt die Bedeutung von folgenden fünf SNPs untersucht werden: XRCC1 (Arg399Gln), ATM (Asp1853Asn), XPD (Lys751Gln), SOD2 (Ala9Val) und TGF β 1 (C-509T). Die Untersuchungen in dieser Arbeit beschränken sich auf die Bedeutung der drei SNPs in den Genen XPD, XRCC1 und ATM. Die beiden anderen SNPs in den Genen SOD2 und TGF β werden in einer parallelen Studie untersucht. In der abschließenden Diskussion werden diese Daten jeweils zusammengefasst.

Insgesamt beinhaltet diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welche Bedeutung haben SNPs in den Genen XPD, XRCC1 und ATM für das Auftreten von Normalgewebereaktionen nach Bestrahlung von Brustkrebspatientinnen?
2. Welche Bedeutung haben diese SNPs für die individuelle Strahlenempfindlichkeit?
3. Wie wirkt sich eine Kombination der untersuchten fünf SNPs auf das

Normalgewebeerisiko aus?

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. Die Strahlentherapie kann eingesetzt werden, wenn entweder eine chirurgische Therapie nicht möglich ist, oder die Organerhaltung erforderlich ist bzw. gewünscht wird. Um dem Patienten eine optimale Therapie anbieten zu können, ist häufig eine kombinierte Therapie mit interdisziplinärer Betreuung sinnvoll (Henne-Bruns et al. 2003).

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

2.1. Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Mitteleuropa mit einem Anteil von 23% der häufigste maligne Tumor der Frau. 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 45000 Frauen an Brustkrebs. Das Brustkrebsrisiko ist für Männer um den Faktor 150 geringer.

Die Häufigkeit für Brustkrebs nimmt für Frauen mit steigendem Lebensalter zu mit einem Gipfel im 55. Lebensjahr. Die Mortalität ist regional sehr unterschiedlich. Diese Unterschiede sind bedingt durch regional unterschiedliche Risikofaktoren wie Genstatus, Hormonkonzentration, Ernährung und Alter (Bühling et al. 2004).

Verschiedene genetische Besonderheiten in mehreren Genen z.B. in p53, bcl-2, c-myc und c-myb sind für ein höheres Mammakarzinomrisiko verantwortlich. Noch eindrucksvoller ist die genetische Disposition bei den Genen BRCA1 und BRCA2, die

zu einem 85 % höheren Risiko der Entwicklung eines Mamma- oder 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. Ein hoher Anteil ungesättigter Fettsäuren und ein regelmäßiger Alkoholkonsum erhöht ebenfalls das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken.

Das Mammakarzinom wird histologisch eingeteilt nach der Invasivität (infiltrierend wachsend), wobei das *carcinoma in situ* vom Karzinom abgegrenzt wird, und in Bezug auf die Lokalisation in duktales (85 %) und lobuläres (10 – 15 %) Karzinoma zu differenzieren ist. Zu den nicht invasiven gehören das intraductale Karzinoma (DCIS), welches durch seine präinvasive Form eine Präkanzerose des Mammakarzinoms darstellt. Es wächst innerhalb des Drüsengangepithels, und die Prognose ist nach operativer Entfernung sehr gut. Eine andere Form des DCIS (zu 70%) ist der „Morbus Paget“, bei dem es zu chronischen ekzemartigen Hauteffloreszenzen um den Warzenvorhof kommt. Histologisch sind intraepidermal sogenannte Paget Zellen nachweisbar. Bei dem lobulären Karzinoma in Situ (CLIS) zeigt sich eine atypische Wucherung, die die Azini eines oder mehrerer Läppchen ausfüllen. Das CLIS wächst häufig multizentrisch (in 30 % kontralateraler Befall). Es wird ebenfalls als Präkanzerose klassifiziert. Innerhalb von 20 Jahren gehen 30 % in ein invasives lobuläres Karzinom über. Das invasive ductale Karzinom (IDK) ist das häufigste Mammakarzinom (85 %), wobei man das medulläre, tubuläre, und das muzinöse Karzinom unterscheidet, die sich durch eine veränderte Prognose auszeichnen. Wesentlich seltener kommt das invasive lobuläre Karzinom (ILK) vor (10%). Auch hier besteht eine Tendenz zu einem beidseitigen Befall. Das Wachstum ist diffus und infiltrativ, wobei die Tumorzellen häufig die Milchgänge ummauern (Bühling et al. 2004).

Die Prognose des Mammakarzinoms ist nicht vorhersehbar. Eine Orientierung erfolgt aufgrund von Prognosefaktoren, die erkennen lassen, mit welchem Risiko ein Rezidiv oder eine verminderte Überlebensrate verbunden ist. Klassische Prognosefaktoren sind z.B. die Tumorgröße, der axilläre Lymphknotenstatus, das histologische Grading, der

Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus (Henne-Bruns et al. 2003).

Die Therapie des Mammakarzinoms ist abhängig vom Zeitpunkt der Entdeckung und von der Ausbreitung. Beim CLIS erhalten die Patienten nach bioptischer Diagnose lediglich eine engmaschige, regelmäßige und lebenslange Vorsorge. Bei dem DCIS lehnt sich das Therapie-Management an einem invasiven Karzinom an. Dies beinhaltet eine vollständige Entfernung (R0) des Tumorherdes (brusterhaltend) mit einem tumorfreien Rand. Bei eindeutigem Fehlen von Invasivität ist auf eine axilläre Lymphnodektomie zu verzichten.

Durch eine Strahlentherapie nach Tumorresektion wird das Risiko eines Rezidivs bei allen Subtypen des Mammakarzinoms gemindert (Vinh-Hung et al. 2004). Deswegen wird i. d. R. eine Strahlentherapie empfohlen. Allerdings ist der Nutzen, vor allem bei Patienten mit DCIS, welches nicht invasiv wächst, gegen die möglichen Nebenwirkungen einer Strahlentherapie abzuwägen. Eine vollständige Ablatio wird beim Morbus Paget empfohlen, da der Tumorherd oft nicht in der Mamillennähe liegt.

Die primäre neoadjuvante Chemotherapie (präoperative medikamentöse Behandlung) wird für inoperable und inflammatorische Mammakarzinome mit guten Erfolgen eingesetzt.

Bei der operativen Therapie sind zwischen einer Brusterhaltenden Therapie (BET) mit Axilladissektion, einer modifizierten radikalen Mastektomie (MRM) mit Axilladissektion (z.T. anschließende Brustrekonstruktion) und einer Ablatio Simplex ohne Entfernung der axillären Lymphknoten zu unterscheiden.

Für eine eindeutige prognostische Aussagekraft müssen mindestens 10 Lymphknoten entnommen werden. Die Therapieindikation ist abhängig von dem klinisch-histopathologischen Befund, dem Ergebnis der Radiologie und dem Wunsch des Patienten. Eine suffiziente Nachbestrahlung, mit dem Ziel der Vernichtung mikroskopischer Tumorzellnester im Operationsgebiet, minimiert das Rezidivrisiko. Die Bestrahlung soll 50 Gy nicht überschreiten und kann 4 bis 6 Wochen nach Operation erfolgen. Bei der BET ist eine Dosis von 1,8 oder 2 Gy viermal die Woche indiziert bis 50 Gy erreicht sind. Unter bestimmten Bedingungen (Histologie, Patientenalter) erfolgt eine Aufsättigung (Boost), z.B. bei allen Patienten bis 50 Jahren oder Patienten bis 70 Jahren mit R1 Resektion ist eine Aufsättigung um 16 Gy indiziert (Bartelink et al. 2000). Nach einer Ablatio simplex ab T3 Tumorstadium oder einer R1

Ablatio ist eine Bestrahlung der Thoraxwand mit 60 Gy zu empfehlen. Die axillären Lymphknoten werden i.d.R. nicht bestrahlt (Ausnahme: inoperable oder mehr als 10 befallene Lymphknoten und Kapseldurchbruch).

Für die strahlentherapeutische Nachsorge wird das Gewebe in vier Felder eingeteilt. Feld 1 ist die Restbrust und Thoraxwand, Feld 2 ist das Tumorbett, Feld 3 ist das Sternalfeld und Feld 4 ist das Supra- und Intraclavicularfeld.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Therapie des Mammakarzinoms sowohl die lokalen, als auch die systemischen Komponenten der Erkrankung abdecken muss. Die chirurgische Therapie begrenzt sich dabei auf das lokale Geschehen, während die medikamentöse Therapie den systemischen Charakter der Erkrankung einzudämmen sucht. Die Nachbestrahlung bei brusterhaltender Therapie bzw. auch nach Ablatio versucht die Metastasierung und somit die Rezidivrate des Mammakarzinoms zu verhindern und arbeitet demnach auf lokoregionärer Ebene.

2.2. Nebenwirkung der Strahlentherapie

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

Bei den Nebenwirkungen unterscheidet man zwischen akuten und späten Normalgewebereaktionen. Die akuten Nebenwirkungen treten schon während oder kurz nach der Therapie auf und klingen in der Regel in den ersten Wochen nach Therapie schnell wieder ab. Akutreaktionen treten vor allem in Gewebe mit hohem Zellumsatz auf wie z.B. Schleimhäute. Häufige Akutreaktionen sind u.a. die Mukositis, der Dermatitis und die Ösophagitis.

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

Retraktion und Atrophie der belassenen Mamma (Reiser et al. 2004). Bei der Planung einer strahlentherapeutischen Behandlung müssen vor allem die späten Nebenwirkungen berücksichtigt werden, da diese chronisch sind. Um dieses Therapieziel zu erreichen, ist eine exakte Auswahl der Gesamtdosis sowie des Therapieplans in Bezug auf die Einzeldosis und die Anzahl der Fraktionierungen von essentieller Bedeutung, um eine möglichst komplikationsfreie Kontrolle des Tumors zu erreichen.

2.3. Quantifizierung von akuten und späten Nebenwirkungen

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

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

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

Bei jedem der Organsysteme werden vier verschiedene Kategorien (SOMA) berücksichtigt: S = subjektive; O = objektive; M = Management; A = Analyse. Die

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

2.4. Fibrose

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

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

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

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

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

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

Das Fibroblastenzellsystem zeigt eine strenge Differenzierungshierarchie und setzt sich zusammen aus den regenerativen teilungsaktiven Progenitorfibroblasten und nicht-regenerativen postmitotischen Fibrozyten (Rodemann et al. 1996). Es wurde nachgewiesen, dass in den Bindegeweben verschiedener Organe ein nahezu konstantes Verhältnis 2:1 für die Zahl der Progenitorfibroblasten und der Funktionsfibrozyten besteht. Die Lebensfähigkeit eines Funktionsfibrozyten ist genetisch determiniert. Ein Funktionsfibrozyt ist verantwortlich für die Produktion der Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und der Wachstumsfaktoren. Stirbt einer dieser Funktionsfibrozyten ab, muss sich ein Progenitorfibroblast in zwei Funktionsfibrozyten ausdifferenzieren, um das Verhältnis konstant zu halten (Burger et al. 1998). Bei

Strahlenexposition wird dieser Prozess dadurch gestört, dass es zu einer vermehrten Differenzierung von Progenitorfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten kommt und damit zu einer überproportionalen Akkumulation von Zellen mit außergewöhnlich hoher ECM-Syntheseleistung. Das bestrahlte Gewebe ist somit gekennzeichnet durch eine hochgradige Kollagenanreicherung, die sich in Form der Fibrose zeigt (Burger et al. 1998, Rodemann et al. 1996).

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

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

2.5. Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen

Das Ausmaß der Normalgewebereaktion kann erheblich variieren. Es besteht daher schon seit langem ein großes Interesse daran Parameter zu etablieren, die eine prädiktive Bestimmung des Normalgeweberisikos vor Beginn der Therapie ermöglichen. Unter dem Begriff „Holy Grail on Radiobiology“ wurde die Suche nach solchen Parametern zur Prädiktion des Normalgeweberisikos auf eine Strahlentherapie bezeichnet (Peters et al. 1990).

Solch eine Prädiktion der akuten und späten Nebenwirkungen könnte eine

Individualisierung der Therapie ermöglichen (Budach 1997). Bisher richtet sich die Strahlentherapie nach dem sogenannten Toleranzdosiskonzept aus. Dieses Konzept besagt, dass die Therapiedosis 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 könnte für die anderen Patienten durch Steigerung der Dosis die Heilungschancen erhöht werden.

Die Normalgewebereaktion ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig (Herrmann et al. 1997, West et al. 1991). Die wichtigsten sind die Strahlendosis und das Bestrahlungsvolumen (West et al. 1995). Mit steigender Strahlendosis nimmt das Risiko für die Ausprägung einer Normalgewebereaktion eindeutig zu (Bentzen et al. 1994, Dorr et al. 1997, Turesson 1990, Turesson et al. 1996). Jedoch auch bei identischem Fraktionierungsschema und Strahlendosis können deutliche Unterschiede auftreten. Dies wurde hinsichtlich der späten Hautreaktion bei Patienten mit Mammakarzinom detailliert von Tucker et al. (Tucker et al. 1992) und Turesson et al. (Turesson et al. 1996) gezeigt. Die Auswertung dieser Daten ergab jeweils, dass die Unterschiede in der Hautreaktion zu 75% nur durch eine Variation der individuellen Strahlenempfindlichkeit erklärt werden kann. Die Unterschiede in der Strahlendosis zusammen mit anderen Faktoren (Alter, Menopausenstatus, Systolischer 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 genetisch determinierter Komponenten diskutiert. Erste Hinweise auf eine genetisch determinierte Strahlenempfindlichkeit lieferten vor allem Beobachtungen an Patienten mit dem Syndrom *Ataxia teleangiectasia* (AT). 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 (*Bloom-Syndrom*,

Fanconi-Anämie (FA), *Li-Fraumeni-Syndrom (LFS)*, *Naevusbasalzell-Syndrom*, *Neurofibromatose (NF)*, *Nijmegen-Syndrom (NBS)* und *Retinoblastom (RB)* zeigten ähnliche Zusammenhänge (Peters 1990, Streffer 1997).

Auch die Untersuchungen von Woods et al. (Woods et al. 1988) und Plowman et al. (Plowman et al. 1990) weisen darauf hin, dass das Ausmaß der Normalgewebereaktion durch eine genetisch determinierte, individuelle Strahlenempfindlichkeit bestimmt wird. In ihrer Studie wurde gezeigt, dass die zelluläre Empfindlichkeit strahlensensitiver Patienten deutlich über der von gesunden Spendern lag. Von Burnet et al. (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 Smith et al. (Smith et al. 1980) und Weichselbaum (Weichselbaum et al. 1976) war zuvor dieser Zusammenhang nicht beobachtet worden. Durch Untersuchungen von Johansen et al. (Johansen et al. 1996) mit 31 Brustkrebspatientinnen konnte die von Burnet (Burnet et al. 1994) aufgestellte Hypothese bestätigt werden. In dieser Studie 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 (Ramsay et al. 1995) berichteten von einer Korrelation zwischen dem Ausmaß der Normalgewebereaktion und der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

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

Von Dikomey et al. (Dikomey et al. 2003) wurde gezeigt, dass diese Widersprüche im Wesentlichen darauf zurückzuführen sind, dass einem Teil dieser Arbeiten eine

falsche Arbeitshypothese zugrunde lag. In diesen Arbeiten wurde irrtümlicherweise angenommen, dass nur Patienten mit einer besonders erhöhten individuellen Strahlenempfindlichkeit schwere akute oder späte Normalgewebereaktionen entwickeln. Von Jung et al. (Jung et al. 2001) wurde aber gezeigt, 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 daher die Patienten entsprechend ihrer Strahlenempfindlichkeit stratifiziert werden (Dikomey et al. 2003).

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

2.6. Genetische Marker der individuellen Strahlenempfindlichkeit

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

In einer vorangehenden Arbeit konnte in dem Labor gezeigt werden, dass die anhand von in-vitro bestrahlten Lymphozyten bestimmte Strahlenempfindlichkeit vor allem gegentisch determiniert ist (Borgmann et al. 2007). Diese Untersuchungen waren an Blutproben von 15 monozygoten Zwillingspaaren durchgeführt worden, und es zeigte sich, dass innerhalb des Zwillingspaars jeweils eine große Übereinstimmung in der Strahlenempfindlichkeit besteht.

Bei der Suche nach genetischen Markern zeigte sich zunächst, dass sich Proteine hierfür nicht eignen (Kasten-Pisula et al. 2007, Kasten et al. 1999), sowie auch nicht der Nachweis von seltenen Mutationen (Borgmann et al. 2002).

2.6.1. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

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

2.6.1.1. Allgemein

SNPs sind Polymorphismen einzelner Nukleotide in der DNA, d.h. Austausch einzelner Basen im Genom. Diese Unterschiede in einzelnen Basenpaaren hervorgerufen durch Basenaustausch führen zu einer Basensequenzveränderung. Zwei Drittel aller SNPs entstehen durch den Basenaustausch von Cytosin zu Thymin. Diese Mutation wird als SNP bezeichnet, wenn in der Bevölkerung die Allelfrequenz mindestens ein Prozent beträgt. Es wird dann angenommen, dass diese Mutation nicht ein zufälliges Ereignis ist, sondern über Vererbung weitergegeben wurde und daher bei einer bestimmten Person jede Zelle diese Veränderung trägt.

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

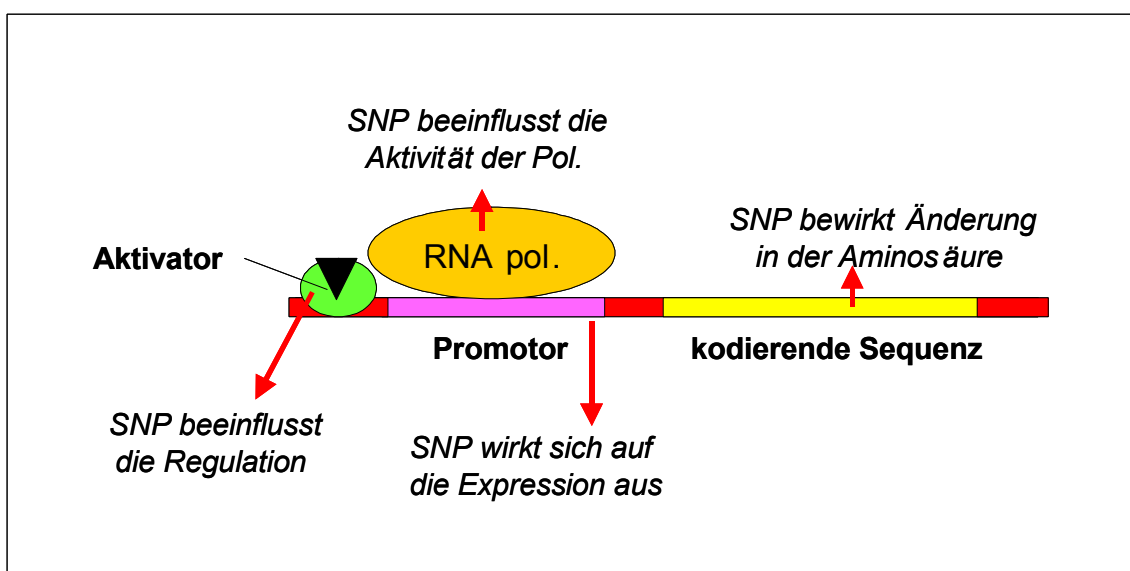


Abb.2.1: Schematische Darstellung der Auswirkungen eines SNPs.

regulatorischen Genabschnitt eines Introns (sog. regulatory SNP) befindet (Abb.1).

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

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

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

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

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

Ein „regulatory SNP“ (rSNP) befindet sich in einem regulatorischen Abschnitt des Genoms. Dieser SNP kann in einer veränderten Genexpression und damit in einer modulierten Expression einzelner Proteine resultieren. Mechanismen des Zellstoffwechsels werden somit verändert, und auch Stoffwechselforgänge des

Organismus können dadurch beeinträchtigt werden.

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

2.6.1.2. *Haplotypen und Allelfrequenzen*

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

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

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

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

SNPs in Genen, die einen signifikanten Effekt auf die DNA-Reparaturkapazität haben, wurden auch schon mit verschiedenen Krebsarten, insbesondere mit Brustkrebs

assoziiert (Goode et al. 2002). In diesem Zusammenhang sind vor allem Polymorphismen von der Xeroderma-pigmentosum Gruppe D (XPD) und der X-ray repair cross-complementing – Gruppe 1 (XRCC1) zu nennen, die in dem Nukleotidexzisionsreparaturmechanismus (NER) und in der Basenexzisionsreparatur (BER) involviert sind.

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

2.6.1.4. *Bedeutung von SNPs für die Normalgewebereaktion*

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

Nicht nur für diese Arbeitsgruppe, sondern auch insgesamt, zeigt sich heute für die verschiedenen SNPs ein sehr heterogenes Bild (Tab.1). So fanden Angele et al. (Angele et al. 2003) eine klare Assoziation für den SNP G5557A im ATM-Gen mit einem erhöhten Normalgeweberisiko. Quarmy et al. (Quarmby et al. 2003) und De Ruyck et al. (De Ruyck et al., 2006) fanden eine entsprechende Assoziation für den SNP C-509T im

TGF β 1. Von Moullan et al. (Moullan et al. 2003) wurde von solch einer Verbindung für die beiden SNPs G28152A und C194T im XRCC1 berichtet. Von Chang-Claude et al. (Chang-Claude et al. 2005) wurde aber für keine der untersuchten SNPs eine klare Beziehung zu der Akutreaktion festgestellt. Es ist derzeit noch unklar, worauf diese Unterschiede in den Ergebnissen beruhen.

Tab.1: Assoziationen von SNPs mit Normalgewebereaktion

<i>Gen^a</i>	<i>SNP^b</i>	<i>Anzahl^c</i>	<i>Endpunkt^d</i>	<i>Assoziation^e</i>	<i>Referenz</i>
APEX	T149G	446 BC	Akut	G ist protektiv	Chang-Claude et al. 2005
	T2197G	41	Fibrose	Unklar	Andreassen et al. 2003
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
ATM	T378A	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C735T	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	T2119C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	T2572C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C2614T	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C3161G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C4148T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C4258T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	"	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C4473T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	C4578T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	"	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	A5098G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	G5557A	41	Fibrose	A ist sensitiv	Andreassen et al. 2006
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2003
	"	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	A5558T	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	CIVS48+238G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003
GIVS38-15C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003	
TIVS22-77C	254	Akut+Spät	T ist sensitiv	Angele et al. 2003	
TIVS38-8C	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003	
TIVS38C	41	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006	
TIVS10-6G	254	Akut+Spät	keine Ass.	Angele et al. 2003	
OGG1	C326G	62Pat+150ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2005
SOD2	T47C	41	Fibrose	T vielleicht sens.	Andreassen et al. 2003
	"	26 Paare	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2005
	"	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C1183T	80	Spät	keine Ass.	Green et al. 2002
TGF β 1	G-800A	103	Fibrose	keine Ass.	Quarmby et al. 2003
	G-800A	87Gyn+140ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2006
	C-509T	103	Fibrose	A ist sensitiv	Quarmby et al. 2003
	C-509T	41	Fibrose	T ist sensitiv	Andreassen et al. 2003
	C-509T	26 Paare	Fibrose	T ist sensitiv	Andreassen et al. 2005
	C-509T	120	Fibrose	keine Ass.	Andreassen et al. 2006
	C-509T	87Gyn+140ND	Spät	T vielleicht sens.	Ruyck et al. 2006
	G25C	87Gyn+140ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2006
C263T	87Gyn+140ND	Spät	keine Ass.	Ruyck et al. 2006	

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

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

2.6.2. Auswahl der SNPs

Für die Studie wurden SNPs in den fünf Genen TGF β 1, SOD2, ATM, XRCC1 und XPD untersucht, wobei in dieser Arbeit die Ergebnisse zu den Genen XRCC1, XPD und ATM dargestellt werden. Kriterium für die Auswahl dieser war zum einen die Tatsache, dass diese Gene beim Strahlenresponse einer Zelle und da insbesondere in dem DNA-Reparaturmechanismus eine bedeutende Rolle spielen. Zum anderen sind die ausgewählten SNPs in den Genen in der europäischen Normalbevölkerung relativ häufig zu finden, wobei schon z.T. bekannt war, dass der jeweilige SNP einen funktionellen Einfluss hat.

2.6.2.1. XPD

Das Gen XPD codiert ein Protein der Nukleotidexzisionsreparatur (NER), welches als eine ATP-abhängige 5'-3'-Helicase verbunden mit dem TF II-Komplex agiert (Egley

2001). Die NER wird bei helikalen Distorsionen der DNA aktiv und ist das DNA-Reparatursystem mit dem größten Läsionsspektrum (de Boer et al. 2000). Neben der Bedeutung der NER bei DNA-Schäden, die z.B. durch Benzpyrene, Aflatoxine und Cisplatin entstehen, ist das Reparatursystem für UV-Licht induzierter DNA-Fotoprodukte von grösster Wichtigkeit (de Boer et al. 2000, Lindahl et al. 1999, Wood 1999). Darüber hinaus wird vermutet, dass das XPD-Protein auch an der NER bei oxidativen DNA-Schäden nach Einwirkung ionisierender Strahlung beteiligt ist (Leadon et al. 1993, Wood et al. 1993). Das XPD-Gen selber wurde erstmals im Zusammenhang mit der Erbkrankheit Xeroderma Pigmentosum (XP) beschrieben. Bei dieser Krankheit liegt eine autosomal-rezessive Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung vor (van Steeg et al. 1999). Die Betroffenen haben dabei ein besonders hohes Risiko (Faktor > 1000) für die Entstehung von Hauttumoren, wie Basalzell- und Plattenepithel-Karzinome und malignen Melanomen (van der Horst et al. 2002).

Die NER ist ein Mehrschrittprozess mit über 20 beteiligten Proteinen (Araujo et al. 2001). Die XP-Proteine spielen dabei eine führende Rolle. Man unterscheidet folgende Schritte: Schadenserkennung, Demarkierung, Inzision, Heraustrennen, Lückenschluß und Ligation (de Boer et al. 2000). Erst werden DNA-Schäden durch das XPC- und XPE- Protein detektiert und durch XPA verifiziert. Dann werden beide DNA-Stränge und der Schaden mittels der gerichteten Helicaseaktivitäten der beiden XPB und XPD-Proteine voneinander getrennt. Danach erfolgt eine Inzision zu beiden Seiten des DNA-Schadens durch die als Endonukleasen wirkenden XPG und XPF- Proteinen.

Der den Schaden tragende DNA-Abschnitt wird herausgelöst und die entstehende Lücke wird durch Neusynthese aufgefüllt und ligiert (Araujo et al. 2001, de Boer et al. 2000). Der Ausfall jeweils eines der 7 DNA-Reparaturgene XP, führt zu einer verminderten Reparaturfähigkeit und dem klinischen Bild der XP (Emmert et al. 2002, van Steeg et al. 1999).

Auf zellulärer Ebene liegen weitere Funktionen des XPD-Proteins in der Initiation der Transkription, der Aktivierung von bestimmten Stoffwechselschritten, insbesondere durch Phosphorylierungsprozesse wie der Rezeptorphosphorylierung durch Kinasen, und der Einleitung der Apoptose durch Bindung an die CTD-Region von p53.

Mutationen im XPD-Gen können somit klinisch nicht nur in Form von XP auffällig werden, sondern sich phänotypisch auch in Form von Syndromen wie der

Trichothio Dystrophie oder dem Cockayne's Syndrom beim Menschen manifestieren. (Lehmann 2003).

Nur wenige Studien haben bisher die Beziehung zwischen Polymorphismen im NER-Protein XPD und der DNA-Reparaturkapazität untersucht. Zwei Polymorphismen werden in der Literatur beschrieben, die zu einem Aminosäuren-Austausch führen, in Codon 312 (Asp→Asn) und in Codon 751 (Lys→Gln) (Chang-Claude et al. 2005, Shen et al. 1998). XPD-Variante Lys 751 Gln 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

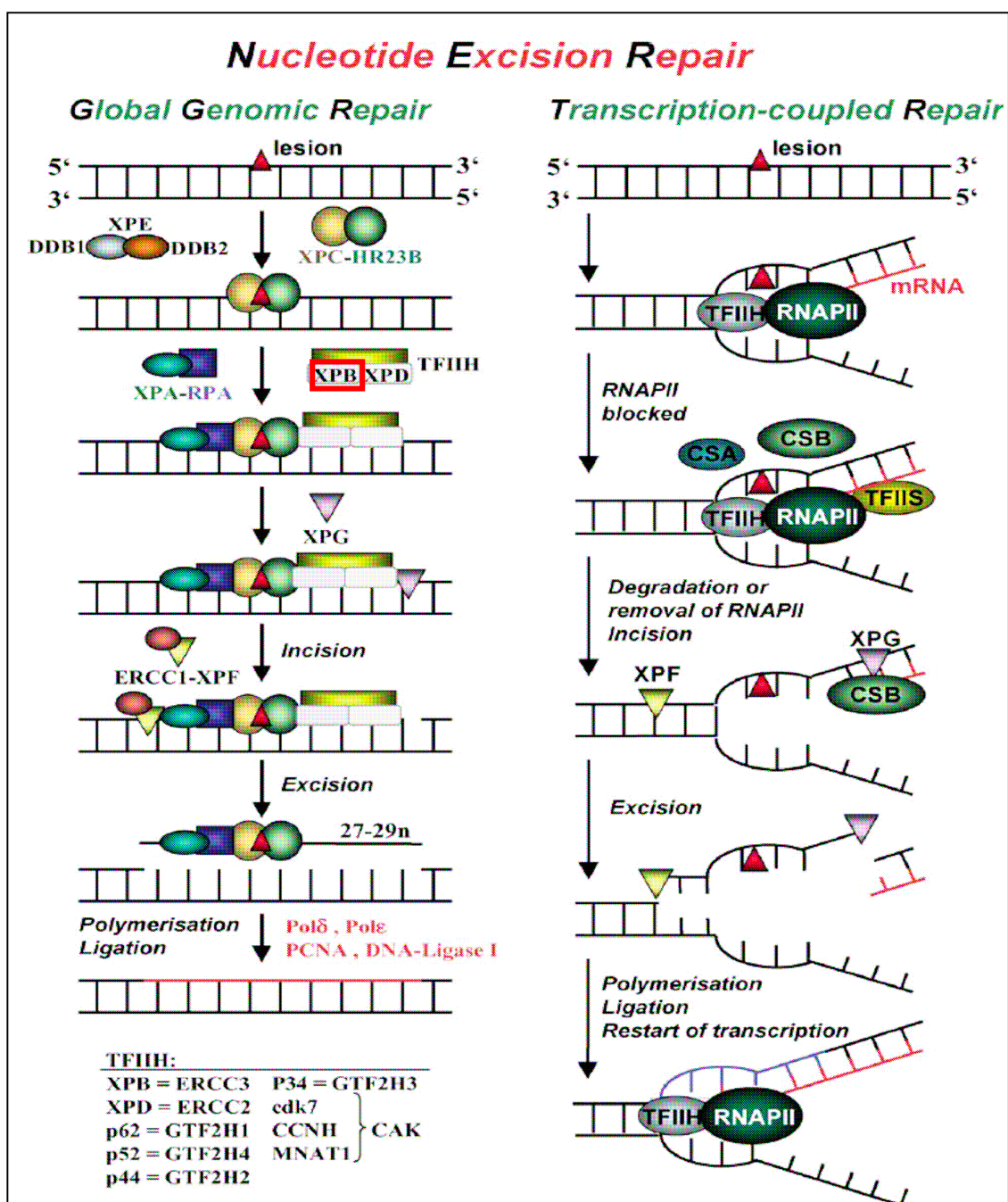


Abb.2.2: Schematischer Ablauf der Nukleotidexzisionsreparatur mit Beteiligung des XPD, rot umrandet; aus (Christmann et al. 2003)

keine Assoziation gefunden werden.

Eine erhöhte Anzahl an Chromatidabberrationen in Lymphozyten mit einem mutierten XP-Protein nach ionisierender Strahlung weist auf die Rolle der XP-Proteine bei der NER in der Reparatur von IR induzierten Schäden hin (Parshad et al. 1993).

In einer kleinen Studie mit Brustkrebspatientinnen wurde der Lys/Lys Codon 751 XPD Genotyp mit einer reduzierten Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden assoziiert. Individuen, die homozygot für das Wildtyp-Allel Lys waren, wiesen einen höheren Grad an Chromatidtypaberrationen auf, als solche mit einem Gln-Allel (Lunn et al. 2000). Die Chromatidtypaberrationen wurden dabei als Maß für die Strahlenempfindlichkeit gesehen (Borgmann et al. 2002). In einer anderen Studie von Vodicka et al. (Vodicka et al. 2004) wurde gezeigt, dass bei 337 gesunden Individuen, die den Gln-Polymorphismus in 751 vom XPD aufwiesen, die Anzahl an Einzelstrangbrüchen nach Bestrahlung mit 5 Gy für 10 Minuten geringer war als bei den Wildtyp-Allel-Trägern.

Es erschien sinnvoll, XPD in unserer Studie näher zu betrachten, da XPD eine bedeutende Rolle in der NER bei strahleninduzierten DNA-Schäden zukommt. Die Untersuchung des Genotyps der XPD-Variante Lys751Gln und dessen Einfluss auf die NER, die Strahlenempfindlichkeit und damit dem Risiko eine Fibrose nach Strahlentherapie zu entwickeln, sollte weitere Erkenntnisse in diesem Bereich hervorbringen und möglichst Widersprüche klären.

2.6.2.2. *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. Diese treten vor allem in Folge von ionisierender Strahlung im Rahmen eines oxidativen DNA-Schadens auf. *XRCC1* codiert für ein multidomänes Gerüstprotein, welches eine wichtige Rolle im 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 möglicherweise in einer fehlerhaften bzw. eingeschränkten BER resultieren. Es wurden bisher drei häufige SNPs beschrieben, die jeweils zu einer AS-Sequenzänderung führen: Codon 194 (Arg/Trp),

280 (Arg/His) und 399 (Arg/Gln), der auch in dieser Studie untersucht wird. Ladiges et al. (Ladiges et al. 2003) beschreibt ebenfalls einen SNP in Exon 10, der mit einer verminderten Basenexzisionsreparatur assoziiert ist.

Der in dieser Studie näher betrachtete Arg399Gln Polymorphismus in XRCC1 wurde bereits bezüglich der Nebenwirkungen nach Strahlentherapie untersucht. Chang-Claude et al. (Chang-Claude et al. 2005) beschreibt eine nicht-signifikante, aber

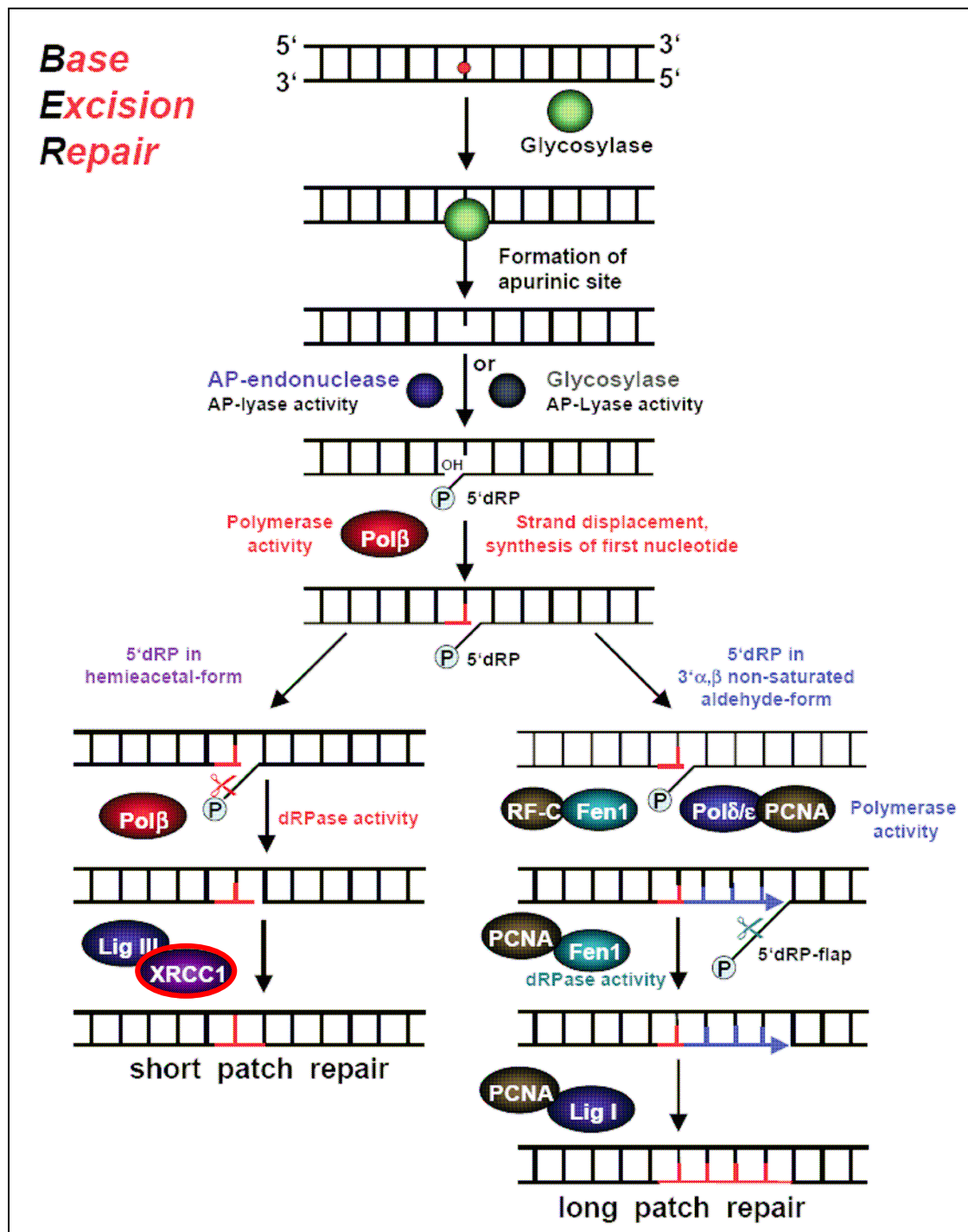


Abb.2.3: Schematischer Ablauf der Basenexzisionsreparatur mit Beteiligung des XRCC1, rot umrandet; aus (Christmann et al. 2003)

tendenziell protektive Wirkung der XRCC1 Arg399Gln-Variante bei Patienten in Hinblick auf akute Nebenwirkungen. Andere Studien hingegen konnten eine positive Korrelation feststellen.

Eine Assoziation zwischen dem Arg399Gln Polymorphismus und einem höheren Risiko für die Entwicklung einer adversen Reaktion in der Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen konnten Thompsen und West (Thompson et al. 2000) finden, basierend auf einer höheren Strahlenempfindlichkeit und chromosomaler Deletionen nach *in vitro*-Bestrahlung (Au et al. 2003, Hu et al. 2001a, Hu et al. 2001b). Zellen, die Defekte bezüglich XRCC1 aufwiesen, waren strahlenempfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung. Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) definierten den Arg399Gln Polymorphismus als „risk-allel“, der besonders im homozygoten Zustand (Arg/Arg-Genotyp) für ein höheres Risiko, eine Fibrose zu entwickeln, stand. Ruyck et al. (De Ruyck et al. 2005) konnte hingegen in einer Studie mit 62 Patientinnen keine Assoziation hinsichtlich eines erhöhten Risikos für eine Spätreaktion feststellen. Andreassen et al. (Andreassen et al. 2006a) konnte für andere SNPs in XRCC1 auch keine Assoziation finden.

Das XRCC1-Gen war aufgrund seiner Bedeutung für den BER für diese Studie interessant. Die XRCC1-Variante Arg399Gln selber wurde in die Untersuchung eingeschlossen, da bereits eine positive Korrelation dieser Variante mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit und damit erhöhten Risiko für eine Normalgewebereaktion beschrieben wurde.

2.6.2.3. ATM

ATM 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 verbundene Krankheitsbild *Ataxia Teleangiectasia*, welches bei einer Mutation in diesem Gen auftritt führt nicht nur zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit sondern auch zur cerebelläre Degeneration, Immunschwäche, genetischer Instabilität sowie erhöhtem Krebsrisiko (Shiloh 1997).

Das ATM-Gen codiert für ein Protein, das an der Detektion von DNA-Schäden (Autophosphorylierung bei Chromatinstrukturveränderungen und Dissoziation in seine Homodimere), der Aktivierung von DNA-Reparatur beteiligt sowie an der Apoptose

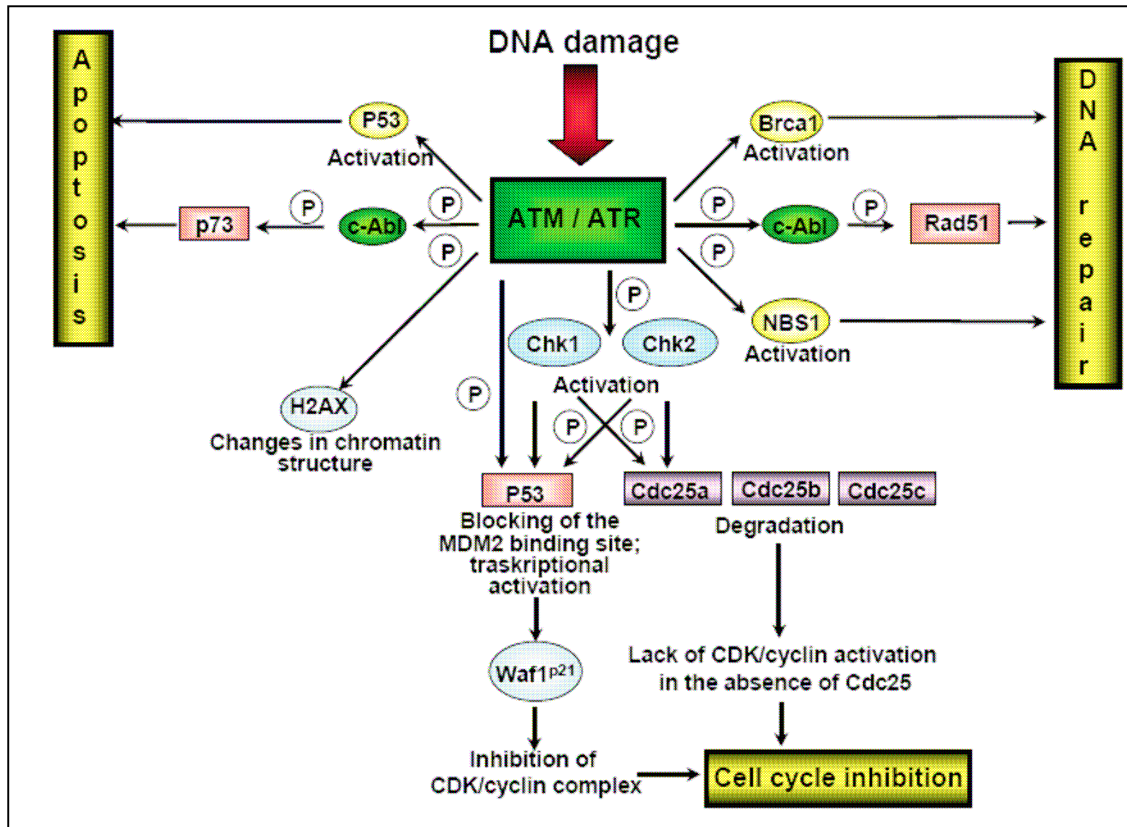


Abb.2.4: Schematische Darstellung für die Bedeutung des ATM nach Bestrahlung; aus(Christmann et al. 2003)

und der Steuerung des Zellzyklus von zentraler Bedeutung ist (Niida et al. 2006). So ist ATM u.a. auch mitverantwortlich für die p53-Induktion durch ionisierende Strahlung.

SNPs in ATM könnten folglich aufgrund der zentralen Rolle des Gens durchaus möglicherweise auf die Strahlenempfindlichkeit Einfluss nehmen.

In einer Studie mit 46 Brustkrebspatientinnen wurde bereits gezeigt, dass bestimmte genetische ATM-Varianten in Hinblick auf die Strahlenempfindlichkeit von großer Bedeutung sind (Iannuzzi et al. 2002). Es wurde berichtet, dass 100% von den untersuchten Patienten, die den Fibrosegrad 3/4 entwickelten oder eine Weichteilnekrose zeigten, eine ATM-missense-Mutation aufwiesen. Eine andere Studie fand eine signifikante Assoziation zwischen homozygoten Trägern der G->A Transition am ATM Nukleotid 5557 (Asp1853Asn) und einer adversen Reaktion auf Strahlentherapie (Angele et al. 2003). Die Patientinnen mit einer ATM G5557A-Homozygotstatus waren unter den strahlenempfindlichen Brustkrebspatientinnen überrepräsentiert. Des Weiteren spricht dieselbe Variante G5557A wie auch die Varianten IV S22-77 T>C und IV S48+238 C>G im homozygoten Zustand für ein erhöhtes Mamma-Ca-Risiko (Angele et al. 2003). Auch Andreassen et al. (Andreassen

et al. 2006b) fanden in einer Studie mit 41 Brustkrebspatientinnen einen Zusammenhang zwischen dem G->A Polymorphismus an Position 5557 und der Entwicklung von Fibrosegrad 3 nach Strahlentherapie, die in den vorherigen Studien nicht gezeigt werden konnte (Andreassen 2005, Andreassen et al. 2003). Eine Assoziation zwischen anderen ATM-Sequenzvarianten und einer klinischen erhöhten Strahlenempfindlichkeit bei Prostatakrebs-Patienten konnten allerdings Hall et al. (Hall et al. 1998) und Cesaretti et al. (Cesaretti et al. 2005) nachweisen.

Vor dem Hintergrund dieser inhomogenen Ergebnisse bezüglich einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit beim Vorliegen der G5557A-Variante erschien es sinnvoll, dass ATM-Gen ebenfalls in dieser Studie zu untersuchen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Patienten

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

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

3.2. Isolierung der DNA

3.2.1. DNA-Isolierung

Die sich in einem EDTA – Röhrchen befindenden Blutproben wurde bei 4 °C aufbewahrt. Für die Aufarbeitung wurden die Proben in ein 50 ml Falcon Röhrchen umgefüllt und mit 500 µl Proteinase K sowie 7 ml BQ1 versetzt. Anschließend wurden

die Proben 10 sec mit einem Vortexer gut durchmischt und dann 20 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Hierdurch wurden die Proteinbestandteile vollständig zersetzt. Zwischendurch wurden die Proben wiederholt durchmischt.

Nach Zugabe von 7 ml Ethanol werden die Proben 10 sec durchmischt und danach 5 min auf Eis gestellt. Das Ethanol führt zur Ausfällung der DNA und ermöglicht somit, dass sich diese an der Membran des im darauffolgenden Schritt genannten Reaktionsgefäßes binden kann. Anschliessend werden 15 ml der Probe (Lysat) in ein durch eine Membran geteiltes Röhrchen (Nucleo Spin Blood XL Column) pipettiert und 3 min bei 4800 rpm (4000 g; swing-out-Rotor) zentrifugiert. Die DNA enthaltende Säule auf der Membran wird in ein neues Tube überführt und der Durchfluss entsorgt.

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

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

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

3.2.2. Bestimmung der DNA Konzentration

Von dem DNA-Eluat werden 5 µl mit 95 µl TE Puffer versetzt, und die DNA Konzentration mit Hilfe des Photometers bestimmt. Ideal sollte die Extinktion_{260/280} ~ 1,6 – 1,9 betragen, was bedeuten würde, dass die DNA in ausreichender Konzentration und ohne störende Bestandteile, wie z.B. Proteine, RNA etc. vorliegt. Läge dieser Wert

unter 1,6, wäre der Proteinanteil zu hoch und die Probe nicht zur Weiterverarbeitung geeignet. Wäre der Wert zu hoch, deutete dies daraufhin, dass die Probe einen zu hohen RNA enthielte und wäre ebenfalls unbrauchbar. Die DNA wurde für weitere Anwendungen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.3. Polymerase Kettenreaktion

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

Die PCR benötigt mehrere grundlegende Komponenten: die DNA, die das zu

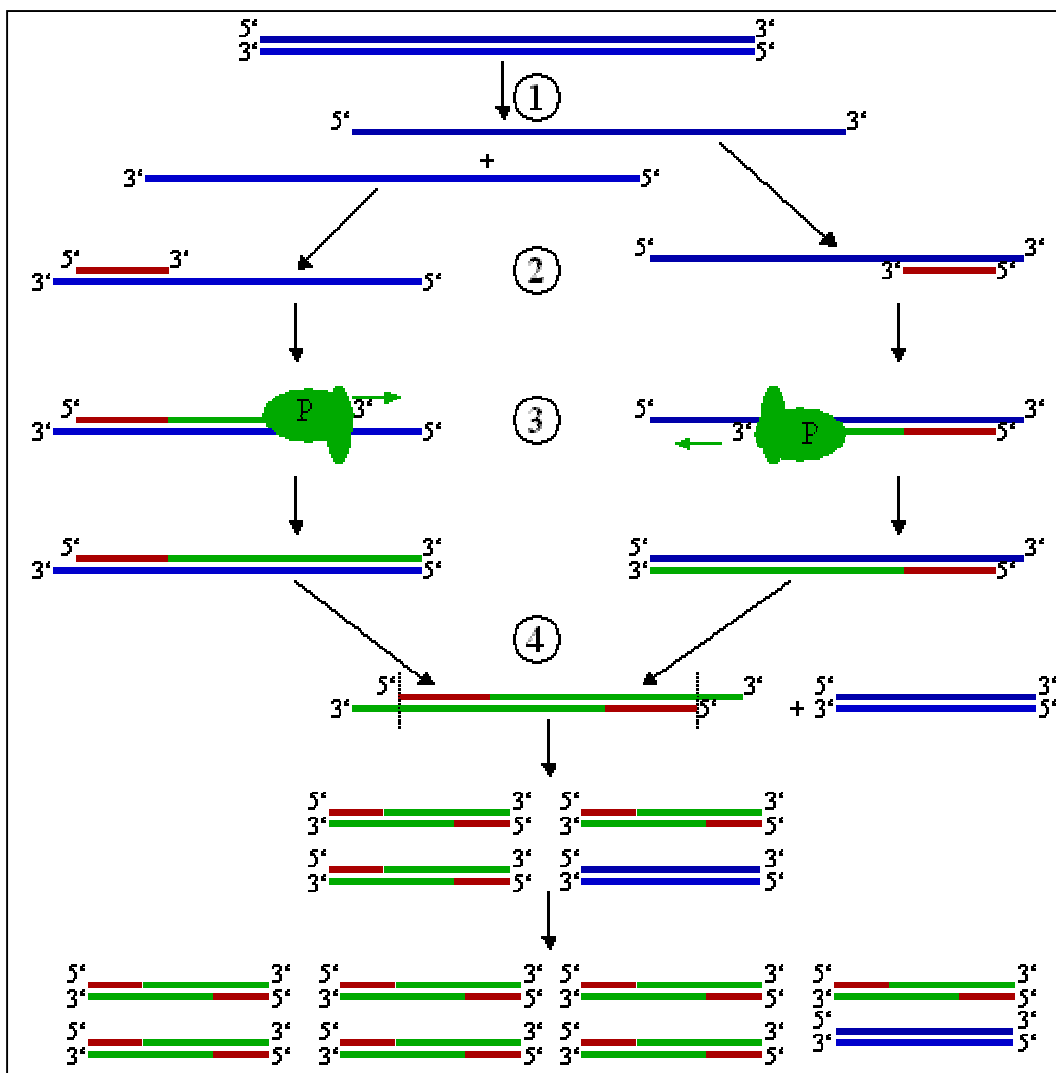


Abb.3.1: Genereller Ablauf einer Polymerasekettenreaktion

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

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

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

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

3.4. Gelelektrophorese

3.4.1. Prinzip der Methode

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

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

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

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

durch Vergleich die Größe der anderen Banden abgeschätzt werden.

3.4.2. Herstellung des Ethidiumbromid-Gels

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

3.4.3. Vorbereitung der Proben

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

3.4.4. Elektrophorese und Auswertung

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

verwendeten DNA-Leiter in Bezug auf seine Basenpaargröße abgeschätzt werden.

3.5. DNA-Elution

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

Die Proben wurden mit 3 Volumeneinheiten QX1 Buffer und 10 µl QIAEX II (welcher vorher 30 sec gemischt wurde) versetzt und umgehend in einem Wasserbad für 10 min bei 50 °C inkubiert (zwischendurch wurde die Probe alle 2 min gut durchmischt). Dann wurde die Probe 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, wobei ein Sediment entstand. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Anschließend wurde die Probe mit 500 µl QX1 versetzt, für 10 sec gut durchmischt, so dass sich das Sediment löste. Des Weiteren wurde die Probe für 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, so dass ein neues Sediment entstand. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das neu entstandene Sediment wurde mit 500 µl PE versetzt, wiederum für 10 sec gut durchmischt, bis sich das Sediment löste und für 30 sec bei 18000 rpm zentrifugiert, so dass wieder ein Sediment entstand. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Pellet wurde bei offenem Tube 15 min. luftgetrocknet. Danach wurde es mit 19 µl destilliertem Wasser versetzt, für 10 sec gut durchmischt und bei geschlossenem Reaktionsgefäß für 5 min stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 30 sec bei 1800 rpm zentrifugiert, bis sich ein Sediment bildete. Im Überstand befand sich die aufgereinigte DNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

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

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

3.6.1. Prinzip der Methode

Durch Restriktionsendonukleasen lässt sich ein Genom an spezifischen Stellen zerschneiden und so in DNA-Fragmente zerlegen. Restriktionsendonukleasen stammen ursprünglich aus bakteriellen Zellen, die damit in der Lage sind, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und die DNA-Helix an dieser Stelle zu schneiden. Bakterien

nutzen diese Enzyme zum Abbau fremder DNA, während sie ihre eigene DNA an den Angriffspunkten durch Methylierung schützen. Die Schnittstellen dieser Restriktionsenzyme bestehen aus 4 – 8 Basenpaare, die zentralsymmetrisch aufgebaut sind und als Palindrome bezeichnet werden. Ein Restriktionsenzym kann daher nur bei dieser Sequenz anbinden und einschneiden.

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

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

3.6.2. RFLP bei XPD

Vom aufgereinigten PCR-Produkt wurden jeweils zwei mal 15 µl in zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Die zum Verdau bestimmte Probe wurde mit 2,5 µl NEB3 und 2,5 µl BSA versetzt. Anschließend wurde 1,5 µl des Restriktionsenzym PST1 (der Fa. MWG – Biotech AG) hinzugegeben. Diese Probe wurde dann bei 37 °C für 16 h inkubiert. Die zur Kontrolle bestimmte Probe wurde mit 10 µl H₂O versetzt, so dass die Gesamtmenge ebenfalls 25 µl entspricht. Die Inkubation erfolgte bei 5°C für 16 h. Anschließend wird wie oben beschrieben ein Ethidiumbromidgel gegossen. Nach der Inkubation wurden die Proben, wie oben beschrieben, vorbereitet und dann nebeneinander ins Gelbett pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte wie oben beschrieben.

3.6.3. RFLP bei XRCC1

Vom aufgereinigten PCR-Produkt wurden jeweils zweimal 20 µl in zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Die zum Verdau bestimmte Probe wurde mit 3 µl NEB2 und 3 µl BSA versetzt. Anschließend wurde 2 µl des Restriktionsenzym MSP1 (der Fa.

MWG – Biotech AG) hinzugegeben. Diese Probe wurde dann bei 37 °C für 16 h inkubiert. Die zur Kontrolle bestimmte Probe wurde mit 10 µl H₂O versetzt, so dass die Gesamtmenge ebenfalls 30 µl entspricht. Die Inkubation erfolgte bei 5°C für 16 h. Anschließend wird wie oben beschrieben ein Ethidiumbromidgel gegossen. Nach der Inkubation wurden die Proben, wie oben beschrieben, vorbereitet und dann nebeneinander ins Gelbett pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte, wie oben beschrieben.

3.7. DNA-Sequenzierung

Die Voruntersuchungen zeigten, dass beim ATM der SNP an der Position G5557A nicht mit der RFLP-Methode nachzuweisen ist, weil die Anbindung des Restriktionsenzym durch einen SNP an der Nachbarposition gestört wurde. Die Nachweise dieses SNPs erfolgten daher mittels DNA-Sequenzierung.

Die DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der DNA-Sequenz, d.h. der Nukleotidabfolge in einem DNA-Molekül. Mit den Sequenzierungsmethoden, die Ende der 70er Jahre entwickelt wurden, konnten Sequenzen von gereinigten DNA-Fragmenten schnell und einfach bestimmt werden. In den letzten 20 Jahren wurden die Sequenzierungsverfahren immer schneller und stärker automatisiert. Mittlerweile wurde das menschliche Genom mit seinen 3.2 Milliarden Basenpaaren sowie Genome von über 160 anderen Organismen sequenziert. Es gibt heute mehrere Verfahren zum Ablesen der Sequenzinformation von einem DNA-Molekül, noch finden aber überwiegend Weiterentwicklungen der Methode nach Frederick Sanger Verwendung. Die neuere Pyrosequenzierung, die für Spezialanwendungen genutzt wird, bietet Möglichkeiten der beschleunigten Sequenzierung durch hochparallelen Einsatz.

3.7.1. Kettenabbruch-Synthese

Die von uns durchgeführte Kettenabbruch-Synthese stellt eine enzymatische Methode dar. Sie wurde von Sanger um 1975 entwickelt und ebenfalls 1977 mit der ersten vollständigen Sequenzierung des Genoms der Bakteriophage φX174 vorgestellt (Sanger et al. 1977). Die Methode besteht aus zwei Teilschritten. Als erstes wird die zu sequenzierende DNA-Sequenz an den Basen, z.B. Adenin markiert (Markierungsreaktion). Dann wird die Probe vervielfältigt bis es zum Kettenabbruch kommt (Terminationsreaktion). Die allgemeine Abkürzung für ein Nucleotid ist dNTP

und kann für dATP, dCTP, dGTP oder dTTP stehen, ddNTPs sind die entsprechenden Didesoxy-Varianten der dNTPs. Bei der Markierungsreaktion wird anhand einer DNA-Sequenz als Matrize in einem Reaktionsansatz mit einem Primer, einem Puffer, DNA-Polymerase, den drei Nukleotiden dTTP, dCTP, dGTP und einem Fluoreszenz markierten dATP ein kurzes Stück neue (komplementäre) DNA (einzelsträngig) synthetisiert, so dass in vier sonst gleichen Reaktionsansätzen jeweils eine Base markiert ist. In vier, getrennten Reaktionsansätzen wird jeweils ein Didesoxynukleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP oder ddTTP, zusammen als ddNTPs bezeichnet) zusätzlich eingesetzt und konkurriert mit seinem normalen Gegenstück. Diese "Kettenabbruch-Nukleotide" besitzen keine 3'-Hydroxygruppe: Werden sie in den neu synthetisierten Strang eingebaut, ist eine DNA-Verlängerung durch eine DNA-Polymerase nicht mehr möglich. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Nach der Sequenzier-Reaktion werden die markierten Abbruchprodukte aus jedem Ansatz parallel nebeneinander ins Gel pipettiert und durch hoch auflösende Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Durch Vergleich der vier Ansätze auf dem Gel kann man die Sequenz ablesen. Als Sequenzier-Reaktion kommt heutzutage eine Variation der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Einsatz. Anders als bei der PCR wird nur ein Primer eingesetzt, so dass die DNA nur linear amplifiziert wird. Seit Anfang der neunziger Jahre werden vor allem mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide eingesetzt. Jedes der vier ddNTPs wird mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Diese Modifikation erlaubt es, alle vier Didesoxynukleotide in einem Reaktionsgefäß zu geben, eine Aufspaltung in getrennte Ansätze und der Umgang mit Radioisotopen entfällt. Die entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes zeigen dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können so von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen, gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Für die Sequenzierung-PCR wurden für das ATM-Fragment folgende Primer der Firma Biotech verwendet: ATMseqneu_for 5' - GCCAATGTGTGAAGTGA – 3' und ATMseqneu_rev 5' -GGCTCGTTTGCGAGA 3'

3.8. Geräte

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

3.9. Puffer und Lösungen

- Nucleo Spin Blood XL-Kit von der Fa.: Macherey – Nagel (BE Puffer, Proteinkinase K, BQ1, BQ2, Ethanol, TE Puffer).
- DNA 100ng für XPD
- DNA 100 ng für XRCC1
- DNA 100 ng für ATM
- Primer 15 pmol (XPD Primer, Fa. Biotech)
- Primer 50 pmol (XRCC1 Primer, Fa. Biotech)
- Primer 15 pmol (ATM Primer; Fa. Biotech)
- Mg Cl 3 μ M
- Dest. Wasser (steril filtriert)
- Ethidiumbromid (Ethidiumbromid Lösung, 10 mg/ml der Fa. SIGMA)
- TBE Puffer (1%): 68g TBE Puffer(Tris Borate – EDTA Buffer For Gel

Electrophoresis der Fa. SIGMA) wird in 1 Liter aufgearbeitetes Wasser unter ständigem Rühren aufgelöst (4 Stunden).

- Agarose Gel (2%): 2 g Agarose (High Strength Analytical Grade Agarose der Fa. BIO RAD) wird 100 ml (1%) TBE Puffer (Tris Borate – EDTA Buffer For Gel Electrophoresis der Fa. SIGMA) hinzugegeben. In der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlung mit 5 µl Ethidiumbromid (Ethidiumbromid Solution, 10 mg/ml der Fa. SIGMA) versetzt.
- 15%-iges TBE- Gel (Fa. BIO RAD)
- Loading Buffer (Nuclei Acid Sample Loading Buffer 5* der Fa. BIO RAD)
- Ladder (AmpliSize™ Molecular Ruler 50 – 2000 bp Ladder, Fa.: BIO RAD)
- QIAEX II (150) Gel Extraction Kit , Fa.: QIAGEN (QX1 Buffer, QIAEX II, PE Buffer)
- PST1, NEB3, BSA (Fa.: MWG – Biotech AG) PST1: 30 Units auf 3,5 µl aufgereinigtes Wasser, NEB3 2,5 µl, BSA 2,5 µl)
- MSP1, NEB2, BSA (Fa.: MWG – Biotech AG) MSP1: 40 Units auf 2 µl aufgereinigtes Wasser, NEB2 3,0 µl, BSA 3,0 µl)
- DdeI, NEB3, BSA (Fa.:MWG – Biotech AG)

4. ERGEBNISSE

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

4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen

4.1.1. XPD

Für das XPD-Fragment wurden folgende Primer der Firma Biotech verwendet: XPD for 5'-CTGCTCAGCCTGGAGCAGCAGCTAGAATCAGAGGAGACGCTG-3' und für XPD rev 5'-AAGACCTTCTAGCACCACCG-3'

Optimale Bedingungen ergaben sich bei Verwendung der puRe Taq PCR Beads, wobei zusätzlich 100 ng DNA, 1,25 mM Mg Cl₂ und 15 pmol Primer (jeweils 10 pmol vorwärts und rückwärts, entspricht 2x1,5µl) hinzugegeben wurden. Die Probe wurde dann mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt

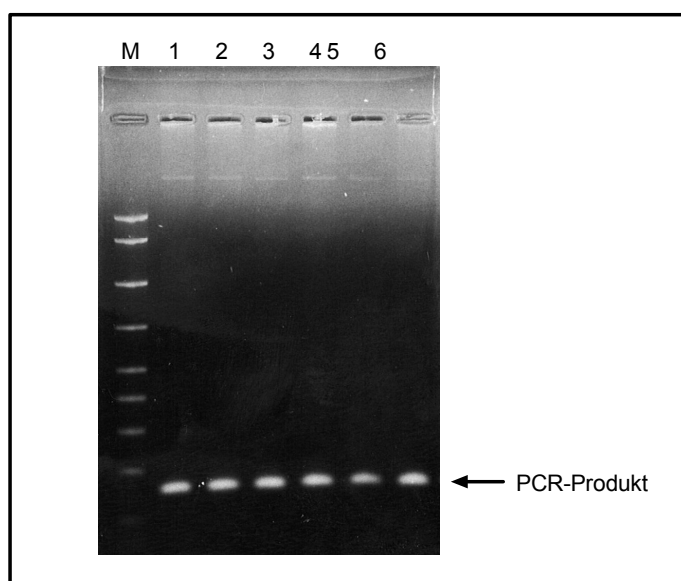


Abb.4.1: Gelelektrophorese unter optimalen PCR-Bedingungen für das DNA-Fragment des XPD-Gens mit der Größe von 161 bp; M, Bande mit Markern definierten Basenpaargröße

Die PCR Bedingungen ergaben sich für den Denaturierungsschritt 30 sec. bei 94 °C, für den Annealingschritt 30 sec. bei 65 °C und für den Elongationsschritt 30 sec. bei 72 °C. Diese Schritte wurden insgesamt 35 mal wiederholt (35 Zyklen). Vor Beginn der Zyklen wurde einmalig 5 min. bei 94 °C denaturiert und nach den Zyklen einmalig 5 min. bei 72 °C elongiert. Das nach der PCR vervielfältigte Fragment hat eine Größe von 161 Basenpaaren (bp).

4.1.2. XRCC1

Für das XRCC1-Fragment wurde ein Primer der Firma Biotech verwendet: XRCC1 for 5' -TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA - 3' und XRCC1 rev 5' -TCCTCCAGCCTT-TTCTGATA- 3'

Optimale Bedingungen wurden erreicht bei Verwendung der puRe Taq PCR Beads, zusätzlich wurden 100 ng DNA, 1,5mM MgCl₂ (im Taq Bead schon 1,5mM enthalten) und 50 pmol Primer (jeweils 5 pmol vorwärts und rückwärts) hinzugegeben. Die Probe wurde dann mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Die PCR Bedingungen ergaben sich für den Denaturierungsschritt 30 sec. bei 94 °C, für den Annealingschritt 90 sec. bei 66 °C. Der Elongationsschritt fehlt hier. Denaturierungs- und Annealingschritt wurden insgesamt 34 mal wiederholt (34 Zyklen). Vor Beginn der Zyklen wurde einmalig 4 min. bei 95 °C denaturiert. Das nach der PCR vervielfältigte Fragment hat eine Größe von 615 bp.

4.2. Genstatus der Patienten

Um den Genstatus zu ermitteln, wurde den Patientinnen Blut entnommen und daraus die genomische DNA isoliert. Anschließend wurde mittels RFLP-Methode der Allelstatus der SNPs in den drei ausgewählten Genen (XPD A751C, XRCC1 G399A und ATM G5557A) bestimmt. Hinsichtlich ATM wurde der Genstatus mittels Sequenzierung bestimmt. Um weiterhin die Verlässlichkeit der RFLP-Methode bei den Genen XPD und XRCC1 zu überprüfen, wurde für einige Proben auch hier die Sequenzierungsmethode herangezogen.

In der Auswertung sollte der Genotyp eines Patienten in Bezug auf den untersuchten SNP mit der individuellen Ausbildung einer Fibrose, eingeteilt nach Graden, in strahlenresistente und strahlenempfindliche Phänotypen, verglichen werden. Dadurch

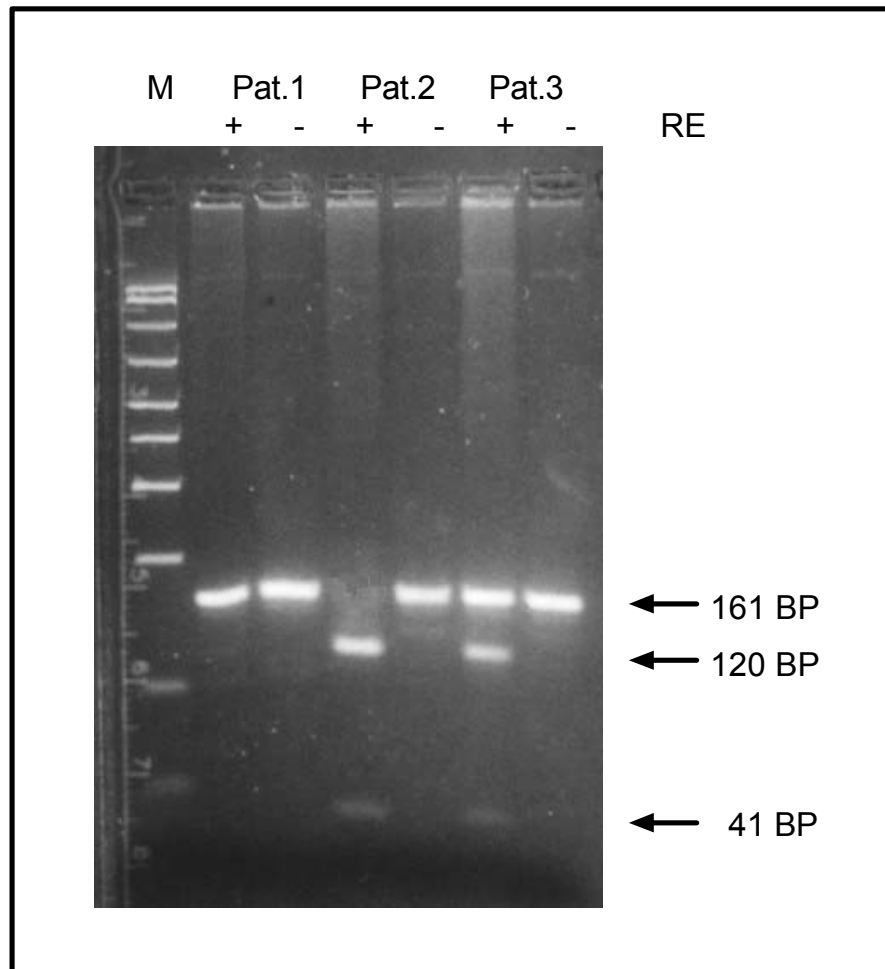


Abb.4.2: Nachweis des Allelstatus für XPD (A751C) bei 3 Patientinnen mittels RFLP-Methode. Pat.2 zeigt den Wildtyp-Status, Pat.1 einen homozygoten SNP und Pat.3 einen heterozygoten Genstatus. + = mit Enzym inkubiert, - = nicht mit Enzym inkubiert. M, Markerbanden.

sollte ein Zusammenhang zwischen Genstatus und individuelle Strahlenempfindlichkeit erkennbar werden.

Abb.4.2 zeigt exemplarisch den Nachweis des Genstatus für den SNP A751C im XPD Gen mittels der RFLP-Methode. Das Gel zeigt die Proben von 3 verschiedenen Patientinnen. Die mit „+“ gekennzeichneten Banden wurden mit dem Restriktionsenzym PST1 versetzt, welches bei entsprechendem Genstatus die DNA schneidet. Die mit „-“ gekennzeichneten Banden sind die Kontrolle ohne Zugabe des Restriktionsenzym. Die mit M gekennzeichnete Bande dient der Orientierung und zeigt definierte Nukleotidgrößen gemessen in Basenpaaren (BP).

Bei der Patientin 2 konnte durch das Restriktionsenzym das DNA-Fragment von 161 bp vollständig verdaut und in die zwei Fragmente mit 120 und 41 bp umgewandelt

werden. Dieses Ergebnis zeigt an, dass bei dieser Patientin beide Allele die Wildtypsequenz aufweisen und somit diese Patientin hinsichtlich des Genstatus als wt/wt einzustufen ist. Bei der Patientin 1 war hingegen kein Verdau durch das Restriktionsenzym festzustellen. Beide Allele müssen somit den SNP enthalten und hinsichtlich des Genstatus ist diese Patientin als SNP/SNP einzuordnen. Eine dazwischen liegende Reaktion wird für die Patientin 3 beobachtet. Für diese Patientin beobachtet man nach Verdau immer noch eine deutliche Bande mit der ursprünglichen Länge und ein Fragment von 120 bp sowie ein schwaches Signal bei 42 bp. Bei dieser Patientin liegt somit ein heterozygoter Status vor. Das dritte Fragment von 41 bp ist bei dem heterozygoten Status aufgrund der geringen DNA-Menge nur schwach erkennbar.

Wie oben bereits erwähnt, wurde bei ausgewählten Proben das RFLP-Ergebnis nochmals mittels der Kettenabbruch-Synthese überprüft. Abb.4.3. zeigt die Gensequenz für die Patientin 2, für die bei der RFLP-Methode ein wt/wt-Status detektiert wurde. Dieses Ergebnis kann durch die Sequenzierung bestätigt werden.

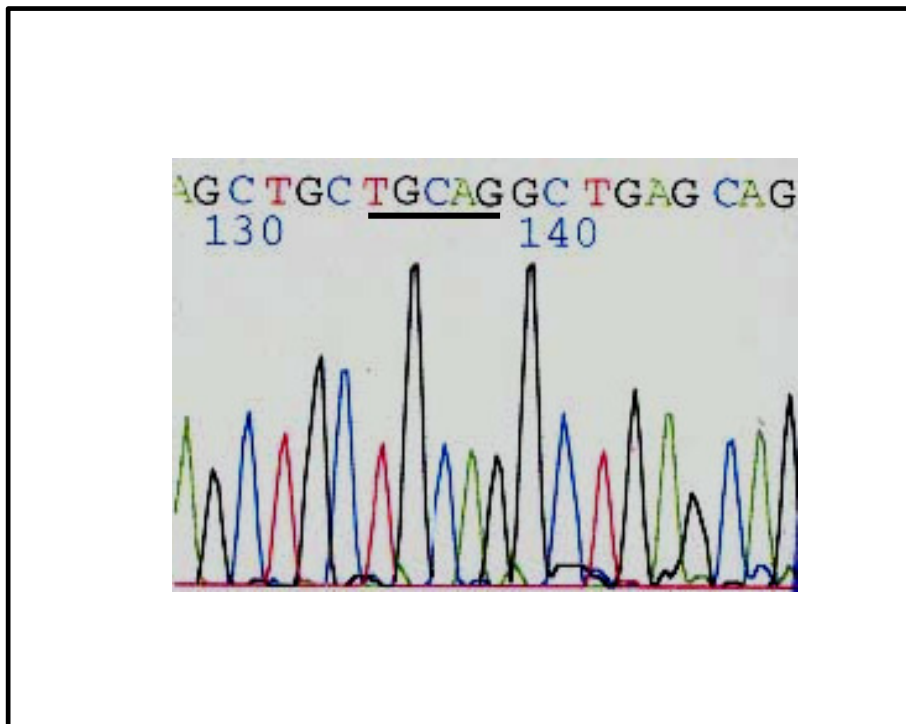


Abb.4.3: Nachweis der Wildtyp-Sequenz im XPD-Gen in Pat.2; AGCTGCTGCAGGCTGAGCAG; Ermittlung des Allelstatus für XPD (A751C) durch Sequenzierung.

Das Ergebnis aller 69 Patienten ist in Tab.4.1 zusammengefasst. Hinsichtlich des XPD-Gens zeigten von den 69 untersuchten Patientinnen neun auf beiden Allelen die Wildtyp-Sequenz, 44 einen heterozygoten Status und 16 für beide Allele die SNP-Sequenz. Bezogen auf die Gesamtzahl der Patientinnen ergibt dies Anteile von 13,0, 63,8 und 23,2%. Und damit eine Allelhäufigkeit von 55%.

Tab.4.1: Häufigkeiten der untersuchten SNPs in den Genen XPD, XRCC1 und ATM für die 69 untersuchten Patientinnen

Gen	Allelstatus ^a	Zahl der Patienten	Verteilung (%)	
			Studie	Europa ^b
XPD (A751C)	ww: AA	9	13,0	34,3
	ws: AC	44	63,8	50,7
	ss: CC	16	23,2	15,0
XRCC1 (G399A)	ww: GG	26	37,7	39,8
	ws: GA	28	40,6	46,0
	Ss: AA	15	21,7	14,2
ATM (G5557A)	ww: GG	47	68,1	69,4
	ws: GA	20	29,0	27,9
	ss: AA	2	2,9	2,7

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

^b Europäische Normalbevölkerung (aus NCBI-Datenbank).

Diese Verteilung entspricht nicht ganz den Werten, wie sie in der NCBI-Datenbank für eine europäische Population angegeben werden. Es fällt auf, dass bei den Brustkrebspatientinnen das polymorphe Allel von XPD (Lys751Gln) wesentlich häufiger vorkommt als bei der europäischen Normalbevölkerung (63,8 vs. 50,7%) und dem entsprechend der wt/wt-Status bei den Brustkrebspatientinnen seltener auftritt (13,0 vs. 34,3%). Diese Daten deuten an, dass möglicherweise das Auftreten dieses SNPs im XPD zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko führt. Dieser Trend ist anhand einer größeren Studie zu überprüfen.

Hinsichtlich des XRCC1-Gens betragen die entsprechenden Anteile 47,7, 40,6 und 21,7% und für das ATM-Gen 68,1, 29,0 und 2,9%, was einer Allelhäufigkeit von 42,0 bzw. 17,4% entspricht. Diese Werte sind nahezu identisch mit den Werten, wie sie der NCBI-Datenbank für eine europäische Normalbevölkerung entnommen wurden. Für diese beiden SNPs deutet sich somit keine Assoziation mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko an.

4.3. Einfluss des Genstatus auf das Fibroserisiko

Für alle 69 Brustkrebspatientinnen wurde die Normalgewebereaktion anhand der LENT/SOMA-Skala erhoben. Dabei wurde ausschließlich der Grad der Fibrose bestimmt. Insgesamt ergibt sich die Verteilung, wie sie in Abb.4.4 dargestellt ist. Der überwiegende Teil der Patientinnen entwickelte keine oder nur eine niedergradige Fibrose (Grad 0 und 1) und nur bei 14 Patientinnen zeigte sich eine Fibrose Grad 2 bzw. bei 3 eine Fibrose Grad 3. Eine Fibrose Grad 4 entwickelte sich bei keiner der Patientinnen.

Von den 69 Patientinnen bekamen 32 zusätzlich eine Tamoxifen-Therapie und 8 eine Chemotherapie. Diese zusätzlichen Therapien hatten jedoch keine Auswirkungen auf eine Ausbildung einer Fibrose (Daten nicht gezeigt).

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

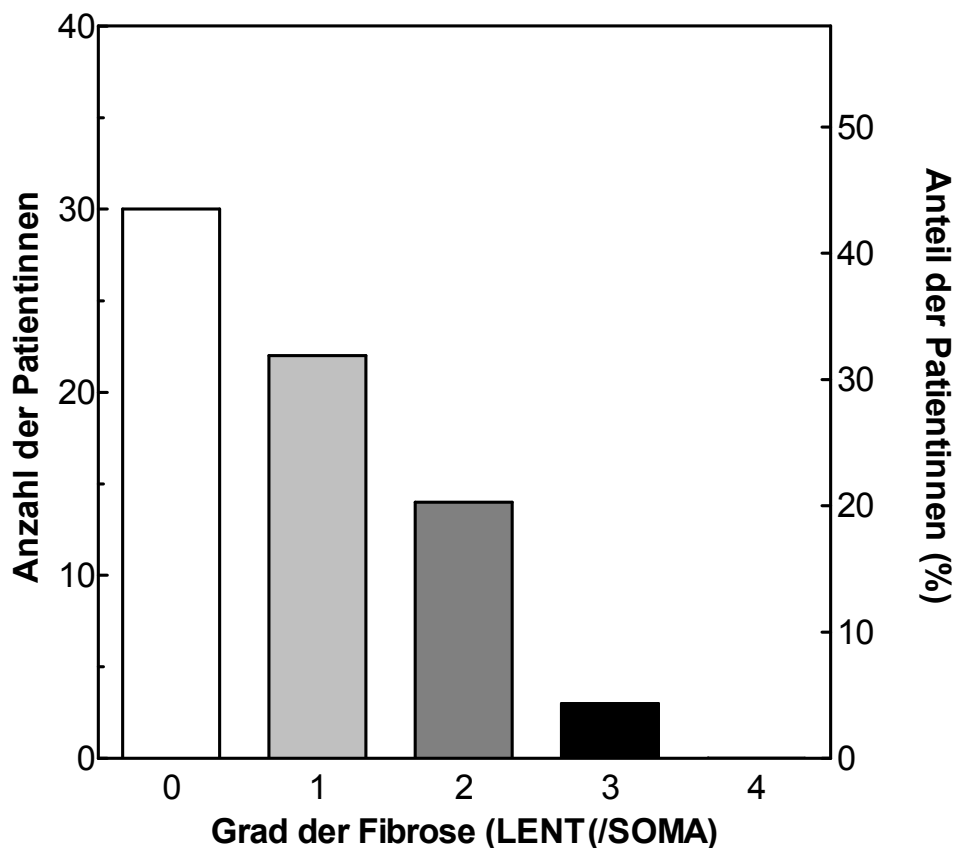


Abb 4.4: Verteilung des Fibrosegrades nach Strahlentherapie bei 69 Brustkrebspatientinnen. Erhebung des Fibrosegrades anhand der LENT/SOMA-Skala.

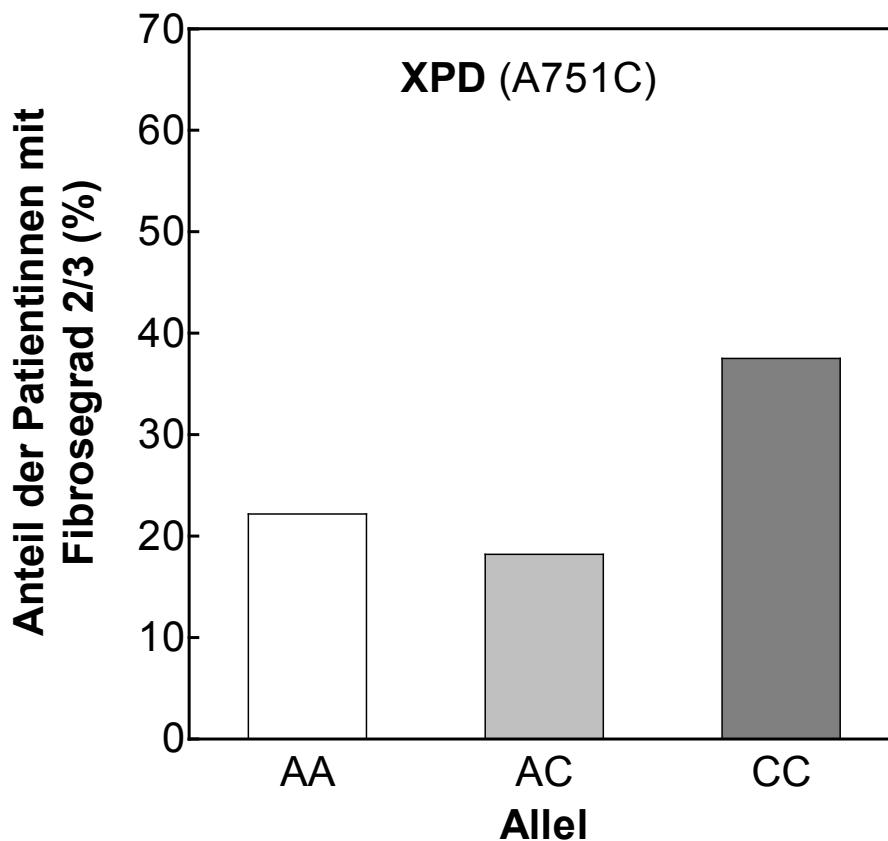


Abb.4.5: Einfluss des SNPs A751C im XPD-Gen auf das Fibrosierisiko nach Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen. Der Genstatus wurde mittels RFLP bestimmt und die Fibrose mittels LENT/SOMA erhoben.

Abb.4.5 zeigt für das XPD-Gen den Zusammenhang zwischen dem Genstatus und dem Fibrosegrad. Für diese Analyse wurden die Patientinnen entsprechend ihres Allelstatus gruppiert und für jede Gruppe der Anteil der Patientinnen mit einer Fibrose vom Grad 2/3 berechnet. Von den 9 Patientinnen mit einem wt/wt-Status entwickelten im Mittel 22% eine Grad 2/3 Fibrose. Bei Patientinnen mit einem wt/s-Status liegt dieser Anteil mit 18% etwas niedriger, während er bei Patientinnen mit s/s-Status den Wert von 37,5% erreicht. Diese uneinheitliche Tendenz läßt damit keine eindeutige Zuordnung dieses SNPs hinsichtlich des Fibrosierisikos zu. Faßt man die beiden letzten Gruppen zusammen so ergibt sich ein Fibrosierisiko von 23,3%, was mit dem der w/w-Gruppe nahezu identisch ist. Es wird daher angenommen, dass dieser SNP des XPD-Gens für das Fibrosierisiko keine Bedeutung hat.

Abb.4.6A zeigt für das XRCC1-Gen den Zusammenhang des SNPs Arg399Gln mit dem Fibrosierisiko. Von den 26 Patientinnen mit wt/wt-Status entwickelten im Mittel nur 11,5 % eine Fibrose mit dem Grad 2/3. Bei den Patientinnen mit dem wt/s-Status liegt dieser Anteil mit 32% bereits deutlich höher und von den fünf Patientinnen mit s/s-

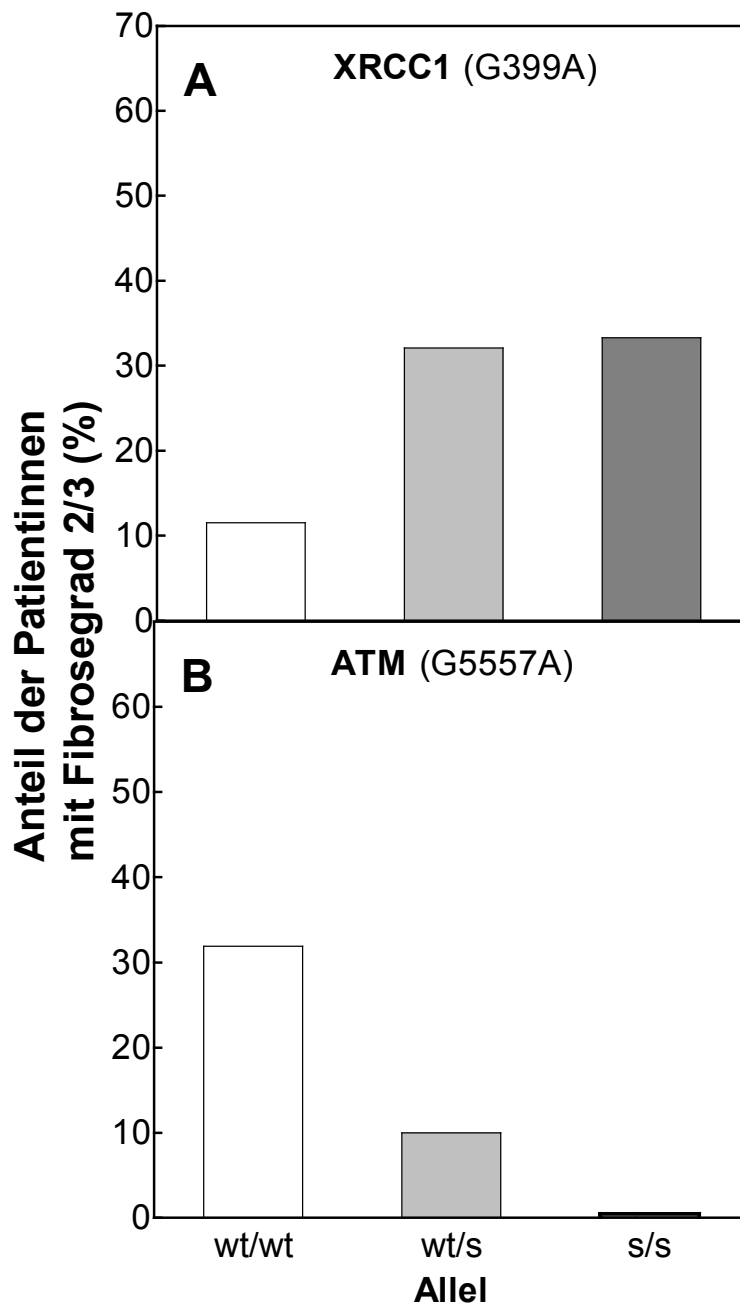


Abb.4.6: Einfluß eines SNP für die Entstehung von Fibrose nach Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen. A) SNP G3999A im XRCC1-Gen; B) SNP G5557A im ATM-Gen. Der Genstatus wurde mittels RFLP bestimmt und die Fibrose mittels LENT/SOMA erhoben.

Status entwickelten sogar 33,3% eine Fibrose mit dem Grad 2/3. Insgesamt deuten somit diese Daten an, dass dieser SNP des XRCC1-Gens als Risikoallel einzustufen ist.

Abb.4.6B zeigt für das ATM-Gen den Zusammenhang zwischen dem SNP G5557A und dem Fibroerisiko. Hier ergibt sich ein vollständig gegenteiliges Ergebnis. Von den 47 Patientinnen mit wt/wt-Status entwickelten 31% eine Fibrose mit dem Grad 2/3. Für

Patientinnen mit dem wt/s-Status nimmt dieser Anteil auf 10% ab und von den zwei Patientinnen mit s/s-Status entwickelte keine eine Fibrose mit dem Grad 2/3. Diese Daten deuten an, dass der SNP G5557A im ATM sich protektiv auswirkt und damit der Wildtypstatus als Risikoallel zu bewerten ist.

4.4. Einfluss des Genstatus auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit

In einer vorangehenden Untersuchung (Hoeller et al. 2003) war für 49 der in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebspatientinnen die individuelle Strahlenempfindlichkeit anhand der Zahl chromosomaler Deletionen der in den mit 6 Gy in-vitro bestrahlten Lymphozyten bestimmt worden. Abb.4.7 zeigt die entsprechende Verteilung dieser Werte. Im Mittel wird ein Wert von 3.74 chromosomalen Deletionen gemessen mit einer Standardabweichung von 0.72. Für die 49 Patienten zeigte sich aber eine deutliche

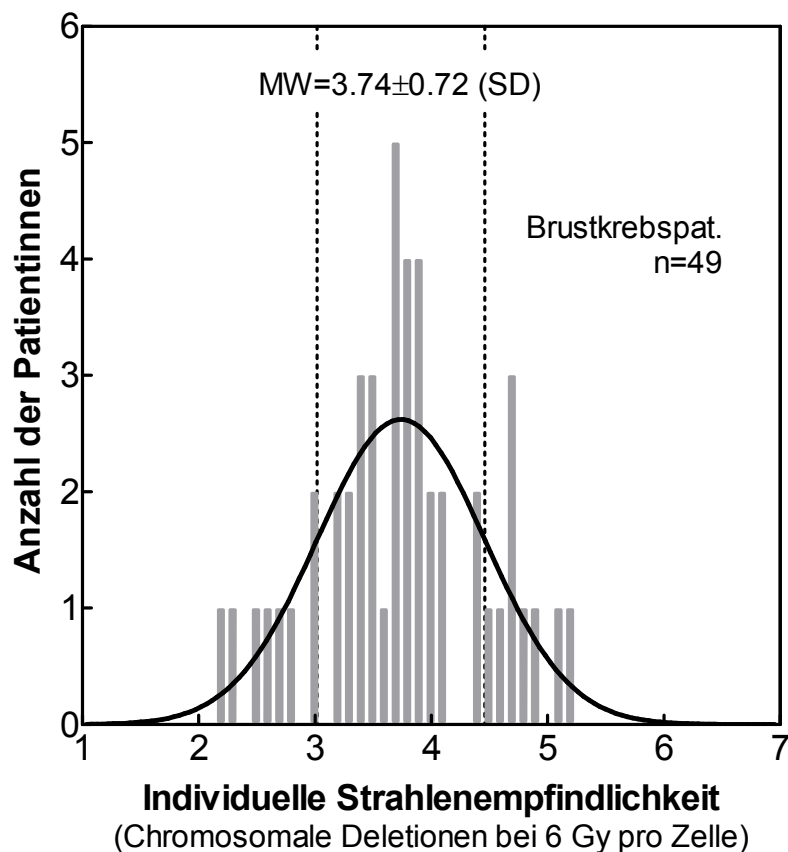


Abb.4.7: Verteilung der individuellen Strahlenempfindlichkeit bei 49 Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand in-vitro-bestrahlter Lymphozyten über die Zahl der chromosomalen Deletionen bestimmt (Hoeller et al. 2003)

Variation mit Werten zwischen 2.2 und 5.2 chromosomalen Deletionen pro Zelle. Anhand dieser Werte werden die Patienten in die drei Gruppen „resistent“, „normal“ und „empfindlich“ aufgeteilt. Dabei wird eine Patientin als „resistent“ eingestuft, wenn die Zahl der chromosomalen Deletionen $< MW-SD=3,02$ ist; dagegen als „sensitiv“, wenn für den Wert gilt $> MW+SD=4,46$ und als „normal“ bei dazwischen liegenden Werten (Abb.4.7, gepunktete Linien). Anhand dieser Grenzen können 9 der 49 Patienten als resistent, 10 als sensitiv und 30 als normal hinsichtlich ihrer individuellen Strahlenempfindlichkeit eingestuft werden.

Aufgrund dieser Werte konnte ebenfalls überprüft werden, welcher Zusammenhang zwischen den drei SNPs in den Genen XPD, XRCC1 sowie ATM mit der individuellen

Strahlenempfindlichkeit besteht. Abb.4.8 zeigt diesen Zusammenhang für den SNP

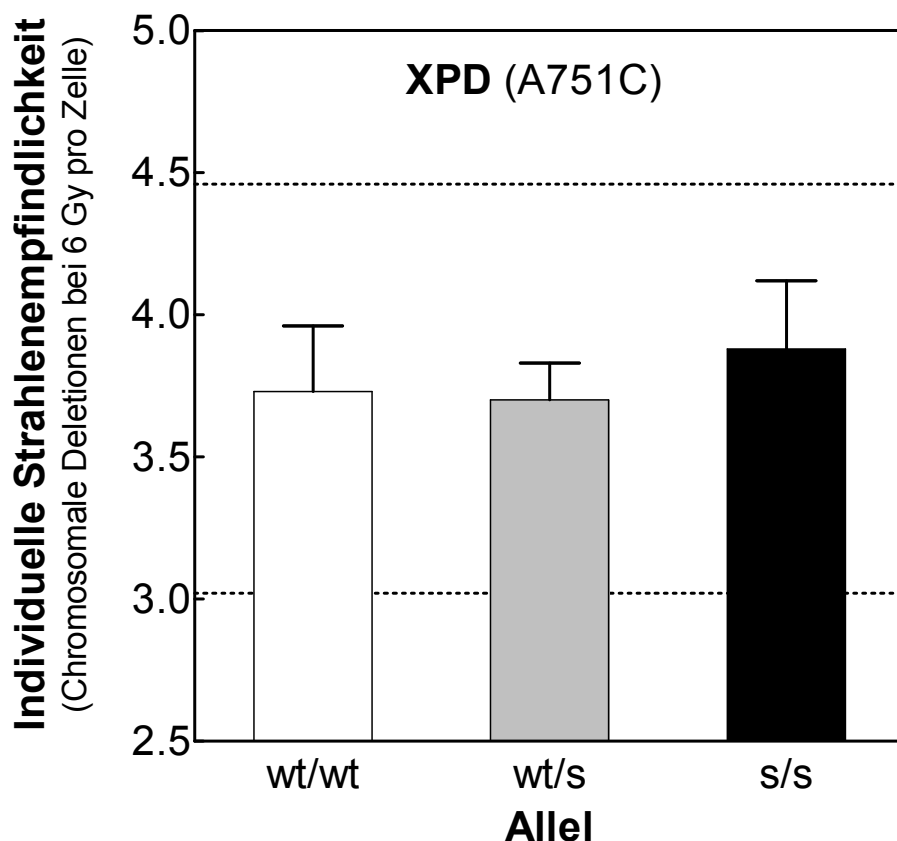


Abb.4.8: Einfluss des Status des XPD-Gens auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit bei Brustkrebspatientinnen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand in-vitro-bestrahlter Lymphozyten über die Zahl der chromosomalen Deletionen bestimmt (Hoeller et al. 2003). Die gepunkteten Linien geben die Grenzen aus Abb.4.7 wieder.

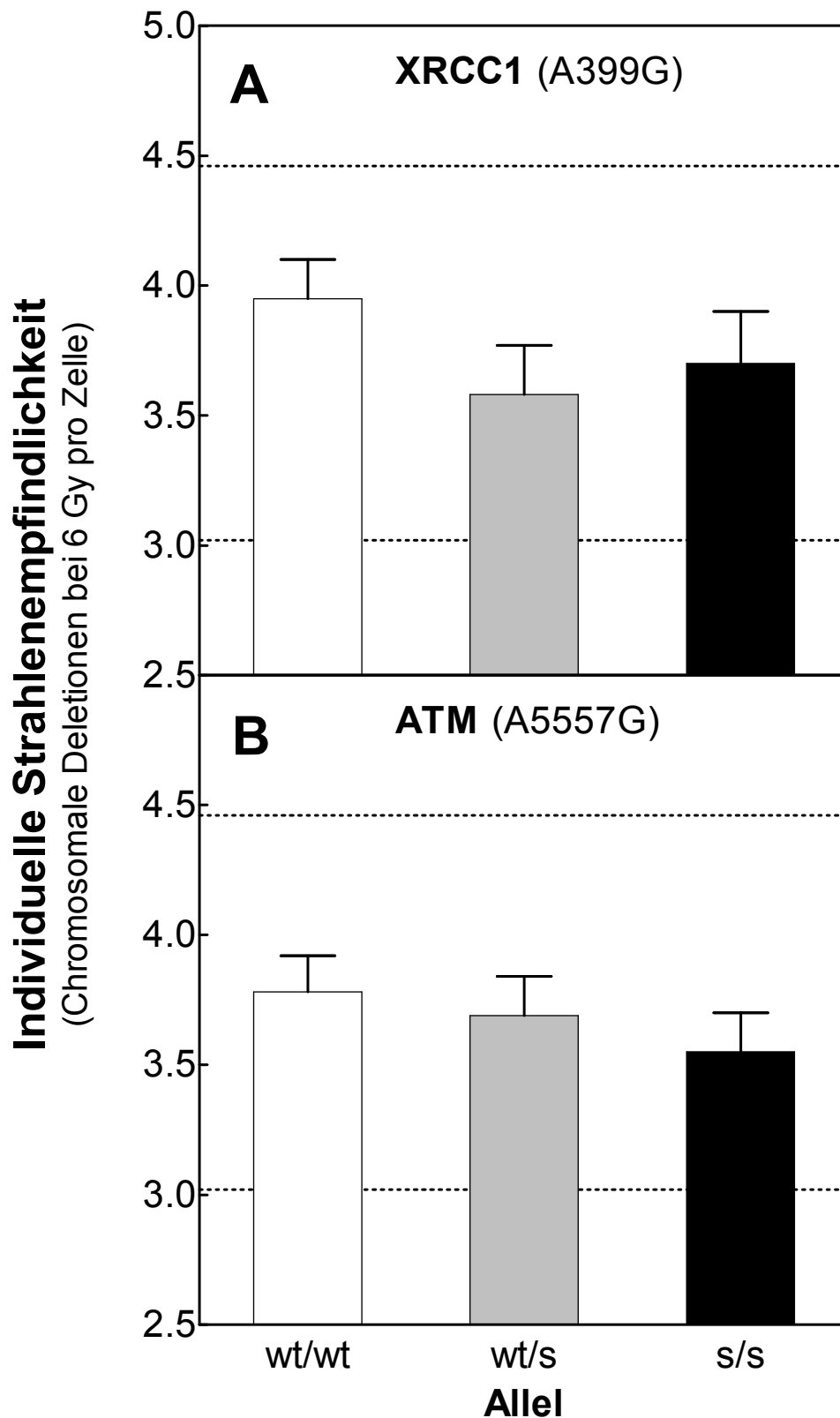


Abb.4.9: Einfluss von SNPs auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit bei Brustkrebspatientinnen. A) SNP A399G im XRCC1-Gen; B) SNP A5557G im ATM-Gen. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde anhand in-vitro-bestrahlter Lymphozyten über die Zahl der chromosomalen Deletionen bestimmt (Hoeller et al. 2003). Die gepunkteten Linien geben die Grenzen aus Abb.4.7 wieder.

A751C im XPD-Gen. Es ist zu erkennen, dass dieser SNP zu keiner deutlichen

Veränderung der individuellen Strahlenempfindlichkeit führt. Es kann somit daraus geschlossen werden, dass sich dieser SNP im XPD-Gen nicht auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit auswirkt.

Abb.4.9 zeigt diesen Zusammenhang für die beiden untersuchten SNPs in den Genen XRCC1 und ATM. Für beide Gene ist zu beobachten, dass der SNP zu einer Abnahme der Zahl an chromosomalen Deletionen und damit auch zur Abnahme der individuellen Strahlenempfindlichkeit führt. Für den SNP im ATM-Gen scheint dies besonders ausgeprägt zu sein. Diese Daten deuten damit an, dass diese beiden SNPs jeweils eine Strahlenresistenz bewirken.

5. DISKUSSION

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

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

5.1. Allelhäufigkeit

Die Polymorphismen in diesen Genen wurden mit der PCR-RFLP-Methode nachgewiesen. Diese Methode hat sich bereits seit langem zum Nachweis von SNPs etabliert und wurde bereits in vielen Untersuchungen angewandt. (Angele et al. 2003, Green et al. 2003, Green et al. 2002, Quarmby et al. 2003)

Bei dieser Methode ist das Fragment, welches den SNP enthält, zunächst mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen, um dann in einem zweiten Schritt mittels spezifischer Restriktionsenzyme das Vorhandensein des SNP zu überprüfen. Für die SNPs in den Genen XPD und XRCC1 wurden jeweils Restriktionsenzyme gewählt, die die Wildtypsequenz erkennen und schneiden. Liegt ein SNP vor, kann demzufolge das Restriktionsenzym nicht an das DNA-Fragment binden und das PCR-Produkt wird nicht geschnitten, weshalb dieses in seiner Länge nicht verändert wird. Bei einem heterozygoten Genstatus wird dementsprechend nur das eine Gen geschnitten, während das andere intakt bleibt. Die Fragmente können dann mittels einer Gelelektrophorese getrennt werden, so dass jeder Probe eindeutig ein bestimmter Genstatus zuzuordnen ist (Abb.4.2).

Hinsichtlich des SNPs A751C im XPD-Gen wurde insgesamt eine Allelhäufigkeit

von 55% gefunden, was von den in der Literatur veröffentlichten Werten von 38 bis 39% deutlich abweicht (Chang-Claude et al. 2005, Dianzani et al. 2006, Naccarati et al. 2007). In weiteren Untersuchungen ist zu überprüfen, ob dies auf Unterschiede in der Bevölkerung zurückzuführen ist, oder ein Indikator dafür, dass dieser SNP bei Brustkrebspatientinnen sehr häufig ist.

Für die beiden untersuchten SNPs in den Genen XRCC1 und ATM wurde eine Allelhäufigkeit von 42,0 bzw. 17,4 gefunden. Dies entspricht sehr gut Werten von 38 bis 40% wie sie für das XRCC1-Gen (Chang-Claude et al. 2005, De Ruyck et al. 2005, Dianzani et al. 2006) bzw. 13 bis 14% für das ATM-Gen (Andreassen et al. 2006b, Angele et al. 2003) gefunden wurden.

5.2. Fibroserisiko und individuelle Strahlenempfindlichkeit

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

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

Der Grad der Fibrose war von zwei erfahrenen Ärzten der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikum erhoben worden. Grundlage für diese Entscheidung war die LENT/SOMA-Skala. Von den insgesamt 69 Patienten entwickelten in dem beobachteten Zeitraum nur 17 eine Fibrose Grad 2/3, 14 nur eine vom Grad 1 und sogar 30 gar keine detektierbare Hautreaktion. Diese Verteilung entspricht dem generell erwarteten Spektrum einer Fibrose bei Brustkrebspatientinnen nach strahlentherapeutischer Behandlung in den Jahren 1980 bis 2000 (Borger et al. 1994, Hoeller et al. 2003).

Die individuelle Strahlenempfindlichkeit war für einen Teil (49) der Patientinnen dieser Untersuchung im Rahmen einer vorhergehenden Studie gemessen worden (Hoeller et al. 2003). Dieser Parameter war dabei anhand in-vitro bestrahlter Lymphozyten bestimmt worden, wobei die Zahl der chromosomalen Deletionen oder die Gesamtzahl der letalen Chromosomenschäden als Indikator der

Strahlenempfindlichkeit gemessen wurde. In Versuchen mit normalen humanen Hautfibroblasten war gezeigt worden, dass diese Zahl mit der entsprechenden Strahlenempfindlichkeit der Zelle korreliert (Borgmann et al. 2004).

Für die so bestimmte individuelle Strahlenempfindlichkeit wurde für die 49 Patientinnen eine deutliche Variation von 2.2 bis 5.2 mit einem Mittelwert von 3.74 und einer Standardabweichung von 0.72 gemessen. Hieraus ergibt sich für den Variationskoeffizienten ein Wert von $CV=19\%$, was den Werten aus anderen Arbeiten entspricht (Hoeller et al. 2003, Johansen et al. 1996, Oppitz et al. 2001).

5.3. Bedeutung der SNPs für Fibroserisiko

Diese Arbeit zeigte für zwei der drei untersuchten Polymorphismen eine deutliche Variation im Fibroserisiko. Dabei wurde für den Polymorphismus G399A im XRCC1 eine Zunahme und für den SNP G5557A im ATM-Gen eine Abnahme für das Fibroserisiko gefunden (Abb.4.6). Aufgrund dieser Daten muß für das XRCC1-Gen das Allel mit dem Nukleotid Adenin an der Position 399 als Risikoallel eingestuft werden, während beim ATM-Gen ein Risiko vorliegt, wenn die Wildtypsequenz vorliegt.

Für den Polymorphismus im XRCC1-Gen wurde von Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) ein ähnliches Ergebnis gefunden. Eine positive Korrelation zwischen dem Arg399Gln Polymorphismus und einem höheren Risiko für die Entwicklung einer adversen Reaktion in der Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen wurde ebenfalls von Thompson and West (Thompson et al. 2000) beschrieben. In einer neueren Arbeit finden Andreassen et al. (Andreassen et al. 2006a) allerdings keinen entsprechenden Zusammenhang für diesen SNP. Ruyck et al. (De Ruyck et al. 2005) konnte auch keine Assoziation zwischen diesem SNP und einem höheren Fibroserisiko finden. Chang-Claude et al. (Chang-Claude et al. 2005) beschreibt sogar bezüglich der Nebenwirkungen nach Strahlentherapie eine nicht-signifikante, aber tendenziell protektive Wirkung der XRCC1 Arg399Gln-Variante im Hinblick auf die Akutreaktion.

Für den von uns untersuchten Polymorphismus G5557A im ATM-Gen werden in anderen Arbeiten ganz unterschiedliche Assoziationen mit dem Auftreten einer Normalgeweberaktion gefunden. So fanden Andreassen et al. (Andreassen et al. 2006a) in einer Studie mit 41 Brustkrebspatientinnen, dass die Position A mit einem erhöhten Fibroserisiko assoziiert ist, was allerdings in anderen bzw. späteren und umfassenderen

Studien nicht bestätigt werden konnte (Andreassen 2005, Andreassen et al. 2006b). Von Angele et al. (Angele et al. 2003) wurde für diesen Polymorphismus keine entsprechende Beziehung gefunden.

Von Ianuzzie et al (Iannuzzi et al. 2002) wurde in einer Studie mit 46 Brustkrebspatientinnen beobachtet, dass bestimmte genetische ATM-Varianten mit einem erhöhten Normalgeweberisiko verbunden sind, da alle Patientinnen, die den Fibrosegrad 3/4 entwickelten oder eine Weichteilnekrose zeigten, eine ATM-missense-Mutation aufwiesen. Dagegen fanden Appleby et al. (Appleby et al. 1997) und Bremer et al. (Bremer et al. 2003) keinen entsprechenden Zusammenhang zwischen einem ATM-Polymorphismus und einer Normalgewebereaktion.

Für den SNP A751C im XPD-Gen wurde in dieser Arbeit keine eindeutige Assoziation mit dem Fibrosierisiko beobachtet (Abb.4.5). Auch von Chang-Claude et al. (Chang-Claude et al. 2005) wird für diesen Polymorphismus kein Zusammenhang mit einem erhöhten Normalgeweberisiko gefunden.

5.4. Bedeutung der SNPs für Strahlenempfindlichkeit

In dieser Arbeit wurde nicht nur die Bedeutung von Polymorphismen auf das Normalgeweberisiko bestimmt, sondern erstmalig auch parallel deren Bedeutung für die individuelle Strahlenempfindlichkeit.

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

Für den SNP A751C im XPD wurde keine eindeutige Assoziation mit dem Fibrosierisiko beobachtet. Das gleiche Ergebnis zeigt sich hinsichtlich der Bedeutung für die individuelle Strahlenempfindlichkeit. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass dieser SNP des XPD-Gens weder für das Fibrosierisiko noch für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Bedeutung ist.

Für den SNP G399A des XRCC1-Gens wird für das Fibrosierisiko eine Zunahme, dagegen für die Strahlenempfindlichkeit eine Abnahme gefunden. D.h. obwohl der SNP zu einer Abnahme der Strahlenempfindlichkeit führt, wird für das Fibrosierisiko eine

Zunahme beobachtet. Dieses Ergebnis deutet an, dass sich dieser SNP im XRCC1-Gen auch auf andere Prozesse auswirken muß, die letztendlich trotz verminderter Strahlenempfindlichkeit zu einem erhöhten Fibrosiserisiko führen.

Das XRCC1-Protein ist von zentraler Bedeutung bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen. Diese treten vor allem in Folge von ionisierender Strahlung im Rahmen eines oxidativen Schadens auf. Somit ist XRCC1 nach Bestrahlung ganz entscheidend an der DNA-Reparatur beteiligt, indem es für ein multidomänes Gerüstprotein codiert, welches eine wichtige Rolle in der BER einnimmt. Dieses Gerüstprotein interagiert mit der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) (Detektion von DNA Schäden), gleichzeitig mit der Ligase 3 (DNA-Ligation und Reparatur) und mit Pol β , PNK, und APE (Endprozessing und Lückenfüllung) (s. Abb.2.3. XRCC1-Pathway). In dieser Studie wurde angenommen, dass Polymorphismen in XRCC1 demzufolge in einer fehlerhaften bzw. eingeschränkten BER resultieren könnten, was wiederum zu einer Zunahme der Strahlenempfindlichkeit führen könnte.

Ladiges et al. (Ladiges et al. 2003) beschreibt einen SNP in Exon 10, der mit einer verminderten Basenexzisionsreparatur assoziiert ist. SNPs in dem BER-Protein XRCC1 wurden teilweise mit einem höheren Krebsrisiko assoziiert. Chacko et al. (Chacko et al. 2005), Smith et al. (Smith et al. 2003) und Sigurdson et al. (Sigurdson et al. 2004) berichten von einer Assoziation zwischen dem XRCC1 Arg194Trp Allel und einem erhöhten Brustkrebsrisiko, wohingegen die Assoziation von anderen nicht bestätigt werden konnte (Deligezer et al. 2004, Duell et al. 2001, Forsti et al. 2004, Moullan et al. 2003, Shen et al. 2005).

Eine Assoziation zwischen dem Arg399Gln Polymorphismus und einem höheren Risiko für die Entwicklung einer adversen Reaktion in der Strahlentherapie bei Brustkrebspatientinnen konnten Thompsen & West (Thompson et al. 2000) finden, basierend auf einer höheren Strahlenempfindlichkeit und chromosomaler Deletionen nach *in vitro*-Bestrahlung (Au et al. 2003, Hu et al. 2001b). Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) definierten den Arg399Gln Polymorphismus als „risk-allel“, der besonders im homozygoten Zustand (Arg/Arg-Genotyp) für ein höheres Risiko, eine Fibrose zu entwickeln, stand. Auch Moullan et al. (Moullan et al. 2003) stellte einen Zusammenhang zwischen dem Codon 399 Gln Allel und einem erhöhten Risiko für eine akute und späte Normalgewebereaktion (n: 254) fest. Chang-Claude et al. (Chang-

Claude et al. 2005) hingegen fand eine signifikante Assoziation des XRCC1 codon 399 Gln Allel in Kombination mit APEX codon 148 Glu Allel für ein reduziertes Risiko für eine Akutreaktion in einer Subgruppe von 104 Patienten (8 Fälle und 96 Kontrollen; n: 446), nicht aber in Kombination mit XPD.

Auf Grund der beobachteten Korrelationen der Variante Arg399Gln wurden ähnliche Tendenzen bei unseren Ergebnissen erwartet. Die Hypothese, dass der SNP in XRCC1 zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit durch mögliche Beeinträchtigung der BER führen könnte, wurde allerdings nicht bestätigt, während eine Assoziation zwischen Variante und Fibrose gefunden wurde.

5.5. Kombinationsanalyse der SNPs

Parallel zu dieser Arbeit wurde in einer zweiten Arbeit die Bedeutung von Polymorphismen in den Genen TGF β 1 und SOD2 untersucht.

Für den SNP C-509T des TGF-Gens wird sowohl für das Fibroserisiko eine Zunahme, als auch für die Strahlenempfindlichkeit eine Zunahme gefunden. Dieses Ergebnis deutet an, dass sich dieser SNP im TGF β 1-Gen über die Strahlenempfindlichkeit auf ein erhöhtes Fibroserisiko auswirken muss.

Für den SNP C1183T im SOD2-Gen wurde eine Abnahme im Fibroserisiko und ebenfalls eine Abnahme in der Strahlenempfindlichkeit gefunden, so dass für das SOD2-Gen die Wildtypsequenz mit einem Cytosin an der Position 1183 als Risikofaktor einzustufen ist. D.h. auch für diesen SNP kann angenommen werden, dass er über die Modifikation der Strahlenempfindlichkeit das Fibroserisiko beeinflusst.

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

Tab.5.1: Risikoallele in den Genen TGF β 1, SOD2, ATM, XRCC1 und XPD^a

<i>Gen</i>	<i>Polymorphismus</i>	<i>Risikoallel</i>
XRCC1	G-A, exon 10	A
XPD	A-C, exon 23	Kein Allel
ATM	G5557A	G
TGF β 1	C-059T	T
SOD2	C1183T	C

Daten stammen aus dieser Arbeit sowie aus der parallel durchgeführten Promotionsarbeit von Herrn stud. med. Sonko Borstelmann.

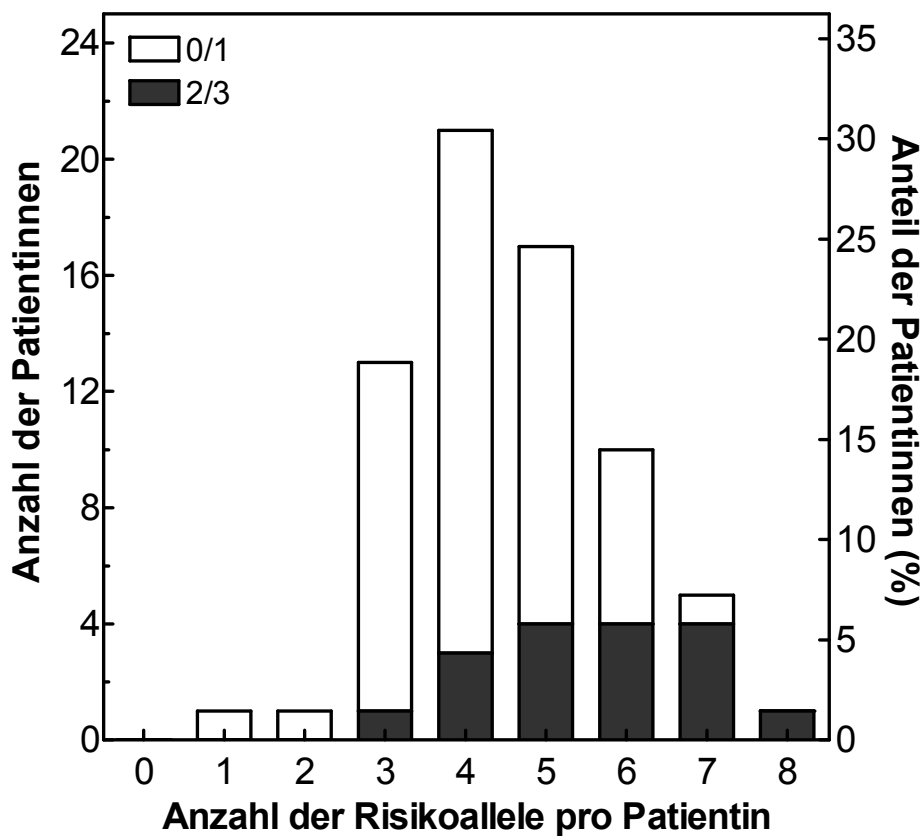


Abb.5.1: Verteilung der Risikoallele aus Tab.5.1 in Brustkrebspatientinnen. Die weiße Säule zeigt die Zahl der Patientinnen mit einer Fibrose vom Grad 0/1 und die schwarze Säule die Patientinnen mit einer Fibrose Grad 2/3.

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

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

Anzahl an Risikoallelen beobachtet wird. Bei 6 Risikoallelen entwickelten von den 10

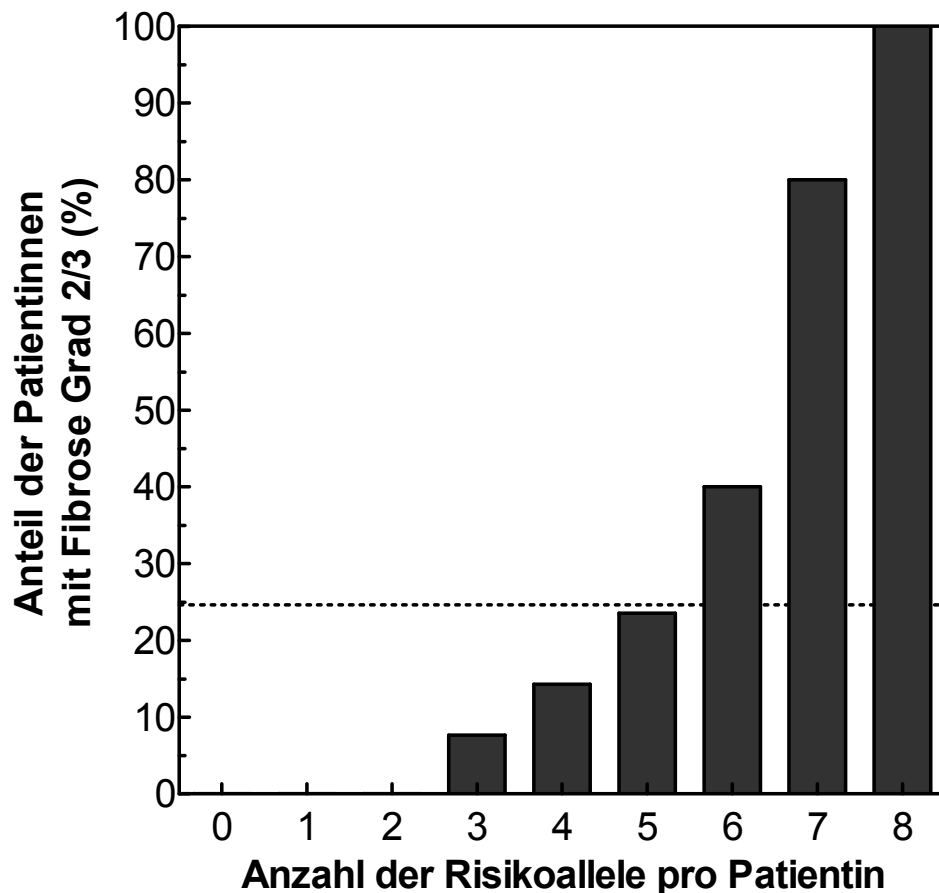


Abb.5.2: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Risikoallele in den Genen TGF β 1, SOD2, ATM und XRCC1 und dem Fibroserisiko für Brustkrebspatientinnen.

untersuchten Patientinnen bereits vier eine Fibrose vom Grad 2/3, bei 7 Risikoallelen waren diese bereits vier der fünf Patientinnen. Berechnet man für jede Anzahl an Risikoallelen den Anteil der Patientinnen mit Fibrose Grad 2/3 an allen Patientinnen, so ergibt sich der Zusammenhang, wie er in Abb.5.2 dargestellt ist. Hier zeigt sich sehr eindeutig und hoch signifikant ($p < 0.001$) die klare Zunahme des Fibroserisikos mit der Anzahl der Risikoallele.

Im Mittel waren für die 69 untersuchten Patientinnen ein Fibroserisiko von 24,6% festgestellt worden. Für Patientinnen mit bis zu vier Risikoallelen liegt dieses Risiko mit maximal 14% deutlich darunter. Ab sechs Risikoallelen liegt es hingegen mit einem Risiko von 40% bereits deutlich darüber und erreicht bei sieben und acht Allelen sogar die Werte von 80 und 100%. Auch wenn aufgrund der geringen Zahl der Patientinnen

mit dieser hohen Anzahl an Risikoallelen dieses klare Ergebnis mit einer gewissen Einschränkung zu betrachten ist, so zeigen diese Daten doch insgesamt sehr deutlich, dass bei Verwendung geeigneter Risikoallele, Patientinnen mit einem extrem hohen aber auch extrem niedrigen Fibroserisiko zu identifizieren sind.

Mit der Abb.5.1 konnte erstmalig basierend auf den Daten der beiden hier zusammengefassten Arbeiten für Brustkrebspatientinnen eine Verteilung der Risikoallele gezeigt werden. Der Befund, wonach diese Daten sehr gut durch eine Normalverteilung beschrieben werden kann, entspricht der Beobachtung, dass auch für andere Indikatoren, denen eine Bedeutung bei der Entwicklung von Normalgewebereaktionen nach Strahlentherapie zugesprochen wird, solch eine Verteilung gefunden wird (Dikomey et al. 2003). Diese Daten zeigen damit auch, dass es nicht eine Subgruppe an Patienten mit einem deutlich erhöhten Risiko, sondern eine Verteilung mit einem kontinuierlich ansteigenden Risiko gibt. Eine ähnliche Abhängigkeit von der Zahl der Risikoallele war zuvor bereits von Andreassen et al. (Andreassen et al. 2003) ebenfalls für Brustkrebspatientinnen gezeigt worden.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, dieses klare und überzeugende Ergebnis dieser beiden Arbeiten durch weitere Studien zu bestätigen und auch für andere Tumorentitäten zu untersuchen. Diese Untersuchungen könnten damit einen wichtigen Schritt zur Individualisierung der Strahlentherapie hinsichtlich der Normalgewebereaktionen leisten und damit ganz wesentlich zum Fortschritt dieser Therapie beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für 69 Brustkrebspatientinnen überprüft, ob Variationen (SNPs) in den Genen XPD (A751C), XRCC1 (G399A) und ATM (G5557A) einen Einfluss auf das Fibroserisiko nach Strahlentherapie haben. Zusätzlich wurde für eine Untergruppe von 49 Patientinnen untersucht, welchen Einfluß diese SNPs auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit haben.

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

Hinsichtlich des untersuchten SNPs im XPD-Gen wiesen von den 69 untersuchten Patientinnen insgesamt 9 in beiden Allelen einen Wildtypstatus (wt/wt) auf, 44 einen heterozygoten Status und 16 in beiden Allelen einen SNP. Bezüglich der untersuchten Variante in XRCC1 waren dies 26, 28 und 15 Patientinnen und beim ATM-Gen 47, 20 und 2. Für die beiden SNPs im XRCC1 und ATM entsprechen diese Werte den Daten einer europäischen Normalbevölkerung. Beim XPD-Gen liegt jedoch eine deutliche Abweichung vor, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass dieser Polymorphismus bei Brustkrebspatientinnen gehäuft auftritt.

Von den 69 Brustkrebspatientinnen dieser Studie haben nach einer Strahlentherapie 17 (24,6%) eine Fibrose vom Grad 2/3 entwickelt. Für die in dieser Arbeit untersuchten SNPs wurde für XRCC1 und ATM eine deutliche Assoziation mit dem Auftreten der Fibrose festgestellt. So lag für Patientinnen mit einem w/w-Status im XRCC1 das Fibroserisiko nur bei 11,5%, dagegen für Patientinnen mit s/s-Status bei 33,3%. Hinsichtlich des ATM nahm für Patienten mit w/w-Status das Fibroserisiko von 31% auf 0% bei s/s-Status ab. Aufgrund dieser Ergebnisse kann beim XRCC1-Gen der SNP als Risikofaktor eingestuft werden, während beim ATM-Gen dies für den Wildtypstatus gilt. Für XPD wurde kein Zusammenhang zwischen SNP und Fibroserisiko festgestellt.

Für eine Untergruppe von 49 Patientinnen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass beim ATM-Gen hinsichtlich der Bedeutung der SNP die gleiche Abhängigkeit auch für die individuelle Strahlenempfindlichkeit besteht. Dieses Ergebnis deutet damit an, dass der Einfluss des SNPs in ATM auf das Fibroserisiko über die Variation der Strahlenempfindlichkeit besteht.

Für den SNP A751C des XRCC1-Gens wird eine Assoziation mit einer Strahlenresistenz gefunden. Dieses Ergebnis deutet an, dass sich dieser SNP im XRCC1-Gen auch auf andere Prozesse auswirken muß, die letztendlich trotz verminderter Strahlenempfindlichkeit zu einem erhöhten Fibrosiserisiko führen.

Für den SNP A751C in XPD wurde sowohl für die individuelle Strahlenempfindlichkeit, als auch für das Fibrosiserisiko keine eindeutige Assoziation beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass dieser SNP in XPD-Gen weder für das Fibrosiserisiko noch für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Bedeutung ist.

In einer parallel durchgeführten Arbeit konnten für das TGF β 1-Gen der SNP (C-509T) als Risikofaktor und für das SOD2-Gen der SNP (C1183T) als protektives Allel identifiziert werden.

Insgesamt ergibt die gemeinsame Auswertung beider Arbeiten, dass hinsichtlich des Fibrosiserisikos bei Brustkrebspatientinnen maximal acht Risikoallele vorliegen können. Für diese Zahl wird eine Variation gefunden, die sich sehr gut mit einer Normalverteilung mit einem Mittelwert von 5 Risikoallelen beschreiben lässt. Das Fibrosiserisiko steigt dabei von 0% bei 0 bis 2 Risikoallelen auf 100% bei 8 Risikoallelen an. Dieses Ergebnis unterstreicht damit das große Potential von genetischen Markern wie SNPs zur prädiktiven Bestimmung der Normalgewebereaktion nach Strahlentherapie.

7. LITERATUR

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

Andreassen CN (2005) Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? *Acta Oncol* 44:801-15

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

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

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

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

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

Appleby JM, Barber JB, Levine E et al. (1997) Absence of mutations in the ATM gene in breast cancer patients with severe responses to radiotherapy. *Br J Cancer* 76:1546-9

Araujo SJ, Nigg EA, Wood RD (2001) Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol Cell Biol* 21:2281-91

Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH (2003) Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 111:1843-50

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

Bartelink H, Horiot J (2000) Factors in decision making in the treatment of breast cancer. *Radiother Oncol* 55:217-8

Bayreuther K, Francz PI, Rodemann HP (1995) [Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation]. *Ontogenez* 26:22-37

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

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

- Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol* 4:68-80
- Borger JH, Kemperman H, Smitt HS et al. (1994) Dose and volume effects on fibrosis after breast conservation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:1073-81
- Borgmann K, Dede M, Wrona A et al. (2004) For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:445-52
- Borgmann K, Haeberle D, Doerk T et al. (2007) Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes. *Radiother Oncol* 83:196-202
- Borgmann K, Roper B, El-Awady R et al. (2002) Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol* 64:141-52
- Bremer M, Klopper K, Yamini P et al. (2003) Clinical radiosensitivity in breast cancer patients carrying pathogenic ATM gene mutations: no observation of increased radiation-induced acute or late effects. *Radiother Oncol* 69:155-60
- Brock WA, Tucker SL, Geara FB et al. (1995) Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:1371-9
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177-86
- Budach W (1997) [Genetic predisposition and radiation sensitivity of tumors]. *Strahlenther Onkol* 173:469-79
- Bühling K J, Lepenies J, Witt K, (2004) Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Aufl., Urban & Fischer, Berlin Kiel Birmingham
- Burger A, Loffler H, Bamberg M et al. (1998) Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 73:401-8
- Burnet NG, Nyman J, Turesson I et al. (1992) Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *Lancet* 339:1570-1
- Burnet NG, Nyman J, Turesson I et al. (1994) The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules. *Radiother Oncol* 33:228-38
- Cesaretti JA, Stock RG, Lehrer S et al. (2005) ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:196-202
- Chacko P, Rajan B, Joseph T et al. (2005) Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 89:15-21
- Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL et al. (2005) Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:4802-9
- Chappell S, Guetta-Baranes T, Batowski K et al. (2004) Haplotypes of the alpha-1 antitrypsin gene in healthy controls and Z deficiency patients. *Hum Mutat* 24:535-6

- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP et al. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34
- De Boer J, Hoeijmakers JH (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21:453-60
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K et al. (2005) Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1140-9
- 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*.65,1240-8.
- Delanian, S. Lefaix, J. L. (2004). The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 73, 119-31.
- Delanian S, Lefaix JL (2004) The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 73:119-31
- Deligezer U, Dalay N (2004) Association of the XRCC1 gene polymorphisms with cancer risk in Turkish breast cancer patients. *Exp Mol Med* 36:572-5
- Denham JW, Hauer-Jensen M, Peters LJ (2001) Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:1105-6
- Dianzani I, Gibello L, Biava A et al. (2006) Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. *Mutat Res* 599:124-34
- Dikomey E, Borgmann K, Peacock J et al. (2003) Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56:1194-200
- Dorr W, Kraft M (1997) Effects of ageing and X-irradiation on the diurnal rhythm of mouse urinary bladder capacity. *Urol Int* 58:153-9
- Duell EJ, Millikan RC, Pittman GS et al. (2001) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:217-22
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ et al. (2000) Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21:965-71
- Egly JM (2001) The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS Lett* 498:124-8
- Emmert S, Slor H, Busch DB et al. (2002) Relationship of neurologic degeneration to genotype in three xeroderma pigmentosum group G patients. *J Invest Dermatol* 118:972-82
- Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L et al. (2004) Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:583-91

Forsti A, Angelini S, Festa F et al. (2004) Single nucleotide polymorphisms in breast cancer. *Oncol Rep* 11:917-22

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

Gotoff SP, Amirmokri E, Liebner EJ (1967) Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am J Dis Child* 114:617-25

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

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

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

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

Hall EJ, Schiff PB, Hanks GE et al. (1998) A preliminary report: frequency of A-T heterozygotes among prostate cancer patients with severe late responses to radiation therapy. *Cancer J Sci Am* 4:385-9

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

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

Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH et al. (2001) Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:353-65

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

Hoeijmakers JH (2001) DNA repair mechanisms. *Maturitas* 38:17-22; discussion 22-3

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

Hu B, Zhou XY, Wang X et al. (2001a) The radioresistance to killing of A1-5 cells derives from activation of the Chk1 pathway. *J Biol Chem* 276:17693-8

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

Hu JJ, Smith TR, Miller MS et al. (2001b) Amino acid substitution variants of APE1

and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22:917-22

Iannuzzi CM, Atencio DP, Green S et al. (2002) ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52:606-13

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

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

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

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

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

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

Ladiges W, Wiley J, MacAuley A (2003) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mech Ageing Dev* 124:27-32

Lamerdin JE, Montgomery MA, Stilwagen SA et al. (1995) Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics* 25:547-54

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* 90:10499-503

Lehmann AR (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85:1101-11

Lindahl T, Wood RD (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286:1897-905

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

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

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

- Matullo G, Palli D, Peluso M et al. (2001) XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22:1437-45
- Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW (1968) Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *Am J Dis Child* 116:557-8
- Mototani H, Mabuchi A, Saito S et al. (2005) A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 14:1009-17
- Moullan N, Cox DG, Angele S et al. (2003) Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1168-74
- Müller RP, Seegenschmiedt MH, Höffken K, Junginger T, Sauer J (1997) LENT-SOMA-Kriterien: Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapiefolgen in der Onkologie, *Deutsches Ärzteblatt Ausgabe 37*, 97(37)
- Naccarati A, Pardini B, Hemminki K, and Vodicka, P. (2007). Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. *Mutat Res* 635, 118-45.
- Naccarati A, Pardini B, Hemminki K et al. (2007) Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. *Mutat Res* 635:118-45
- Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21:3-9
- Oppitz U, Baier K, Wulf J et al. (2001) The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. *Int J Radiat Biol* 77:105-10
- Parshad R, Tarone RE, Price FM et al. (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* 294:149-55
- Peacock J, Ashton A, Bliss J et al. (2000) Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* 55:173-8
- Peters LJ (1990) The ESTRO Regaud lecture. Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response. *Radiother Oncol* 17:177-90
- Peters LJ, Wendt CD (1990) Tumor volume as a predictor of radiocurability--a drop in the bucket? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19:497-8
- Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF et al. (1990) An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol* 63:624-8
- Quarby S, Fakhoury H, Levine E et al. (2003) Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol* 79:137-43
- Ramsay J, Birrell G (1995) Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:339-44

- Reiser M, Kuhn FP, Debus J (2002) *Duale Reihe Radiologie*, Thieme, Stuttgart
- Rodemann HP, Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 35:83-90
- Rodemann HP, Binder A, Burger A et al. (1996) The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Int Suppl* 54:S32-6
- Rudat V, Dietz A, Conradt C et al. (1997) In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer. *Radiother Oncol* 43:181-8
- Rudat V, Dietz A, Nollert J et al. (1999) Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 53:233-45
- Sanger F, Air GM, Barrell BG et al. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265:687-95
- Sano M, Kuroi N, Nakayama T et al. (2005) Association study of calcitonin-receptor-like receptor gene in essential hypertension. *Am J Hypertens* 18:403-8
- Shen J, Gammon MD, Terry MB et al. (2005) Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:336-42
- 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* 58:604-8
- Shiloh Y (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Annu Rev Genet* 31:635-62
- Shimazaki A, Kawamura Y, Kanazawa A et al. (2005) Genetic variations in the gene encoding ELMO1 are associated with susceptibility to diabetic nephropathy. *Diabetes* 54:1171-8
- Shu XO, Cai Q, Gao YT et al. (2003) A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1462-7
- Sigurdson AJ, Hauptmann M, Chatterjee N et al. (2004) Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *BMC Cancer* 4:9
- Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT et al. (1980) Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6:1573-5
- Smith TR, Levine EA, Perrier ND et al. (2003) DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1200-4
- Spitz MR, Wu X, Wang Y et al. (2001) Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 61:1354-7

- Stein MB, Fallin MD, Schork NJ et al. (2005) COMT polymorphisms and anxiety-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 30:2092-102
- Streffer C (1997) [Genetic predisposition and radiation sensitivity of normal tissue]. *Strahlenther Onkol* 173:462-8
- Thompson LH, West MG (2000) XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res* 459:1-18
- Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992) Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer* 28A:1783-91
- Turesson I (1990) Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19:1569-74
- Turesson I, Nyman J, Holmberg E et al. (1996) Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36:1065-75
- van der Horst GT, Meira L, Gorgels TG et al. (2002) UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (Csa) mutant mice. *DNA Repair (Amst)* 1:143-57
- van Steeg H, Kraemer KH (1999) Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today* 5:86-94
- Vinh-Hung V, Verschraegen C (2004) Breast-conserving surgery with or without radiotherapy: pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 96:115-21
- Vodicka P, Kumar R, Stetina R et al. (2004) Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 25:757-63
- Weichselbaum RR, Epstein J, Little JB et al. (1976) Inherent cellular radiosensitivity of human tumors of varying clinical curability. *AJR Am J Roentgenol* 127:1027-32
- West CM, Davidson SE, Elyan SA et al. (2001) Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:10-5
- West CM, Davidson SE, Hendry JH et al. (1991) Prediction of cervical carcinoma response to radiotherapy. *Lancet* 338:818
- West CM, Elyan SA, Berry P et al. (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 68:197-203
- Wood RD (1999) DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 81:39-44
- Wood RD, Aboussekhra A, Biggerstaff M et al. (1993) Nucleotide excision repair of DNA by mammalian cell extracts and purified proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58:625-32
- Woods WG, Byrne TD, Kim TH (1988) Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* 62:2341-5

8. DANKSAGUNG

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

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

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

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Frau Alexandra Zilinski für ihre gute technische Unterstützung, die praktische Anleitung und insbesondere für die Isolierung der Genomischen DNA sowie der Hilfsbereitschaft bei der experimentellen Arbeit. Auch ihr freundliches motivierendes Wesen sei hier erwähnt. Danke Alex.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen engen Freunden für die Unterstützung, die Geduld und die Nachsicht.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Borgmann und Herrn Dr. Oliver Zschenker, die meine Arbeit mit großem Interesse und Engagement begleitet haben und mir auf dem Gebiet der Strahlenbiologie einen sehr interessanten Einblick verschaffen konnten. Ich schätze sie nicht nur als Wissenschaftler sehr, sondern auch als Doktormutter bzw. Doktorvater und hätte mir keine bessere Betreuung als durch die beiden wünschen können. Sie waren stets hilfsbereit, geduldig und jederzeit unterstützend und motivierend an meiner Seite. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Dankeschön.

9. LEBENSLAUF

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit mit dem Titel „Bedeutung von Einzelnukleotidpolymorphismen in den Genen XRCC1, XPD und ATM bei Brustkrebspatientinnen für die Fibrose nach Strahlentherapie“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

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

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

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

Hamburg, den 30.08.2011

Inga Kathleen Böckelmann