

Jörg Hümmerich

Dr. sc. hum.

## **Untersuchungen zur Erkennung individueller Strahlenempfindlichkeit durch Analyse der mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen**

Geboren am 15.09.70 in Neuwied

Diplom der Fachrichtung Umweltschutz am 05.10.1999 an der Fachhochschule Bingen

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Bartsch

**Zielsetzung:** Das Auftreten unerwünscht starker Strahleneffekte im Normalgewebe stellt ein wesentliches Problem in der Strahlentherapie dar. Die Reaktion auf die Bestrahlung ist individuell sehr unterschiedlich und kann bisher nicht verlässlich vorausgesagt werden. Herkömmliche *in vitro* Methoden zur Erfassung der individuellen Strahlenempfindlichkeit korrelieren häufig nur unzureichend mit den am Patienten auftretenden Nebeneffekten und sind aufgrund des Aufwands in der Durchführung für den klinischen Einsatz nur wenig geeignet. Die DNA stellt das empfindlichste Ziel ionisierender Strahlung (IR) dar. Deshalb wird angenommen, dass die Fähigkeit zur Reparatur IR-induzierter Schäden für die Strahlenempfindlichkeit der Zelle entscheidend ist. Durch die Untersuchung der Expression von DNA-Reparaturgenen sollten mögliche Biomarker zur Vorhersage einer klinischen Strahlenüberempfindlichkeit aufgedeckt werden. Auf der Basis solcher prädiktiven Expressionsmarker soll in Zukunft ein klinisch nutzbarer Test für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Patienten entwickelt werden.

**Methodik:** Im ersten Teil der Arbeit dienten lymphoblastoide AT-Zellen als Prototyp für Zellen mit einer übermäßigen Empfindlichkeit gegenüber IR. Die Strahlenüberempfindlichkeit dieser Zellen wurde *in vitro* mit dem alkalischen *Comet-Assay* und durch Wachstumskurven überprüft. Die mRNA-Expression von DNA-Reparaturgenen in bestrahlten AT-Zellen wurde anschließend mit Normalzellen verglichen. Zur Erfassung der Genexpression von DNA-Reparaturgenen wurden selbst entwickelte cDNA-Arrays und die quantitative RT-PCR eingesetzt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die konstitutive Genexpression in peripheren Blutlymphozyten (PBL) von Prostatakrebspatienten vor einer Strahlentherapie mit optimierten cDNA-Arrays und der quantitativen RT-PCR untersucht. Die Reaktion der Patienten auf die Strahlenbehandlung wurde in der Klinik erfasst und mit epidemiologischen Methoden ausgewertet. Weiterhin wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes die zelluläre Strahlenempfindlichkeit an PBL dieser Patienten *in vitro* mit dem *Comet-Assay* bestimmt und die Antioxidantienpiegel im Blut der Patienten gemessen. Die Expressionsprofile wurden schließlich auf ihre Korrelation mit den klinischen, den *in vitro* und den analytischen Daten überprüft.

**Ergebnisse:** Die AT-Zellen hatten im Vergleich zu den Normalzellen nach Bestrahlung eine auffällig geringere Wachstumsrate, die vermutlich auf eine geringere Überlebensrate der AT-Zellen zurückzuführen ist. Im DNA-Reparaturtest (*Comet-Assay*) zeigten sich keine Unterschiede zwischen AT- und Normalzellen. Die Bestrahlung von AT- und Normalzellen führte dagegen zu unterschiedlichen Expressionsmustern. Insbesondere die Induktion von *CDKN1A* und *PCNA* unterschied beide Zelltypen voneinander.

Durch die Analyse der konstitutiven mRNA-Expression mit cDNA-Arrays am Kollektiv der Prostatakrebspatienten (n = 59) wurde eine Gruppe von Genen identifiziert, die von den Patienten unterschiedlich stark exprimiert wurden. Die Expression dieser Gene korrelierte bedingt mit der klinischen Strahlenempfindlichkeit. Auffällig war, dass alle Patienten mit hohen Expressionswerten für diese Kandidatengene (n = 9) nach Strahlentherapie keine starken Nebenwirkungen zeigten. Ausgeprägte Nebenwirkungen wurden dagegen gehäuft bei Patienten mit niedrigen Expressionswerten beobachtet. Die Korrelation zwischen der klinischen und der zellulären Strahlenempfindlichkeit (*Comet-Assay*) war gering, obwohl bei strahlenüberempfindlichen Patienten auch häufiger schlechte DNA-Reparaturparameter beobachtet wurden. Ebenso war die Korrelation zwischen der Genexpression und der zellulären Strahlenempfindlichkeit gering.

Es wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Ascorbatkonzentration und der klinischen Strahlenempfindlichkeit der Patienten beobachtet, wobei überempfindliche Patienten höhere Ascorbatkonzentrationen im Blut hatten. Ebenso hatten Patienten mit hohen Expressionswerten für die identifizierten Kandidatengene signifikant niedrigere Ascorbat Spiegel. Darüber hinaus wurde die Strahlenempfindlichkeit der Patienten mit niedrigen Expressionswerten signifikant durch  $\gamma$ - und nahezu signifikant durch  $\alpha$ -Tocopherol beeinflusst. Auch hier hatten die empfindlichen Patienten höhere Blutkonzentrationen.

**Schlussfolgerungen:** Strahlenüberempfindliche AT-Zellen zeigen nach Bestrahlung ein anderes Expressionsmuster für *CDKN1A* und *PCNA* als Normalzellen. Dieses unterschiedliche Expressionsverhalten kann möglicherweise als Biomarker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Patienten genutzt werden. Die konstitutive mRNA-Expression bestimmter DNA-Reparaturgene nimmt Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von Patienten. Hohe Expressionswerte für die identifizierten Gene scheinen mit einem Schutz vor starken Strahlennebenwirkungen einherzugehen. Eine schwache Expression führt jedoch nicht zwangsläufig zu unerwünschten Strahleneffekten, scheint aber das Risiko dafür zu erhöhen. Insbesondere die Expression von Genen aus dem Reparaturweg der homologen Rekombination wie *RAD51*, *RAD52*, *MRE11A*, *BRCA1* und *BRCA2* könnten geeignete Kandidaten für die Entwicklung eines biologischen Tests zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit sein. Sowohl die Strahlenempfindlichkeit der Patienten als auch die Genexpression werden von weiteren Faktoren, wie beispielsweise den Ascorbat- und Tocopherolspiegeln im Serum der Patienten, beeinflusst.