

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Katrin Wiebalk

aus Bremervörde

Tag der mündlichen Prüfung:



Strahleninduzierte Genexpression von  
Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen  
als Biomarker für individuelle Strahlenempfindlichkeit

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Odilia Popanda

Prof. Dr. Michael Wink



Aus der Abteilung  
Toxikologie und Krebsrisikofaktoren  
Leiter: Prof. Dr. Helmut Bartsch  
am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder in einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 22. November 2006

Katrin Wiebalk



## Zusammenfassung

**Zielsetzung:** Ein großes Problem der Strahlentherapie ist das Auftreten von schweren Nebenwirkungen. Die Reaktion auf die Bestrahlung ist individuell sehr unterschiedlich und kann bislang mit herkömmlichen *in vitro* Methoden nicht verlässlich vorausgesagt werden. Die Untersuchung der Induzierbarkeit von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen nach Bestrahlung von Lymphozyten *in vitro* soll mögliche Biomarker zur Bestimmung der individuellen klinischen Strahlenempfindlichkeit aufdecken. Mithilfe dieser Marker könnte in Zukunft ein klinisch nutzbarer Test entwickelt werden.

**Methoden:** Die Induzierbarkeit der Genexpression von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen nach  $\gamma$ -Bestrahlung von Lymphozyten *in vitro* wurde mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Zunächst wurden die experimentellen Bedingungen an Lymphozyten von gesunden Blutspendern optimiert. 99 Prostatakrebspatienten wurden vor der Strahlentherapie rekrutiert und an ihren Lymphozyten wurde die Induzierbarkeit von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *TP53*, *XPC*, *GADD45A* und *DDB2* 4h nach Bestrahlung *in vitro* bestimmt. Die erhaltenen Induktionswerte wurden mit dem Ausmaß der Nebenwirkungen verglichen, die die Patienten während ihrer Bestrahlung tatsächlich entwickelten. Zum besseren Verständnis der im ersten Teil bestimmten Unterschiede in der Induktion wurde im Zellmodell an p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen untersucht, ob das Fehlen von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) eine Auswirkung auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat. Desweiteren wurde die Technik der RNA-Interferenz angewendet, um die Expression des Gens *CDKN1A* zu vermindern. Die Auswirkungen auf die Expression anderer DNA-Reparaturgene wurden mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR bestimmt.

**Ergebnisse:** Bei den sechs untersuchten Genen konnte die Induktion von *XPC* als möglicher Biomarker für individuelle klinische Strahlenempfindlichkeit identifiziert werden. Da Rauchen einen starken Effekt auf die *XPC*-Induktion hatte ( $p < 0,01$ ), wurde ein logistisches Regressionsmodell verwendet, um so die Assoziation der *XPC*-Induktion und der Strahlenempfindlichkeit für Tabakkonsum zu adjustieren. Nach dem Adjustieren ergab sich ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für klinische Strahlenempfindlichkeit in den Patienten mit hohen *XPC*-Induktionsfaktoren (Odds-Ratio: 5,3;  $p = 0,03$ ; Konfidenzintervall: 1,25-24,5). Im Zellmodell zeigten sich keine Unterschiede nach Bestrahlung im Wachstumsverhalten und im DNA-Reparaturtest (*Comet Assay*) in p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen. Es konnte jedoch ein deutlicher Unterschied in der Verteilung auf die Zellzyklusphasen beobachtet werden. p21-defiziente Zellen wurden nach Bestrahlung im Gegensatz zu der parenteralen Zelllinie nicht in der G1-Phase des Zellzyklus angehalten. Die Experimente mit p21-siRNA zeigten, dass nach Reduktion der *CDKN1A*-Transkriptmenge eine Erhöhung der Mengen von *PCNA* und *GADD45A* eintritt. Auch bei verminderter *CDKN1A*-Menge blieb die Induzierbarkeit von *CDKN1A* nach Bestrahlung erhalten.

**Schlussfolgerungen:** Das Induktionsverhalten von *XPC* nach Bestrahlung *in vitro* könnte sich möglicherweise als prädiktiver Marker für klinische Strahlenempfindlichkeit eignen. Allerdings ist zu beachten, dass das Rauchverhalten der untersuchten Patienten einen starken Einfluss auf die Induktion von *XPC* hatte, was eine Adjustierung nötig machte. Für die Entwicklung eines aussagekräftigen Tests werden weitere Untersuchungen an größeren Patientengruppen nötig sein sowie komplexere Auswertungen mit verschiedenen Markern wie auch der konstitutiven RNA-Expression, Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen, Antioxidantienspiegel im Plasma und weiteren Faktoren. Die Methode der RNA-Interferenz eignet sich, um zelluläre RNA-Mengen zeitweise zu reduzieren und so weiterführende mechanistische Untersuchungen durchzuführen.



## Summary

**Aim:** Radiotherapy is limited by occurrence of severe side effects. Inter-individual variation in sensitivity of normal tissue to IR in cancer patients can be high and can not be reliably predicted prior therapy. To identify possible biomarkers for clinical hypersensitivity to radiation, inducibility of cell cycle control DNA-repair genes after irradiation of lymphocytes *in vitro* was measured. Based on these markers, a clinical assay for hypersensitivity to radiation could be developed.

**Methods:** Inducibility of gene expression of cell cycle control and DNA-repair genes after  $\gamma$ -irradiation of lymphocytes *in vitro* was analyzed using quantitative real-time PCR. Firstly, experimental conditions were optimized with lymphocytes from healthy blood donors. Then, 99 prostate cancer patients were recruited prior to radiotherapy and in their lymphocytes, inducibility of *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *TP53*, *XPC*, *GADD45A* and *DDB2* 4h was measured after irradiation *in vitro*. Induction factors were compared with the incidence of side effects which patients developed during therapy.

For a better understanding of the differences in gene induction, a cell culture model with p21-proficient and p21-deficient cells was used to determine the effect of loss of *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) on cellular radiosensitivity. In addition, RNA interference was used to reduce expression of *CDKN1A* gene. The effect on expression of other DNA-repair genes was determined with quantitative real-time PCR.

**Results:** Out of the six genes investigated, induction of *XPC* could be identified as a possible biomarker for predicting clinical hypersensitivity to radiation. As tobacco consumption was shown to affect *XPC* induction strongly, a logistic regression model was used to adjust the association of *XPC* induction and hypersensitivity for tobacco consumption. After adjustment for smoking, individuals with highest *XPC* inducibility showed an increased risk to suffer from adverse reactions during radiotherapy (Odds-Ratio: 5,3;  $p = 0,03$ ; confidence limits: 1,25-24,5).

In the cell culture model, no differences between p21-proficient and p21-deficient cells were found with regard to cell growth and DNA repair (*Comet Assay*) after irradiation. However, a pronounced difference in distribution into the different phases of cell cycle could be observed. p21-deficient cells showed no stop in G1-phase while p21-proficient did. The experiments with p21-siRNA showed a reduction of *CDKN1A* mRNA and an increase of *PCNA* and *GADD45A* mRNA amounts. Inducibility of *CDKN1A* after irradiation could be measured although the *CDKN1A* mRNA amount was reduced by siRNA.

**Conclusion:** *XPC* induction after irradiation *in vitro* may serve as a predictive marker for clinical hypersensitivity to radiation. Smoking habits of the analyzed patients have however a strong effect on *XPC* induction thus requiring adjustment for tobacco consumption. Further mechanistic analyses as well as molecular-epidemiological studies are necessary to establish *XPC* mRNA induction *in vitro* as a biomarker for hypersensitivity to radiation. Possible factors for a more complex analysis are constitutive RNA expression, polymorphisms in DNA-repair genes, antioxidant levels in plasma and others.

RNA interference is a suitable method to reduce RNA levels for a certain time which allows further mechanistic analyses.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Strahlentherapie und ihre Nebenwirkungen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Strahleneffekte bei Beckenbestrahlung von Prostatakrebspatienten	2
1.2	<b>Zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung</b>	<b>2</b>
1.2.1	DNA-Reparatur	5
1.3	<b>Test zur Erkennung von Strahlenüberempfindlichkeit</b>	<b>13</b>
1.4	<b>Ziele der Untersuchungen</b>	<b>14</b>
1.4.1	Untersuchungen an Lymphozyten von Prostatakrebspatienten	15
1.4.2	Untersuchungen zur Bedeutung von <i>CDKN1A</i> ( <i>p21</i> , <i>Cip1</i> , <i>WAF1</i> )	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>17</b>
2.2	<b>Allgemeine Voraussetzung für die experimentellen Arbeiten</b>	<b>23</b>
2.3	<b>Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Spendern</b>	<b>23</b>
2.3.1	Isolierung der Lymphozyten	24
2.3.2	Analyse der Geninduktion mittels quantitativer Realtime-PCR	24
2.4	<b>Studie zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Prostatakrebspatienten</b>	<b>33</b>
2.4.1	Bewertung der klinischen Strahlenempfindlichkeit der Prostatakrebspatienten	34
2.4.2	Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die Geninduktionsanalyse	35
2.4.3	Gewinnung des Patientenmaterials	35
2.4.4	Analyse der Geninduktion bei Prostatakrebspatienten mittels quantitativer Realtime-PCR	36
2.5	<b>Untersuchungen zur Bedeutung von <i>CDKN1A</i> (<i>p21</i>, <i>Cip1</i>, <i>WAF1</i>) an p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen</b>	<b>37</b>
2.5.1	Beschreibung der Zelllinien und ihre Kultivierung und Konservierung	37
2.5.2	Untersuchung der zellulären Strahlenempfindlichkeit von p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen	37
2.5.3	Analyse der Geninduktion nach Bestrahlung mittels quantitativer Realtime-PCR	40
2.5.4	Stummschaltung von <i>CDKN1A</i> ( <i>p21</i> , <i>Cip1</i> , <i>WAF1</i> ) in p21-kompetenten HCT116-Zellen mit siRNA	41
2.6	<b>Statistische Berechnungen</b>	<b>48</b>
2.6.1	Mittelwerte, Variationskoeffizienten und Mediane	48
2.6.2	Der Wilcoxon (Mann-Whitney) two sample Test	48
2.6.3	Der Kruskal-Wallis Test	49

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
3.1	Überprüfung der RNA-Qualität	52
3.2	Überprüfung der Qualität der Erststrang-cDNA	53
3.3	Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Spendern	54
3.4	<b>Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen in Lymphozyten von Prostatakrebspatienten nach Bestrahlung</b>	<b>55</b>
3.4.1	Bestimmung der akuten klinischen Strahlenempfindlichkeit der Prostatakrebspatienten und ihre Abhängigkeit von ausgewählten anthropometrischen und klinischen Merkmalen	59
3.4.2	Assoziation der Induktionsfaktoren mit dem Antioxidantienspiegel	67
3.5	<b>Untersuchungen an zur Bedeutung von <i>CDKN1A</i> (<i>p21</i>, <i>Cip1</i>, <i>WAF1</i>) an p21-defizienten und p21-kompetenten HCT116-Zellen</b>	<b>71</b>
3.5.1	Untersuchung der zellulären Strahlenempfindlichkeit	71
3.5.2	Analyse der Geninduktion bestrahlter HCT116-Zellen	77
3.5.3	Stummschaltung von <i>CDKN1A</i> ( <i>p21</i> , <i>Cip1</i> , <i>WAF1</i> ) in p21-kompetenten HCT116-Zellen mit siRNA	81
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
4.1	Qualität der Messungen mittels quantitativer Realtime-PCR	93
4.2	<b>Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen in Lymphozyten nach Bestrahlung</b>	<b>93</b>
4.3	<b>Untersuchungen zur Bedeutung von <i>CDKN1A</i> (<i>p21</i>, <i>Cip1</i>, <i>WAF1</i>) für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit</b>	<b>100</b>
4.3.1	Vergleich von p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen	100
4.3.2	Stummschaltung von <i>CDKN1A</i> ( <i>p21</i> , <i>Cip1</i> , <i>WAF1</i> )	102
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>131</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AT	<i>ataxia telangiectasia</i> , Ataxia Teleangiectasia
BER	<i>base excision repair</i> , Basen-Exzisions-Reparatur
BMI	<i>body mass index</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA, Erststrang-cDNA
CTC	<i>common toxicity criteria</i>
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsRNA	<i>double strand RNA</i> ; doppelsträngige RNA
esiRNA	<i>endoribonuclease-prepared siRNA</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s <sup>2</sup> )
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis (1 Gy = 1 J/kg)
h	Stunde(n)
HR	<i>homologous recombination</i> , homologe Rekombination
IR	<i>ionizing radiation</i> , ionisierende Strahlung
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molarität (Mol pro Liter)
min	Minute(n)
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NER	<i>nucleotide excision repair</i> , Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	<i>non homologous end joining</i> , nicht homologes "End-Joining"
Pack-years	„Packungsjahre“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Realtime-PCR	„Echtzeit“-PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription/ Transkriptase
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
ssRNA	<i>single strand RNA</i> ; einzelsträngige RNA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient



# 1 Einleitung

Die Strahlentherapie ist neben der Chemotherapie und der Operation eine der wichtigsten Waffen im Kampf gegen Tumorzellen. Das Ziel der Bestrahlung von Tumoren ist eine möglichst effektive Zerstörung des Tumorgewebes bei geringer Schädigung des umliegenden normalen Gewebes. In vielen Fällen ist eine exakte, tumorspezifische Applikation der Strahlung nicht möglich, so dass auch gesundes Gewebe bestrahlt wird, was zu strahlenbedingten Nebenwirkungen führen kann. Die Therapie ist für die überwiegende Zahl der Patienten jedoch gut verträglich, sie reagieren darauf mit keinen oder nur geringfügigen Nebenwirkungen. Bei bis zu 15 % der Patienten treten allerdings schwerwiegendere Akut- und Spätreaktionen des bestrahlten Normalgewebes auf, die zum Abbruch der Therapie führen bzw. eine Fibrose oder einen strahleninduzierten Tumor verursachen können (Alapetite et al. 2000; Oppitz et al. 1999; Rosen et al. 1999). Heute ist ein Teil der Faktoren bekannt, welche die Verträglichkeit einer Strahlentherapie beeinflussen. Allerdings bleibt die Ursache von etwa 70 % aller Nebenwirkungen ungeklärt (Turesson et al. 1996).

## 1.1 Strahlentherapie und ihre Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen einer Strahlentherapie kann man in akute und chronische Nebenwirkungen unterteilen. Akute Effekte treten während der Behandlung auf und bleiben für 1 bis 2 Monate nach Beenden der Behandlung bestehen. Chronische Effekte treten dagegen frühestens 6 bis 9 Monate nach der Behandlung auf, manchmal aber auch erst viele Jahre später (Rosen et al. 2000a).

Die Nebenwirkungen der Strahlentherapie lassen sich durch verschiedene Maßnahmen verringern. Die Beschränkung auf ein möglichst kleines Zielvolumen senkt die Wahrscheinlichkeit und Ausprägung von Nebenwirkungen. Um das gesunde Gewebe möglichst wenig zu bestrahlen, werden Mehrfelder- oder Bewegungsbestrahlung eingesetzt, so dass nur das Tumorgewebe ständig im Fokus der Strahlung ist. Durch genaue Lokalisierung des Tumors durch moderne bildgebende Verfahren kann die Bestrahlung gezielter eingesetzt werden. Durch die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) ist es möglich, empfindliche Strukturen sogar innerhalb des Zielgewebes auszugrenzen (Nilsson et al. 2004). Mit der dreidimensionalen konformalen Strahlentherapie (3DCRT) ist es gelungen, das Volumen des bestrahlten

Normalgewebes um 40-50 % gegenüber konventionellen Methoden zu verringern (Nilsson et al. 2004). Weitere Faktoren, die die Nebenwirkungen beeinflussen, sind die Art der Applikation, Qualität der Strahlung, das Fraktionierungsschema und die Fraktionsdosis (Kauffmann et al. 1996; Rosen et al. 2000a; Rosen et al. 2000b).

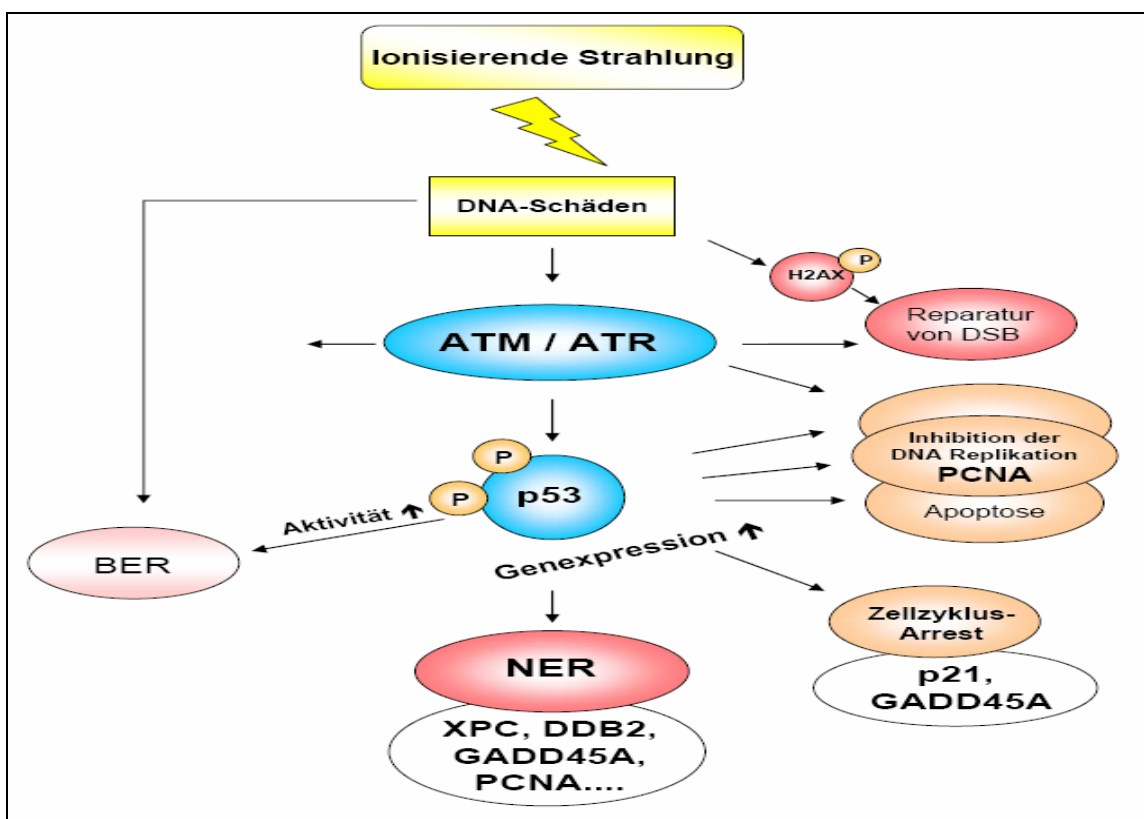
### **1.1.1 Strahleneffekte bei Beckenbestrahlung von Prostatakrebspatienten**

Das Prostatakarzinom ist die häufigste bösartige Neuerkrankung des Mannes in der westlichen Welt und tritt meist im fortgeschrittenen Alter auf (Dearnaley et al. 1999; Fransson et al. 2002; Nilsson et al. 2004). Über die Ätiologie dieser Erkrankung ist bisher wenig bekannt (Nilsson et al. 2004). Die Behandlungsformen sind in erster Linie Operation und Strahlentherapie (Jani und Hellman 2003). Eine radikale Prostatektomie bietet den Vorteil einer besseren Bewertung der Erkrankung anhand des entnommenen Materials, birgt aber ein höheres Risiko für schwere Komplikationen wie Impotenz und Inkontinenz. Daher ist die Bestrahlung von Prostata und Samenblase eine gute Alternative zur Operation. Die Nebenwirkungen der Bestrahlung beschränken sich hauptsächlich auf die angrenzenden Gewebe des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts und äußern sich in Störungen der Darm- und Blasenfunktion. Relativ häufig, aber meist reversibel, treten akute Zystitis und Proktitis auf (Fransson et al. 2002). Chronische Effekte sind weniger häufig und meistens gering oder moderat. Die chronische Proktitis ist der limitierende Faktor bei der Strahlenbehandlung des Prostatakarzinoms (Dearnaley et al. 1999).

## **1.2 Zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung**

Die Ursachen für die starken interindividuellen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung (IR) sind bisher noch nicht geklärt. Jedoch besteht ein Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit der einzelnen Zelle gegenüber einem Stressfaktor und ihrer Fähigkeit, auf diese Belastung zu reagieren (Rosen et al. 2000b). IR-induzierte DNA-Schäden führen zu einer Veränderung der Chromatinstruktur. Diese induziert die intermolekulare Autophosphorylierung eines ATM-Dimers am Serin 1981 und die Dissoziation des vorher stabilen Dimers (Bakkenist und Kastan 2003). Als Proteinkinase phosphoryliert ATM verschiedene Zielproteine, darunter p53 am Serin 15, CHK2 am Threonin 68 und MDM2 am Serin 365. Die durch Phosphorylierung aktivierte CHK2 phosphoryliert nun p53 am Serin 20. Diese Phosphorylierung und die Phosphorylierung von MDM2 lösen die Bindung von MDM2 an p53, was zu

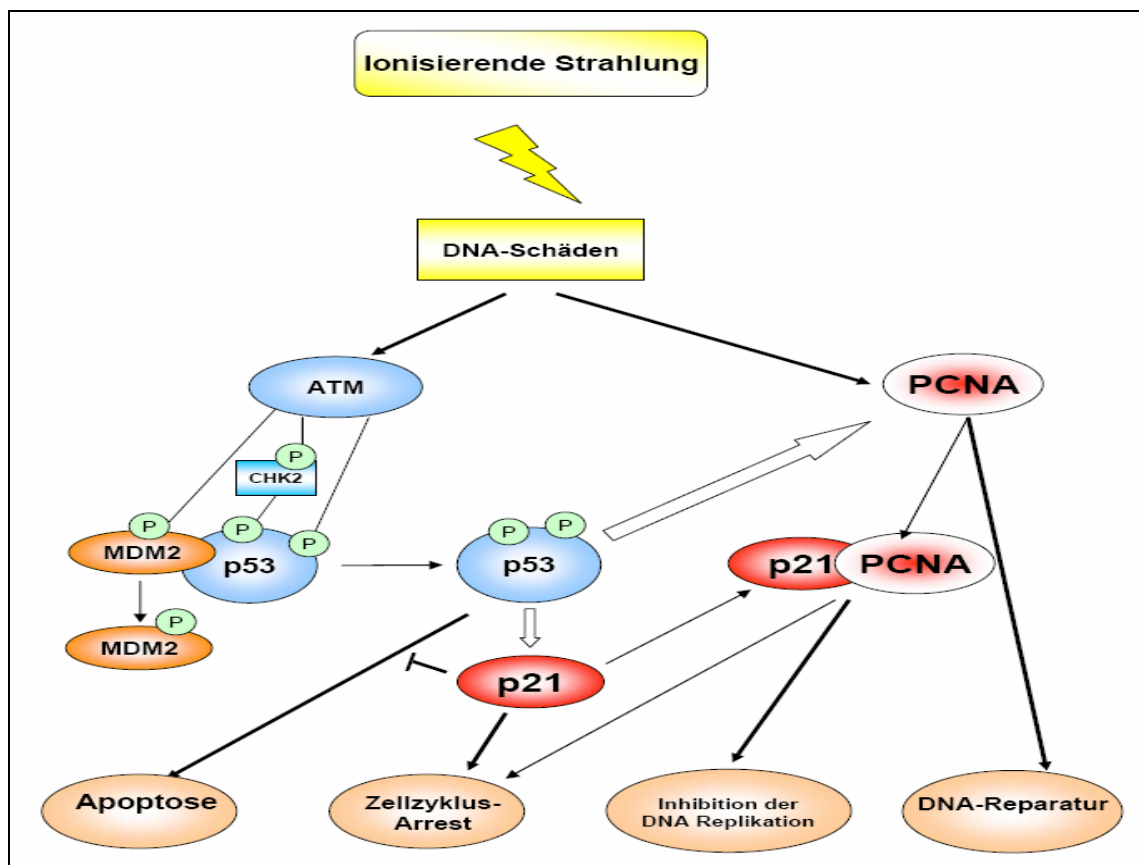
einer Erhöhung der freien p53-Proteinmenge führt (Kastan und Lim 2000). p53 ist ein multifunktionales Protein, welches verschiedene physiologische Prozesse reguliert: Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur (Woods und Vousden 2001) (siehe Abbildung 1.1). Nach der Aktivierung von p53 durch IR bindet p53 sequenzspezifisch an die DNA und verstärkt die Expression von Genen, die ein *p53-response-element* in ihrem Promotor oder im Intron besitzen (El Deiry 1998). p53 gilt als Transkriptionsfaktor für über 100 verschiedene Gene (Zhao et al. 2000a), welche vor allem Funktionen in folgenden Bereichen haben: Zellzykluskontrolle, Apoptose, genetische Stabilität und Hemmung der Neubildung von Blutgefäßen (Vogelstein et al. 2000).



**Abbildung 1.1: p53-vermittelte Antwort auf ionisierende Strahlung; DSB: Doppelstrangbruch, BER: Basen-Exzisions-Reparatur, NER: Nukleotid-Exzisionsreparatur, P: Phosphorylierung**

Im Signalweg der Zellzykluskontrolle kommt es zu einer verstärkten Transkription am *CDKN1A*-Gen (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) (Bae et al. 1995; Delia et al. 1997; Lalle et al. 1995), das für p21, einen starken Inhibitor der cyclinabhängigen Kinase 2 (cdk2), codiert (Cannell et al. 1998; El Deiry et al. 1994; Harper et al. 1993). Die p21-Menge in der Zelle steigt stark an und inhibiert cdk2-Cyclin-E- und cdk4-Cyclin-D-Komplexe, die den Übertritt der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus einleiten (Di

Leonardo et al. 1994; Kastan et al. 1991). Weiterhin ist p21 ein Inhibitor der p53-abhängigen Apoptose. Es ist noch nicht vollständig klar, wie Zellen zwischen Apoptose und p21-abhängigem Zellzyklusarrest nach DNA-Schäden und Stabilisierung von p53 entscheiden. Häufig führen hohe p21-Mengen zu einem Zellzyklusarrest und schützen vor Apoptose (Gartel und Tyner 2002). Weitere Gene, die durch p53 transkriptionell aktiviert werden, sind *PCNA*, *GADD45A*, *XPC* und *DDB2* (Adimoolam und Ford 2002; Hwang et al. 1999; Paunesku et al. 2001; Tan und Chu 2002; Vogelstein et al. 2000; Zhao et al. 2000b).



**Abbildung 1.2: p53-vermittelte Induktion von p21 und PCNA nach Bestrahlung**

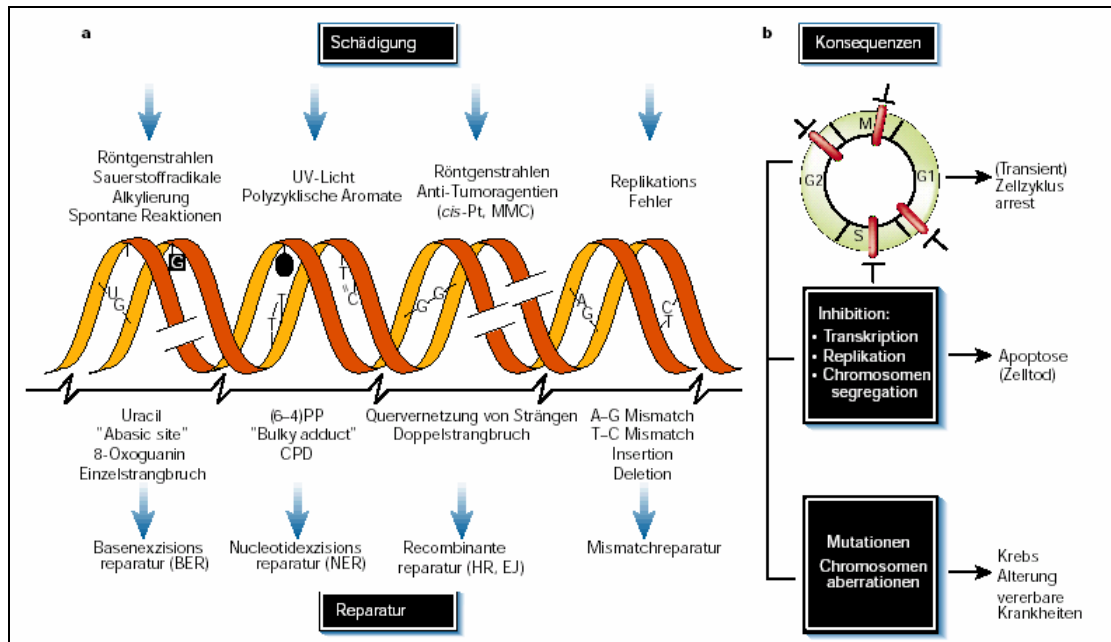
PCNA ist hauptsächlich an den Prozessen der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur, aber auch am Zellzyklusarrest nach DNA-Schädigung und der Apoptose beteiligt (Paunesku et al. 2001). Das trimere Protein hat eine ringförmige Struktur und gleitet bei der Replikation und DNA-Reparatur in einem Komplex vieler assoziierter Proteine über den DNA-Strang. PCNA interagiert mit verschiedenen Polymerasen, Nukleasen, Ligasen und weiteren Proteinen der Replikations- und Reparaturmaschinerie. CDKN1A und PCNA sind nicht nur in dasselbe Signalnetzwerk involviert, sondern es besteht auch eine Interaktion zwischen beiden Proteinen (Abbildung 1.2). In Anwesenheit von p21

verliert PCNA seine Aktivität bei replikativen Vorgängen, die Aktivität in der DNA-Reparatur bleibt jedoch erhalten (Paunesku et al. 2001). Darüber hinaus wird durch die Bindung von p21 an PCNA ein Zellzyklusarrest in der G1- und der G2-Phase des Zellzyklus ausgelöst, was auch in p53-defizienten Zellen auftritt (Cayrol et al. 1998).

Das Protein GADD45A besitzt Funktionen in der Zellzykluskontrolle und in der DNA-Reparatur und ist zudem ein Interaktionspartner von p21 und PCNA. GADD45A blockiert die Aktivität der cdc2-Kinase und verhindert dadurch den Übergang der Zelle von der G2-Phase in die Mitose-Phase des Zellzyklus (Zhan 2005). GADD45A kann veränderte Chromatinstrukturen erkennen und daran binden, was die Erkennung der schadhafte Stellen in der DNA durch die Enzyme der Nukleotid-Exzisions-Reparatur erleichtert. Das XPC-Protein dient im Komplex mit hHR23B ebenfalls der Erkennung von schadhafte Stellen in der DNA. XPC ist essentiell für die Einleitung der globalen Genom-Reparatur, einem wichtigen Reparaturweg in der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (Adimoolam und Ford 2002; Adimoolam und Ford 2003; Costa et al. 2003). Das Gen *DDB2* codiert für p48, ein Bestandteil des heterodimeren Proteins aus p127/DDB1 und p48/DDB2. Dieser Komplex erkennt sehr spezielle Arten von DNA-Schäden wie z.B. Cyclobutan-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4-PP), die über Nukleotid-Exzisions-Reparatur repariert werden.

### **1.2.1 DNA-Reparatur**

Unterschiedliche Arten von DNA-Schäden, wie Desaminierungen, Alkylierungen, größere DNA-Addukte oder oxidative Schäden werden durch komplexe Interaktion diverser Reparaturenzyme erkannt und entfernt. Die Fähigkeit zur effektiven DNA-Reparatur bewahrt den Organismus vor den Folgen dieser DNA-Schäden. Abhängig von der Art des Schadens sorgen vier verschiedene Hauptreparaturmechanismen dafür, dass Defekte an der Erbsubstanz wieder repariert werden (Hoeijmakers 2001) (Abbildung 1.3). Geringfügige chemische Änderungen der Basen werden durch Basen-Exzisions-Reparatur (BER) entfernt. Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) wird für die Reparatur von größeren Veränderungen in der DNA-Helix-Konformation, z.B. durch Addukte von aromatischen Kohlenwasserstoffen, benötigt. Doppelstrangbrüche sind, da beide Stränge betroffen sind, komplexere Schäden, und werden mit Hilfe von *end joining* und homologer Rekombination repariert. Fehlerhafte Nukleotidpaarungen werden durch *mismatch*-Reparatur korrigiert.

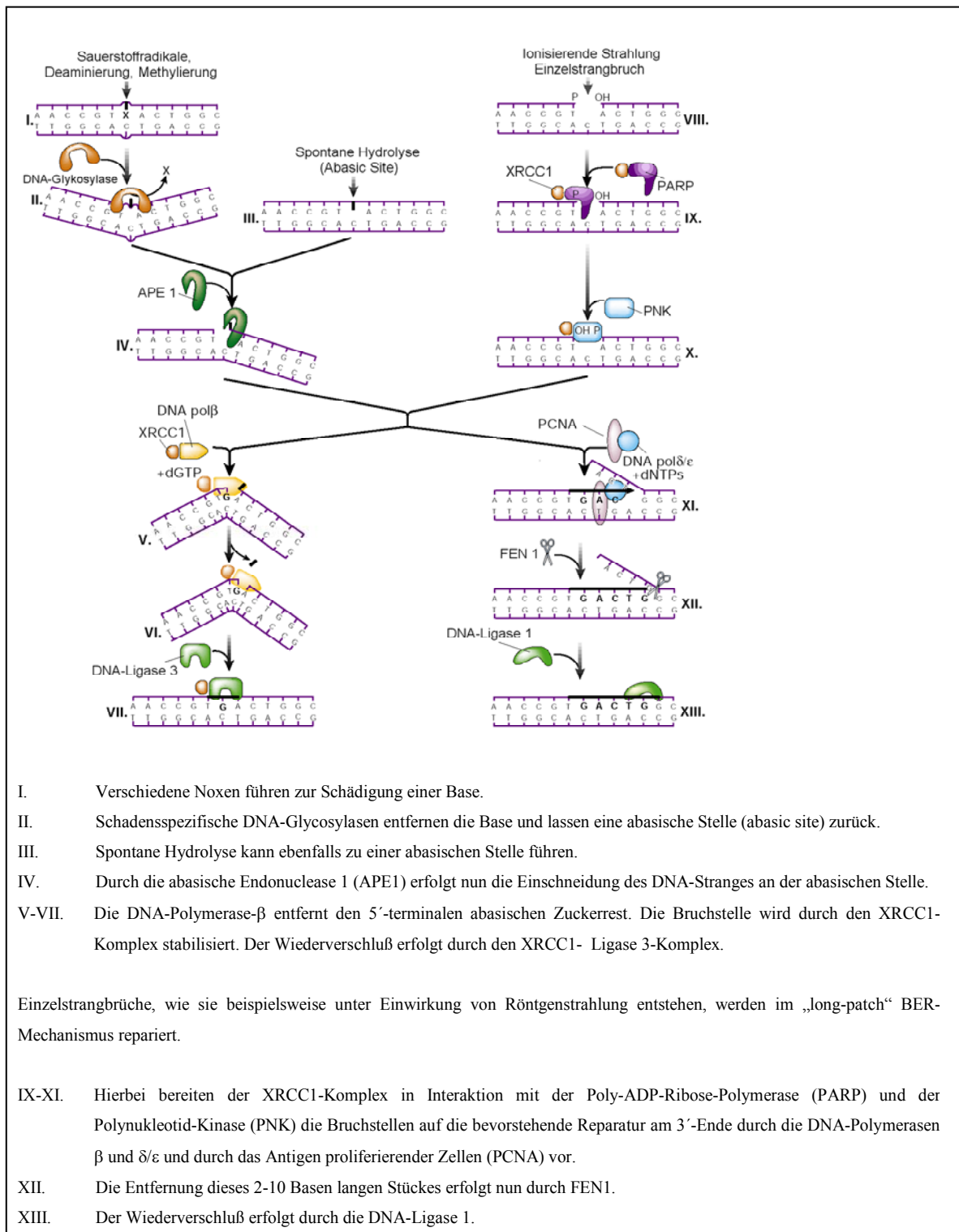


**Abbildung 1.3: Schäden an der DNA und ihre Reparatur (nach Hoeijmakers, 2001)**

### 1.2.1.1 Basen-Exzisions-Reparatur

Durch ionisierende Strahlen, ROS, Methylierungen, Desaminierungen und Hydroxylierungen entstehen Einzelstrangbrüche, basenfreie Stellen und oxidierte Basen. Die BER ist der am häufigsten eingesetzte Reparaturmechanismus bei Schäden durch den zellulären Metabolismus und nach IR. Einen Überblick über die BER gibt Abbildung 1.4. Die BER kann auf zwei Wegen erfolgen, die teilweise unterschiedliche Enzyme erfordern (Hoeijmakers 2001). Im ersten Weg, als *short patch* BER bezeichnet, erkennt eine DNA-Glykosylase die veränderten Basen und ändert die Konformation der DNA, so dass die veränderte Base nach außen schwingt. Die geschädigte Base wird durch die Glykosylase entfernt und es entsteht eine basenfreie Stelle, wie sie auch durch spontane Hydrolyse entstehen kann. Durch das Enzym Apurinische Endonuklease 1 (APE1) erfolgt ein Schnitt an der veränderten Stelle. DNA-Polymerase- $\beta$  schneidet den 5'-terminalen abasischen Zuckerrest aus. Durch den XRCC1-Komplex wird diese Stelle stabilisiert und gleichzeitig dirigiert der Komplex die Bindung der anderen Proteine an die Schadensstelle. Der Ligase-3-Komplex bewirkt im Anschluss die Verknüpfung der freien Enden (Hoeijmakers 2001). Der *long patch* BER repariert Einzelstrangbrüche. Damit die DNA-Polymerase die fehlenden Basen einfügen kann, ist eine Hydroxylgruppe am 3'-Ende nötig. Der XRCC1-Komplex interagiert mit der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und der Polynukleotid-Kinase (PNK) und bereitet so die Bruch-

stellen auf die Reparatur am 3'-Ende durch die DNA-Polymerasen  $\beta$  und  $\delta/\epsilon$  und durch das nukleäre Antigen proliferierender Zellen (PCNA) vor. Das ersetzte Stück wird durch die Endonuklease FEN1 entfernt; DNA-Ligase 1 verbindet das neu synthetisierte Stück mit dem vorhandenen Strang und schließt den Bruch endgültig.

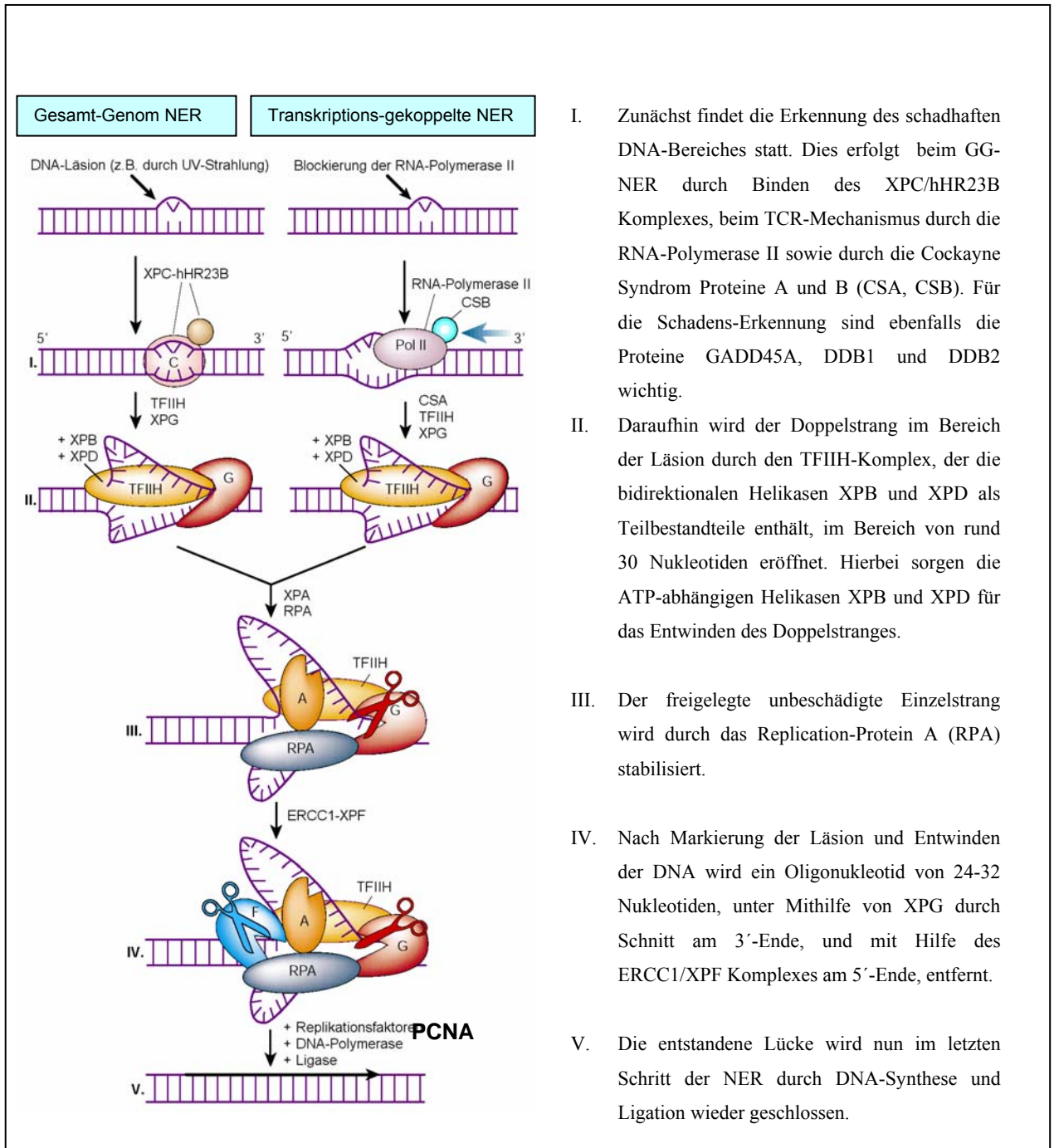


**Abbildung 1.4: Basen-Exzisions-Reparatur (nach Hoeijmakers 2001)**

### 1.2.1.2 Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt Schäden, die sperrige Veränderungen an der Konformation der DNA-Helix verursachen und dadurch die Basenpaarung und die DNA-Replikation und –Transkription stören. Die bekanntesten dieser Läsionen sind Cyclobutan-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4-PP), welche durch UV-Licht induziert werden, sowie verschiedene Arten von *bulky adducts*, die durch chemische Verbindungen hervorgerufen werden (Costa et al. 2003). Die Aktivierung vieler NER-Enzyme ist p53-vermittelt (Abbildung 1.1). Die NER lässt sich in zwei Mechanismen unterteilen (siehe Abbildung 1.5): Der Gesamt-Genom-NER-Mechanismus (GGR) untersucht das komplette Genom auf Unregelmäßigkeiten, wohingegen der Transkriptions-gekoppelte NER-Mechanismus (TCR) Schäden in der zu transkribierenden DNA entfernt, die vor allem RNA-Polymerasen bei der Transkription behindern würden.

Beide Mechanismen unterscheiden sich in der Art der Schadenserkenkung. In der GGR findet die Erkennung des DNA-Schadens durch den XPC-hHR23B-Komplex, den DDB1/DDB2-Komplex oder GADD45A statt, welche an den Schaden binden und so die Struktur der DNA-Helix verändern (Costa et al. 2003; Zhan 2005). Der XPC-hHR23B-Komplex ist essentiell für die Organisation der restlichen Reparaturenzyme. Bei der TCR spielt dieser Komplex keine Bedeutung. Die durch den DNA-Schaden blockierte RNA-Polymerase II ist der auslösende Schritt für die Erkennung des Schadens durch CSA und CSB. Die weiteren Schritte sind in beiden Reparaturwegen identisch. XPA und RPA dienen zur weiteren Schadenserkenkung und dirigieren die Helikasen XPB und XPD zur schadhaften Stelle, die die DNA in der Nähe des Schadens entwinden. Durch die Nukleasen XPG und XPF/ERCC1 wird ein etwa 30 bp langes Stück aus dem DNA-Strang herausgeschnitten, welches die fehlerhafte Stelle enthält. DNA-Polymerasen- $\delta$  und  $\epsilon$  interagieren mit PCNA und synthetisieren den fehlenden Strang neu, welchen die DNA-Ligase I mit dem bestehenden Strang verknüpft (Adimoolam und Ford 2003; Costa et al. 2003; Zhan 2005). Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur wird normalerweise nicht für typische IR-induzierte Schäden benötigt. Ionisierende Strahlung kann jedoch außer DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verursachen, die zu verschiedenen raumfordernden DNA-Veränderungen und Protein-DNA-Crosslinks führen können (Kuraoka et al. 2000), die über NER repariert werden.



- I. Zunächst findet die Erkennung des schadhaften DNA-Bereiches statt. Dies erfolgt beim GG-NER durch Binden des XPC/hHR23B Komplexes, beim TCR-Mechanismus durch die RNA-Polymerase II sowie durch die Cockayne Syndrom Proteine A und B (CSA, CSB). Für die Schadens-Erkennung sind ebenfalls die Proteine GADD45A, DDB1 und DDB2 wichtig.
- II. Daraufhin wird der Doppelstrang im Bereich der Läsion durch den TFIIH-Komplex, der die bidirektionalen Helikasen XPB und XPD als Teilbestandteile enthält, im Bereich von rund 30 Nucleotiden eröffnet. Hierbei sorgen die ATP-abhängigen Helikasen XPB und XPD für das Entwinden des Doppelstranges.
- III. Der freigelegte unbeschädigte Einzelstrang wird durch das Replication-Protein A (RPA) stabilisiert.
- IV. Nach Markierung der Läsion und Entwinden der DNA wird ein Oligonukleotid von 24-32 Nucleotiden, unter Mithilfe von XPG durch Schnitt am 3'-Ende, und mit Hilfe des ERCC1/XPF Komplexes am 5'-Ende, entfernt.
- V. Die entstandene Lücke wird nun im letzten Schritt der NER durch DNA-Synthese und Ligation wieder geschlossen.

Abbildung 1.5: Nukleotid-Exzisions-Reparatur (nach Hoeijmakers, 2001)

### 1.2.1.3 Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche (DSB) werden allgemein als der DNA-Schaden mit der höchsten Toxizität für die Zellen angesehen, da sie bei inadäquater Reparatur zum Zelltod führen können (Willers et al. 2004). Ein einzelner DSB kann bereits genügen, um eine Zelle durch die Inaktivierung eines essentiellen Gens oder durch Auslösung von Apoptose abzutöten (Featherstone und Jackson 1999; Jackson 2001). Ein fehlerhaft reparierter DSB kann in der Zelle Mutationen und chromosomale Umstrukturierung hervorrufen. Diese kann zu genomischer Instabilität führen und die maligne Entartung von Zellen auslösen (Willers et al. 2004). DSB können auf verschiedene Arten entstehen. Bei physiologischen Rekombinationen wie der V(D)J-Rekombination in B- und T-Zellen treten sie kontrolliert auf (Jackson 2001; Jackson 2002; Jeggo 2002; Sancar 1996; Sancar et al. 2004; van Gent et al. 2001). DSB werden durch IR, Radiomimetika, Inhibitoren der Topoisomerasen und Chemikalien, die reaktive Sauerstoffspezies freisetzen, verursacht (Jackson 2001; Rotman und Shiloh 1999; Sancar et al. 2004). DSB treten auch als Produkt blockierter und kollabierter Replikationsgabeln auf (Jackson 2002; Karran 2000; Sancar et al. 2004) und entstehen bei der Replikation eines Einzelstrangbruchs. Etwa 50 DSB pro Zellzyklus treten spontan auf (Vilenchik und Knudson 2003).

IR verursacht an der DNA komplexe Läsionen (*multiple damaged sites, complex lesions* oder *clustered damage*), welche multiple Basenschäden, DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche umfassen können. Diese komplexen Schäden sind eine besondere Schadensgattung, da sie endogen nicht auftreten, und für die Zelle eine besondere Herausforderung darstellen (Harrison et al. 1999; Jeggo 2002; Willers et al. 2004; Yang et al. 2006). DSB, die nicht korrekt oder nicht schnell genug von der Zelle repariert werden können, sind in erster Linie für den strahlungsinduzierten Zelltod verantwortlich (Frankenberg-Schwager 1990).

Die Erkennung von DSB löst in der Zelle eine komplexe Kaskade von Reaktionen aus, die einen Zellzyklusarrest und die Rekrutierung von Reparaturfaktoren zur Folge haben (Hoeijmakers 2001; Khanna und Jackson 2001), (siehe Abbildung 1.6).

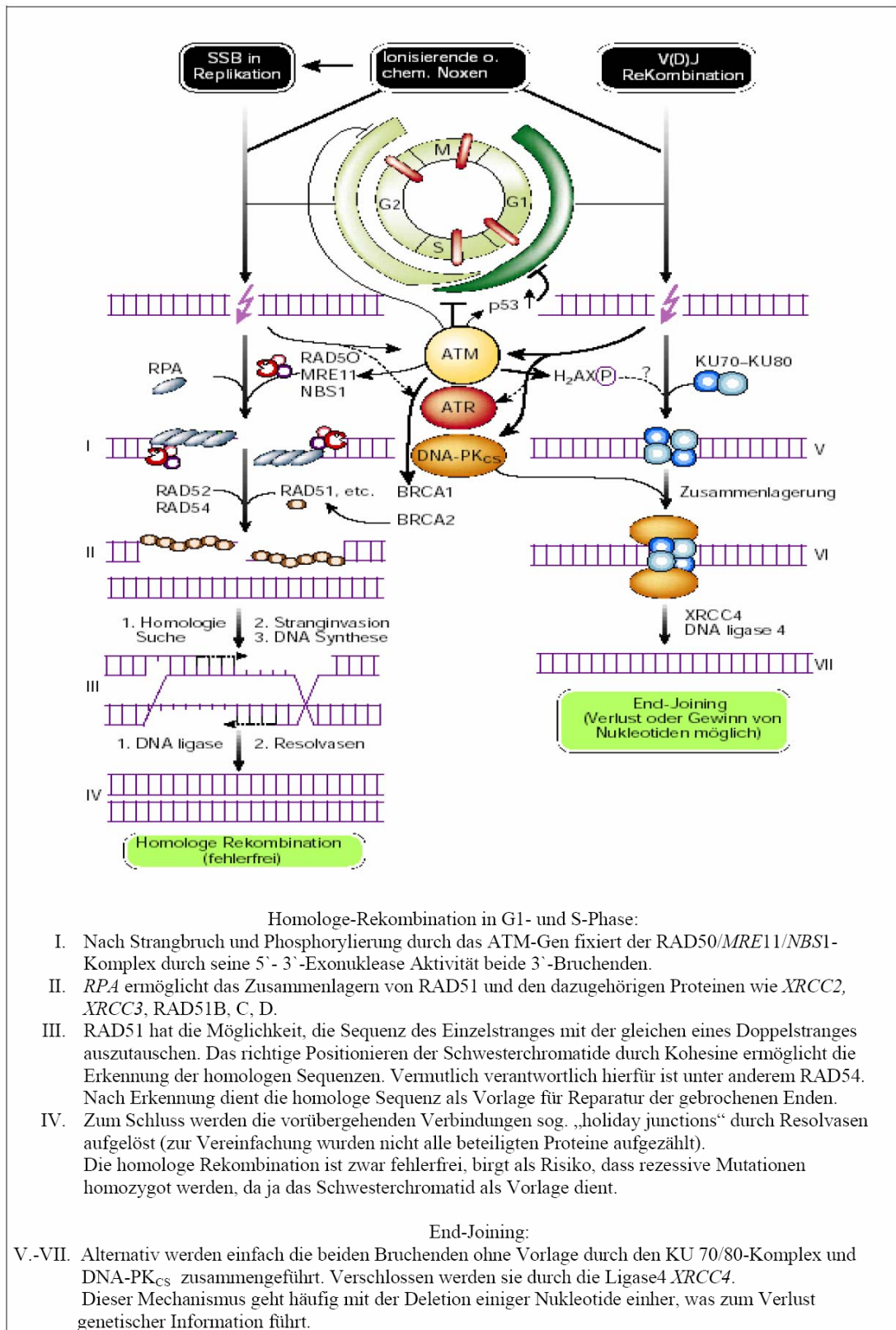


Abbildung 1.6: Doppelstrangbruch-Reparatur (nach Hoeijmakers 2001)

Eine zentrale Rolle nimmt die Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) ein, die über p53 und p21 einen Zellzyklusstopp vermittelt (Hoeijmakers 2001). Das Histon H2AX wird im Bereich der Bruchstellen phosphoryliert (Paull et al. 2000), was der Markierung des Schadens und somit der schnellen Rekrutierung der notwendigen Reparaturenzyme dient (Hoeijmakers 2001).

DSB können auf zwei verschiedenen Reparaturwegen repariert werden – durch die homologe Rekombination (HR) und das nicht-homologe *end-joining* (NHEJ) (Hoeijmakers 2001) (siehe Abbildung 1.6). Die HR verwendet zur Reparatur als Kopiervorlage das intakte Schwesterchromatid und läuft daher fehlerfrei ab (Featherstone und Jackson 1999). Wegen der Abhängigkeit vom Schwesterchromatid kann die HR nur in der späten S- und G1-Zellzyklusphase erfolgen (Hoeijmakers 2001). Die HR scheint der bevorzugte Reparaturweg in diesen Zellzyklusphasen zu sein. Das NHEJ kommt ohne Vorlage aus, da es einfach die freien DNA-Enden miteinander verknüpft, was eine schnelle Reparatur bedeutet. Diese Art von Reparatur kann daher während aller Zellzyklusphasen erfolgen, ist jedoch potentiell mit Fehlern behaftet, da nicht sichergestellt ist, dass die richtigen DNA-Enden miteinander verknüpft werden. Auch können Basen verloren gehen, wenn die Enden nicht perfekt aneinander passen, oder durch Aktivität von Polymerasen werden neue Basen angefügt, so dass es bei der NHEJ leicht zu Veränderungen wie Deletionen oder Insertionen an der genetischen Information kommen kann (Featherstone und Jackson 1999; Hoeijmakers 2001).

Die HR scheint darüber hinaus wichtig für die Reparatur kollabierter Replikationsgabeln zu sein, welche entstehen, wenn die Polymerase ihre Synthese aufgrund von DNA-Schäden nicht fortführen kann (Sancar et al. 2004; Willers et al. 2004). Im Gegensatz dazu ist das NHEJ essentiell für die V(D)J-Rekombination und wird als der bevorzugte Reparaturweg von Strahlen- und Radiomimetika-induzierten DSB angesehen (Sancar et al. 2004). Dieser Mechanismus toleriert weitere komplexe Läsionen im Bereich der Bruchstelle wahrscheinlich eher als die HR (Willers et al. 2004).

### 1.3 Test zur Erkennung von Strahlenüberempfindlichkeit

Zur Abschätzung von Strahlenrisiken in der Strahlentherapie und im Strahlenschutz ist das Wissen um die individuelle Strahlenempfindlichkeit von zunehmender Bedeutung. Aus der klinischen Erfahrung ist schon seit langem bekannt, dass Patienten auf Strahlentherapie mit sehr unterschiedlichen Nebenwirkungen reagieren, die von Haut- und Schleimhautreizungen und Nekrosen bis hin zum Strahlentod führen können. Allerdings existiert bisher noch kein allgemeines prädiktives Testverfahren, um strahlenüberempfindliche Personen zu identifizieren. Es gibt verschiedene Ansätze, um zelluläre *in vitro* Testsysteme für die Strahlenempfindlichkeit von Patienten zu entwickeln: Bestimmung der (1) Überlebens- und Replikationsfähigkeit, (2) Frequenz spezifischer Chromosomenabberationen, (3) Fähigkeit zur Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden, (4) anderer, mit der Strahlung verbundene Reaktionen wie der Induktion von Apoptose (zusammengefasst in: (Twardella und Chang-Claude 2002)). Diese Tests sind meist sehr zeit- und kostenintensiv, außerdem ist die Korrelation zwischen der *in vitro* bestimmten und der klinischen Strahlenempfindlichkeit oft nur gering, somit sind diese Tests nicht für eine Routineanwendung in der Klinik geeignet. Ein Grund für die schlechte Korrelation von *in vitro* bestimmter und klinischer Strahlenempfindlichkeit könnte in den sehr heterogen zusammengesetzten Patientenkollektiven früherer Studien und der schlechten Vergleichbarkeit in der Bewertung der Strahlenreaktion in den unterschiedlichen bestrahlten Geweben sein (Baumann et al. 2003). Bis heute gibt es für die klinische Routine keinen verlässlichen Test, der die Strahlenempfindlichkeit eines Patienten voraussagt (Gatti 2001). Daher besteht der Bedarf für einen schnell durchführbaren und kostengünstigen *in vitro* Test mit hoher Prädiktivität.

Zellen reagieren auf genotoxischen Stress unter anderem mit einer veränderten Transkription von Genen, die mit DNA-Reparatur oder Zellzyklus verbunden sind (Amundson et al. 2001; Rieger und Chu 2004; Shiloh 2001; Shiloh 2003; Valerie und Povirk 2003). Strahlungsinduzierbare Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgene sind daher ein möglicher Ansatzpunkt zur Identifizierung strahlenüberempfindlicher Phänotypen. Für die Beurteilung der Strahlenüberempfindlichkeit könnte einerseits die konstitutive mRNA Expression von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen sowie andererseits die induzierte mRNA Induktion dieser Gene nach *in vitro* Exposition herangezogen werden. Sind die Expressionsprofile von normalen und sensiblen Zellen bekannt, so könnte die Identifizierung mit einer PCR-Methode schnell, sicher und

kostengünstig durchgeführt werden. Die Entwicklung eines solchen Tests muss an einem homogenen Patientenkollektiv geschehen, bei dem die Nebenwirkungen in den bestrahlten Geweben möglichst klar definiert sind.

In vorausgegangenen Untersuchungen in der *Arbeitsgruppe Genetische Toxikologie und DNA-Reparatur* am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) wurden anhand von cDNA-Array-Untersuchungen einige DNA-Reparaturgene als mögliche Biomarker identifiziert (Hümmerich et al. 2006). Insbesondere die konstitutive Expression von Genen aus dem Reparaturweg der homologen Rekombination wie *RAD51*, *RAD52*, *MRE11A*, *BRCA1* und *BRCA2* könnten Kandidaten für die Entwicklung von Biomarkern für die individuelle Strahlenempfindlichkeit sein. Darüber hinaus konnte J. Hümmerich zeigen, dass *CDKN1A* und *PCNA* nach Schädigung mit IR verstärkt exprimiert werden, diese Hochregulation aber bei strahlenüberempfindlichen AT-Zellen deutlich geringer ausfällt (Hümmerich 2005). Aus dieser Arbeit wurde gefolgert, dass die Untersuchung der induzierten Expression von *CDKN1A* und *PCNA* in Zellen von Patienten ein viel versprechender Ansatz zur Entwicklung von Biomarkern für individuelle Strahlenüberempfindlichkeit sein könnte.

#### 1.4 Ziele der Untersuchungen

Das Auftreten von unerwünschten Reaktionen durch die Radiotherapie ist individuell sehr verschieden, wobei die Ursachen für diese Differenzen bisher nicht näher bekannt sind. Unter allen Patienten, die mit Strahlung therapiert werden, ist bei bis zu 15 % der Fälle mit schweren Akut- und Spätreaktionen zu rechnen (Oppitz et al. 1999). Für den Therapieerfolg und die Vermeidung unnötiger Belastungen für den Patienten wäre es von außerordentlicher Bedeutung, Personen mit einer Hypersensibilität gegenüber IR im Voraus zu identifizieren und einer alternativen oder individuell angepassten Therapie zuzuführen. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Entwicklung eines klinisch einsetzbaren *in vitro* Tests zur Erkennung individuell stark ausgeprägter Strahlenüberempfindlichkeit geleistet werden. Der Test soll auf der Induzierbarkeit von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen nach  $\gamma$ -Bestrahlung *in vitro* beruhen. Als zu untersuchende Gene wurden die von J. Hümmerich identifizierten (*CDKN1A* (*p21*), *Cip1*, *WAF1*) und *PCNA*) sowie Gene, die aus der Literatur als strahleninduzierbar bekannt sind (*XPC*, *DDB2*, *GADD45A*), ausgewählt (Amundson et al. 2003b; Hümmerich 2005; Rieger und Chu 2004; Tusher et al. 2001).

### 1.4.1 Untersuchungen an Lymphozyten von Prostatakrebspatienten

Im Rahmen eines vom Bundesamt für Strahlenschutz geförderten Projekts mit dem Titel „Entwicklung von Verfahren zur Erkennung individueller Strahlenempfindlichkeit durch Analyse der Expression geeigneter Kandidatengene“ wurde eine prospektive Studie an Prostatakrebspatienten, die eine Strahlentherapie erhielten, durchgeführt. Dieses Patientenkollektiv ist sehr homogen, da alle Patienten männlich und etwa gleichen Alters sind, und bietet den Vorteil, dass die Behandlung ohne Chemotherapie erfolgt, die eine bedeutende Störgröße darstellen würde. Außerdem ist das Langzeitüberleben dieser Patienten relativ hoch, so dass auch in Zukunft weitere Untersuchungen (follow-up) an diesen Patienten möglich sind. Die Beurteilung der klinischen Strahlenempfindlichkeit der Patienten erfolgte anhand eines standardisierten Bewertungsmaßstabs zur Bewertung der akuten Nebenwirkungen (*CTC* modifiziert nach Seegenschmiedt (Seegenschmiedt 1998)) durch erfahrene Kliniker (Abt. Klinische Radiologie, Universitätsklinik Heidelberg, Leiter: Prof. Dr. J. Debus).

Zunächst wurden die experimentellen Bedingungen an Lymphozyten von gesunden Blutspendern optimiert. Die Lymphozyten wurden mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet. Die RNA-Extraktion aus den Lymphozyten sollte so optimiert werden, dass RNA in ausreichender Menge und Qualität für die quantitative Realtime-PCR zur Verfügung stand. Mittels quantitativer Realtime-PCR sollte der Verlauf der Induktion der Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA* und *TP53* mit zunehmender Zeit nach der Bestrahlung bestimmt werden. Als Referenzgen diente *ACTB*. Für die späteren Untersuchungen an Lymphozyten von Prostatakrebspatienten sollte ein optimaler Zeitpunkt festgelegt werden, an dem die RNA aus den Lymphozyten extrahiert werden sollte. An diesem Zeitpunkt sollten sich die Induktionswerte von *CDKN1A* und *PCNA* deutlich von den Werten aus den Proben direkt vor der Bestrahlung (0 h) unterscheiden, außerdem sollte, wenn möglich, ein vom experimentellen Ablauf praktikabler Zeitpunkt gewählt werden. Das Gen *TP53* ist durch Bestrahlung nicht induzierbar, die RNA-Menge sollte jedoch als Kontrolle ebenfalls quantifiziert werden.

Mit den erarbeiteten optimierten Versuchsbedingungen sollten dann Lymphozyten von Prostatakrebspatienten auf die Induzierbarkeit der Genexpression nach Bestrahlung untersucht und inter-individuelle Unterschiede bestimmt werden. Es wurden Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgene quantifiziert, von denen aus der Literatur bekannt ist, dass sie durch IR induzierbar sind (*CDKN1A*, *PCNA*, *XPC*, *DDB2*, *GADD45A*)

(Amundson et al. 2003b; Rieger und Chu 2004). Zusätzlich wurde die Transkriptmenge des Gens *TP53* bestimmt. Die erhaltenen Induktionswerte wurden mit dem Ausmaß der Nebenwirkungen, die die Patienten während ihrer Bestrahlung tatsächlich entwickelten, verglichen. Weiterhin sollten Faktoren identifiziert werden, die die Induzierbarkeit der untersuchten Gene beeinflussen können.

#### **1.4.2 Untersuchungen zur Bedeutung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*)**

Zum besseren Verständnis der im ersten Teil bestimmten Unterschiede in der Induktion von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) wurden weitere Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit an Zellen, in denen das Gen *CDKN1A* durch homologe Rekombination ausgeschaltet ist (*p21*<sup>-/-</sup>; *p21*-defizient, *p21*-knockout) sowie an der unveränderten parenteralen Zelllinie (*p21*<sup>+/+</sup>; *p21*-kompetent) durchgeführt. Im Zellmodell sollte untersucht werden, ob das Fehlen von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) eine Auswirkung auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen bestrahlt und das Wachstumsverhalten, die DNA-Reparatur sowie die Zellzyklusverteilung bestimmt.

Desweiteren wurde die Technik der RNA-Interferenz angewendet, um in der parenteralen Zelllinie (*p21*<sup>+/+</sup>) die Expression des Gens *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) zu vermindern. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *CDKN1A* nach Schädigung mit IR verstärkt exprimiert wird und diese Hochregulation bei strahlenüberempfindlichen Zellen deutlich geringer ausfällt (Hümmerich 2005). Bisher war jedoch noch nicht geklärt, wie viele und welche DNA-Reparatur- bzw. Reparatur-assoziierten Gene von einer abgeschwächten bzw. fehlenden Hochregulierung von *CDKN1A* betroffen sind. In *p21*-kompetenten Zellen wurde die Expression von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *Waf1*) durch Transfektion mit *p21*-siRNA vermindert und die Auswirkungen auf die Expression mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR bestimmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### PCR-Geräte

DNA Engine PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg

#### Zentrifugen

LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Centrifuge 5402	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Minifuge Universal	Hettich, Tuttlingen

#### Elektrophorese

Horizontale Elektrophoresewanne	Renner GmbH, Dannstadt-Schauernheim
Agagel Midi-Wide	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Agagel Mini	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Elektrophoresis Power Supply EPS 300	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Elektrophoresis Power Supply EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Powerpack 25	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
X Cell Sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe

#### Zellkultur

CO <sub>2</sub> -Inkubator Jouan IG 150	Astel SA, Chateau Gontier, Frankreich
Inversmikroskop Wilovert	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Labormikroskop Loborlux S	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Sterile Werkbank Biogard Hood KL II	Baker, Stanford, USA

#### sonstige Geräte

AcuBoy	TecNoMara, Ruhberg
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, USA
Analysenwaage A200S	Sartorius AG Göttingen

Bestrahlungsgerät Gammacell 1000 (10,1 Gy/min)	MDS Nordion, Ottawa, Kanada
Bestrahlungsgerät OB 58 (0,575 Gy/min)	Buchler, Braunschweig
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Comet-Assay Auswerteanlage	Metasystems, Altlußheim
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
FACS Calibur	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Färbebrücke mit Färbewanne	Migge, Heidelberg
Hybridisierungsöfen OV2	Whatman Biometra GmbH, Göttingen
Hypercassette	Amersham GE Healthcare, München
Mikrowellengerät HMT 832C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Pipetten (0,1-2,5; 0,5-10; 2-20; 10-100; 20-200; 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Schüttler Minishaker MS2	IKA GmbH, Staufen
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Densitometer	Herolab, Wiesloch
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage Typ 1518	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad WG	Neolab, Heidelberg

### **Materialien**

24 Loch-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
5 ml Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
6 Loch-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96 Loch-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar Zellkulturflaschen, 50 ml (T25), 250 ml (T75)	Greiner Bio.One GmbH, Frickenhausen
Comet Slides	Trevigen/AMS, Wiesbaden
Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Europe Ltd., Neerijse, Belgien
Cryovials (2 ml, 5 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser (24 x 70 mm)	Menzel, Braunschweig
Einmal-Wägeschälchen (7 ml, 100 ml)	Neolab, Heidelberg
Hyperfilm	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Invitrolon PVDF Membrans	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Leukosep-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
LightCycler Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Migge, Heidelberg

NuPAGE Novex Bis-Tris Gele	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen (unsteril, filterlos)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Filtertips, steril (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Prospekthüllen DIN A4	Corporate Express, Stuttgart
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Serologische Pipetten, (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
Sterilfilter (0.2 µm, 0.45 µm)	Millipore, Molsheim
UV-Küvette mikro	Brand GmbH, Wertheim
Wide bore Tips (200 µl)	Stratagene, La Jolla, USA

#### **Chemikalien, Lösungen und Puffer**

6 x DNA Ladepuffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon
Agarose, Low Melting	Biozym Diagnostics, Hameln
Agarose, PeqGold Universal Agarose	PeqLab, Erlangen
BD FACS Flow	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
BD FACS Rinse	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Choroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
dNTP Mix 10 mM	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethanol absolut	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidumbromid (1 mg/ ml), Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz- Lösung (EDTA-Na <sub>2</sub> ), 0,5 M	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kalium-dihydrogen-phosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Lymphoprep	Axis-Shield, Oslo
Lysoformin	Lysoform AG, Windisch/Brugg, Schweiz
Magic Mark XP, Western Protein Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Methyl-p-Benzoesäure	Serva, Heidelberg
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N-Laurylsarcosin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNase Away, Dekontaminationsreagenz für RNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
SYBR-Green I	Molecular Probes, Leiden
Trinatriumcitrat Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trishydroxymethylaminomethan (Trizma-Base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trizol Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, Kanada
Wasser ultra pure, DNase, RNase frei	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### **Medien und Zusätze für die Zellkultur**

Antibiotikum-Antimykotikum (100x)	
10.000 units/μl Penicillin G Na, 10.000 μg/ml Streptomycinsulfat und 25 μg/ml Amphotericin B in 0,85 % Kochsalzlösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Hepes-Puffer 1 M (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic Acid)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
McCoy's 5A Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung: 10.000 units/μl Pencillin G Na, 10.000 μg/ml, Streptomycinsulfat in 0,85% Kochsalzlösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (L-Glutamin frei)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und

#### Lösungen

Agilent 6000 Nano LabChip Kit	Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, USA
BioRad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE LDS Probenpuffer (4 x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Puffer (20 x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Sample Reducing Agent (10 x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Puffer (20 x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer, Life Sciences, Inc., Boston, USA
X-treme Gene siRNA Dicer Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
X-treme Gene siRNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### Enzyme

Benzonase Nuklease	Merck, Darmstadt
Ribonuclease (RNase)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNasin Ribonuklease Inhibitor 40 units/ $\mu$ l	Promega GmbH, Mannheim
Superscript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transscriptase 200 units/ $\mu$ l	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase 5 units/ $\mu$ l	Qiagen GmbH, Hilden
Taq DNA Polymerase 5 units/ $\mu$ l	Eppendorf AG, Hamburg

#### Antikörper

Gadd45 $\alpha$ (C-4) mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
p21 (187) mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
p53 (DO-1) mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
$\beta$ -actin (AC-15) mouse monoclonal antibody	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

#### Nukleinsäuren

5'-Oligo(dT) <sub>18</sub> VN-3' Primer	Applied Biosystems, Darmstadt
esiWay RNA Resource, Nr RZPDp3000C0927R	RZPD GmbH, Heidelberg
Längenmarker GeneRuler 50 (plus), 100 (plus)	MBI Fermentas, St. Leon
Längenmarker pUC19 DNA/MspI (HpaII),	MBI Fermentas, St. Leon
Luciferase GL3 Duplex	Dharmacon, Bonn

RNA 6000 ladder	Ambion, Inc. Austin, USA
Sequenzspezifische Oligonucleotide	Wolfgang Weinig, DKFZ, Heidelberg
SpotReport 10 Array Validation System	Stratagene, La Jolla, USA

### **Zelllinien**

HCT116 p21 +/+	Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA
HCT116 p21-/- (80S4)	Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA

### **Computer-Software und Datenbanken**

ADAM 2.5	DKFZ, Heidelberg
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources	<a href="http://husar.dkfz-heidelberg.de">http://husar.dkfz-heidelberg.de</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Reference Manager 10.0	Thomson ResearchSoft, Stamford, USA
Primer Version 0.5	Whitehead Institute for Biomedical Research
SAS release 9.1	SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA
Sigma Plot 9.0	Systat Software Inc., Point Richmond, USA

## 2.2 Allgemeine Voraussetzung für die experimentellen Arbeiten

Die vorliegenden Versuche wurden unter möglichst konstanten Bedingungen durchgeführt. Es wurden adäquate Maßnahmen ergriffen, um Kontaminationen verschiedenster Art zu vermeiden. Die Arbeiten mit primären Zellen sowie mit Zellkulturzellen wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Alle verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Werkbank der Sicherheitsklasse 2, die vor und nach der Arbeit desinfiziert wurde, bearbeitet. Es wurde steril verpacktes Einwegmaterial oder autoklavierte Materialien eingesetzt. Mikrobiell anfällige Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Gerätschaften und Gegenstände für die Zellkultur wurden durch Hitze sterilisiert oder mit 70 % Ethanol desinfiziert.

Bei der Arbeit mit DNA und RNA wurden DNase und RNase-freie Labormaterialien verwendet und der Arbeitsplatz mit *RNase Away* behandelt, um RNasen zu entfernen. Es wurden nur Einmalmaterialien und Lösungen verwendet, die diesen Anforderungen entsprachen. Als Lösungsmittel wurde nur Nuklease-freies Wasser verwendet, welches kommerziell bezogen wurde. Alle Lösungen, die nicht frei von Nukleasen sein mussten, wurden mit „Reinstwasser“ angesetzt, welches über eine Millipore-Anlage (Milli-Q) aus deionisiertem Wasser gewonnen wurde. Materialien wurden den Herstellerangaben entsprechend gelagert und nur bis zur garantierten Haltbarkeitsgrenze eingesetzt. RNA und cDNA wurden generell bei -80°C gelagert und möglichst so fraktioniert, dass sie nicht wiederholt aufgetaut werden mussten. Arbeiten mit Nukleinsäuren und Proteinen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

## 2.3 Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Spendern

Zunächst wurden Versuche an Lymphozyten von gesunden Blutspendern durchgeführt, um so die geeigneten Bedingungen für die Untersuchung der Lymphozyten der Prostatakrebspatienten zu etablieren. Die Lymphozyten sollten bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet werden. Mittels quantitativer Realtime-PCR sollte die relative RNA-Menge von *CDKN1A*, *PCNA* und *TP53* bestimmt werden, wobei *ACTB* als Referenzgen verwendet wurde. Dies diente zur Untersuchung der Änderung der Genexpression in Lymphozyten nach  $\gamma$ -Bestrahlung.

### 2.3.1 Isolierung der Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden aus einem Buffycoat gewonnen, der von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Heidelberg bezogen wurde. Die Lymphozyten wurden durch die modifizierte Einschnitt-Zentrifugation nach Boyum in einem Ficoll-Gradienten isoliert (Boyum 1968) und in Portionen von  $10^7$  Lymphozyten in 1 ml Einfriermedium (50 % FCS, 10 % DMSO, 39,2 % RPMI 1640, 0,4 % L-Glutamin, 0,4 % Penicillin-Streptomycin-Lösung) kryokonserviert.

### 2.3.2 Analyse der Geninduktion mittels quantitativer Realtime-PCR

#### 2.3.2.1 Bestrahlung der Lymphozyten *in vitro*

Mehrere Aliquots von Lymphozyten eines Spenders wurden aufgetaut und nach Waschen mit PBS und Zellzahlbestimmung in 1 ml Kulturmedium pro  $10^6$  Zellen aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Mayer et al. 2002). Nach 72 h Inkubation wurden die Lymphozyten bei 230 x g pelletiert und in einer Zelldichte von  $10^5$  Zellen pro ml frischem Kulturmedium, welches mit 10 mM HEPES-Puffer versetzt worden war, eingestellt. Der Transport aller Proben zur Bestrahlungsanlage erfolgte auf Eis. Das erste Zell-Aliquot wurde nicht bestrahlt; die weiteren Aliquots wurden mit einer Dosis von 5 Gy aus einer <sup>137</sup>Cäsium-Quelle mit einer Dosisleistung von 10,1 Gy pro Minute bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben für 2, 4, 6, 8 und 24 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben für 10 min bei 230 x g zentrifugiert und der Überstand restlos abgenommen. Das Pellet wurde in 800 µl Trizol aufgenommen und gut resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur Extraktion der RNA wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

**Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Kulturmediums**

Komponente	Konzentration
RPMI 1640	88 %
FCS	10 %
L-Glutamin (200mM)	1 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung	1 %

#### 2.3.2.2 Extraktion der RNA

Die RNA wurde durch eine modifizierte Einschnitt-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987) unter Verwendung von Trizol nach Herstellerangaben gewonnen. Dabei wurde

das Protokoll für geringe RNA-Mengen verwendet. Die aufgetaute Suspension wurde zweimal durch eine 26-Gauge-Nadel in eine Spritze aufgezogen und wieder in das Tube zurückgegeben. Hierdurch wurde die DNA geschert und die Viskosität herabgesetzt. Die Proben wurden jeweils mit 200 µl Chloroform versetzt und etwa 15 Sekunden sehr kräftig geschüttelt. Anschließend erfolgte eine kurze Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g und 4 °C. Nach der Zentrifugation waren zwei Phasen vorhanden: Die untere rote Phenol-Chloroform-Phase und die obere, wässrige Phase, die die RNA enthielt. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 µg RNase-freiem Glycogen als Träger für die Fällung der RNA versetzt und gemischt. Die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol fällte die gelöste RNA und das verbliebene Pellet wurde in 2 ml 75 %igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 5 min auf 55°C erhitzt. Die gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert. Konzentration und Qualität der RNA wurden am Agilent 2100 Bioanalytiker mit dem RNA 6000 NanoLab Chip Kit nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies) gemessen. Die Methode beruht auf der laserinduzierten Fluoreszenz eines RNA-bindenden Cy3-Farbstoffs (Mueller et al. 2000). Auf dem RNA-Chip wird eine Mikrogelelektrophorese durchgeführt und gleichzeitig die Fluoreszenz gemessen. Die Auswertung wurde mit der „Software 2100 Expert“ im „Eukaryote Total Nano RNA Assay Modus“ durchgeführt. Man erhält eine Konzentrationsangabe relativ zum eingesetzten RNA 6000 Marker (Ambion) und eine *RNA Integrity Number* (RIN), die über ein Verhältnis der 28 S rRNA zur 18 S rRNA der Probe errechnet wird und so ein Maß für die Qualität der RNA darstellt (Schroeder et al. 2006).

### **2.3.2.3 Erststrangsynthese aus Gesamt-RNA durch Reverse Transkription**

Die Gesamt-RNA wurde in Erststrang-cDNA unter Verwendung von Oligo(dT)<sub>18</sub>VN-Primern umgeschrieben, da diese mRNA spezifisch sind. Jeder RNA-Probe wurde jeweils eine konstante Menge exogener RNA zugesetzt. Diese so genannte Spike-mRNA stammt aus *Arabidopsis thaliana* und diente zur späteren Kontrolle von Effizienzunterschieden in der Reversen Transkription.

Es wurden 500 ng RNA mit RNase-freiem Wasser auf 8 µl Volumen gebracht. Zu den Ansätzen wurden 4 µl einer Mischung aus 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>VN-Primer (500 µg/ml) und 2 µl Spike-mRNA (0,05 ng/µl) gegeben. Die RNA wurde für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend sofort für mindestens 1 Minute auf Eiswasser abgeschreckt. Es erfolgte die Zugabe von 7 µl

Reaktionsgemisch aus 4 µl Puffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNasin (40 Units). Diese Ansätze wurden bei 42°C für 2 Minuten inkubiert, bevor zu jedem Ansatz 1 µl Reverse Transcriptase (Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, 200 units) gegeben wurde. Anschließend wurde für weitere 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde teilweise verdünnt und in Aliquots bei -80°C gelagert.

#### 2.3.2.4 PCR zur Überprüfung der Reversen Transkription

Zur Kontrolle der Reversen Transkription wurde eine PCR durchgeführt. Als Testgen diente *Clathrin* mit einer mRNA-Länge von über 6000 bp. In zwei getrennten PCR-Reaktionen wurden von jeder cDNA-Präparation ein 550 bp langes Fragment am 3'-Ende und ein 570 bp langes Fragment am 5'-Ende des Clathringens amplifiziert. Nur bei vollständiger Umschreibung der mRNA in cDNA konnten gleiche Mengen von PCR-Produkten an beiden Enden der cDNA entstehen. Die Amplifikate wurden in einem 1,5 % Agarosegel bei einer Feldstärke von 4 V/m für 30 min aufgetrennt. Als Laufpuffer diente Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer (TAE-Puffer: 40 mM Tris, pH=8,3, 20 mM Essigsäure, 1mM EDTA). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter dem Densitometer fotografiert. Für die beiden PCR-Reaktionen wurden folgende Reaktionsansätze hergestellt:

**Tabelle 2.2: Reaktionsansatz (25 µl) für die Clathrin-PCR**

Komponente	Konzentration im Reaktionsgemisch
H <sub>2</sub> O	
10 x PCR-Puffer (Qiagen)	1 x
dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM
Primermix (50 µM)	0,5 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl, Qiagen)	0,05 U/ µl
cDNA	0,04 µl/µl Reaktionsansatz

**Tabelle 2.3: PCR-Bedingungen für die Clathrin-PCR**

Funktion	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung	94	120	1
Amplifikation	94	30	30
	56	30	
	72	30	
Finale Verlängerung	72	420	1

### 2.3.2.5 Messung der Geninduktion mittels quantitativer Realtime-PCR

#### 2.3.2.5.1 Prinzip der quantitativen Realtime-PCR

Zur Quantifizierung der Kandidatengene sowie des Referenzgens aus der cDNA wurde die quantitative Realtime-PCR mit dem LightCycler 1.0 (Roche) verwendet. Bei der quantitativen Realtime-PCR handelt es sich um eine Fluoreszenz-basierte PCR-Methode (Higuchi et al. 1993), die in einem Realtime-Gerät durchgeführt wird, in dem ein Laser den in der Probe enthaltenen Farbstoff anregt. Ein Detektor misst die Intensität der von der Probe emittierten Fluoreszenz. Nach einer vorangegangenen Reversen Transkription wird wie bei der konservativen PCR durch zyklisches Denaturieren, Primeranlagerung und Verlängerung durch die Polymerase ein Amplikon exponentiell vermehrt. Durch den im Reaktionsansatz enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green wird das Reaktionsprodukt jedoch schon während der PCR sichtbar. SYBR-Green bindet ausschließlich an doppelsträngige DNA und fluoresziert dann proportional zur vorhandenen (doppelsträngigen) DNA-Menge. In ungebundener Form tritt bei SYBR-Green keine Fluoreszenz auf. Die Fluoreszenzmessung erfolgt daher am Ende jeder Verlängerungsphase. Sobald die Fluoreszenz im Reaktionsansatz mit zunehmender Zykluszahl einen Hintergrundwert überschreitet, kann die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes am Bildschirm beobachtet werden. Nach einigen Zyklen der exponentiellen Zunahme verlangsamt sich die Amplifikation aufgrund zunehmend schlechterer Reaktionsbedingungen. Da die Primerkonzentration während der PCR relativ zur Produktmenge immer mehr abnimmt und die Menge an Pyrophosphat zunimmt, kommt aufgrund des Massenwirkungsgesetzes die Reaktion langsam zum Stillstand. Für jede Probe erhält man die sigmoide Kurve einer logistischen Wachstumsfunktion. Die Kurven besitzen alle die gleiche Form, entstehen aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Amplifikation. Als *Crossing Point* (Cp) bezeichnet man den Zyklus, an dem das Signal aus dem Hintergrund tritt. Der Cp ist abhängig von der Ausgangskonzentration der cDNA des zu untersuchenden Gens, wodurch eine quantitative Aussage über die anfangs vorhandene mRNA-Transkriptmenge getroffen werden kann (Roche Applied Science 2001; Roche Applied Science 2003). Es kann eine absolute oder relative Quantifizierung der Proben erfolgen. Für die absolute Quantifizierung ist das Erstellen einer Eichgerade zur Bestimmung einer absoluten Menge (z.B. Kopienzahl,  $\mu\text{g}$ ) nötig. Bei der relativen Quantifizierung wird die mRNA des Ziel-Gens relativ zur mRNA eines Referenz-Gens betrachtet. Diese Methode wird nach heutigem Standard als die bestmögliche Prozedur zur Quantifizierung von mRNA

angesehen, weil sie für verschiedene Störeinflüsse korrigiert (Bustin 2000; Bustin 2002; Bustin und Mueller 2005).

#### 2.3.2.5.2 Oligonukleotide für die Realtime-PCR

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) waren entweder bereits im Labor etabliert oder wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Für die Berechnung neuer Primer wurde das Programm Primer (Version 0.5) vom *Whitehead Institute for Biomedical Research* eingesetzt. Es wurden Primer für die Herstellung von Eichstandards, die in der quantitativen PCR mitgeführt wurden, berechnet. Als Grundlage für die Primerberechnung wurde die Sequenz über die Sequenzdatenbank Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) abgerufen. Die gewünschte Produktgröße wurde auf 300-600 bp eingestellt. In die Produktsequenz des Eichstandards wurde ein weiteres Primerpaar für die quantitative Amplifikation eines Genfragments gelegt. Die gewünschte Produktgröße für dieses Primerpaar war 80-200 bp, wobei die Primer, wenn möglich, so gewählt wurden, dass sie eine Exongrenze überspannten, damit sie cDNA-spezifisch binden (Hurteau und Spivack 2002). Die vom Programm berechneten Sequenzen wurden zur Synthese weitergegeben (W. Weinig, *Abteilung Oligonukleotidsynthese/ DNA-Sequenzierung*, DKFZ Heidelberg). Die verwendeten Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt.

#### 2.3.2.5.3 Herstellung von Eichstandards für die Realtime-PCR

Die Quantifizierung wurde nicht absolut mit Hilfe einer Eichgeraden vorgenommen. Um jedoch zu einem späteren Zeitpunkt die Möglichkeit für diese Art der Auswertung zu haben, wurde in jedem Lauf ein Eichstandard bekannter Konzentration mitgeführt. Die Eichstandards wurden, sofern sie noch nicht im Labor vorhanden waren, ausgehend von humaner cDNA durch Amplifikation eines Fragments des gewünschten Gens hergestellt. Das Produkt wurde mit dem „Qiaquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Größe im Agarosegel überprüft. Der Standard wurde am Photometer vermessen und die Konzentration nach Formel 2.1 berechnet:

#### Formel 2.1: Berechnung der Konzentration des Eichstandards

$$CN_{Std} = \frac{N_A \times c_{Std}}{PS_{Std} \times MW_{bp}}$$

( $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  (Avogadro Konstante);  $c_{Std}$  = Massenkonzentration des Standards in g/  $\mu$ l,  $PS_{Std}$  = Produktgröße des Standards in Basenpaaren (bp),  $MW_{bp}$  = durchschnittliches Molekulargewicht eines Basenpaares:  $660 \text{ g} \times (\text{mol} \times \text{bp})^{-1}$ ,  $CN_{Std}$  = Kopienzahl des Standards (Kopien/  $\mu$ l))

**Tabelle 2.4: Reaktionsansatz (50 µl) zur Herstellung der Eichstandards**

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration im Reaktionsmix</b>
H <sub>2</sub> O	
10 x PCR-Puffer (Qiagen)	1 x
dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM
Primermix (50 µM)	1 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl, Qiagen)	0,05 U/ µl
cDNA	0,04 µl/ µl Reaktionsmix

**Tabelle 2.5: PCR-Bedingungen zur Herstellung der Eichstandards (*CDKN1A*, *PCNA*, *TP53*)**

<b>Funktion</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (s)</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	94	300	1
Amplifikation	94	30	30
	57	30	
	72	240	
Finale Verlängerung	72	600	1

**Tabelle 2.6: PCR-Bedingungen zur Herstellung der Eichstandards (*XPC*, *DDB2*, *GADD45A*)**

<b>Funktion</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (s)</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	94	120	1
Amplifikation	94	30	2
	60	15	
	72	45	
Amplifikation	94	30	2
	59,5	15	
	72	45	
Amplifikation	94	30	35
	59	15	
	72	45	
Finale Verlängerung	72	600	1

#### 2.3.2.5.4 Herstellung des Calibrators für die Realtime-PCR

Um Proben aus verschiedenen PCR-Läufen miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem Lauf der so genannte Calibrator in Triplikaten gemessen. Der Calibrator ist eine cDNA, die einmal in großem Ansatz hergestellt und in Aliquots eingefroren wurde. Optimalerweise sollte der Calibrator in jedem Lauf das gleiche Ergebnis liefern. Lauf-zu-Lauf-Unterschiede können so durch die Auswertung mit der LightCycler-Software bereinigt werden.

### 2.3.2.5.5 Etablierung und Optimierung der PCR-Bedingungen

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ für den LightCycler etabliert. Das Reaktionsvolumen betrug abweichend von den Herstellerangaben 10 µl. Das PCR-Programm wurde für jedes Gen optimiert. Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde mit Formel 2.2 berechnet (Rasmussen 2001).

#### Formel 2.2: Berechnung der PCR-Reaktionseffizienz

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{slope}}}$$

Hierbei bezeichnet  $E$  die PCR-Reaktionseffizienz und  $Slope$  die Steigung einer Regressionsgeraden, die man bei der Untersuchung einer Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe (1:10-1:200) aus dem Graphen erhält, in welchem der *Crossing Point* gegen den Logarithmus der cDNA Konzentration aufgetragen wurde (Roche Applied Science 2001). Der  $Slope$  wird von der LightCycler Software berechnet. Eine theoretisch optimale PCR-Effizienz entspräche dem Wert  $E = 2$ , also einer Verdopplung der DNA-Moleküle in jedem Zyklus. Die Effizienz der Reaktion wurde durch Variation der Primerbindungstemperatur, der Verdünnung der eingesetzten Test-cDNA und der Elongationszeit auf Werte von nahe 2 optimiert.

### 2.3.2.5.6 Durchführung der Quantifizierung

Für die Quantifizierung der Erststrang-cDNA wurde das „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ verwendet. 2 µl der cDNA-Verdünnung wurden mit spezifischen Primern für das zu untersuchende Gen in folgendem 10 µl-Reaktionsansatz eingesetzt:

**Tabelle 2.7: Reaktionsansatz (10 µl) für die quantitative Realtime-PCR**

Komponente	Konzentration im Reaktionsmix
H <sub>2</sub> O	
2 x QuantiTect SYBR Green PCR Mix*	1 x
Primer (forward) (10 µM)	0,5 µM
Primer (reverse) (10 µM)	0,5 µM
cDNA	0,02 µl/µl Reaktionsmix

\*QuantiTect SYBR Green PCR Mix enthält HotStarTaq Polymerase, PCR-Puffer, dNTP-Mix (inklusive dUTP), SYBR Green, MgCl<sub>2</sub> und ROX (Referenzfarbstoff).

Außer den zu untersuchenden Proben wurden folgende Kontrollen mitgeführt: H<sub>2</sub>O als Kontaminationskontrolle, Standard bekannter Konzentration (Duplikate) und Calibrator-cDNA in Triplikaten.

Der Reaktionsansatz wurde in die LightCycler-Kapillare pipettiert und der Lauf wurde gestartet. Die eingesetzte Polymerase wurde vom Hersteller in ihrem aktiven Zentrum mit einem Antikörper blockiert, um eine frühzeitige Aktivität und damit unspezifische Effekte zu vermeiden. Daher mussten die Proben im initialen Aktivierungsschritt für 15 min auf 95°C erhitzt werden. Die Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

**Tabelle 2.8: PCR-Bedingungen für die Quantifizierung**

<b>Funktion</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (s)</b>	<b>Zyklen</b>
initialer Aktivierungsschritt	95	900	1
Amplifikation	94	30	50
	56/ 55/ 53*	30	
	72	30	
Bestimmung der Schmelztemperatur	40-97	1°C/s	1
Reaktionsende	40	30	1

\* Annealingtemperatur: 56°C für *ACTB*, *CDKN1A*, *TP53*, *XPC*, *GADD45*, *DDB2*, 55°C für *ATLTP6*, 53°C für *PCNA*

### 2.3.2.5.7 Auswertung der quantitativen Realtime-PCR

Zur Auswertung der erhaltenen Messwerte (*Crossing Point*-Werte, Cp-Werte) wurde die Calibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur unter Verwendung der LightCycler-Software 4 durchgeführt (Roche Applied Science 2001). Um aus diesen Cp-Werten eine Aussage über die cDNA-Molekülzahl des untersuchten Gens machen zu können, bedient man sich einer Wachstumsfunktion (Formel 2.3), die die Vermehrung der DNA-Moleküle in einer PCR-Reaktion beschreibt.

#### Formel 2.3: Wachstumsfunktion für eine PCR

$$N = N_0 \times E^{C_p}$$

(N= Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus n, N<sub>0</sub>= Ausgangsmenge Moleküle, E= Reaktionseffizienz, C<sub>p</sub>= Zyklus, an dem das Signal aus dem Hintergrund tritt (*Crossing Point*))

Hierbei erfolgt die Quantifizierung der mRNA des Ziel-Gens relativ zu der mRNA des Referenz-Gens (Pfaffl 2001). Für jedes Ziel-Gen und Referenz-Gen wurde die relative Menge bestimmt, wobei für die Kalkulation der Daten ausschließlich die *Crossing Points* (Cp) herangezogen wurden, die von der Software automatisch ermittelt wurden. Das Ergebnis der Calibrator-normalisierten relativen Quantifizierung ist eine Funktion der PCR-Effizienz und der Bestimmung der *Crossing Points*.

Zur Effizienzkorrektur greift die Software auf relative Standardkurven zurück, die die PCR-Effizienz des Target- und Referenz-Gens beschreiben. Diese relativen Standardkurven wurden nur einmalig bestimmt und für einen Zugriff durch die Software hinterlegt.

Durch den Calibrator wurden unterschiedliche Detektionssensitivitäten korrigiert. Der Calibrator stellte eine positive Vergleichsprobe dar, die in jedem Lauf mitgeführt wurde. Der Calibrator diente zur Normalisierung aller Proben innerhalb eines Laufs und als konstanter Kalibrierungspunkt zwischen mehreren LightCycler-PCR-Läufen.

Die Calibrator-Normalisierung bereinigte für Lauf-zu-Lauf-Unterschiede in der PCR, während die Effizienzkorrektur die Abweichung der tatsächlichen PCR-Effizienz von der idealen PCR-Effizienz = 2 in die Berechnung einbrachte. In der relativen Quantifizierung wird die Menge des Zielgens immer im Verhältnis zum Referenzgen angegeben. Das Ergebnis aus dieser Methode wird als *Normalized Ratio* angegeben. Die Berechnung des *Normalized Ratios* wurde von der Software mit Formel 2.4 durchgeführt.

**Formel 2.4: Berechnung des *Normalized Ratio***

$$\begin{aligned} \text{Normalized Ratio} &= \frac{\frac{N_{Z(P)}}{N_{R(P)}}}{\frac{N_{Z(C)}}{N_{R(C)}}} = \frac{\frac{N_{0Z(P)}}{N_{0R(P)}} \times \frac{E_Z^{CpZ(P)}}{E_R^{CpR(P)}}}{\frac{N_{0Z(C)}}{N_{0R(I)}} \times \frac{E_Z^{CpZ(C)}}{E_R^{CpR(C)}}} = \text{konstant} \Rightarrow \\ \text{Normalized Ratio} &= \frac{\frac{N_{0Z(P)}}{N_{0R(P)}}}{\frac{N_{0Z(C)}}{N_{0R(I)}}} = \frac{E_Z^{CpZ(C)}}{E_R^{CpR(C)}} = \frac{E_Z^{CpZ(C)}}{E_R^{CpR(C)}} \times \frac{E_R^{CpR(P)}}{E_Z^{CpZ(P)}} = E_Z^{CpZ(C)-CpZ(P)} \times E_R^{CpR(P)-CpR(C)} \end{aligned}$$

(Cp = Cp-Wert, N = cDNA Molekülzahl zum Zeitpunkt Cp, N<sub>0</sub> = cDNA Molekülzahl zum Zeitpunkt 0, E = Reaktionseffizienz, Z = Zielgen, R = Referenzgen, P = Patientenprobe, C = Calibrator-Probe)

Um Geninduktionsfaktoren für die verschiedenen Zeitpunkte zu erhalten, wurde der Quotient aus den *Normalized Ratios* der bestrahlten Probe und der entsprechenden unbestrahlten Probe gebildet.

**Formel 2.5: Berechnung des Induktionsfaktors**

$$\text{Induktionsfaktor} = \frac{\text{Normalized Ratio 5 Gy}}{\text{Normalized Ratio 0 Gy}}$$

### **2.3.2.5.8 Identifizierung der entstandenen PCR-Produkte**

Durch das Auftreten eines Fluoreszenzsignals in der PCR wurde nur die Bildung eines Produkts, aber nicht dessen Reinheit und Identität nachgewiesen. Um dies zu überprüfen, wurde eine Schmelzkurve von dem entstandenen PCR-Produkt erstellt und der Schmelzpunkt  $T_m$  bestimmt, der bei konstanten Pufferbedingungen charakteristisch für jedes Produkt ist. Nebenprodukte zeigten sich in weiteren Maxima in der abgeleiteten Kurve, falsche Produkte an einem verschobenen Schmelzpunkt. Neue Produkte, deren Schmelzpunkte noch nicht bekannt waren, wurden einmalig in einem Agarosegel anhand der Produktlänge identifiziert. Außerdem wurde von jedem Produkt eine Probe zur Sequenzierung gegeben (A. Hunziker, *Abteilung Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung*, DKFZ Heidelberg) und das erhaltene Ergebnis mit der Genbanksequenz verglichen.

## **2.4 Studie zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Prostatakrebspatienten**

Zur Untersuchung der Ursachen individueller Unterschiede in der Reaktion des Normalgewebes auf eine Strahlentherapie bei Prostatakrebspatienten wurde eine epidemiologische Studie in Kooperation von zwei Arbeitsgruppen des DKFZ Heidelberg und der Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt. Die Rekrutierung der Patienten sowie die Dokumentation der klinischen Daten wurde von der *Abteilung für Klinische Radiologie* der Universitätsklinik Heidelberg unter der Leitung von Herrn Prof. J. Debus durchgeführt. Von epidemiologischer Seite wurde die Studie von der *Arbeitsgruppe für Genetische Epidemiologie*, DKFZ, unter der Leitung von Frau Prof. J. Chang-Claude betreut. Die Leitung der gesamten Studie hatten Herr Dr. P. Schmezer und Frau Priv.-Doz. Dr. O. Popanda aus der *Arbeitsgruppe für Genetische Toxikologie und DNA-Reparatur, Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren*, DKFZ. Für die Untersuchungen wurden ab August 2001 Prostatakrebspatienten rekrutiert, für die eine Strahlentherapie indiziert war. Die Patienten wurden vor Beginn der Therapie über die von der Ethikkommission der Universität Heidelberg genehmigte Studie (206/2000) unterrichtet. Gaben die Patienten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie, wurden erste Daten anhand eines Fragebogens erhoben. Neben allgemeinen Informationen und Fragen zur Lebenssituation wurden anthropometrische und klinische Daten sowie möglichen Risiko- und Einflussfaktoren für die Entwicklung von unerwünschten Strahlenreaktionen abgefragt. Für die geplanten Laboruntersuchungen wurden den Patienten vor Beginn der

Strahlentherapie etwa 50 ml Blut abgenommen.

#### **2.4.1 Bewertung der klinischen Strahlenempfindlichkeit der Prostatakrebspatienten**

Zur Erfassung der Nebeneffekte wurden die Patienten während des Bestrahlungsregimes wöchentlich durch erfahrene Kliniker des Kooperationspartners untersucht. Es wurden verschiedene Organe und Gewebe mit besonderem Gewicht auf Blut und Knochenmark sowie Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt untersucht. Die Bewertung der Nebenwirkungen wurde auf der Grundlage der Common Toxicity Criteria 2.0 (CTC) des National Cancer Institute (<http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>) modifiziert nach Seegenschmiedt (Seegenschmiedt 1998) separat für jeden Parameter (Gewebe, Organ) vorgenommen (siehe Tabelle 2.9). Auf einer Skala von 0 (kein Hinweis auf Nebeneffekte) bis 4 (lebensbedrohliche Nebeneffekte) wurden die einzelnen Ergebnisse auf Evaluierungsbögen festgehalten. Für die abschließende Bewertung eines Patienten wurde der höchste in einem Parameter aufgetretene CTC-Wert innerhalb des gesamten Zeitraums herangezogen. Zur Vereinfachung wurden Patienten mit einer abschließenden CTC-Bewertung von 0, 1 und 2 zur Gruppe der normalempfindlichen Patienten zusammengefasst. Patienten mit Wertungen von 3 und 4 wurden als klinisch strahlenüberempfindlich eingestuft, da bei diesen Patienten wesentliche klinische Interventionen sowie eine Veränderung der Strahlentherapie notwendig waren.

**Tabelle 2.9: Bewertungen der Strahlennebenwirkungen nach CTC (*common toxicity criteria*) des National Cancer Institute modifiziert nach (Seegenschmiedt 1998)**

<b>CTC-Wert</b>	<b>Stärke der Nebenwirkungen</b>	<b>Auswirkungen der Strahleneffekte auf die Strahlentherapie und deren Behandlung</b>
0	keine	keine
1	gering und leicht	spontanes Abklingen, ohne spezielle Therapie; keine Unterbrechung der Strahlentherapie notwendig
2	mäßig und deutlich	ambulante Behandlung mit einfachen Medikamenten; keine wesentliche Verzögerung, Dosismodifikation oder Unterbrechung der Strahlentherapie
3	stark und ausgeprägt	oft Hospitalisierung und Einleitung intensiver medikamentöser und supportiver Maßnahmen; deutliche Verzögerung oder Unterbrechung der Strahlentherapie und/ oder Dosismodifikation
4	lebensbedrohlich	sofortige notfallmäßige Hospitalisierung und umgehende intensivmedizinische Maßnahmen oder chirurgische Interventionen; sofortiger Abbruch der Strahlentherapie

#### **2.4.2 Zusammensetzung des Patientenkollektivs für die Geninduktionsanalyse**

Von den bis Februar 2004 rekrutierten 250 Patienten wurden 129 für die Geninduktionsanalyse ausgewählt. Von diesen stammten 40 aus der Gruppe der klinisch strahlenüberempfindlichen Patienten (CTC-Wert 3 oder 4) und 89 aus der Gruppe der normalempfindlichen Patienten (CTC-Wert 0-2).

#### **2.4.3 Gewinnung des Patientenmaterials**

Vor Beginn der Strahlentherapie wurden den Patienten etwa 50 ml Blut direkt in EDTA-Monovetten abgenommen. Die Aufarbeitung des EDTA-Bluts erfolgte zeitnah zur Blutentnahme in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 wie unter 2.3.1 beschrieben. Es wurden Portionen von  $10^7$  Lymphozyten kryokonserviert. Lymphozyten eines gesunden, männlichen Blutspenders (von der Blutbank der Universität Heidelberg) dienten als Standard.

#### **2.4.4 Analyse der Geninduktion bei Prostatakrebspatienten mittels quantitativer Realtime-PCR**

Zur Bestimmung der Geninduktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen nach Bestrahlung mit 5 Gy in Lymphozyten von Prostatakrebspatienten wurde die RNA 4 h nach der Bestrahlung geerntet. Dieser Zeitpunkt wurde nach den Vorversuchen mit Lymphozyten von gesunden Spendern als optimal festgelegt. Zusätzlich zu den in den Vorversuchen quantifizierten Genen (*CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA* und *TP53*) wurden weitere Gene ausgewählt, die in der Literatur als induzierbar durch  $\gamma$ -Bestrahlung beschrieben wurden: *XPC*, *DDB2* und *GADD45A*.

Pro Patient wurden zwei Aliquots der Lymphozyten aufgetaut und wie in 2.3.2.1 behandelt. Das erste Zell-Aliquot wurde nicht bestrahlt; das zweite Aliquot wurde mit einer Dosis von 5 Gy aus einer  $^{137}\text{Cäsium}$ -Quelle mit einer Dosisleistung von 10,1 Gy pro Minute bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben für 4 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert, anschließend für 10 min bei 230 x g zentrifugiert und der Überstand restlos abgenommen. Das Pellet wurde in 800  $\mu\text{l}$  Trizol aufgenommen und gut resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur Extraktion der RNA wurden die Lysate bei -80°C gelagert. Die RNA wurde wie in 2.3.2.2 extrahiert und in cDNA umgeschrieben (2.3.2.3). Die quantitative Realtime-PCR erfolgte wie in 2.3.2.5 beschrieben. Die Geninduktionsfaktoren 4 h nach Bestrahlung wurden für jeden Patient und für jedes Gen nach Formel 2.6 bestimmt.

##### **Formel 2.6: Berechnung des Induktionsfaktors**

$$\text{Induktionsfaktor} = \frac{\text{Normalized Ratio 5 Gy}}{\text{Normalized Ratio 0 Gy}}$$

## **2.5 Untersuchungen zur Bedeutung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) an p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen**

### **2.5.1 Beschreibung der Zelllinien und ihre Kultivierung und Konservierung**

Die verwendeten Zelllinien waren humanen colorektalen Ursprungs. Die Zelllinie HCT116 p21<sup>+/+</sup> war p21-kompetent, die Linie HCT116 p21<sup>-/-</sup> war p21-defizient. Beide Linien wurden von Prof. Bert Vogelstein, Baltimore (USA) zur Verfügung gestellt, wobei die p21-knockout-Zelllinie durch homologe Rekombination des Zielgens generiert worden war (Waldman et al. 1995c). Als Zellkulturmedium wurde McCoy's 5A-Medium verwendet, welches mit 10 % FCS und 1 % Antibiotikum/Antimykotikum supplementiert wurde. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die adhären wachsenden Zellen nach Abnahme des Mediums durch Waschen mit PBS von Mediumrückständen befreit. Anschließend wurde mit Trypsin-EDTA gespült, die Flüssigkeit wieder abgesaugt und erneut 1 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation (37°C) wurde durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche überprüft, ob sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Zellen wurden mit 20 ml frischem Medium auf eine Zellzahl von  $7,5 \times 10^4$  Zellen pro ml eingestellt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach dem Trypsinieren in PBS zentrifugiert und in Medium (1 ml pro  $3 \times 10^6$  Zellen), welches 20 % FCS und 10 % DMSO enthielt, aufgenommen und eingefroren.

### **2.5.2 Untersuchung der zellulären Strahlenempfindlichkeit von p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen**

#### **2.5.2.1 Wachstumsverhalten nach Bestrahlung**

Am Tag vor der Bestrahlung wurden beide Zelllinien in einer Dichte von  $0,05 \times 10^6$  Zellen pro ml in 24 Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) in 10 ml frischem Medium ausgesät. Ein Ansatz wurde mit 2 Gy, ein zweiter mit 5 Gy mit einer Dosisleistung von 0,575 Gy/min bestrahlt. Der dritte Ansatz blieb als Kontrolle unbestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel in allen Ansätzen. Die Zellen wurden über 7 Tage weiterkultiviert. An jedem Tag wurden die Zellen von einer Zellkulturschale je

Ansatz trypsiniert und mit der Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Ausschluss gezählt (Lindl 2002). Von jedem Ansatz wurden vier Aliquots ausgezählt. Das gesamte Experiment wurde dreimal durchgeführt. Idealisierte Wachstumskurven der bestrahlten und unbestrahlten Zellen wurden in Microsoft Excel durch exponentielle Interpolation der ermittelten Zellzahlen durchgeführt. Die Generationszeiten für beide Zelllinien im unbestrahlten Zustand sowie nach 2 und 5 Gy wurden ermittelt.

### **2.5.2.2 Bestimmung der DNA-Reparatur mittels Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (*Comet Assay*)**

Die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (*Comet Assay*) wurde erstmals von Singh (Singh et al. 1988) beschrieben und hier nach der von Popanda modifizierte Variante durchgeführt (Popanda et al. 2003). Mit dem *Comet Assay* können genotoxische Effekte detektiert werden, die von karzinogenen Substanzen oder physikalischen Einflüssen, wie ionisierender Strahlung, ausgehen. Der *Comet Assay* wurde eingesetzt, um die strahleninduzierten DNA-Schäden sowie die DNA-Reparaturkapazität nach Bestrahlung in p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen zu bestimmen. Die Zellen wurden auf Objektträgern (Trevigen) in 0,7 %iger Agarose eingebettet und nach dem Erstarren der Agaroseschicht bestrahlt. Zur Ermittlung des Hintergrundschadens wurden die Objektträger nicht bestrahlt, während die anderen Objektträger mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt wurden. Nach der Bestrahlung wurden die Objektträger zur Bestimmung des Hintergrundschadens sowie die Objektträger zur Bestimmung des induzierten Schadens (0 min) direkt in die Lyse gegeben. Die übrigen Objektträger wurden für 15 bzw. 60 min bei 37°C in RPMI inkubiert, um den Zellen Zeit zur Reparatur der induzierten DNA-Schäden zu geben. Membranstrukturen und Zytoskelett wurden anschließend durch Inkubation der Zellpräparation in Lysepuffer (NaCl 2,5 M, Trizma-Base 10 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 0,1 M, N-Laurylsarcosin Na-Salz 1 %, Triton X-100 1 %, DMSO 10 %; pH 10,0) aufgelöst. Die DNA der Zellen wurde in einer nachfolgenden Elektrophorese im stark alkalischen Milieu aufgetrennt (NaOH 0,3 M, EDTA-Na<sub>2</sub> 1,0 M; pH 13,1). Fragmentierte DNA wandert dabei zur Anode und setzt sich von der hochmolekularen ungeschädigten DNA des Zellkerns ab. Je stärker die DNA der Zellen geschädigt ist, desto ausgeprägtere kometenartige Strukturen bilden sich während der Elektrophorese aus.

Die Auswertung des Comet-Assay wurde mit einer automatischen Auswertanlage (Metasystems) vorgenommen. Nach Anfärbung der Präparation mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green wurde die DNA der Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop

sichtbar (SYBR Green, Biozol, 0,1 µl/ml TE-Puffer). Einzelne Kerne wurden automatisch in einem Bildfenster positioniert, fokussiert und ausgelesen. Aufgrund der Signalintensitäten wurden die DNA-Anteile in Kopf und Schweif aufgeteilt sowie die Schweiflänge berechnet. Der Parameter *Olive Tail Moment* (µm) ist definiert als das Produkt aus Tail-Länge und dem prozentualen Anteil der DNA im Schweif. Die Tail-Länge spiegelt das Ausmaß der DNA-Wanderung wieder. Je intensiver und heller der Schweif, desto mehr DNA ist während der Elektrophorese gewandert, oder desto stärker war die DNA fragmentiert bzw. geschädigt (Olive et al. 1990). Für jede Versuchsbedingung wurden mindestens 3 x 100 Zellen (aus drei Agaroseflecken) ausgewertet. Das *Olive Tail Moment* ist keine normalverteilte Größe, sondern folgt einer rechts-schiefen Verteilung. Aus diesem Grund wurde zur Mittelung einer Messung der Median aus den vermessenen Zellen berechnet. Von den drei Medianen einer Behandlung wurde anschließend der Mittelwert (arithmetisches Mittel) gebildet. Aus den Daten wurden die vier Parameter Hintergrundschaden, induzierter Schaden und Restschaden nach 15 bzw. 60 Minuten Reparatur für jede Zelllinie bestimmt. Der Hintergrundschaden ergab sich aus dem Wert der unbestrahlten Kontrolle, der induzierte Schaden aus dem Wert für die bestrahlten Zellen, die keine Zeit zur Reparatur hatten.

### **2.5.2.3 Zellzyklusanalyse nach Bestrahlung mittels Fluoreszenzaktiviertem Cell Sorter (FACS)**

Das Prinzip des Durchflusszytometers basiert auf einem speziellen Mikroskop zur schnellen Messung verschiedener Parameter, wie Fluoreszenz und Streulicht von Zellen oder Zellkernen. Die fixierten Zellen fließen im Flüssigkeitsstrom an einer Lichtquelle (z.B. Argonlaser) vorbei, die die Zellen mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregt (z.B. 488 nm). Die Wellenlänge des emittierten Lichts sowie der Streuwinkel werden von Detektoren erfasst (Lindl 2002). Die Seitwärtsstreuung (SSC) und die Vorwärtsstreuung (FSC) geben Rückschluss auf Größe und Struktur der Zelle. Nach der Färbung der DNA mit Propidiumjodid kann der DNA-Gehalt von Zellen bestimmt werden, was eine Analyse von Zellpopulationen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermöglicht (BD Biosciences 2003). Zellen mit einem einfachen DNA-Gehalt (Chromosomensatz 2n) befinden sich in der G1/G0-Phase, Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt (Chromosomensatz 4n) befinden sich in der G2/M-Phase und Zellen mit einem DNA-Gehalt dazwischen befinden sich in der S-Phase. Apoptotische Zelltrümmer haben einen geringeren DNA-Gehalt als intakte Zellen.

Um mögliche Unterschiede der p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen in ihrem

Verhalten im Zellzyklus nach DNA-Schädigung durch IR aufzudecken, wurde die Verteilung der Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen nach Bestrahlung mit ansteigenden Dosen sowie nach unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Am Tag vor der Bestrahlung wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Zellkulturmedium ausgesät. Der Transport zur Bestrahlungsanlage erfolgte lichtgeschützt, um einen möglichen Einfluss durch Streulicht auszuschließen. Die Zellen wurden entweder nicht (0 Gy) oder mit Dosen von 2 oder 5 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel, bevor die Schalen wieder zurück in den Inkubator gestellt wurden. Die Zellen wurden jeweils nach 4, 8, oder 24 h geerntet. Die Zellen wurden trypsiniert und anschließend in 10 ml PBS für 5 min bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert und erneut in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, und die Suspension wurde anschließend auf dem Vortexer in 5 ml eiskaltes Fixans (70 % Ethanol, 20 % Aqua bidest., 10 % PBS) getropft. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Analyse im FACS erfolgte bei -20°C (mindestens 1 h, aber auch bis zu mehreren Monaten möglich). Direkt vor der Messung wurden die fixierten Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Es erfolgte eine RNaseA-Behandlung (Endkonzentration 50 µg/ml) für 30 min bei 37°C, bevor der DNA-Farbstoff Propidiumjodid (Endkonzentration 50 µg/ml) zu den Proben gegeben und alles für weitere 30 min im Dunkeln inkubiert wurde. Im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) wurden von 10.000 Zellen pro Probe folgende Parameter aufgenommen: Vorwärts-Streulicht (*Forward Scatter, FSC*), Seitwärts-Streulicht (*Side Scatter, SSC*), FL2-Height, FL2-Area und FL2-Width (FL2 = Fluoreszenz 2- Propidiumjodid). Die Auswertung der Verteilung in die verschiedenen Zellzyklusphasen (sub G1, G1/G0, S, G2/M) erfolgte durch Auswertung der Signalintensitäten mit dem mitgelieferten Programm „CellQuestPro“ (Becton Dickinson).

### **2.5.3 Analyse der Geninduktion nach Bestrahlung mittels quantitativer**

#### **Realtime-PCR**

Die Auswirkung von fehlendem p21 auf die Induktion von DNA-Reparaturgenen nach Bestrahlung wurde mit quantitativer Realtime-PCR gemessen. Am Tag vor der Bestrahlung wurden beide Zelllinien in einer Dichte von  $0,15 \times 10^6$  Zellen pro ml in Zellkulturschalen (3,5 cm Durchmesser) in 4 ml frischen Medium ausgesät. Ein Ansatz wurde mit 2 Gy, ein zweiter mit 5 Gy mit einer Dosisleistung von 0,575 Gy/min bestrahlt. Der dritte Ansatz blieb als Kontrolle unbestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte ein

Mediumwechsel. Jeweils nach 0, 2, 4, 6, 8 und 24 h wurden die Zellen von einer Schale geerntet und die RNA mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert, und Qualität und Konzentration wurden im Agilent Bioanalytiker bestimmt. Reverse Transkription und Quantifizierung mit Realtime-PCR wurden wie schon beschrieben durchgeführt (2.3.2.3 und 2.3.2.5)

#### **2.5.4 Stummschaltung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) in p21-kompetenten HCT116-Zellen mit siRNA**

##### **2.5.4.1 Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi)**

Die RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al. 1998b) ist eine wirkungsvolle Methode zur Untersuchung von Genfunktionen und ermöglicht den *knock down* von Genen in einer Vielzahl von Organismen sowie in menschlichen Zelllinien. Das Phänomen wurde erstmals bei *C. elegans* beobachtet (Fire et al. 1998a) und entsteht durch die Wechselwirkung von kurzen Stücken (21-25 Nukleotide lang) doppelsträngiger RNA (small interfering RNA= siRNA) mit einem Proteinkomplex (Elbashir et al. 2001). Dieser so genannte *RNA-induced silencing complex* (RISC) zeigt Nukleaseaktivität und schneidet mRNA mit einer komplementären Basenabfolge zu einem Strang der siRNA. Die siRNA dient also als eine Art Ziel-Sequenz zur Erkennung der mRNA durch RISC und leitet so deren Abbau ein und verhindert die Proteinsynthese (Hammond et al. 2000). Diese Methode ist sehr spezifisch, da schon bei ein oder zwei abweichenden Nukleotiden in der mRNA-Sequenz die Nukleaseaktivität gestoppt ist.

Die RNA-Interferenz ermöglicht die Stummschaltung bzw. Herabregulierung von einzelnen Genen und kann sowohl dauerhaft als auch transient eingesetzt werden.

##### **2.5.4.2 Herstellung der siRNA**

Zur Herstellung der siRNA wurde die „esiWay RNA Resource“ des *Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD)* verwendet (Kittler et al. 2004; Rees et al. 2006). Die zur Stummschaltung von *CDKN1A* verwendete esiRNA Resource war ein gen-spezifisches PCR-Produkt mit einer Länge von 342 Basenpaaren, das keine repetitiven oder homologen Sequenzen enthielt. Aus diesem PCR-Produkt wurde die siRNA im Labor hergestellt. Zunächst wurde das Fragment amplifiziert, dann durch *in vitro* Transkription in dsRNA umgeschrieben. Nach einem Verdau mit dem Enzym Dicer, einer speziellen RNase, wurden die 21-23 bp langen dsRNA Fragmente erhalten.

### Amplifizierung des PCR-Produkts

Die esiRNA Resource hatte identische T7-Promotoren an beiden Enden, so dass zur Amplifizierung ein T7-Primer verwendet wurde. Die PCR wurde gemäß der Vorschrift des RZPD durchgeführt.

**Tabelle 2.10: Reaktionsansatz (100 µl) zur Amplifizierung der esiRNA Resource**

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration im Reaktionsmix</b>
H <sub>2</sub> O	
10 x PCR-Puffer	1 x
T7-Primer (10 µM)	0,8 µM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl, Eppendorf)	0,05 U/µl
esiRNA Resource (50 ng/µl)	1 ng/µl

**Tabelle 2.11: PCR-Bedingungen zur Amplifizierung der esiRNA Resource**

<b>Funktion</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit (s)</b>	<b>Zyklen</b>
Denaturierung	95	120	1
	95	20	30
Amplifikation	46	15	
	72	30	
Finale Verlängerung	72	360	1

Das entstandene PCR-Produkt wurde mit dem „Qiaquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration des PCR-Produkts im Photometer bestimmt. Als Qualitätskontrolle wurde ein Aliquot des PCR-Produkts in einem 2 % igen Agarosegel aufgetrennt. Hier sollte nur eine definierte Bande von 342 bp sichtbar sein.

### *T7 in vitro Transkription der dsDNA in dsRNA*

Die *in vitro* Transkription diente zur Umschreibung der dsDNA in dsRNA. Hierzu wurde das „X-treme GENE siRNA Dicer Kit“ (Roche) gemäß Herstellerangaben verwendet. In einer Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 30 µl wurde 1 µg PCR-Produkt mit 12 µl T7-Reaktionsmix und 3 µl T7- Enzymmix eingesetzt. Die Reaktion wurde für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die entstandene dsRNA durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert. Das Reaktionsgefäß wurde aus dem Heizblock entnommen und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, so dass die komplementären Stränge wieder aneinander binden konnten.

Die Reinigung der dsRNA erfolgte durch Isopropanolfällung. Dazu wurden 30 µl dsRNA in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß umgefüllt, anschließend wurden 70 µl nuklease-freies H<sub>2</sub>O und 70 µl Isopropanol zugefügt, gemischt und 10 min auf Eis stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei 14.000 x g bei 4°C für 20 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min wurde das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 30 µl nuklease-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde am Photometer bestimmt (1 OD RNA = 40 µg/ml). Zur Bestimmung von Größe und Qualität der RNA wurde ein Aliquot von 0,5 µl dsRNA in einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die Banden am Densitometer dokumentiert. Es sollte nur eine definierte Bande zu erkennen sein.

#### *Schneidung der dsRNA mit Dicer*

Dicer ist eine recombinante humane Typ-III-Ribonuklease, die lange dsRNA in 21-23 bp lange siRNA Duplexe mit 2 Nukleotiden Überhang schneidet.

Unter Verwendung des „X-treme GENE siRNA Dicer Kit“ (Roche) gemäß Herstellerangaben wurden in einer Verdaureaktion von 300 µl Volumen 30 µg der gereinigten dsRNA sowie 60 µl Dicer-Reaktionspuffer und 90 µl Dicer-Enzym (0,33 U/ µl) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Dicer-Stop-Lösung und Inkubation für 30 min bei 65°C wurde das Reaktionsgefäß aus dem Heizblock entnommen und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die verdauten PCR-Produkte mussten von unverdauten langen RNA-Fragmenten gereinigt werden, da längere dsRNA in transfizierten Zellen unerwünschte und unspezifische Reaktionen verursachen kann. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des „X-treme GENE siRNA Dicer Kit“ (Roche) gemäß Herstellerangaben über Filterröhrchen. Zum Nachweis der Integrität der siRNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (4 % Agarose in TAE-Puffer, 75 Volt, 90 min). Auf das Gel wurden Aliquots der Dicing-Reaktion und der Ausgangs-dsRNA sowie ein Größenstandard aufgetragen. Im Gegensatz zur unverdauten dsRNA mit 342 bp sollte die siRNA eine Fragmentgröße von etwa 20 bp aufweisen und nicht mit größeren Fragmenten verunreinigt sein. Die Konzentration der gereinigten siRNA wurde im Photometer bestimmt.

### **2.5.4.3 Transfektion der HCT 116 Zellen mit siRNA**

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 24-Loch-Platten in einer Konzentration von  $8 \times 10^4$  Zellen in exakt 450  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium ausgesät. Für die Transfektion wurde das „X-treme GENE siRNA Transfection Reagent“ (Roche) gemäß Herstellerangaben verwendet. Insgesamt wurden 6 verschiedene siRNA Konzentrationen (100, 60, 50, 30, 20, 10 nM) getestet. Weiterhin wurden drei verschiedene Kontrollen eingesetzt. Als Referenz für die spätere Auswertung galt die nicht-transfizierte Kontrolle. Hier blieben die Zellen unbehandelt. Um unspezifische Wirkungen durch das Transfektionsreagenz erkennen zu können, wurde die zweite Kontrolle nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Eine weitere Kontrolle stellte die Transfektion der Zellen mit 100 nM Luciferase siRNA dar, eine siRNA, die in den verwendeten Zellen kein Ziel findet, so dass auch mit dieser Kontrolle unspezifische Wirkungen aufgedeckt werden könnten.

Die Herstellung des Gemischs aus siRNA, Transfektionsreagenz und serumfreiem Medium wurde exakt nach Herstellerangaben durchgeführt. Abhängig von der siRNA-Konzentration wurde auch das Transfektionsreagenz erhöht. Zuerst wurde serumfreies Medium (OptiMEM, Gibco) mit Transfektionsreagenz gemischt, danach serumfreies Medium mit siRNA. Beide Ansätze wurden vereinigt und 20 min bei RT inkubiert. Die Transfektion erfolgte durch tröpfchenweise Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Lösung auf die Zellen. Das vorhandene Medium konnte auf den Zellen bleiben. Die Platten wurden vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen und anschließend wieder zurück in den Inkubator gestellt. Es wurden mehrere Platten angesetzt, um die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten ernten zu können.

### **2.5.4.4 Bestrahlung und Ernte der mit siRNA transfizierten Zellen**

Um die Auswirkungen von Bestrahlung auf Zellen mit vermindertem mRNA-Gehalt des Gens *CDKN1A* zu testen, wurde ein Teil der Platten 24 h nach der Transfektion mit 5 Gy bestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte ein Mediumwechsel bei allen Zellen. Die Lyse der Zellen erfolgte bei diesen Zellen 4 h nach der Bestrahlung. Die Zellen der anderen Platten wurden nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet (24, 48, 72, 96 h nach der Transfektion). Vor der Lyse wurden die Zellen im Mikroskop betrachtet, um toxische Effekte zu erkennen.

#### 2.5.4.5 Quantifizierung der mRNA durch quantitative Realtime-PCR

Die RNA Extraktion wurde mit dem „Qiagen RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden direkt in der Platte lysiert und nicht vorher trypsinisiert. Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert. Konzentration und Qualität der RNA wurde am Agilent Bioanalyzer bestimmt. In die Reverse Transkription wurden nur RNAs eingesetzt, deren RIN (*RNA Integrity Number*) größer als 8,5 war (Schroeder et al. 2006). Die Reverse Transkription wurde ausgehend von 500 ng RNA wie schon beschrieben (2.3.2.3) durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde 1:10 verdünnt und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung wurden wie schon beschrieben durchgeführt (2.3.2.5).

#### 2.5.4.6 Proteinanalyse mittels Western Blot

##### *Extraktion von Proteinen*

Zur Proteinextraktion wurde der Überstand von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, jeder Probe wurde ein Aliquot für die Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau entnommen (Lindl 2002). Die Zellen wurden 5 min bei 15.700 x g und 4°C pelletiert und in 100 µl Proteinlysepuffer aufgenommen, gut resuspendiert und für 20 min auf Eis stehen gelassen. Es folgte eine Benzonase-Behandlung (1 µl/ 100 µl Proteinlysepuffer) für 30 min bei 37°C, die die DNA und RNA abbaute. Zelldebris wurde durch anschließendes Zentrifugieren (5 min, 15.700 x g, 4°C) pelletiert, der Überstand enthielt die nukleären und cytoplasmatischen Proteine. Die Konzentration der Protein-Lösung wurde mittels BioRad Protein Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

**Tabelle 2.12 Zusammensetzung des Proteinlysepuffers**

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	20 mM
Harnstoff	7 M
DTT	100 mM
Triton-X 100	1 %

vor Benutzung: Zugabe von 1 mM MgCl<sub>2</sub>

##### *SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)*

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamidgelen ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli 1970; Schagger und von Jagow 1987). Die eigene

Polarität der Proteine durch geladene Aminosäurereste ist unerheblich, da sich sowohl im Probenpuffer als auch im Gel Natriumdodecylsulfat (SDS) befindet, das sich unabhängig von der Aminosäuresequenz an Proteine anlagert. Aufgrund der negativen Ladung des SDS wandern alle Proteine zur Anode.

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (Invitrogen) und „Reduzierendem Agens“ (Invitrogen) versetzt und für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Taschen des Minigels (Invitrogen) wurden mit Laufpuffer gespült und zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard (MagicMark, Invitrogen) geladen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 200 V für 50-60 min im „X Cell Sure Lock System“ (Invitrogen) durchgeführt.

**Tabelle 2.13: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
20 x Nupage MOPS SDS-Puffer	50 ml
dd H <sub>2</sub> O	950 ml

*Western-Blot*

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektroblot aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (0,45 µm, Invitrolon, Invitrogen) überführt. Dazu wurden eine PVDF-Membran, zwei Filterpapiere und 4 Blotschwämme für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Blot wurden von der Kathode aus zwei Blotschwämme, ein Filterpapier, das Gel, die PVDF-Membran, ein Filterpapier sowie zwei weitere Blotschwämme luftblasenfrei zusammengelegt und in die Apparatur eingebaut. Der Transfer fand bei konstanter Spannung von 30 V für 60 min statt. Nach der Transferzeit wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung geblockt. Die Membran wurde dreimal für 5 min gewaschen, bevor die Lösung mit dem primären Antikörper auf die Membran gegeben wurde. Der primäre Antikörper wurde in unterschiedlicher Verdünnung eingesetzt und je nach Antikörper erfolgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C Tabelle 2.16.

**Tabelle 2.14: Transferpuffer für ein Gel**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
20 x Transferpuffer	50 ml
Methanol	100 ml
dd H <sub>2</sub> O	850 ml

vor Benutzung: Zugabe von 1ml Antioxidant

Beim Blotten von zwei Gelen wurde der Methanolgehalt verdoppelt.

**Tabelle 2.15: Lösungen für Western Blot-Analyse**

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
TBST Waschlösung	10 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
Blocklösung	5 % Milchpulver in TBST
Lösung zur Verdünnung der Antikörper	1 % Milchpulver in TBST

**Tabelle 2.16: Verdünnung und Inkubationszeiten der Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
anti-p21	1:200	über Nacht
anti-p53	1:100	1 h
anti-gadd45a	1:200	1 h
anti-actin	1:10 000	1 h
sekundärer Anti-Maus-Antikörper	1: 2 000-1:10 000	1 h

Nach erneutem Waschen (4 x 10 min) wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper inkubiert. Anschließend folgten weitere Waschschrte (3 x 15 min) und die Detektion mit dem „Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus“-System (Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers. Die Membran wurde luftblasenfrei unter Klarsichtfolie gelegt, und die Exposition von Hyperfilm (Amersham) Filmen erfolgte für 5 s bis zu 20 min in einer Filmkassette. Danach wurden die Hyperfilme digitalisiert (HP Scanner) und mit Hilfe der Adobe Photoshop Software 7.0 quantifiziert. Dabei wurde die Intensität der Zielproteinbande ins Verhältnis zur Intensität der Bande von  $\beta$ -Actin gesetzt.

#### *Entfernen der Antikörper von der PVDF-Membran*

Um mehrere Proteine nacheinander auf einer Membran nachweisen zu können, wurden die Membranen von Antikörpern befreit („gestrippt“). Dazu wurden die Membranen in einem vollen 50 ml Bluecap-Röhrchen für 30 min bei 50 °C mit Stripp-Puffer behandelt, danach 3 x 5 min gewaschen und erneut für 1 h geblockt.

**Tabelle 2.17: Zusammensetzung des Stripp-Puffers**

Komponente	Volumen
dH <sub>2</sub> O	216,25 ml
Tris-Base 2 M, pH 6,8	8,75 ml
SDS 20 %	25 ml

vor Gebrauch: Zugabe von 0,8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

## 2.6 Statistische Berechnungen

### 2.6.1 Mittelwerte, Variationskoeffizienten und Mediane

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei Mittelwerten um das arithmetische Mittel. Diese werden im Folgenden zusammen mit der Standardabweichung angegeben (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Als Streuungsmaß wird der Variationskoeffizient als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert verwendet:

#### Formel 2.7: Berechnung des Variationskoeffizienten

$$VK = SD/MW$$

Mit VK: Variationskoeffizient, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Der Median einer geordneten Stichprobe  $(x_1, x_2, \dots, x_n)$  von  $n$  Messwerten berechnet sich als

#### Formel 2.8: Berechnung des Medians

$$\tilde{x} = \begin{cases} x_{(n+1)/2} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} (x_{(n/2)} + x_{(n/2+1)}) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

### 2.6.2 Der Wilcoxon (Mann-Whitney) two sample Test

Der Wilcoxon Test prüft, ob sich 2 Gruppen signifikant unterscheiden. Der Test ist nicht parametrisch, d.h. es wird keine Normalverteilung der Variablen der Gruppen vorausgesetzt. Die Daten werden in eine Rangfolge gebracht und für  $i = 1, \dots, I$  die Rangsummen  $R_i$  in den einzelnen Gruppen bestimmt:

**Formel 2.9: Berechnung der Signifikanz der Rangsummen**

$$R_i = \sum_{j=1}^{n_i} R_{ij}.$$

Die Teststatistik prüft, ob sich die Rangsummen signifikant unterscheiden.

**2.6.3 Der Kruskal-Wallis Test**

Der Kruskal-Wallis Test ist eine Varianzanalyse für Rangdaten. Er prüft, ob sich mehr als 2 Gruppen hinsichtlich ihrer Verteilung unterscheiden. Er ist nicht parametrisch. Er verwendet ebenfalls Rangsummen. Die Teststatistik  $H$  des Kruskal-Wallis Tests vergleicht die Rangsummen  $R_i$  mit ihren Erwartungswerten  $E(R_i)$ . Sie lautet:

**Formel 2.10: Berechnung der Signifikanz von Rangsummen (Kruskal-Wallis-Test)**

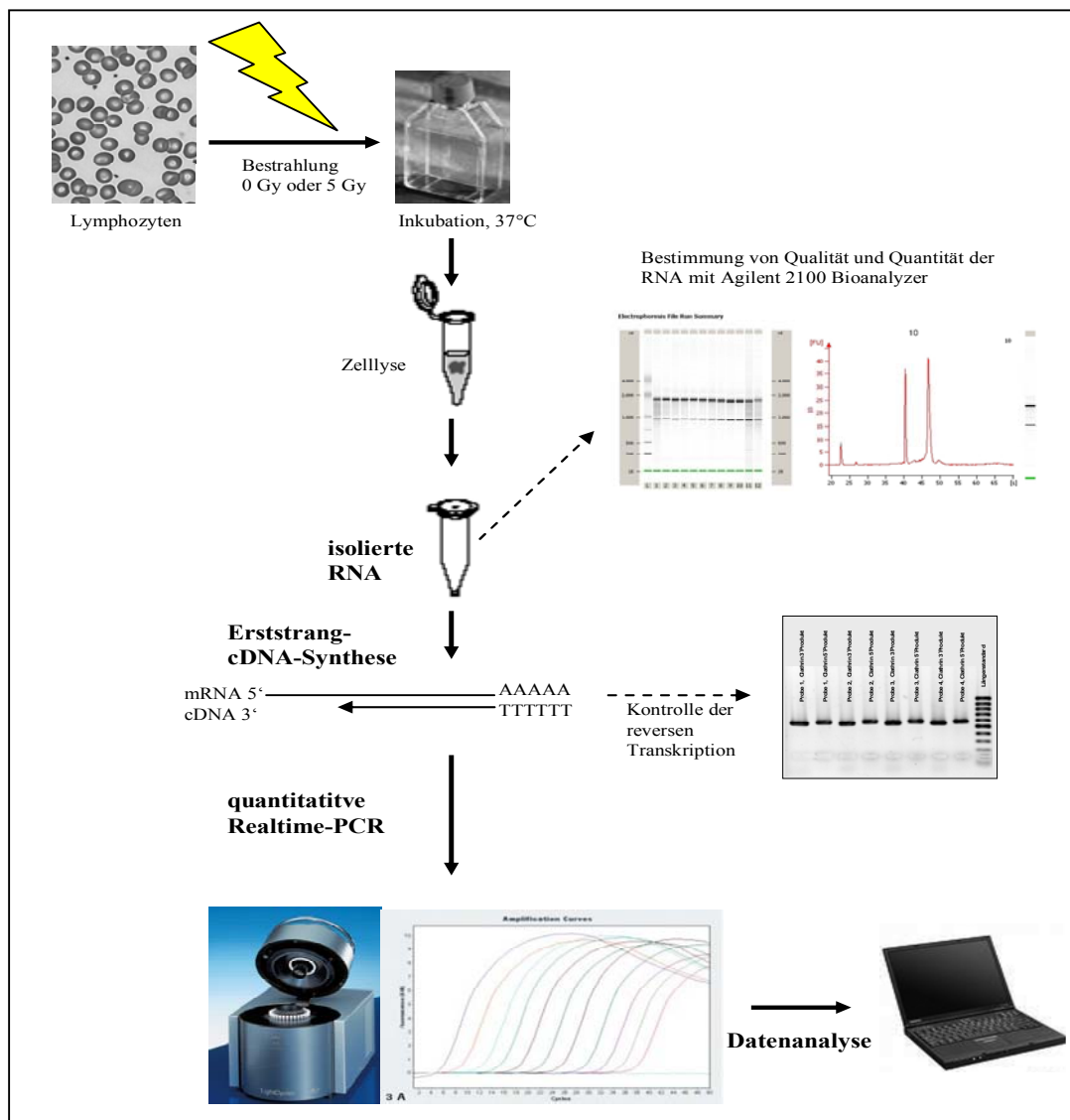
$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^I \frac{1}{n_i} \left( R_i - \frac{n_i(n+1)}{2} \right)^2$$

Für große Stichprobenumfänge ist  $H$  approximativ chiquadrat-verteilt und ein p-Wert kann anhand eines theoretischen Chiquadrat-Werts angegeben werden.



### 3 Ergebnisse

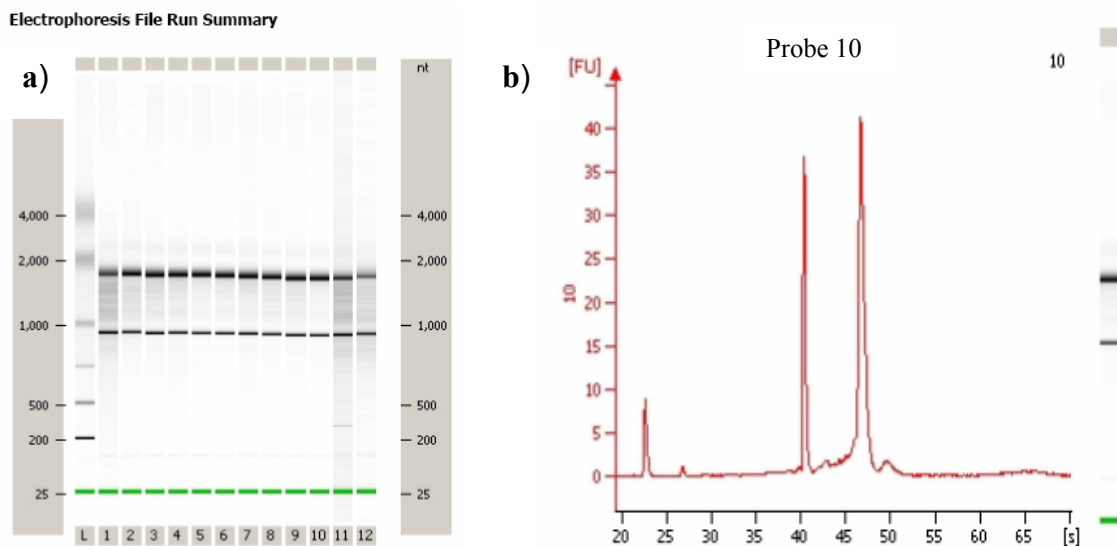
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lymphozyten von Prostatakrebspatienten auf die Induzierbarkeit der Genexpression bestimmter Gene nach Bestrahlung untersucht. Die ermittelten inter-individuellen Unterschiede wurden auf Assoziation mit verschiedenen klinischen und individuellen Parametern getestet. Der experimentelle Ablauf der Expressionsanalyse an Lymphozyten ist in Abbildung 3.1 kurz dargestellt.



**Abbildung 3.1: Durchführung der Expressionsanalyse an Lymphozyten mittels quantitativer Realtime-PCR**

### 3.1 Überprüfung der RNA-Qualität

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft. Erkennbar sind die beiden Banden für 18 S und 28 S RNA im Gel bzw. im Elektropherogramm (Abbildung 3.2 a und b). Sind beide Spezies als scharfe Peaks oder klare Banden erkennbar, gilt die RNA-Qualität als gut, wie die Proben 2-10 im gezeigten Beispiel. Auch die von der Software berechnete *RNA Integrity Number* (RIN) von 0-10 gibt Aufschluss über die Qualität der RNA. RNA-Proben, die Anzeichen von Degradation aufwiesen, wie bei Probe 11 als fragmentierte RNA im gezeigten Beispiel erkennbar (Abbildung 3.2 a), wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

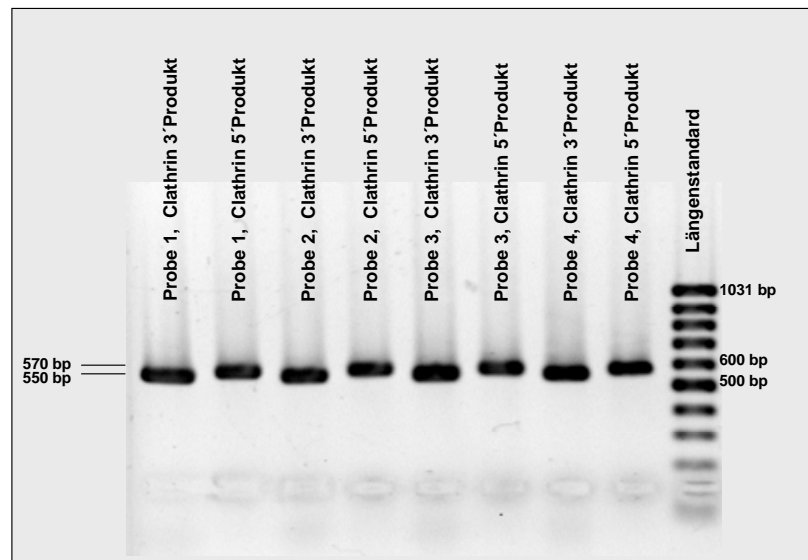


**Abbildung 3.2: RNA Quantifizierung und Qualitätsbestimmung mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer: a) Gel, b) Elektropherogramm**

Um eine vollständige Umschreibung der mRNA in Erststrang-cDNA zu gewährleisten, wurden für die weiteren Genexpressionsuntersuchungen im LightCycler nur RNAs ohne Zeichen von Degradation verwendet. Von 129 Patientenproben wurden 30 Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen, weil entweder die RNA-Menge nach der Extraktion zu gering war oder die Qualität nicht den Anforderungen entsprach. Die Geninduktion konnte daher in Lymphozyten von 99 der 129 Patienten (77 %) im LightCycler bestimmt werden.

### 3.2 Überprüfung der Qualität der Erststrang-cDNA

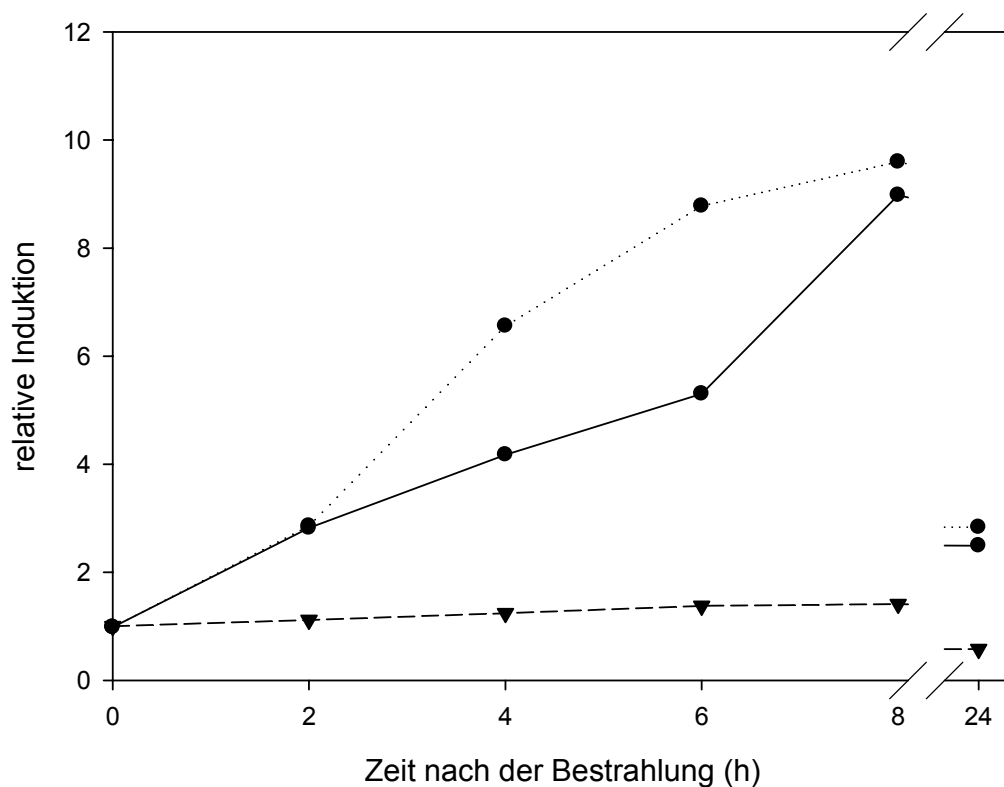
Nach der Synthese der cDNA wurden PCR-Reaktionen durchgeführt, um die Qualität und Vollständigkeit der Reversen Transkription zu überprüfen. Die Qualität der Reversen Transkription war dann zufriedenstellend, wenn die beiden Fragmente am 3'- und am 5'-Ende des Clathringens, wie im gezeigten Beispiel (Abbildung 3.3), deutlich im Gel erkennbar waren. Fehlt eines der Fragmente oder sind die Banden in ihrer Intensität deutlich unterschiedlich, kann man daraus schließen, dass die Reverse Transkription unvollständig oder nur mit geringer Effizienz abgelaufen war. In diesem Fall wurde eine neue cDNA-Synthese durchgeführt, sofern ausreichend RNA vorhanden war.



**Abbildung 3.3: Überprüfung der cDNA-Synthese. Die Abbildung zeigt die am 3'- (550 bp) und am 5'- (570 bp) Ende amplifizierte Fragmente des Clathringens aufgetrennt in einem 1,5 % Agarosegel.**

### 3.3 Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Spendern

In Vorversuchen an Lymphozyten von gesunden Blutspendern wurde die relative RNA-Menge von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA* und *TP53* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit 5 Gy quantifiziert. Ausgehend vom zeitlichen Verlauf der Geninduktion sollte der optimale Zeitpunkt für die Ernte der Zellen für die spätere Auswertung der Patientenproben festgelegt werden.



**Abbildung 3.4: Induktion der mRNA von *CDKN1A* (—●—), *PCNA* (····●····) und *TP53*(---▼---) nach Bestrahlung mit 5 Gy, gemessen nach 0, 2, 4, 6, 8 und 24 h.**

Die Induktionswerte wurden, wie im Methodenteil beschrieben, aus dem Quotienten der *Normalized Ratio* der bestrahlten und der unbestrahlten Probe bestimmt. Das *Normalized Ratio* korrigierte für Lauf-zu-Lauf-Unterschiede, Effizienzunterschiede in der PCR-Effizienz von Ziel- und Referenzgen und bezog den ermittelten Wert für das Zielgen auf das Referenzgen *ACTB*.

Schon nach 2 h waren die RNA-Mengen von *CDKN1A* und *PCNA* deutlich erhöht und stiegen zeitabhängig weiter an. Das Maximum war nach 8 h erreicht, wo für beide Gene

eine relative Induktion von 8- bis 10-fach zu beobachten war. 24 h nach der Bestrahlung befanden sich die RNA-Mengen wieder nahe dem Ausgangsniveau. Die relative RNA-Menge von *TP53* hatte sich nach der Bestrahlung nicht verändert, was zu erwarten war, da aus der Literatur bekannt ist, dass die Erhöhung der p53-Proteinmenge nach Schädigung des Genoms nicht durch eine erhöhte Transkription von *TP53* mRNA verursacht wird, sondern auf Proteinebene durch Phosphorylierung des Proteins.

Für die weiteren Versuche an Lymphozyten von Prostatakrebspatienten wurde 4 h als optimaler Zeitpunkt für die RNA-Extraktion nach der Bestrahlung festgelegt, weil zu diesem Zeitpunkt schon eine deutliche Induktion zu beobachten war, wobei sich diese Induktion noch nicht im Sättigungsbereich befand. Auch vom experimentellen Ablauf erwies sich die RNA-Extraktion nach 4 h als günstig.

### **3.4 Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen in Lymphozyten von Prostatakrebspatienten nach Bestrahlung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lymphozyten von 99 Patienten auf Induzierbarkeit bestimmter Gene nach Bestrahlung mit 5 Gy untersucht. Induktionsfaktoren für die Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *TP53*, *DDB2*, *XPC* und *GADD45A* wurden als Quotient der *Normalized Ratio* der bestrahlten Probe und der unbestrahlten Probe ausgedrückt. Alle Induktionsfaktoren sind im Anhang in Tabelle 6.2 aufgeführt. Eine Zusammenfassung der Induktionsfaktoren (Mittelwert, Minimum, Maximum und Standardabweichung) für die untersuchten Gene ist in Tabelle 3.1 aufgelistet.

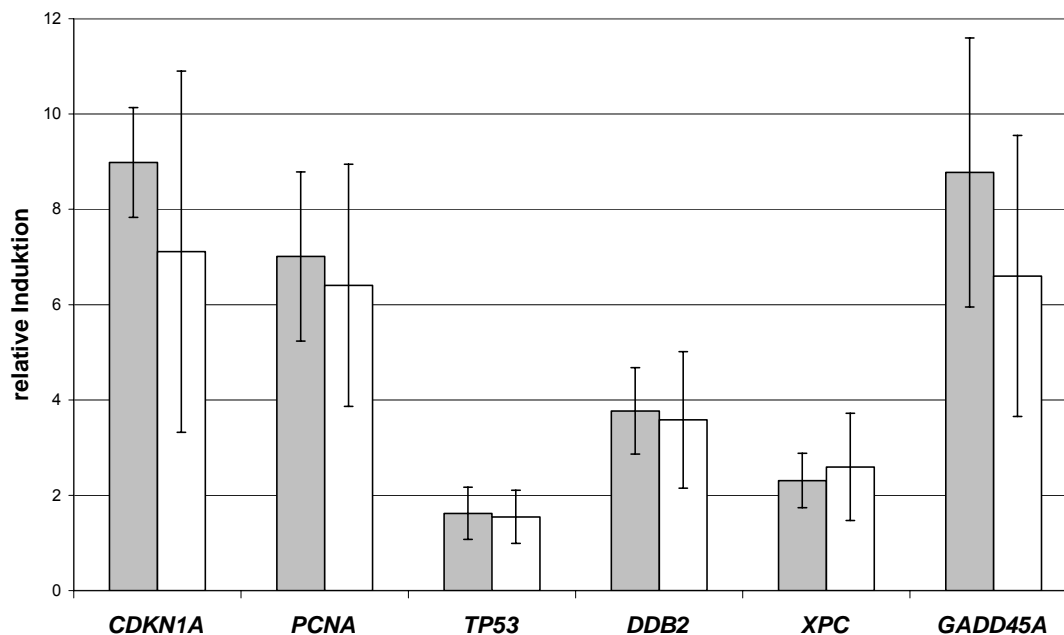
Als Kontrolle für experimentelle Schwankungen diente eine Standardprobe mit Lymphozyten eines gesunden Blutspenders. Die Standardprobe wurde in 11 unabhängigen Experimenten analog zu den Lymphozyten der Patienten behandelt, sowie die RNA extrahiert, cDNA synthetisiert und Transkriptmengen der verschiedenen Gene im LightCycler gemessen. Die Induktionsfaktoren der Standardprobe finden sich ebenfalls in Tabelle 3.1.

Eine deutliche Geninduktion nach 4 h zeigte sich für die Gene *CDKN1A*, *PCNA* und *GADD45A* mit mittleren Induktionsfaktoren von 7,1, 6,4 und 6,6. Eine mäßige Induktion war für die Gene *DDB2* und *XPC* zu beobachten mit Induktionsfaktoren von 3,6 und 2,6. Das Gen *TP53* zeigte keine Induktion 4 h nach der Bestrahlung mit einem mittleren Induktionsfaktor von 1,6.

Die Höhe der Induktion war in allen Genen für Patientenproben und Standardprobe vergleichbar (siehe Abbildung 3.5), jedoch für die Gene *CDKN1A*, *PCNA*, *TP53*, *DDB2* und

*GADD45A* in der Standardprobe etwas höher und für das Gen *XPC* etwas niedriger. Die Streuung der Werte war in den Patientenproben deutlich größer. Die Induktionsfaktoren für das Gen *CDKN1A* wiesen in den Patientenproben einen Variationskoeffizienten von 53 % auf, in der Standardprobe betrug der Variationskoeffizient nur 12,8 %. Die Schwankung der Methode wurde in der Standardprobe bestimmt und betrug in Abhängigkeit vom quantifizierten Gen zwischen 12,8 und 34 %. Die höchste Methodenschwankung ergab sich für das Gen *TP53*, das einzige Gen, welches in der Standardprobe nicht deutlich weniger streute als in den Patientenproben.

Es gab einige Patienten mit besonders hohen Induktionsfaktoren, wie am gezeigten Histogramm beispielhaft für die Induktionsfaktoren von *XPC* erkennbar (Abbildung 3.6). Für die weitere Auswertung wurden die Patienten daher in zwei Gruppen aufgeteilt: *Normale Induktion* bezeichnet den Bereich der Induktionsfaktoren für 90 % aller Patienten, während *hohe Induktion* das Decil mit der höchsten Induzierbarkeit bezeichnet.



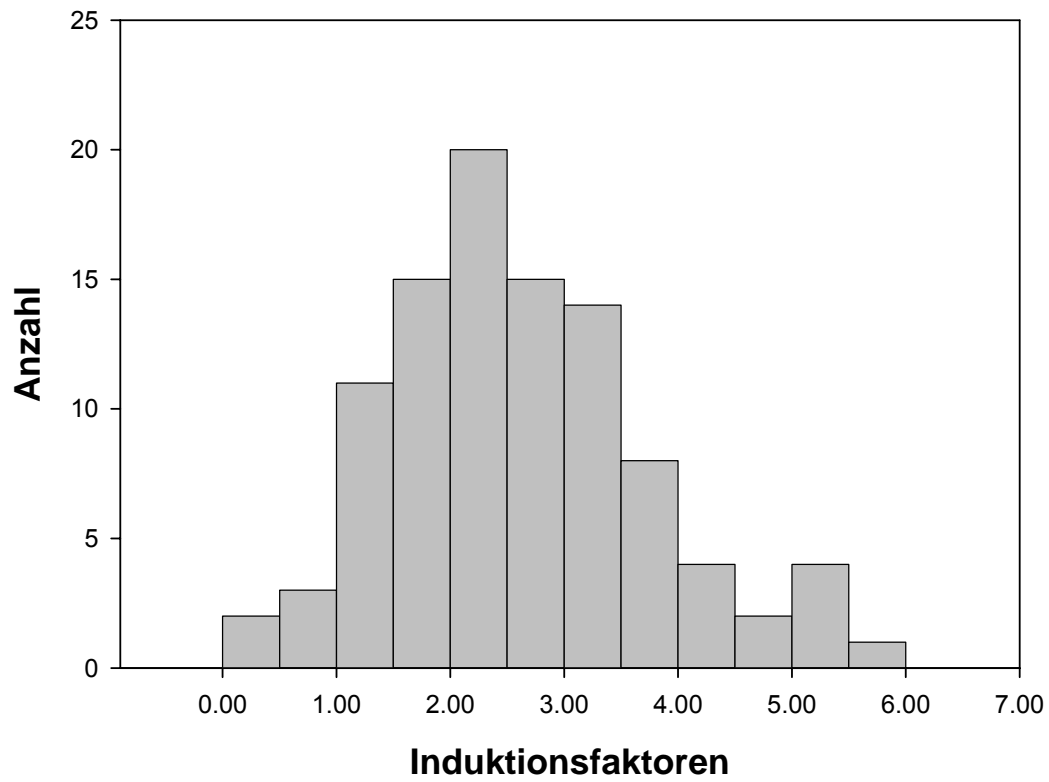
**Abbildung 3.5: Mittelwerte der Induktionsfaktoren mit Standardabweichung der Standardprobe ■ (n=11) und der Patienten □ (n=99)**

**Tabelle 3.1: Deskriptive Statistik der Geninduktionsfaktoren in Patienten und Standardprobe**

<b>Kennwerte</b>	<i>CDKN1A</i>	<i>PCNA</i>	<i>TP53</i>	<i>DDB2</i>	<i>XPC</i>	<i>GADD45a</i>
<b>Patienten (n = 99)</b>						
Mittelwert	7.11	6.40	1.55	3.58	2.59	6.60
Minimum	0.38	1.66	0.21	0.11	0.29	1.38
Maximum	21.2	13.99	3.59	7.52	5.77	18.24
Standardabweichung	3.79	2.54	0.56	1.43	1.12	2.95
Variations- koeffizient (%)	53.27	39.66	36.02	40.01	43.37	44.69
<b>normale Induktion*</b>	0.38- 11.98	1.66- 10.34	0.21- 2.24	0.11- 5.78	0.29- 4.10	1.38- 10.71
<b>(≤ 90%), n=89</b>						
<b>hohe Induktion**</b>	12.0- 21.20	10.4- 13.99	2.25- 3.59	5.79- 7.52	4.14- 5.77	10.72- 18.24
<b>(&gt;90 %), n=9</b>						
<b>Standardprobe (n = 11)</b>						
Mittelwert	8.98	7.01	1.62	3.77	2.31	8.77
Standardabweichung	1.15	1.78	0.55	0.91	0.57	2.82
Variations- koeffizient (%)	12.81	25.34	33.97	24.09	24.63	32.18

\*normale Induktion: Bereich der Induktionsfaktoren für 90 % der Patienten

\*\*hohe Induktion: Bereich der Induktionsfaktoren für die 10 % der Patienten mit der höchsten Induzierbarkeit



**Abbildung 3.6: Verteilung der Induktionsfaktoren von XPC in 12 Klassen**

### 3.4.1 Bestimmung der akuten klinischen Strahlenempfindlichkeit der Prostatakrebspatienten und ihre Abhängigkeit von ausgewählten anthropometrischen und klinischen Merkmalen

Die Patienten wurden während ihrer Strahlenbehandlung auf akute Strahlenreaktionen hin untersucht, die anschließend zu einer Gesamtbewertung nach *CTC* (*Common Toxicity Criteria*) zusammengefasst wurden. Die Verteilung der abschließenden Bewertungen zur klinischen Radiosensitivität für das untersuchte Patientenkollektiv ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Nur drei Patienten zeigten während der gesamten Therapiezeit keine Anzeichen von Nebenwirkungen durch die Strahlentherapie (*CTC-Wert: 0*). Den Hauptanteil bildeten Patienten mit geringen (*CTC-Wert: 1*) bzw. mäßigen (*CTC-Wert: 2*) Nebenwirkungen. Der Schweregrad der Nebenwirkungen in dieser Patientengruppe (*CTC-Wert: 0-2*) bewegt sich in einem Rahmen, den man als „normale Strahlenreaktion“ bezeichnen kann. Die Beschwerden können in der Regel ambulant behandelt werden und erfordern keine wesentliche Verzögerung oder Dosismodifikation in der Therapie. Diese Patienten wurden für die weiteren Untersuchungen zur Gruppe der *klinisch normalempfindlichen* Patienten zusammengefasst (n = 68). Starke Nebenwirkungen (*CTC-Wert: 3*) zeigten dagegen 27 Patienten, bei 4 Patienten waren die Strahlenreaktionen sogar lebensbedrohend (*CTC-Wert: 4*). Diese Patienten benötigten teilweise intensive therapeutische Maßnahmen und die Strahlenbehandlung musste unterbrochen werden. Bei den Patienten dieser Gruppe kann man von einer Hypersensibilität gegenüber IR sprechen. Diese Patientengruppe wurde zur Gruppe der *klinisch strahlenüberempfindlichen* Patienten zusammengefasst und machte ca. ein Drittel des Kollektivs aus (n = 31).

**Tabelle 3.2: Verteilung der akuten klinischen Strahlenempfindlichkeit im Patientenkollektiv (nach *CTC*\*)**

Klinische Empfindlichkeit ( <i>CTC</i> -Wertung*)	Patienten (n=99)		
	n	%	
0	3	3	} n = 68
1	36	36	
2	29	29	
3	27	27	} n = 31
4	4	4	

\**CTC: Common Toxicity Criteria* (Seegenschmiedt 1998)

In der gesamten Patientengruppe der Studie (n = 250) wurden 41 Patienten als klinisch strahlenüberempfindlich und 209 als klinisch normalempfindlich eingestuft, somit waren 16 % der Studienteilnehmer klinisch strahlenüberempfindlich.

Bis 2004, dem Beginn dieser Untersuchungen, wurden 40 klinisch strahlenüberempfindliche Patienten identifiziert und dazu passend 89 klinisch normalempfindliche Patienten für die Messung der Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen ausgewählt; die klinisch strahlenüberempfindlichen Patienten wurden in dieser Pilotstudie also angereichert und stellten 31 % der Gruppe dar. Der Verlust von insgesamt 30 Patientenproben durch mangelnde RNA-Ausbeute und Qualität betraf beide Gruppen (normalempfindliche und strahlenüberempfindliche Patienten) gleichermaßen, so dass auch die zur weiteren Auswertung verwendete Gruppe 31 % strahlenüberempfindliche Patienten enthielt.

Vom Kooperationspartner (*Arbeitsgruppe für Genetische Epidemiologie*, Leiterin: Prof. J. Chang-Claude, DKFZ Heidelberg) wurde mit statistischen Methoden der Einfluss von anthropometrischen Merkmalen und Lebensstilfaktoren auf die akute Strahlenempfindlichkeit der Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass die wichtigsten anthropometrischen Merkmale Alter, Größe, Gewicht, *Body-Mass-Index*, Haarfarbe und Hauttyp keinen erkennbaren Einfluss auf die klinische Strahlenempfindlichkeit hatten. Ebenso wurde die Strahlenempfindlichkeit der Patienten nicht vom Alkoholkonsum und vom Familienstand beeinflusst (Tabelle 3.3).

Umfangreiche Informationen über das Rauchverhalten (niemals oder jemals geraucht, in den letzten 20 Jahren geraucht oder nicht geraucht) sowie den kumulativen Tabakkonsum (Anzahl der Pack-years, wobei ein Pack-year definiert ist als 20 gerauchte Zigaretten täglich für ein Jahr) ermöglichte die Auswertung mit verschiedenen Rauchparametern (siehe Tabelle 3.3). Patienten, die nie oder nur wenig rauchten, waren eher strahlenüberempfindlich als Patienten, die stärker rauchten. Nach Klassifizierung mit dem Parameter *Pack-years*, *Median* befanden sich 62 % aller überempfindlichen, jedoch nur 41 % aller normalempfindlichen Patienten in der Gruppe mit geringen Pack-years (0-5). Die Unterschiede im Rauchverhalten waren jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,06$ ) (siehe Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3: Allgemeine Beschreibung der untersuchten Patientengruppe**

Merkmale	Klinische Strahlenempfindlichkeit		p-Wert $\chi^2$ -Test
	normalempfindlich n = 68 (%)	überempfindlich n = 31 (%)	
<b>Alter (Jahre)</b>			
Mittelwert $\pm$ SD	66.5 $\pm$ 7.8	67.3 $\pm$ 6.9	
Bereich	48-79	50-79	
<b>Altersgruppen (Jahre)</b>			
< 60	13 (19)	3 (10)	
60-64	10 (15)	7 (23)	
65-69	17 (25)	10 (32)	
70-74	18 (27)	7 (23)	
$\geq$ 75	10 (15)	4 (13)	0.64*
<b>Rauchverhalten</b>			
Nie geraucht	25 (37)	17 (55)	
Jemals geraucht	43 (63)	14 (45)	0.09
<b>Tabakkonsum (Pack-years)<sup>#</sup></b>			
<b>Gruppen</b>			
0	25 (37)	17 (55)	
1-19	20 (29)	4 (13)	
$\geq$ 20	18 (27)	8 (26)	0.13*
<b>dichtomisiert bzgl. Median</b>			
0-5	26 (41)	18 (62)	
$\geq$ 6	37 (59)	11 (38)	0.06
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>			
Normalgewicht (< 25)	18 (27)	8 (26)	
Übergewicht (25-29.9)	37 (54)	17 (55)	
Starkes Übergewicht ( $\geq$ 30)	13 (19)	6 (19)	1.00
<b>Alkoholkonsum</b>			
nie Alkohol getrunken	20 (29)	12 (39)	
jemals Alkohol getrunken	48 (71)	19 (61)	0.36
<b>Alkoholmenge (g/Tag)</b>			
0	20 (29)	12 (39)	
1-12	24 (35)	8 (26)	
13-24	16 (24)	6 (19)	
> 25	8 (12)	5 (16)	0.65
<b>Familienstand</b>			
alleinstehend	9 (13)	1 (3)	
verheiratet	59 (87)	30 (97)	0.17*

\*Fishers exakter Test; <sup>#</sup> Es fehlen Daten von 7 Patienten

Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit und verschiedenen klinischen Charakteristika der Erkrankung wie dem Malignitätsgrad und der Ausbreitung des Tumors (Grading und Staging) sowie Unterschieden in der Behandlung (vorangegangene Prostatektomie, adjuvante Hormontherapie) hergestellt werden (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4: Klinische Charakteristika: Tumormerkmale und Tumor-bezogene Therapie vor der Strahlentherapie**

Klinische Charakteristika	Klinische Strahlenempfindlichkeit		p-Wert $\chi^2$ -Test
	normalempfindlich n = 68 (%)	überempfindlich n = 31 (%)	
<b>Tumorstadium: Grösse</b>			
T1	11 (16)	8 (26)	0.53
T2	34 (50)	14 (45)	
T3	23 (34)	9 (29)	
<b>Tumorstadium: Lymphknoten</b>			
N0	62 (91)	27 (87)	0.52
N1	4 (6)	2 (6.5)	
N2	1 (1.5)	0 (0)	
Nx	1 (1.5)	2 (6.5)	
<b>Tumorstadium: Metastasen</b>			
M0	63 (93)	27 (87)	0.46*
MX	5 (7)	4 (13)	
<b>Chemotherapie<sup>+</sup></b>			
nein	67 (100)	30 (97)	0.32*
ja	0 (0)	1 (3)	
<b>Prostatektomie</b>			
nein	39 (57)	22 (71)	0.2
ja	29 (43)	9 (29)	
<b>Hormontherapie</b>			
nein	41 (60)	22 (71)	0.31
ja	27 (40)	9 (29)	

\* Fishers exakter Test; <sup>+</sup>Es fehlen die Daten eines Patienten.

Für die weitere Auswertung wurden die Patienten in 2 Gruppen aufgeteilt: Die Gruppe mit hohen Induktionsfaktoren (>90-100 %) enthielt 10 % der Patienten, die Gruppe mit normalen Induktionsfaktoren (0-90 %) enthielt 90 % der Patienten. Diese beiden Gruppen wurden mit der klinischen Strahlenüberempfindlichkeit sowie vielen anderen Parametern verglichen.

Die Induktionsfaktoren der untersuchten Gene, aufgeteilt in die beiden Gruppen (0-90 % und > 90 %) im Vergleich mit verschiedenen Parametern wie klinischer und zellulärer Strahlenempfindlichkeit, Alter, BMI und Rauchgewohnheiten sind in Tabelle 3.5, Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 aufgeführt. Die Induktionsfaktoren von *CDKN1A*, *PCNA*, *TP53*, *DDB2* und *GADD45A* zeigten keinen Einfluss auf die klinische Strahlenempfindlichkeit.

Für die klinische Strahlenempfindlichkeit ergab sich eine positive Assoziation nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0,07$ ) mit den *XPC*-Induktionsfaktoren. Patienten mit hohen *XPC*-Induktionsfaktoren tendierten eher dazu, klinisch strahlenüberempfindlich zu sein (Tabelle 3.6). Das Risiko für Strahlenüberempfindlichkeit war in der Gruppe mit hohen *XPC*-Induktionsfaktoren etwa 4-fach erhöht (Odds-Ratio 3,8; Konfidenzintervall 0,99-14,4;  $p = 0,05$ ). Außerdem waren die *XPC*-Induktionsfaktoren in allen untersuchten Rauchparametern mit dem Rauchen statistisch signifikant korreliert (Tabelle 3.6). In der Gruppe mit hoher *XPC*-Induktion befanden sich mehr Raucher (70 % rauchten in den letzten 20 Jahren) als ehemalige Raucher (20 %) oder Nichtraucher (10 %) ( $p = 0,006$ ) als in der Gruppe mit normaler Induktion (23 % Raucher, 28 % ehemalige Raucher und 49 % Nichtraucher). 89 % aller Patienten mit hohen, aber nur 48 % aller Patienten mit niedrigen *XPC*-Induktionsfaktoren waren stärkere Raucher (6 Pack-years oder mehr) ( $p = 0,03$ ) (siehe Tabelle 3.6).

Da das Rauchverhalten einen starken Effekt auf die *XPC*-Induktion hatte, wurde ein logistisches Regressionsmodell verwendet, um so die Assoziation der *XPC*-Induktion und der Strahlenüberempfindlichkeit für Tabakkonsum zu adjustieren. Nach dem Adjustieren ergab sich ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für klinische Strahlenüberempfindlichkeit in den Patienten mit hohen *XPC*-Induktionsfaktoren (Odds-Ratio: 5,3;  $p = 0,03$ ; Konfidenzintervall: 1,25-24,5). Dieses Modell wurde auch zur Berechnung des Risikos für klinische Strahlenüberempfindlichkeit in Zusammenhang mit der Induktion der anderen bestimmten Gene herangezogen; es konnte jedoch kein Unterschied zu den nicht-adjustierten Werten festgestellt werden.

Eine weitere Assoziation ergab sich für das Alter der Patienten und die Induktionsfaktoren des Gens *CDKN1A* (Tabelle 3.5). Die Patienten mit hohen *CDKN1A*-Induktionsfaktoren waren meist älter als der Median ( $p = 0,007$ ).

Die Auswertung nach Einteilung der Patientengruppe in Terzile ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 6.3 und Tabelle 6.4). Es wurde ein Zusammenhang zwischen der *PCNA*-Induktion und dem *Body-Mass-Index* gefunden, sowie eine Assoziation von Rauchverhalten und *XPC*- und *DDB2*-Induktion.

**Tabelle 3.5: Assoziation der Geninduktion von *CDKN1A* und *PCNA*, aufgeteilt nach Höhe des Induktionsfaktors, mit ausgewählten Charakteristika**

	<i>CDKN1A</i> -Induktionsfaktoren			<i>PCNA</i> -Induktionsfaktoren		
	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test
<b>Klinische Strahlenempfindlichkeit</b>						
normalempfindlich (CTC 0-2)	62 (70)	6 (60)	0.7	63 (71)	5 (50)	0.2
überempfindlich (CTC 3+4)	27 (30)	4 (40)		26 (29)	5 (50)	
<b>Alter</b>						
≤ Median	50 (56)	1 (10)	0.007	47 (53)	4 (40)	0.5
> Median	39 (44)	9 (90)		42 (47)	6 (60)	
<b>BMI</b>						
-25	10 (11)	1 (10)	0.9	8 (9)	3 (30)	1.0
25-29	54 (61)	7 (70)		56 (63)	5 (50)	
>29	25 (28)	2 (20)		25 (28)	2 (20)	
<b>Rauchverhalten</b>						
nie	37 (42)	5 (50)	0.6	40 (45)	2 (20)	0.2
jemals	52 (58)	5 (50)		49 (55)	8 (80)	
in letzten 20 Jahren nicht geraucht*	59 (71)	8 (80)	0.7	60 (72)	7 (70)	1.0
in letzten 20 Jahren geraucht	24 (29)	2 (20)		23 (28)	3 (30)	
nie*	37 (45)	5 (50)	0.8	40 (48)	2 (20)	0.1
in letzten 20 Jahren nicht geraucht	22 (27)	3 (30)		20 (24)	5 (50)	
in letzten 20 Jahren geraucht	24 (29)	2 (20)		23 (28)	3 (30)	
<b>Tabakkonsum (Pack-years)<sup>#</sup> Gruppen</b>						
0	37 (45)	5 (50)	0.8	40 (48)	2 (22)	0.3
1-19	21 (26)	3 (30)		20 (24)	4 (44)	
≥ 20	24 (29)	2 (20)		23 (28)	3 (33)	
<b>dichotomisiert bzgl. Median</b>						
0-5	39 (48)	5 50	1.0	42 (51)	2 (22)	0.2
≥ 6	43 (52)	5 50		41 (49)	7 (78)	

\*Es fehlen Daten von 6 Patienten. <sup>#</sup>Es fehlen Daten von 7 Patienten.

**Tabelle 3.6 : Assoziation der Geninduktion von *TP53* und *XPC*, aufgeteilt nach Höhe des Induktionsfaktors, mit ausgewählten Charakteristika**

	<i>TP53</i> -Induktionsfaktoren			<i>XPC</i> -Induktionsfaktoren		
	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test
<b>Klinische</b>						
<b>Strahlenempfindlichkeit</b>						
normalempfindlich (CTC 0-2)	63 (71)	5 (50)	0.2	64 (72)	4 (40)	0.07
überempfindlich (CTC 3+4)	26 (29)	5 (50)		25 (28)	6 (60)	
<b>Alter</b>						
<= Median	47 (53)	6 (60)	0.5	48 (54)	3 (30)	0.2
> Median	42 (47)	4 (40)		41 (46)	7 (70)	
<b>BMI</b>						
<25	9 (10)	2 (20)	0.3	11 (12)	0 (0)	0.6
25-29	54 (61)	7 (70)		53 (60)	8 (80)	
>29	26 (29)	1 (10)		25 (28)	2 (20)	
<b>Rauchverhalten</b>						
nie	37 (42)	5 (50)	0.7	41 (46)	1 (10)	0.04
jemals	52 (58)	5 (50)		48 (54)	9 (90)	
in letzten 20 Jahren nicht geraucht*	61 (73)	6 (67)	0.7	64 (77)	3 (30)	0.004
in letzten 20 Jahren geraucht	23 (27)	3 (23)		19 (23)	7 (70)	
nie*	37 (44)	5 (56)	0.7	41 (49)	1 (10)	0.006
in letzten 20 Jahren nicht geraucht	24 (29)	1 (11)		23 (28)	2 (20)	
in letzten 20 Jahren geraucht	23 (27)	3 (33)		19 (23)	7 (70)	
<b>Tabakkonsum (Pack-years)<sup>#</sup></b>						
<b>Gruppen</b>						
0	37 (45)	5 (56)	0.7	41 (49)	1 (11)	0.049
1-19	23 (28)	1 (11)		21 (25)	3 (33)	
≥ 20	23 (28)	3 (33)		21 (25)	5 (56)	
<b>dichotomisiert bzgl. Median</b>						
0-5	39 (47)	5 (56)	0.7	43 (52)	1 (11)	0.03
≥ 6	44 (43)	4 (44)		40 (48)	8 (89)	

\*Es fehlen Daten von 6 Patienten. <sup>#</sup>Es fehlen Daten von 7 Patienten.

**Tabelle 3.7: Assoziation der Geninduktion von *DDB2* und *GADD45A*, aufgeteilt nach Höhe des Induktionsfaktors, mit ausgewählten Charakteristika**

	<i>DDB2</i> -Induktionsfaktoren			<i>GADD45A</i> -Induktionsfaktoren		
	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test
<b>Klinische</b>						
<b>Strahlenempfindlichkeit</b>						
normalempfindlich (CTC 0-2)	63 (71)	5 (50)	0.2	62 (70)	6 (60)	0.7
überempfindlich (CTC 3+4)	26 (29)	5 (50)		27 (30)	4 (40)	
<b>Alter</b>						
<= Median	45 (51)	6 (60)	0.7	44 (49)	7 (70)	0.3
> Median	44 (49)	4 (40)		45 (51)	3 (30)	
<b>BMI</b>						
<25	10 (11)	1 (10)	1.0	10 (11)	1 (10)	1.0
25-29	55 (62)	6 (60)		55 (62)	6 (60)	
>29	24 (27)	3 (30)		24 (27)	3 (30)	
<b>Rauchverhalten</b>						
nie	38 (43)	4 (40)	1.0	35 (39)	7 (70)	0.09
jemals	51 (57)	6 (60)		54 (61)	3 (30)	
in letzten 20 Jahren nicht geraucht*	61 (73)	6 (67)	0.7	59 (70)	8 (89)	0.4
in letzten 20 Jahren geraucht	23 (27)	3 (33)		25 (30)	1 (11)	
nie*	38 (45)	4 (44)	1.0	35 (42)	7 (78)	0.2
in letzten 20 Jahren nicht geraucht	23 (27)	2 (22)		24 (29)	1 (11)	
in letzten 20 Jahren geraucht	23 (27)	3 (33)		25 (30)	1 (11)	
<b>Tabakkonsum (Pack-years)<sup>#</sup></b>						
<b>Gruppen</b>						
0	38 (45)	4 (50)	1.0	35 (42)	7 (78)	0.07
1-19	22 (26)	2 (25)		22 (27)	2 (22)	
≥ 20	24 (29)	2 (25)		26 (31)	0 (0)	
<b>dichotomisiert bzgl. Median</b>						
0-5	40 (48)	4 (50)	1.0	37 (45)	7 (78)	0.08
≥ 6	44 (52)	4 (50)		46 (55)	2 (22)	

\*Es fehlen Daten von 6 Patienten. <sup>#</sup>Es fehlen Daten von 7 Patienten.

### 3.4.2 Assoziation der Induktionsfaktoren mit dem Antioxidantienspiegel

Da die Ernährung, insbesondere die Aufnahme von antioxidativen Vitaminen, einen Einfluss auf die Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen nach IR haben kann, wurden 9 Vitamine im Plasma von unserem Kooperationspartner gemessen (PD Dr. J. Linseisen, DKFZ, Heidelberg). Aus der Gruppe der Karotinoide wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ - Carotin, Canthaxanthin, Cryptoxanthin, Lutein und Lycopin bestimmt, Desweiteren  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol sowie Ascorbinsäure. Die Induktionsfaktoren der untersuchten Gene wurden mit dem Antioxidantienstatus verglichen (Tabelle 3.8, Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10). Dabei zeigte sich, dass Patienten mit hohen *CDKN1A*-Induktionsfaktoren meist einen niedrigen  $\beta$ -Carotinspiegel hatten ( $p = 0,02$ ). Außerdem war in Patienten mit hohen *PCNA*-Induktionsfaktoren der Canthaxanthin- und Cryptoxanthinspiegel erniedrigt ( $p = 0,04$  und  $p = 0,03$ ). Im Rahmen der geringen Schwankungen der Induktionsfaktoren von *TP53* zeigte sich, dass relativ hohe Induktionsfaktoren mit einem hohen Canthaxanthin- und hohem Cryptoxanthinspiegel einhergehen ( $p = 0,04$ ). Keine Assoziation wurde für die Induktionsfaktoren der Gene *XPC*, *DDB2* und *GADD45A* mit dem Antioxidantienspiegel beobachtet.

Die Auswertung nach Einteilung der Patientengruppe in Terzile ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 6.3 und Tabelle 6.4).

**Tabelle 3.8: Assoziation der Geninduktion von *CDKN1A* und *PCNA* mit dem Antioxidantienstatus**

	<i>CDKN1A</i> -Induktionsfaktoren			<i>PCNA</i> -Induktionsfaktoren		
	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test
<b>Ascorbinsäure</b>						
<= Median	47 (53)	5 (50)	1.0	47 (53)	5 (50)	1.0
> Median	42 (47)	5 (50)		42 (47)	5 (50)	
<b><math>\alpha</math>-Carotin*</b>						
<= Median	41 (49)	8 (80)	0.09	42 (49)	7 (78)	0.16
> Median	43 (51)	2 (20)		43 (51)	2 (22)	
<b><math>\beta</math>-Carotin*</b>						
<= Median	41 (49)	9 (90)	0.02	44 (52)	6 (67)	0.5
> Median	43 (51)	1 (10)		41 (48)	3 (33)	
<b>Canthaxanthin*</b>						
<= Median	48 (57)	3 (30)	0.2	43 (51)	8 (89)	0.04
> Median	36 (43)	7 (70)		42 (49)	1 (11)	
<b>Cryptoxanthin*</b>						
<= Median	44 (52)	6 (60)	0.7	42 (49)	8 (89)	0.03
> Median	40 (48)	4 (40)		43 (51)	1 (11)	
<b>Lutein*</b>						
<= Median	44 (52)	7 (70)	0.3	44 (52)	7 (78)	0.2
> Median	40 (48)	3 (30)		41 (48)	2 (22)	
<b>Lycopin*</b>						
<= Median	40 (48)	8 (80)	0.09	42 (49)	6 (67)	0.5
> Median	44 (52)	2 (20)		43 (51)	3 (33)	
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>						
<= Median	44 (52)	8 (80)	0.2	46 (54)	6 (67)	0.7
> Median	40 (48)	2 (20)		39 (46)	3 (33)	
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol*</b>						
<= Median	43 (51)	5 (50)	0.9	42 (49)	6 67	0.5
> Median	41 (49)	5 (50)		43 (51)	3 33	

\*Es fehlen Daten von 5 Patienten.

**Tabelle 3.9: Assoziation der Geninduktion von *TP53* und *XPC* mit dem Antioxidantienstatus**

	<i>TP53</i> -Induktionsfaktoren			<i>XPC</i> -Induktionsfaktoren		
	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test
<b>Ascorbinsäure</b>						
<= Median	46 (52)	6 (60)		46 (52)	6 (60)	
> Median	43 (48)	4 (40)	0.7	43 (48)	4 (40)	0.7
<b><math>\alpha</math>-Carotin*</b>						
<= Median	44 (52)	5 (50)		41 (49)	8 (80)	
> Median	40 (48)	5 (50)	0.9	43 (51)	2 (20)	0.09
<b><math>\beta</math>-Carotin*</b>						
<= Median	45 (54)	5 (50)		43 (51)	7 (70)	
> Median	39 (46)	5 (50)	1.0	41 (49)	3 (30)	0.3
<b>Canthaxanthin*</b>						
<= Median	49 (58)	2 (20)		44 (52)	7 (70)	
> Median	35 (42)	8 (80)	0.04	40 (48)	3 (30)	0.3
<b>Cryptoxanthin*</b>						
<= Median	48 (57)	2 (20)		43 (51)	7 (70)	
> Median	36 (43)	8 (80)	0.04	41 (49)	3 (30)	0.3
<b>Lutein*</b>						
<= Median	46 (55)	5 (50)		45 (54)	6 (60)	
> Median	38 (45)	5 (50)	0.8	39 (46)	4 (40)	0.7
<b>Lycopin*</b>						
<= Median	43 (51)	5 (50)		40 (48)	8 (80)	
> Median	41 (49)	5 (50)	1.0	44 (52)	2 (20)	0.09
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol*</b>						
<= Median	46 (55)	6 (60)		46 (55)	6 (60)	
> Median	38 (45)	4 (40)	1.0	38 (45)	4 (40)	1.0
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol*</b>						
<= Median	44 (52)	4 (40)		40 (48)	8 (80)	
> Median	40 (48)	6 (60)	0.5	44 (52)	2 (20)	0.09

\*Es fehlen Daten von 5 Patienten.

**Tabelle 3.10: Assoziation der Geninduktion von *DDB2* und *GADD45A* mit dem Antioxidantienstatus**

	<i>DDB2</i> -Induktionsfaktoren			<i>GADD45A</i> -Induktionsfaktoren		
	normal (0-90%) n (%)	hoch (> 90%) n (%)	p-Wert Fishers Test	normal (0-90%) n (%)	normal (0-90%) n (%)	p-Wert Fishers Test
<b>Ascorbinsäure</b>						
<= Median	46 (52)	6 (60)	0.7	45 (51)	7 (70)	0.3
> Median	43 (48)	4 (40)		44 (49)	3 (30)	
<b><math>\alpha</math>-Carotin*</b>						
<= Median	43 (51)	6 (60)	0.7	44 (52)	5 (50)	0.9
> Median	41 (49)	4 (40)		40 (48)	5 (50)	
<b><math>\beta</math>-Carotin*</b>						
<= Median	44 (52)	6 (60)	0.7	43 (51)	7 (70)	0.3
> Median	40 (48)	4 (40)		41 (49)	3 (30)	
<b>Canthaxanthin*</b>						
<= Median	43 (51)	8 (80)	0.1	47 (56)	4 (40)	0.5
> Median	41 (49)	2 (20)		37 (44)	6 (60)	
<b>Cryptoxanthin*</b>						
<= Median	43 (51)	7 (70)	0.3	45 (54)	5 (50)	0.8
> Median	41 (49)	3 (30)		39 (46)	5 (50)	
<b>Lutein*</b>						
<= Median	45 (54)	6 (60)	0.7	47 (56)	4 (40)	0.5
> Median	39 (46)	4 (40)		37 (44)	6 (60)	
<b>Lycopin*</b>						
<= Median	41 (49)	7 (70)	0.3	43 (51)	5 (50)	1.0
> Median	43 (51)	3 (30)		41 (49)	5 (50)	
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol*</b>						
<= Median	44 (52)	8 (80)	0.2	46 (55)	6 (60)	1.0
> Median	40 (48)	2 (20)		38 (45)	4 (40)	
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol*</b>						
<= Median	44 (52)	4 (40)	0.5	44 (52)	4 (40)	0.5
> Median	40 (48)	6 (60)		40 (48)	6 (60)	

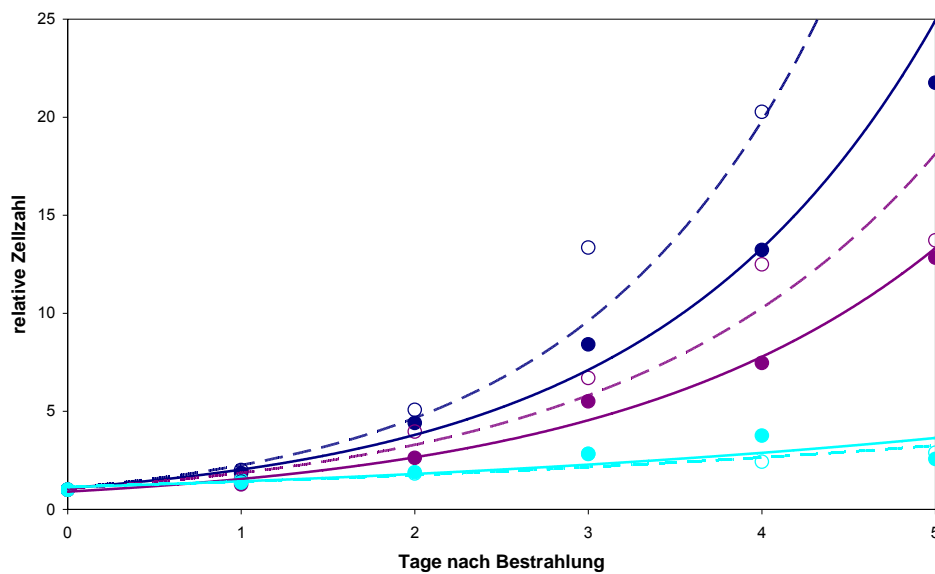
\*Es fehlen Daten von 5 Patienten.

### 3.5 Untersuchungen an zur Bedeutung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) an p21-defizienten und p21-kompetenten HCT116-Zellen

#### 3.5.1 Untersuchung der zellulären Strahlenempfindlichkeit

##### 3.5.1.1 Wachstum nach $\gamma$ -Bestrahlung

Die p21-defizienten und p21-kompetenten Zelllinien wurden mit 2 und 5 Gy bestrahlt und ihr Wachstum über mehrere Tage beobachtet. Aus der Analyse der Zellzahlen ergab sich ein verzögertes Wachstum der bestrahlten Zellen gegenüber unbestrahlten Zellen, wobei die Wachstumsrepression mit steigender Dosis zunahm (siehe Abbildung 3.7). Die p21-defizienten Zellen zeigten bereits ohne Bestrahlung eine etwas geringere Wachstumsrate als die p21-kompetenten Zellen. Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen festgestellt werden. Die Generationszeiten der Zelllinien nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen sind in Tabelle 3.11 dargestellt.



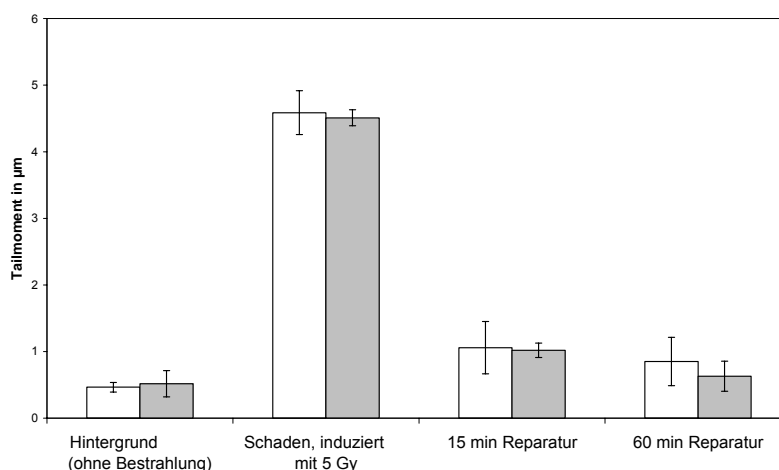
**Abbildung 3.7: Wachstumskurven von p21<sup>-/-</sup> und p21<sup>+/+</sup> Zellen nach Bestrahlung mit 0, 2 und 5 Gy: ● und \_\_\_ p21<sup>-/-</sup> Zellen, ○ und ---- p21<sup>+/+</sup> Zellen, 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy**

**Tabelle 3.11: Veränderung der Generationszeiten von p21<sup>-/-</sup> und p21<sup>+/+</sup> HCT116-Zellen nach Bestrahlung**

Dosis	Generationszeit der Zelllinien in Tagen	
	p21 <sup>-/-</sup>	p21 <sup>+/+</sup>
0 Gy	1.1	1.0
2 Gy	1.4	1.3
5 Gy	3.7	3.3

### 3.5.1.2 Bestimmung von strahleninduzierten DNA-Schäden sowie deren Reparatur

Der induzierte DNA-Schaden nach  $\gamma$ -Bestrahlung mit 5 Gy sowie die Fähigkeit der Zellen zur Reparatur wurden mit dem *Comet Assay* in p21-defizienten und p21-kompetenten HCT116-Zellen bestimmt. Die verbliebenen DNA-Schäden wurden nach einer Reparaturzeit von 15 und 60 Minuten gemessen. Die Auswertung der Daten wies auf keinerlei Unterschiede im Hintergrundschaden, im induzierten DNA-Schaden sowie in der Reparatur zwischen beiden Zelllinien hin (siehe Abbildung 3.8). Die p21-defizienten Zellen reparierten in der verwendeten Untersuchungsmethode die DNA-Schäden im selben Umfang und mit der gleichen Geschwindigkeit wie die p21-kompetenten Zellen.



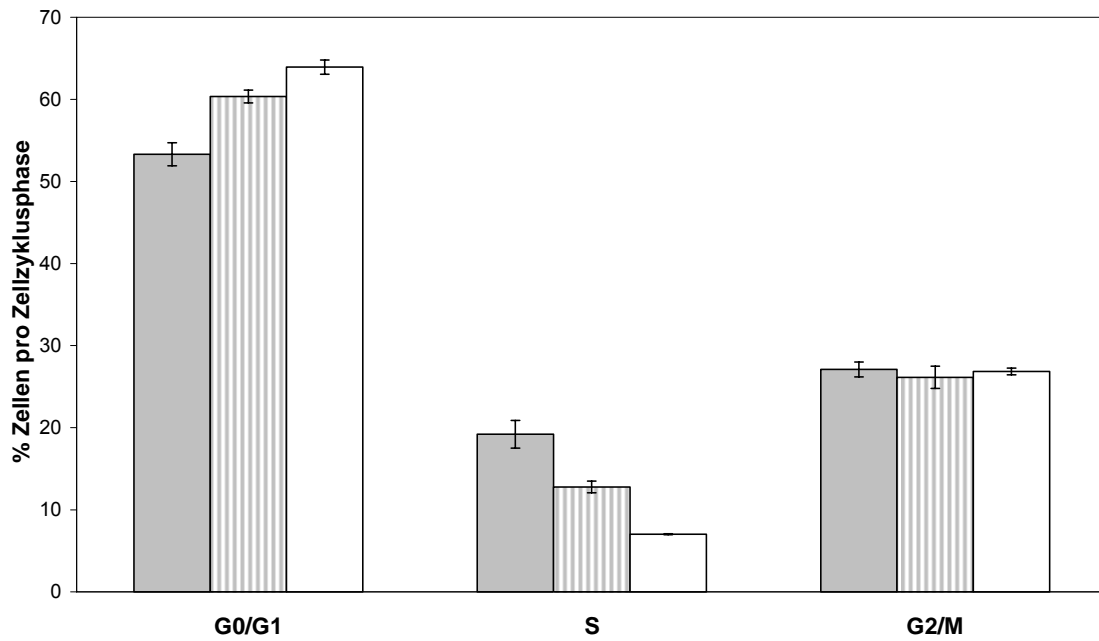
**Abbildung 3.8: Reparatur der DNA-Schäden nach Bestrahlung von p21<sup>-/-</sup> (□) und p21<sup>+/+</sup> (■) HCT116-Zellen mit 5 Gy (Mittelwerte + SD) gemessen im *Comet Assay*.**

### 3.5.1.3 Zellzyklusanalyse

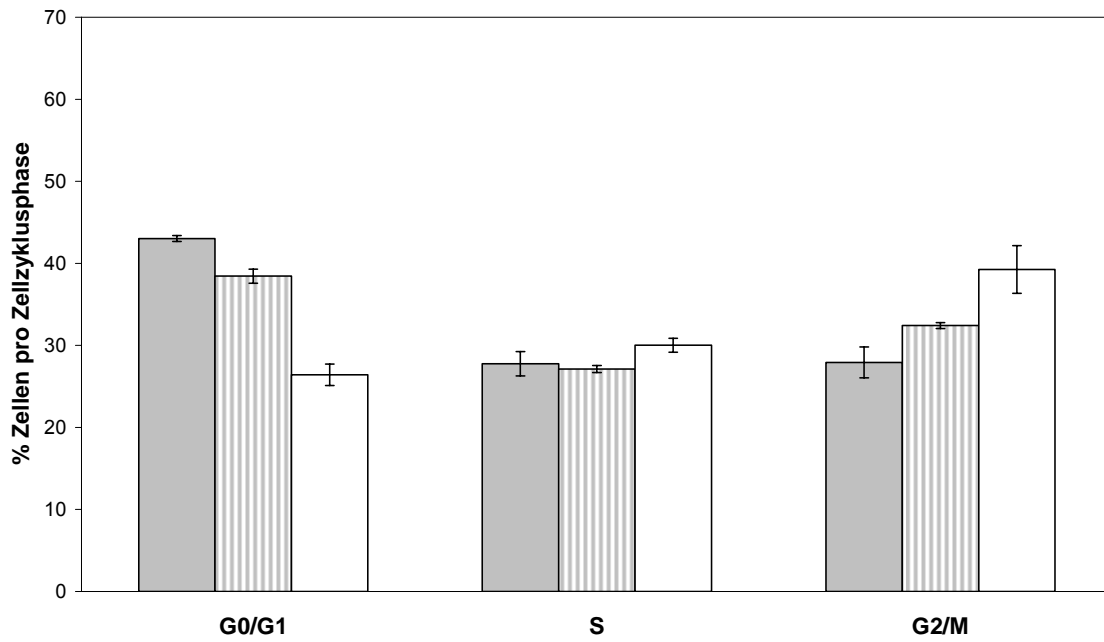
Die Verteilung in die verschiedenen Zellzyklusphasen (subG1, G0/G1, S und G2/M) nach Bestrahlung mit 0, 2 und 5 Gy wurde für beide Zelllinien nach 4, 8 und 24 h bestimmt. Der prozentuale Anteil der subG1-Phase war in allen Messungen kleiner als 2 % und wurde für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt.

Nach 24 h war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10). In der p21-kompetenten Zelllinie (Abbildung 3.9) ließ sich eine dosisabhängige Zunahme von Zellen in der G0/G1-Phase beobachten, während es zu einer dosisabhängigen Abnahme von Zellen in der S-Phase kam. Der Anteil der Zellen in G2/M-Phase wurde durch Bestrahlung nicht verändert. Dieses Verhalten ist ein Zeichen für eine Blockierung des Zellzyklus in G0/G1. Ein anderes Bild zeigte sich für die p21-defiziente Zelllinie (Abbildung 3.10), in der es 24 h nach Bestrahlung zu einer dosisabhängigen Abnahme in der G0/G1-Phase und zu einer Zunahme in der G2/M-Phase kam, während die S-Phase unverändert blieb. Somit fand in den p21-defizienten Zellen kein G0/G1-Block statt.

Im unbestrahlten Zustand (0 Gy) war die Verteilung in die Zellzyklusphasen von p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen etwa gleich.



**Abbildung 3.9: Zellzyklusverteilung 24 h nach Bestrahlung mit 0 (■), 2 (▨) und 5 (□) Gy in p21-kompetenten Zellen**



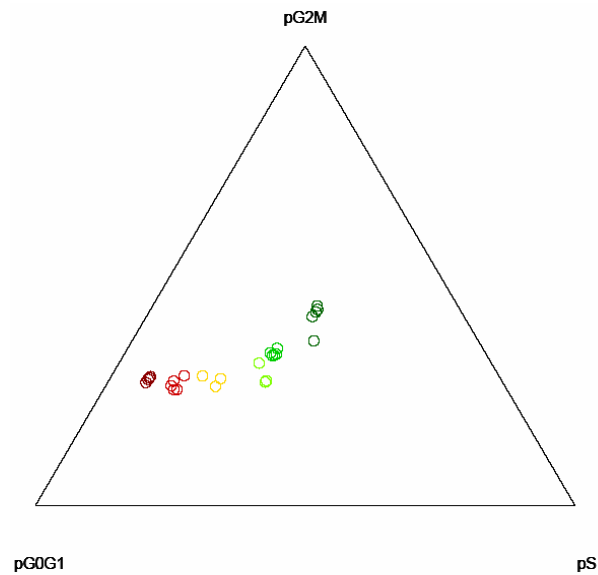
**Abbildung 3.10: Zellzyklusverteilung 24 h nach Bestrahlung mit 0 (■), 2 (▨) und 5 (□) Gy in p21-defizienten Zellen**

Zusätzlich zu den Balkendiagrammen erfolgte eine graphische Darstellung der Daten mittels ternärer Diagramme. Die Achsen eines solchen Diagramms bilden ein gleichseitiges Dreieck der Höhe 1 (Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12). Jedes Tripel von relativen Häufigkeiten der drei Zellzyklusphasen lässt sich durch einen Punkt innerhalb des Dreiecks beschreiben. Die Ecken des Dreiecks entsprechen den einzelnen Zellzyklusphasen. Fällt man das Lot eines Punktes auf die Seite des Dreiecks, so beschreibt die Länge dieses Lotes den prozentualen Anteil der Zellzyklusphase des gegenüberliegenden Ecks. Verschiedene ternäre Diagramme verdeutlichen die Abhängigkeit der Phasenzusammensetzung von Dosis und Zeitpunkt im Vergleich der beiden Zelllinien.

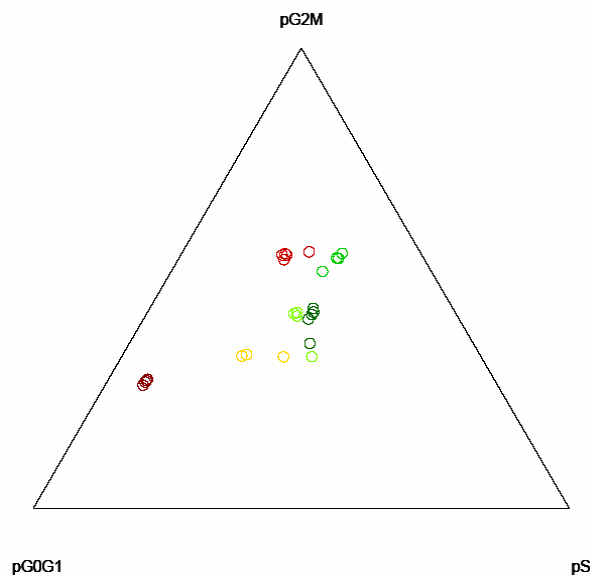
In der Abbildung 3.11 ist deutlich zu erkennen, dass die Punkte für beide Zelllinien ohne Bestrahlung dicht zusammen liegen. Mit zunehmender Bestrahlungsdosis verändert sich die Lage der Punkte für beide Zelllinien in entgegengesetzte Richtungen, was eine unterschiedliche Zusammensetzung beider Zelltypen in die Zellzyklusphasen bedeutet.

Abbildung 3.12 zeigt die Zeitabhängigkeit der Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung mit 5 Gy. Auch hier verhalten sich die beiden Zelllinien unterschiedlich.

Nach additiver Log-Ratio-Transformation der Daten wurde eine 3-faktorielle multivariate Varianzanalyse (MANOVA) mit zwei unabhängigen Variablen und den Faktoren Zelllinie, Dosis und Zeitpunkt durchgeführt. Alle Faktoren gingen kategorial in die Analyse ein. Sämtliche Haupteffekte sowie alle Interaktionseffekte sind hoch signifikant (Wilks-Test,  $p < 0.0001$ ).



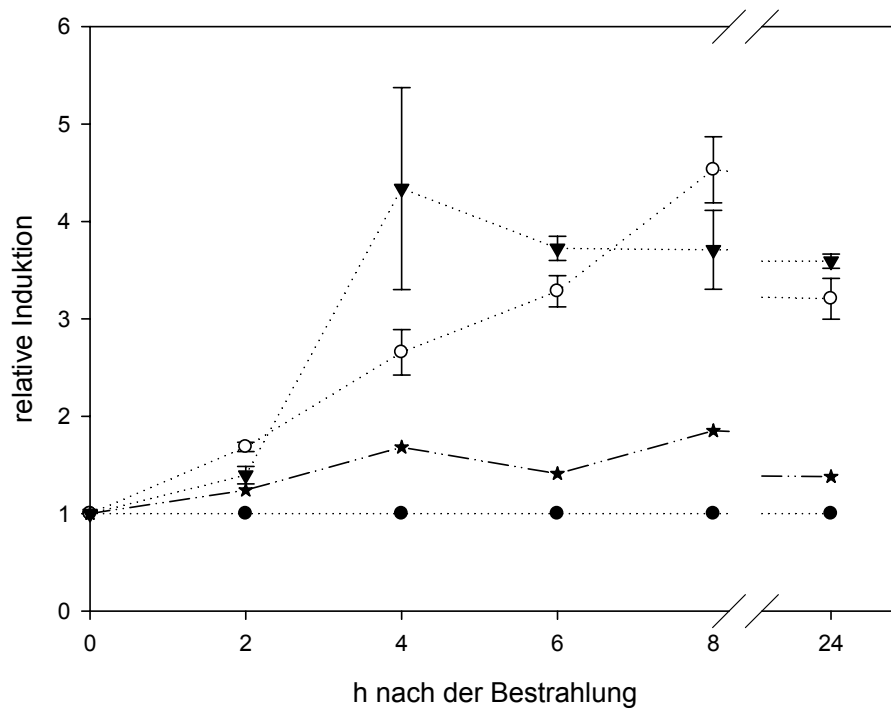
**Abbildung 3.11: Dosis-Wirkungs-Beziehung: Verteilung der Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen, gemessen 24 h nach der Bestrahlung von p21-defizienten Zellen mit 0 (○), 2(○), und 5(○) Gy sowie von p21-kompetenten Zellen mit 0 (○), 2 (○)und 5 (○)Gy**



**Abbildung 3.12: Kinetik nach der Bestrahlung mit 5 Gy: Verteilung der Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen, gemessen in p21-defizienten Zellen nach 4 (○), 8(○), und 24(○) Stunden sowie in p21-kompetenten Zellen nach 4 (○), 8 (○)und 24 (○)Stunden**

### 3.5.2 Analyse der Geninduktion bestrahlter HCT116-Zellen

Die p21-kompetenten und p21-defizienten Zelllinien wurden mit Dosen von 0, 2 und 5 Gy bestrahlt und die Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Die dargestellte Abbildung 3.13 zeigt die Induktion von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) nach Bestrahlung von p21<sup>+/+</sup>-Zellen. Alle Werte wurden mindestens zweimal bestimmt. Die relative Induktion ohne Bestrahlung wurde für alle Zeitpunkte auf 1 gesetzt. Eine Zu- oder Abnahme der Transkriptmenge um den Faktor 2 wurde als auffällig gewertet. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich ein Anstieg der relativen Induktion bis zum Maximum von 4,5 nach 8 h. Auch nach 24 h war noch ein erhöhter Induktionswert von 3,5 zu beobachten. Nach Bestrahlung mit 5 Gy wurde die maximale Induktion (4,5) bereits nach 4 h erreicht und blieb bis zum Ende der Messung nach 24 h etwa auf demselben Niveau. Zusätzlich wurden die gemessenen Werte der p21-defizienten Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy in die Abbildung eingefügt. Wie zu erwarten, wurde bei diesen Zellen keine Induktion von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) höher als Faktor 2 beobachtet. Die Induktionswerte für alle untersuchten Gene in p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen sind in Tabelle 3.12 dargestellt.



**Abbildung 3.13: Induktion von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) nach Bestrahlung von p21-kompetenten Zellen mit 0 (●), 2 (○) und 5 (▼), sowie die Induktionswerte nach 5 Gy in p21-defizienten Zellen★**

Tabelle 3.12: Induktion der mRNA Expression nach Bestrahlung

Gen Dosis	Induktionsfaktoren nach h					
	0	2	4	6	8	24
<b>p21<sup>+/+</sup> Zellen</b>						
<i>CDKN1A (p21, Cip1, WAF1)</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	1.68	<b>2.66</b>	<b>3.28</b>	<b>4.53</b>	<b>3.21</b>
5 Gy	1.00	1.39	<b>4.34</b>	<b>3.72</b>	<b>3.71</b>	<b>3.59</b>
<i>PCNA</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	0.85	1.04	0.79	0.88	0.96
5 Gy	1.00	0.93	1.32	0.91	0.81	1.20
<i>TP53</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	0.69	1.04	0.80	0.82	1.18
5 Gy	1.00	0.69	1.40	0.81	0.70	1.06
<i>XPC</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	1.40	1.65	<b>2.05</b>	<b>3.56</b>	<b>2.44</b>
5 Gy	1.00	0.77	1.83	1.61	1.60	<b>2.09</b>
<i>DDB2</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	0.88	1.05	1.18	1.49	1.06
5 Gy	1.00	0.81	1.84	1.73	1.47	1.29
<i>GADD45A</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	0.89	1.10	1.14	1.68	1.04
5 Gy	1.00	0.98	1.82	1.51	1.85	1.01
<b>p21<sup>-/-</sup> Zellen</b>						
<i>CDKN1A(p21, Cip1, WAF1)</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	1.22	1.71	1.06	1.40	1.63
5 Gy	1.00	1.24	1.68	1.41	1.85	1.38
<i>PCNA</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	1.92	1.55	1.23	1.24	1.93
5 Gy	1.00	0.83	0.72	0.38	0.54	0.75
<i>TP53</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	1.72	1.15	1.00	0.96	1.34
5 Gy	1.00	1.51	0.85	1.03	0.64	0.86
<i>XPC</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	<b>2.85</b>	1.33	1.57	1.37	1.88
5 Gy	1.00	<b>3.60</b>	1.15	1.22	1.10	1.54
<i>DDB2</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	1.56	1.02	1.29	1.12	1.50
5 Gy	1.00	1.31	0.68	0.64	0.55	0.82
<i>GADD45A</i>						
0 Gy	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2 Gy	1.00	<b>2.96</b>	1.66	<b>2.01</b>	1.43	1.28
5 Gy	1.00	<b>2.62</b>	1.14	1.48	0.86	1.05

Zusätzlich zu *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) wurde in beiden Zelllinien die Induktion der Gene *PCNA*, *TP53*, *XPC*, *DDB2* und *GADD45A* nach  $\gamma$ -Bestrahlung bestimmt (Tabelle 3.12). Hier ergab sich eine deutliche Induktion für die Transkriptmenge von *XPC* in den p21-kompetenten Zellen. Nach Bestrahlung mit 2 Gy erhöhte sich der Wert für *XPC* nach 6 h 2,05-fach und erreichte nach 8h mit dem 3,56-fachen der Ausgangsmenge sein Maximum. Nach 24 h war die *XPC*-Transkriptmenge noch 2,44-fach erhöht.

Nach der Bestrahlung mit 5 Gy zeigte sich eine 2-fache Erhöhung nur zum Zeitpunkt 24 h. Für die übrigen bestimmten Gene konnte keine Änderung der Transkriptlevel beobachtet werden, die größer als 2-fach waren.

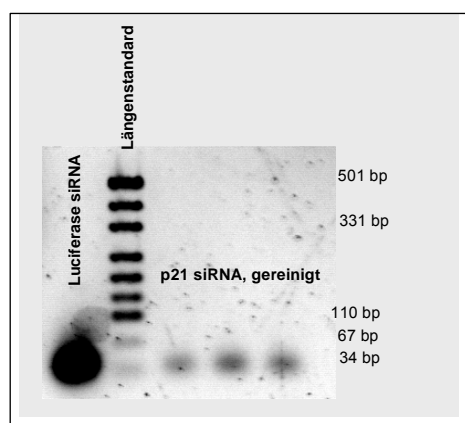
Auch in den p21-defizienten Zellen wurden die relativen RNA-Mengen zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit 0, 2 und 5 Gy bestimmt. Obwohl das Gen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) in den p21-/- Zellen durch homologe Rekombination entfernt sein sollte, wurden relative mRNA-Mengen von *CDKN1A* bestimmt. Da nicht das komplette Gen entfernt wurde (Waldman et al. 1995b), waren noch Bindungsstellen für die verwendeten Primer vorhanden, was dazu führte, dass für das Gen *CDKN1A* Induktionswerte bestimmt wurden. Diese Induktionswerte stiegen allerdings nur auf das 1,85-fache nach 5 Gy an, was im Schwankungsbereich der Methode liegt. In den p21-defizienten Zellen zeigte sich eine deutliche Änderung der *XPC*-Transkriptlevel 2 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy (2,85-fach) und 5 Gy (3,60-fach). Nach 4 h befanden sich die Werte wieder auf dem Ausgangsniveau. Außerdem konnte eine Änderung in der RNA-Menge von *GADD45A* beobachtet werden. 2 h nach Bestrahlung mit 2 Gy betrug der Induktionswert 2,96, nach Bestrahlung mit 5 Gy 2,62. Nach 4 h konnte keine deutliche Änderung beobachtet werden, zum Zeitpunkt 6 h nach Bestrahlung mit 2 Gy war die RNA-Menge 2,01-fach erhöht.

### 3.5.3 Stummschaltung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) in p21-kompetenten HCT116-Zellen mit siRNA

Die RNA-Interferenz ermöglicht die Stummschaltung von Genen durch Abbau der mRNA des Zielgens und verhindert die Proteinsynthese. Die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) sollte eine Zwischenstufe zwischen den p21-kompetenten und den p21-defizienten Zellen herstellen. Zunächst musste aber die geeignete Konzentration der siRNA sowie der geeignete Zeitpunkt zur Ernte der Zellen nach der Transfektion ermittelt werden. Danach sollte beobachtet werden, welchen Einfluss eine verminderte Transkriptmenge des Gens *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) auf die Transkriptmenge sowie die Proteinmenge anderer Gene hat.

#### 3.5.3.1 Herstellung der siRNA

Aus der „esiWay RNA Resource“ des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH wurde die siRNA gegen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) mRNA hergestellt. Die esiRNA Resource war ein gen-spezifisches Produkt mit einer Länge von 342 Basenpaaren. Dieses Fragment wurde zunächst amplifiziert, dann durch *in vitro* Transkription in dsRNA umgeschrieben. Nach dem Verdau mit dem Enzym *Dicer* erhielt man die 21-23 bp langen siRNA-Fragmente, die über Filterröhrchen gereinigt wurden. Zum Nachweis der Integrität der siRNA wurden die gereinigten siRNAs auf einem 4 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Wie in Abbildung 3.14 zu erkennen, wiesen die Fragmente eine Länge von 21-23 bp auf und waren nicht mit längeren Fragmenten verunreinigt.



**Abbildung 3.14: Überprüfung der Fragmentlänge der gereinigten p21-siRNA sowie der kommerziell erworbenen Luciferase siRNA**

### 3.5.3.2 Behandlung der Zellen mit siRNA und Beobachtung der Toxizität

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen (100, 60, 50, 30, 20, 10 nM) transfiziert und für 24, 48, 72 oder 96 h inkubiert. Desweiteren wurde ein Teil der Zellen 24 h nach der Transfektion mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt und dann für weitere 4 h inkubiert. Jeweils ein Aliquot jeder Behandlung stand für die Extraktion der RNA zur Verfügung, dafür wurde der Lysepuffer direkt auf die Zellen gegeben. Ein weiteres Aliquot jeder Behandlung wurde zunächst trypsiniert und eine geringe Menge der Zellsuspension für die Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau entnommen. Die Vitalität der Zellen betrug in allen Ansätzen zwischen 85 und 100 %. Die Transfektion mit siRNA war somit in keiner der eingesetzten Konzentrationen toxisch für die Zellen. Aus der übrigen Zellsuspension wurden Proteine extrahiert.

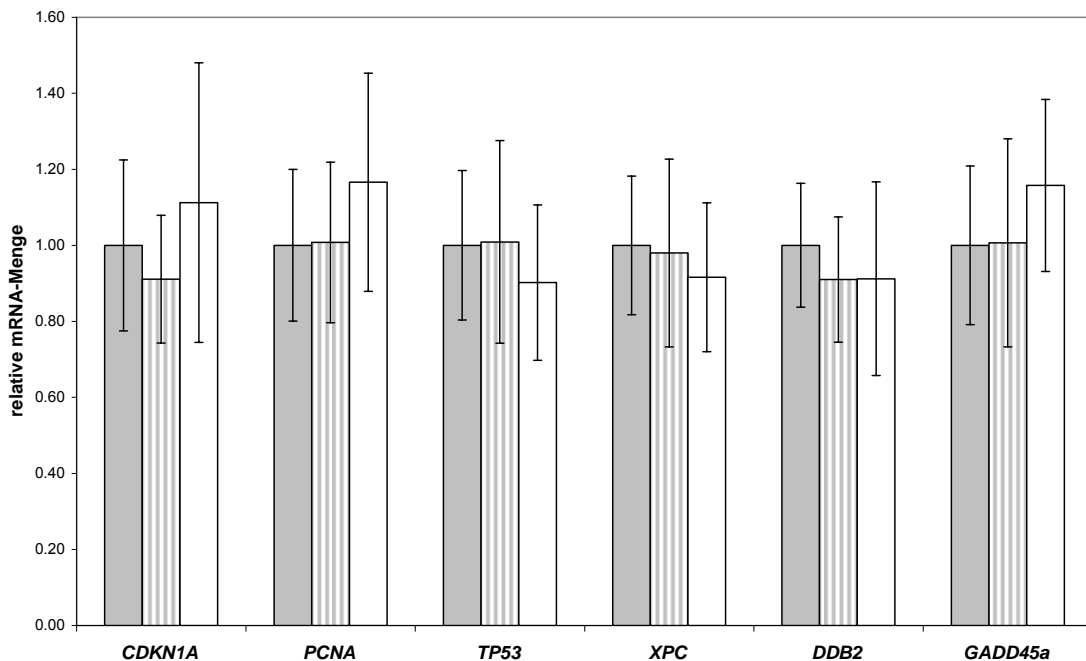
### 3.5.3.3 Überprüfung der Reduktion der mRNA

Um den Erfolg der Transfektion zu prüfen sowie die Veränderung der Transkription anderer DNA-Reparaturgene zu beobachten, wurden die relativen Transkriptmengen der Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *TP53*, *XPC*, *DDB2* und *GADD45A* mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt.

Es wurden drei verschiedene Kontrollen im Experiment eingesetzt. Die Werte der nicht-transfizierten Kontrolle wurden auf 1 gesetzt, um so den relativen Effekt der Behandlung zu zeigen. Als weitere Kontrolle wurde nur das Transfektionsreagenz allein auf die Zellen gegeben, um eventuelle Effekte durch das Transfektionsreagenz aufzuzeigen. In allen untersuchten Genen konnte kein Unterschied zwischen nicht-transfizierten Zellen und der Transfektionsreagenz-Kontrolle festgestellt werden. Eine andere Kontrolle stellte die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen Luciferase mRNA dar, einer siRNA, die in den verwendeten Zellen keine Zielsequenz hat. Mit dieser Kontrolle sollte es möglich sein, unspezifische Effekte durch die siRNA selbst aufzuzeigen. Auch hier konnte kein Unterschied zu der nicht-transfizierten Kontrolle festgestellt werden. Dies bedeutet, dass weder das Transfektionsreagenz noch die Transfektion mit Luciferase siRNA einen Einfluss auf die Transkriptmengen der untersuchten Gene haben. Die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen sind für jedes Gen und für jede Kontrolle in Tabelle 3.13 und Abbildung 3.15 aufgelistet.

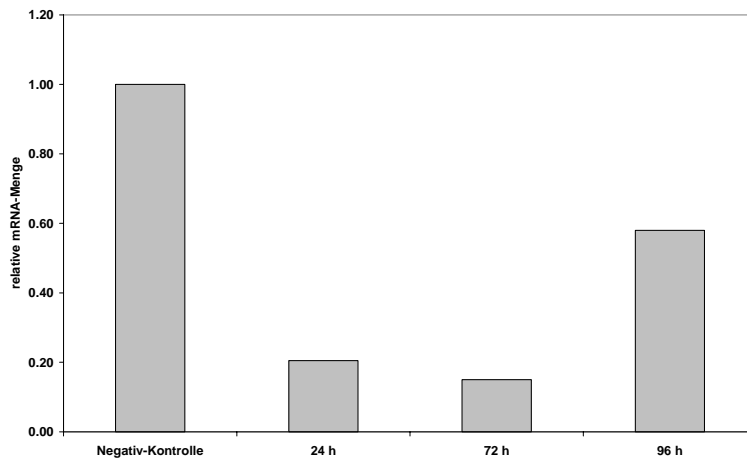
**Tabelle 3.13: Schwankungen der relativen mRNA-Mengen innerhalb der Negativkontrollen (3 unabhängige Bestimmungen). Die Werte der negativen Transfektion wurden gleich 1 gesetzt.**

	negative Transfektion	Transfektionsreagenz			Luciferase siRNA		
	MW	MW	SD	Variationskoeffizient (%)	MW	SD	Variationskoeffizient (%)
<i>CDKN1A</i>	1.00	0.91	0.17	18.47	1.11	0.37	33.07
<i>PCNA</i>	1.00	1.01	0.21	20.95	1.17	0.29	24.60
<i>TP53</i>	1.00	1.01	0.27	26.41	0.90	0.20	22.66
<i>XPC</i>	1.00	0.98	0.25	25.19	0.92	0.20	21.38
<i>DDB2</i>	1.00	0.91	0.16	18.12	0.91	0.25	27.94
<i>GADD45a</i>	1.00	1.01	0.27	27.18	1.16	0.23	19.58

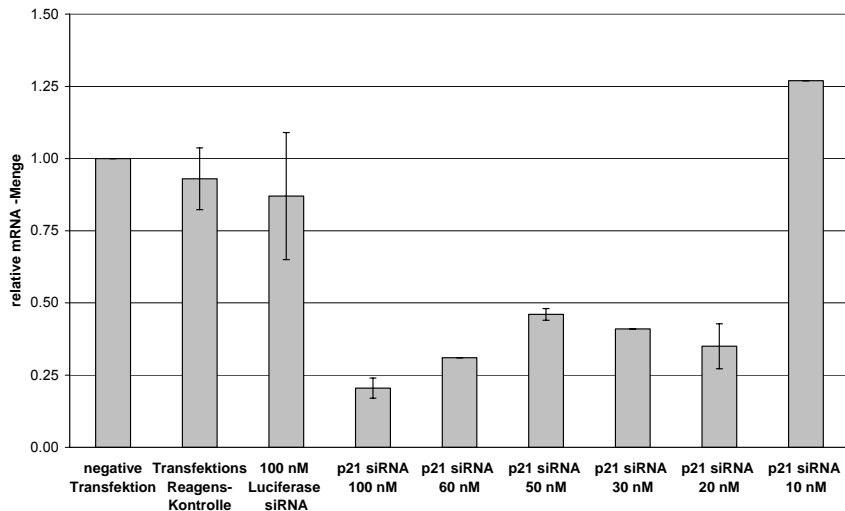


**Abbildung 3.15: Schwankungen der relativen mRNA-Menge innerhalb der Negativkontrollen: ■ negative Transfektion; ▨ Transfektionsreagenz; □ Luciferase siRNA**

Durch Transfektion der Zellen mit siRNA gegen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) mRNA konnte eine Herabregulierung der mRNA von *CDKN1A* erzielt werden. Die höchste eingesetzte siRNA-Konzentration von 100 nM erzielte den größten Effekt: Es konnte eine Verminderung der mRNA-Menge um 79 % nach 24 Stunden und um 85 % nach 72 Stunden beobachtet werden (Abbildung 3.16). Nach 96 h war der Effekt wieder abgeklungen. Auch mit geringeren Konzentrationen (60, 50, 30, 20 nM) konnte eine Verminderung erzielt werden. Die niedrigste Konzentration von 10 nM reichte allerdings nicht mehr aus, um eine Reduktion der mRNA zu erzielen (Abbildung 3.17). Die Verminderung der mRNA-Menge war im Bereich von 50, 60 und 100 nM dosisabhängig, die höchste Konzentration an eingesetzter siRNA führte zur stärksten Erniedrigung der mRNA-Menge (Abbildung 3.18).

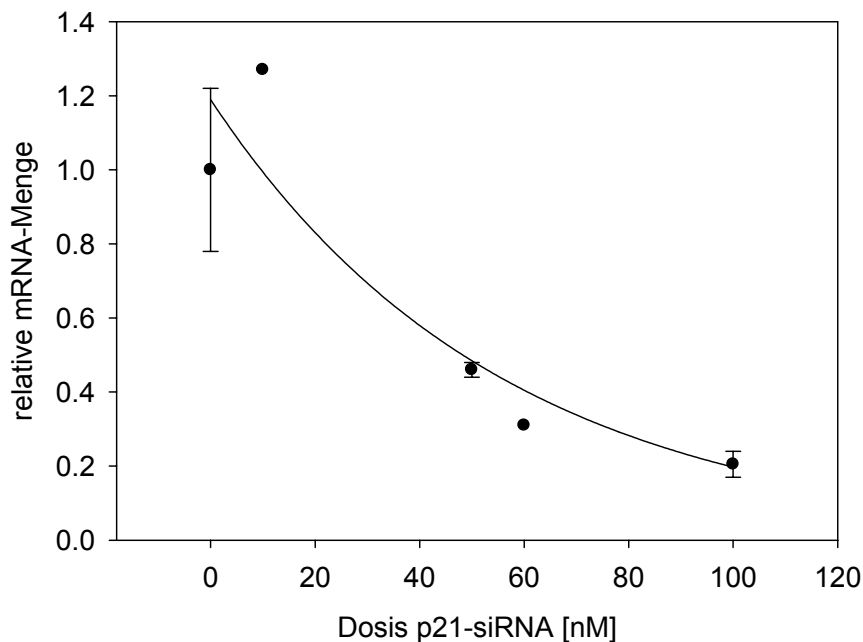


**Abbildung 3.16: Zeiteffekt: mRNA-Menge von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) nach Transfektion mit 100 nM p21-siRNA**



**Abbildung 3.17: Dosiseffekt: mRNA-Menge von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), 24 h nach Transfektion mit p21-siRNA**

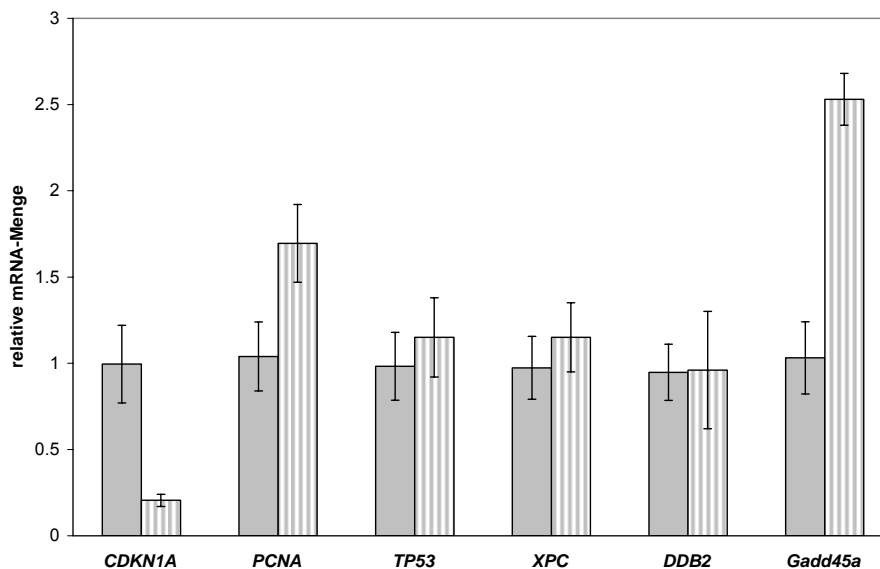
Für die dosisabhängige Reduktion der mRNA von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) lässt sich eine Dosis-Wirkungskurve erstellen (siehe Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen eingesetzter p21-siRNA und relativer mRNA-Menge von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), bestimmt 24 h nach der Transfektion**

Nach der Transfektion der Zellen mit p21-siRNA wurden außer den relativen mRNA-Mengen von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) auch die relativen RNA-Mengen von *PCNA*, *TP53*, *XPC*, *DDB2* und *GADD45A* bestimmt. Nach der Reduktion von *CDKN1A* mit

100 nM p21-siRNA konnte eine Erhöhung der mRNA-Menge von *PCNA* (1,7-fach) und *GADD45A* (2,5-fach) beobachtet werden (siehe Abbildung 3.19). Die relativen RNA-Mengen von *TP53*, *XPC* und *DDB2* blieben unverändert. Alle gemessenen relativen Transkriptmengen sind in Tabelle 3.14 und Tabelle 3.15 aufgeführt.



**Abbildung 3.19: Effekt von 100 nM p21-siRNA auf die relativen mRNA-Mengen, gemessen nach 24 h: ■ negative Transfektion, ▨ Transfektion mit 100 nM p21-siRNA**

### 3.5.3.4 Einfluss der Transfektion mit siRNA auf die Induzierbarkeit nach Bestrahlung

24 h nach der Transfektion wurden Zellen aus jeder Behandlung noch zusätzlich mit 5 Gy bestrahlt und 4 h danach die RNA-Extraktion vorgenommen. Damit sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die Bestrahlung auf die relativen RNA-Mengen bzw. auf die Induzierbarkeit der Gene hat. Die erhaltenen Rohwerte können auf zwei verschiedene Arten ausgewertet werden.

Die erste Art der Auswertung ist relativ zur Transfektionskontrolle. Sie ist identisch mit der oben beschriebenen, d.h., die erhaltenen Werte aus der negativen Transfektion wurden gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte in Relation zu dieser negativen Transfektion betrachtet. Die Ergebnisse mit diesem Bezug auf die nicht stummgeschaltete Kontrolle finden sich in Tabelle 3.14 und Tabelle 3.15. Diese Werte zeigen, dass *CDKN1A* (*p21*,

*Cip1*, *WAF1*) auch nach Bestrahlung herunter reguliert blieb; so sind nach Transfektion mit einer siRNA-Konzentration von 60 nM etwa 60 % weniger Transkripte von *CDKN1A* vorhanden als in der nicht-transfizierten Kontrolle. Diese Reduktion ist ähnlich dem Ergebnis der unbestrahlten Proben (hier war eine 70 %ige Reduktion zu beobachten). Die relativen RNA-Mengen der anderen gemessenen Gene schwanken um 1, was bedeutet, dass hier keine verstärkte oder verminderte RNA-Expression in Relation zur nicht-transfizierten Probe zu beobachten war. Auch die RNA-Mengen der Gene *PCNA* und *GADD45A* zeigen, im Gegensatz zu den unbestrahlten Proben, keine Erhöhung.

Die zweite Art der Auswertung bezieht alle Werte auf die der unbestrahlten Kontrolle. Die erhaltenen Werte nach Stummschaltung und Bestrahlung mit 5 Gy sind in Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21 dargestellt. In Abbildung 3.20 sind die *Normalized Ratios* von *CDKN1A* in unbestrahlten und bestrahlten Zellen aufgeführt. Die beiden Negativkontrollen (negative Transfektion und Transfektionsreagenz-Kontrolle) zeigten im unbestrahlten Zustand *Normalized Ratios* von etwa 4. Vier h nach Bestrahlung mit 5 Gy erhöhte sich das *Normalized Ratio* auf etwa 12, was eine deutliche Induktion der *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) mRNA bedeutet. Die mit p21-siRNA transfizierten Proben (hier: 50 und 20 nM) hatten im unbestrahlten Zustand ein deutlich geringeres *Normalized Ratio* (etwa 2), was ein Zeichen für die Stummschaltung ist. Nach Bestrahlung fand jedoch auch in diesen Zellen eine deutliche Induktion von *CDKN1A* statt, das *Normalized Ratio* nach Bestrahlung betrug etwa 6. Werden aus den *Normalized Ratios* Induktionsfaktoren als Quotient aus bestrahlter und unbestrahlter Probe gebildet, so erhält man sowohl für die nicht-transfizierten als auch für die mit p21-siRNA transfizierten Proben Induktionsfaktoren von etwa 3 (siehe Abbildung 3.21). Dies bedeutet, dass auch nach Reduktion der RNA-Menge von *CDKN1A* die Induzierbarkeit nach Bestrahlung erhalten blieb.

**Tabelle 3.14: Relative mRNA-Mengen der Gene *CDKN1A*, *PCNA* und *TP53* nach der Transfektion mit siRNA gegen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*); MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung**

Gen	Dosis	24 h		24h, 5 Gy		48 h		72 h	96 h
		MW	SD*	MW	SD*	MW	SD*	MW	MW
<i>CDKN1A</i>	negative Transfektion	1.00		1.00		1.00		1.00	1.00
	Transfektionsreagenz-Kontrolle	0.93	0.11	0.97	0.11	0.91	0.21	0.79	1.14
	100 nM Luciferase siRNA	0.87	0.22	1.08	0.00	0.88	0.07	0.84	1.24
	p21-siRNA 100 nM	<b>0.21</b>	0.04					0.15	0.58
	p21-siRNA 60 nM	<b>0.31</b>		<b>0.38</b>				0.29	0.67
	p21-siRNA 50 nM	<b>0.46</b>	0.02	0.54	0.07	0.54	0.18	0.97	
	p21-siRNA 30 nM	<b>0.41</b>		0.65				0.40	
	p21-siRNA 20 nM	<b>0.35</b>	0.08	<b>0.34</b>	0.01	<b>0.46</b>	0.12	0.72	
	p21-siRNA 10 nM	1.27		0.95		1.03	0.00	0.92	1.31
<i>PCNA</i>	negative Transfektion	1.00		1.00		1.00		1.00	1.00
	Transfektionsreagenz-Kontrolle	0.88	0.08	0.97	0.10	1.01	0.14	1.42	1.21
	100 nM Luciferase siRNA	0.84	0.00	1.16		0.93			1.66
	p21-siRNA 100 nM	1.70						0.94	<b>2.22</b>
	p21-siRNA 60 nM	1.48		1.12				0.90	1.90
	p21-siRNA 50 nM	0.95	0.08	0.94	0.02	0.68	0.12		
	p21-siRNA 30 nM	<b>2.04</b>		1.11				0.51	
	p21-siRNA 20 nM	1.66		1.04	0.01	0.83	0.04		
p21-siRNA 10 nM	1.97		0.93		0.83		0.93	1.62	
<i>TP53</i>	negative Transfektion	1.00		1.00		1.00		1.00	1.00
	Transfektionsreagenz-Kontrolle	0.63	0.05	1.07	0.05	1.19	0.24	1.34	0.84
	100 nM Luciferase siRNA	0.74		1.02		0.83			0.68
	p21-siRNA 100 nM	1.15	0.23					0.74	0.73
	p21-siRNA 60 nM	0.67		0.80				0.91	1.42
	p21-siRNA 50 nM	0.93		0.93	0.20	0.88	0.07		
	p21-siRNA 30 nM	0.83		0.85				0.96	
	p21-siRNA 20 nM	0.80		0.97		0.76	0.04		
p21-siRNA 10 nM	1.37		0.91		1.06		1.72	1.03	

\*SD wurde aus Werten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestimmt.

**Tabelle 3.15: Relative mRNA-Mengen der Gene *XPC*, *DBB2* und *GADD45A* nach der Transfektion mit siRNA gegen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*); MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung**

Gen	Dosis	24 h		24h, 5 Gy		48 h		72 h	96 h
		MW	SD*	MW	SD*	MW	SD*	MW	MW
<i>XPC</i>	negative Transfektion	1.00		1.00		1.00		1.00	1.00
	Transfektions- reagenz-Kontrolle	0.79	0.13	0.97	0.08	1.13	0.09	1.47	0.98
	100 nM Luciferase siRNA	0.75		0.97		0.64			1.04
	p21-siRNA 100 nM	1.15	0.20					0.69	1.17
	p21-siRNA 60 nM	0.85		0.87				1.00	1.19
	p21-siRNA 50 nM	0.88	0.02	0.87	0.07	0.69			
	p21-siRNA 30 nM	0.73		1.04				0.92	
	p21-siRNA 20 nM	0.95		0.84	0.10	0.77			
<i>DBB2</i>	negative Transfektion	1.00		1.00		1.00		1.00	1.00
	Transfektions- reagenz-Kontrolle	0.88	0.19	0.88	0.08	0.84	0.14	0.90	
	100 nM Luciferase siRNA	0.82		1.19		0.77			0.56
	p21-siRNA 100 nM	0.96	0.34					0.64	0.65
	p21-siRNA 60 nM	<b>0.42</b>		0.93				1.04	0.69
	p21-siRNA 50 nM	0.97	0.01	1.06	0.03	0.75	0.18		
	p21-siRNA 30 nM	0.58		0.94				0.82	
	p21-siRNA 20 nM	1.00		1.24	0.05	0.88	0.06		
<i>Gadd45A</i>	negative Transfektion	1.00		1.00		1.00		1.00	1.00
	Transfektions- reagenz-Kontrolle	0.79	0.05	1.01	0.12	1.08	0.34	0.68	1.27
	100 nM Luciferase siRNA	1.05		1.09					1.54
	p21-siRNA 100 nM	<b>2.53</b>	0.15					0.58	1.57
	p21-siRNA 60 nM	1.53		1.11				0.75	1.72
	p21-siRNA 50 nM			1.36	0.21	1.24	0.11		
	p21-siRNA 30 nM	1.64		1.05				0.82	
	p21-siRNA 20 nM	<b>2.34</b>		1.29		1.32	0.03		
p21-siRNA 10 nM	1.71		1.01		0.59		0.71	1.66	

\*SD wurde aus Werten aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestimmt.

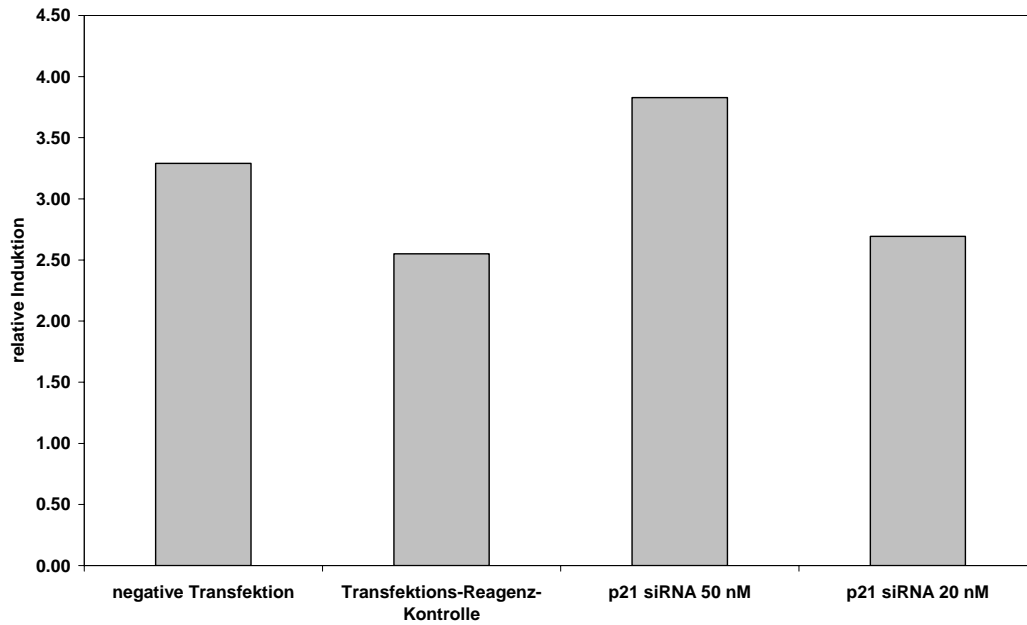


Abbildung 3.20: *Normalized Ratios* von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), gemessen in □ unbestrahlten und ■ bestrahlten (5 Gy) Zellen

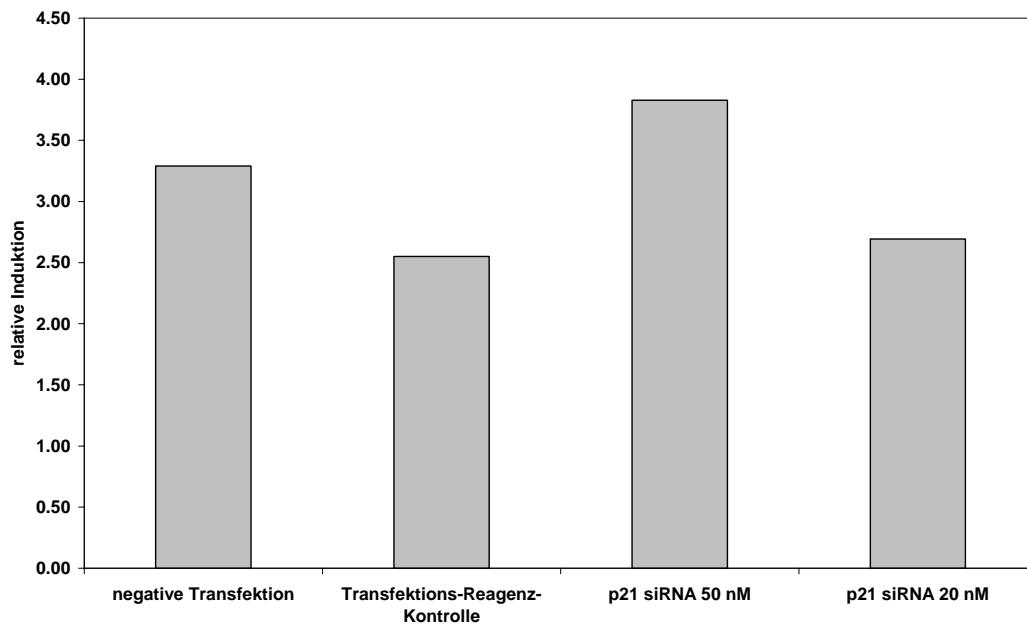
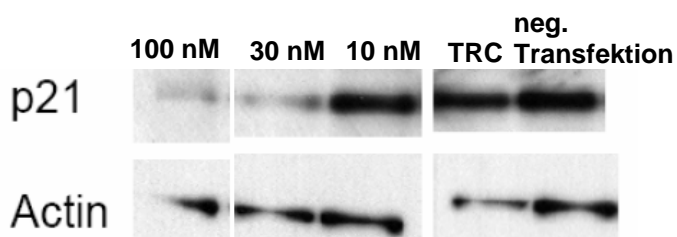


Abbildung 3.21: Relative Induktion von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) nach Bestrahlung von transfizierten Zellen

### 3.5.3.5 Einfluss der Transfektion mit siRNA auf die Proteinexpression

Um zu erkennen, ob sich die Herabregulierung von *CDKN1A* mRNA auch auf die p21-Proteinkonzentration auswirkt, wurden von den transfizierten Zellen sowie den Kontrollen Gesamtproteinlysate extrahiert und im Western Blot analysiert. In Abbildung 3.22 ist deutlich zu erkennen, dass die Proteinmenge von p21 in Abhängigkeit von der siRNA-Konzentration abnahm. 24 h nach der Transfektion mit 100 und 30 nM ist kaum noch p21 im Blot erkennbar, während nach der Transfektion mit 10 nM siRNA und den Negativkontrollen deutliche Banden auf dem Film zu sehen sind.



**Abbildung 3.22: Nachweis von p21-Protein nach Transfektion der Zellen mit p21-siRNA; TRC: Transfektionsreagenz-Kontrolle**

Die durchgeführten Blots wurden ebenfalls mit p53- und gadd45a-Antikörpern inkubiert. Es konnte jedoch keine Veränderung in der Proteinmenge von p53 und gadd45a nach der Transfektion mit p21-siRNA festgestellt werden.

## 4 Diskussion

Die hohen inter-individuellen Schwankungen in der Strahlenempfindlichkeit des bestrahlten Normalgewebes sind ein limitierender Faktor in der Strahlentherapie und werden vermutlich weitgehend durch genetische Faktoren bestimmt (Andreassen et al. 2002; Hendry 2001; Safwat et al. 2002). In der Vergangenheit wurden bereits Versuche unternommen, um die Strahlenempfindlichkeit der Patienten *in vitro* zu bestimmen, um so die Therapie entsprechend anzupassen. Einige funktionelle Tests zeigten eine gewisse Korrelation zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten oder Fibroblasten mit der Reaktion im Normalgewebe von Patienten (Andreassen et al. 2002; Borgmann et al. 2002; Budach et al. 1998; Geara et al. 1993; Johansen et al. 1996; Mariano Ruiz et al. 2002; Oppitz et al. 2002; Raaphorst et al. 2000; Rudat et al. 1997; West et al. 2001; Widel et al. 2003). Die ermittelten Korrelationen zwischen klinischen und funktionellen Markern sind jedoch oft nur gering und bis heute existiert kein verlässlicher prädiktiver Test, um die Strahlenempfindlichkeit von Patienten vor der Therapie zu ermitteln (Andreassen et al. 2002; Baumann et al. 2003; Dickson et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, Gene aus dem Bereich Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur zu identifizieren, deren Induktionsverhalten nach Bestrahlung zukünftig als Biomarker für einen prädiktiven Test zur Bestimmung der individuellen klinischen Strahlenüberempfindlichkeit dienen könnte.

Es wurde untersucht, ob die Induktion der Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *GADD45A*, *DDB2*, und *XPC* möglicherweise als Biomarker für die Vorhersage von Strahlenüberempfindlichkeit geeignet ist. Von diesen Genen ist aus der Literatur bekannt, dass sie durch Bestrahlung induzierbar sind (Amundson et al. 2003a). Die Induktion dieser Gene wurde nach Bestrahlung von Lymphozyten *in vitro* bestimmt und mit den einheitlich nach *CTC* (Seegenschmiedt 1998) bewerteten akuten Strahlennebenwirkungen der Prostatakrebspatienten verglichen. Um die experimentellen Bedingungen zu optimieren, wurden im Vorfeld Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Blutspendern durchgeführt.

Desweiteren wurde im Zellmodell an p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen untersucht, inwieweit *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) eine Auswirkung auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat, bzw. welche anderen DNA-Reparaturgene vom Fehlen von *CDKN1A* betroffen sind.

#### 4.1 **Qualität der Messungen mittels quantitativer Realtime-PCR**

Die quantitative Realtime-PCR wurde zur Messung der Genexpression bestrahlter und unbestrahlter Lymphozyten eingesetzt. Diese Methode wird zur Zeit als die am meisten verlässliche Methode zur Bestimmung von mRNA-Transkriptmengen angesehen (Bustin 2000; Bustin 2002; Bustin und Mueller 2005). Die Qualität der erhaltenen Daten wird jedoch von vielen Faktoren beeinflusst, daher wurde das experimentelle Protokoll optimiert, um Fehler zu minimieren. Zum einen ist eine hohe Reinheit und Integrität der eingesetzten RNA-Proben erforderlich. Aus diesem Grund wurden Qualität und Konzentration der RNA-Proben in den vorliegenden Untersuchungen mit dem Agilent 2100 Bioanalyser auf Nano LabChips bestimmt und nur hoch reine RNAs ohne Anzeichen von Degradation in den weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Zur Kontrolle von Effizienzunterschieden in der Reversen Transkription wurde jeder RNA-Probe jeweils eine konstante Menge exogener RNA aus *Arabidopsis thaliana* zugesetzt und in getrennten Ansätzen quantifiziert. Desweiteren wurde nach der Erststrang-cDNA-Synthese eine PCR durchgeführt, die die vollständige Umschreibung von mRNA in cDNA bestätigte.

Die während der quantitativen Realtime-PCR im LightCycler gemessenen Rohwerte, die *Crossing Points*, wurden in *Normalized Ratios* umgerechnet. In der Berechnung des *Normalized Ratios* wurde der Wert des Zielgens auf das Referenzgen *ACTB* bezogen. Außerdem flossen Unterschiede in der PCR-Effizienz von Ziel- und Referenzgen sowie Lauf-zu-Lauf-Unterschiede während der PCR-Reaktionen in diesen Wert ein. Die methodischen Schwankungen, die durch Behandlung, RNA-Extraktion, Reverse Transkription und andere Aufbereitungsschritte verursacht wurden, lagen zwischen 13 und 34 %. Damit wurde gezeigt, dass mit der Methode der quantitativen Realtime-PCR die Genexpressionsmessungen mit guter Verlässlichkeit reproduzierbar sind und Expressionsunterschiede mit einem Faktor größer als 2 sicher erfasst werden.

#### 4.2 **Induktion von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen in Lymphozyten nach Bestrahlung**

##### *Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Blutspendern*

Die Untersuchungen an Lymphozyten von gesunden Blutspendern zeigten eine deutliche Induzierbarkeit der Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) und *PCNA*. Dies steht im Einklang mit der Literatur (Amundson et al. 2000; Amundson et al. 2003b; Rieger und

Chu 2004; Tusher et al. 2001). Amundson et al. fanden nach Bestrahlung von Lymphozyten mit 2 Gy eine deutliche Induktion der Gene *CDKN1A*, *PCNA*, *XPC* und *DDB2* nach 4 h. Allerdings zeigten sich die maximalen Induktionswerte erst nach 24 h, während in der vorliegenden Arbeit der Effekt nach 24 h bereits wieder abgeklungen war.

J. Hümmerich konnte an Zellen von strahlenüberempfindlichen AT-Patienten und deren klinisch unauffälligen Familienmitgliedern zeigen, dass die Gene *CDKN1A* und *PCNA* durch  $\gamma$ -Bestrahlung im Vergleich mit anderen DNA-Reparaturgenen und Reparatur-assoziierten Genen am deutlichsten induzierbar waren und hier auch die größten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien auftraten (Hümmerich 2005). Dabei erfolgte die Induktion von *CDKN1A* schnell mit einem Maximum 4 h nach der Bestrahlung bei den Zellen des klinisch unauffälligen Familienmitglieds und nur schwach in Zellen von AT-Patienten. Die maximale *PCNA*-Expression erfolgte in den Zellen des klinisch unauffälligen Familienmitglieds sehr schnell (4 h nach der Bestrahlung), in den Zellen des Patienten wurde diese Induktion jedoch erst mit einer zeitlichen Verzögerung gemessen (8 h nach Bestrahlung).

Nach Zusammenfassung aller Anhaltspunkte wurde für die Untersuchungen der Lymphozyten der Prostatakrebspatienten der Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung als am besten geeignet festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt die Induktion von *CDKN1A* und *PCNA* gegenüber dem Ausgangswert deutlich erhöht war, die Höhe der Induktion sich aber noch nicht im Sättigungsbereich befand.

Die Expression von *TP53* mRNA ließ sich in den Lymphozyten durch  $\gamma$ -Strahlung nicht induzieren, was ebenfalls im Einklang mit Literaturdaten steht (Vogelstein et al. 2000). Die Aktivität von p53 wird nicht über die RNA-Menge, sondern über die Phosphorylierung des Proteins und die daraus resultierende Stabilisierung von p53 reguliert (Kastan und Lim 2000).

#### *Untersuchungen an Lymphozyten von Prostatakrebspatienten*

##### *Inter-individuelle Streuung der Induktionswerte nach 4 h*

Ähnlich wie in den Lymphozyten gesunder Blutspender war die mRNA-Expression der Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *DDB2*, *XPC* und *GADD45A* in den Lymphozyten der Prostatakrebspatienten 4 h nach Bestrahlung mit 5 Gy erhöht. Die Lymphozyten der Patienten wurden unter möglichst identischen experimentellen Bedingungen analysiert. Die große Anzahl der Patienten erlaubt zum ersten Mal, auch die

Variation der Induktionswerte zwischen einzelnen Individuen zu beurteilen.

Die Variationskoeffizienten für den Vergleich der 99 Patienten liegen, je nach Gen, zwischen 36 und 53 %. Dies war bei allen Genen größer als die experimentelle Variation von 13-34 %, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die Induktionswerte innerhalb des Patientenkollektivs stark schwanken. Da große Anstrengungen unternommen wurden, um die Schwankung der Methode selbst gering zu halten, müssen diese hohen Schwankungen auf tatsächliche Unterschiede zwischen den Patienten zurückzuführen sein.

Für besonders hohe oder besonders niedrige Induktionsfaktoren können zum einen Faktoren aus der Umwelt wie Exposition gegenüber schädigenden Agenzien (Rauchen) oder Ernährung oder aber individuelle Faktoren wie Alter oder genetische Ausstattung verantwortlich sein. Von den möglichen Faktoren, die getestet wurden (Alter, BMI, Rauchen, Antioxidantienspiegel, Alkoholkonsum) waren die folgenden mit der Induzierbarkeit assoziiert: Ältere Patienten zeigten erhöhte *CDKN1A*-Induktionsfaktoren ( $p=0,007$ ) und Patienten mit hohen *CDKN1A*-Induktionsfaktoren zeigten niedrige  $\beta$ -Carotinspiegel ( $p=0,02$ ), während bei Patienten mit hohen *PCNA*-Induktionsfaktoren die Plasmawerte von Canthaxanthin und Cryptoxanthin niedrig waren ( $p=0,04$  und  $p=0,03$ ). Raucher zeigten hingegen erhöhte *XPC*-Induktionsfaktoren ( $p=0,04$ ).

Eine mögliche Erklärung für erhöhte *CDKN1A*-Induktionsfaktoren bei älteren Patienten könnte die allgemein niedrigere Zellteilungsrate und ein längerer Zellzyklusarrest mit zunehmendem Alter sein. Herbig und Sedivy zeigten, dass p21 in seneszenten Zellen hochreguliert ist und dies mit dem Auftreten von DNA-Schäden, phosphoryliertem p53 und Langzeit-Zellzyklusarrest assoziiert ist (Herbig und Sedivy 2006). Möglicherweise sind Lymphozyten von älteren Patienten empfindlicher gegenüber DNA-schädigenden Einflüssen und reagieren deshalb stärker auf Bestrahlung. Ein Zusammenhang von hohen *CDKN1A*-Induktionsfaktoren mit den Nebenwirkungen während der Strahlentherapie konnte in dieser Studie allerdings nicht gezeigt werden.

Desweiteren wurde ein Zusammenhang zwischen niedrigen Antioxidantienwerten im Plasma und hohen Induktionsfaktoren der Gene *CDKN1A* und *PCNA* festgestellt. Ein niedriger Antioxidantienspiegel im Plasma könnte ein Marker für eine weniger gesunde Ernährung (Al Delaimy et al. 2005) oder für einen allgemein weniger gesunden Lebensstil der Patienten sein. Die Carotinoide  $\beta$ -Carotin, Canthaxanthin und Cryptoxanthin wirken antioxidativ (Astley et al. 2004; Palozza et al. 1996) und DNA-schützend (Nantz et al. 2006). Weiterhin konnten hohe Carotin-Plasmawerte mit einer

verbesserten DNA-Reparatur in primären Lymphozyten in Verbindung gebracht werden (Astley et al. 2004). Die Patienten mit niedrigen Antioxidantien-Plasmawerten in der vorliegenden Studie haben wahrscheinlich einen schlechteren Schutz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, die in der Zelle endogen oder exogen auftreten. Die reaktiven Sauerstoffspezies können an der zellulären DNA verschiedene Schäden verursachen, so dass als Folge darauf zelluläre Reparatursysteme aktiviert werden (Hoeijmakers 2001; Sancar et al. 2004). Nach Bestrahlung der Lymphozyten dieser Patienten *in vitro* wird die DNA vermutlich stärker geschädigt als in Patienten mit hohen Antioxidantien-Plasmawerten, worauf die Zelle mit verstärkter Expression von DNA-Reparaturgenen reagiert, so dass erhöhte Induktionsfaktoren gemessen wurden.

Die Induzierbarkeit der *XPC* mRNA nach Bestrahlung schwankte in den untersuchten Patienten über 20-fach. Ein Grund für eine hohe Induzierbarkeit von *XPC* könnte die frühere Exposition eines Patienten gegenüber DNA-schädigenden Substanzen sein, wie sie bei Rauchern auftritt (Rieger und Chu 2004). Im untersuchten Kollektiv wurde eine Assoziation von hohen *XPC* Induktionsfaktoren mit dem Rauchverhalten gefunden. Dieser Befund wurde bisher in der Fachliteratur noch nicht berichtet. Yang et al. fanden keine Assoziation zwischen der konstitutiven *XPC* mRNA Expression und dem Rauchverhalten der untersuchten Personen (Yang et al. 2005). Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass die p53-vermittelte Antwort auf DNA-Schäden an die Höhe der externen Exposition angepasst ist. So ist die *XPC*-Induktion nach Bestrahlung *in vitro* in Personen mit höherer externer Exposition deutlich höher als in Personen mit geringerer Exposition. Eine an die Exposition angepasste Reparaturantwort würde eine verbesserte Reparaturaktivität nach DNA-Schäden durch „konditionierende Behandlung“ (hier: Rauchen) auslösen und somit die Antwort auf weiteren genotoxischen Stress, wie z.B. bei einer Strahlentherapie, verbessern. Obwohl bereits einige Gruppen versuchten, die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen aufzudecken, ist jedoch wegen der komplexen Signalwege und der Vielzahl der beteiligten Proteine noch vieles unklar (Miura 2004).

Die Unterschiede der RNA-Menge nach Bestrahlung könnten nicht nur auf exogene Exposition der Patienten zurückzuführen sein, sondern auch auf die individuelle genetische Prädisposition. Es gibt jedoch kaum Arbeiten über die Assoziation von genetischen Varianten (SNPs = single nucleotide polymorphisms) und mRNA-Expression (Yang et al. 2005). Um diesen Zusammenhang näher zu erforschen, sollten nicht nur Varianten im jeweiligen Gen, sondern auch in weiteren Genen, die an der

Erkennung von DNA-Schäden beteiligt sind, untersucht werden.

Die Lymphozyten von einigen Patienten zeigten Induktionswerte kleiner als 1, demnach ließ sich die Expression des betreffenden Gens innerhalb von 4 h nach der Bestrahlung nicht steigern. Ähnliche Beobachtungen machten auch andere Autoren (Adimoolam und Ford 2002; Akerman et al. 2005). Adimoolam und Ford vermuten, dass eine anfängliche Abnahme der *XPC*-mRNA auf einen Transkriptionsblock durch DNA-Schädigung der etwa 30 kb großen Region des *XPC* Gens zurückzuführen ist. Die Transkription kann erst nach erfolgter DNA-Reparatur fortgeführt werden, eine Induktion könnte so erst verzögert auftreten und ist deshalb innerhalb von 4 h nicht messbar. Eine Abnahme der mRNA-Menge in einigen Patienten könnte daher auf eine Verzögerung in anderen Reparaturwegen hinweisen.

*Assoziation der mRNA-Induktion nach Bestrahlung und dem Auftreten von akuten klinischen Nebenwirkungen bei der Strahlentherapie*

Auch für die klinische Strahlenüberempfindlichkeit könnten solche Mechanismen, die zu einer sehr hohen oder sehr niedrigen Induktion nach Bestrahlung führen, verantwortlich sein. Daher wurden die Induktionsfaktoren in Decile aufgeteilt und gemessen, ob Strahlenüberempfindlichkeit mit niedrigsten oder höchsten Induktionsfaktoren korrelierte. Zusätzlich wurde für die Faktoren adjustiert, die die Strahlenempfindlichkeit beeinflussen könnten. Für die Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *TP53*, *DDB2* und *GADD45A* konnte mit dieser Methode kein Zusammenhang zwischen Höhe der Induktion nach 4 h und dem Auftreten klinischer Nebenwirkungen während der Strahlentherapie festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen Induktion und klinischer Strahlenüberempfindlichkeit konnte jedoch für das Gen *XPC* beobachtet werden, allerdings erst nach Korrektur für Rauchen: Patienten mit hohen *XPC*-Induktionsfaktoren haben ein erhöhtes Risiko, schwere akute Nebenwirkungen während der Strahlentherapie zu entwickeln.

Da die *XPC*-Induktion stark mit dem Rauchverhalten der Patienten korreliert war, musste in einem Regressionsmodell für Tabakkonsum adjustiert werden. Nach dem Adjustieren waren hohe *XPC*-Induktionsfaktoren mit einem mehr als 5-fach erhöhten Risiko zur Entwicklung schwerer akuter Nebenwirkungen verbunden. Dies konnte beobachtet werden, wenn die 10 % Patienten mit den höchsten Induktionswerten als separate Gruppe analysiert wurde, jedoch nicht nach Aufteilung der Gruppe in Terzile. Dies lässt vermuten, dass nur die höchsten Induktionswerte für den Effekt

verantwortlich sind.

Auf den ersten Blick überrascht die Induktion der *XPC*-Expression als Antwort auf ionisierende Strahlung, da das *XPC*-Protein seine Hauptfunktion in der Nukleotid-Exzisions-Reparatur hat (Volker et al. 2001), die normalerweise nicht für typische IR-induzierte DNA-Schäden benötigt wird. Ionisierende Strahlung kann jedoch außer DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verursachen, die zu verschiedenen raumfordernden (*bulky*) DNA-Veränderungen und Protein-DNA-Crosslinks führen können (Kuraoka et al. 2000), die über NER repariert werden.

Die Induktion von *XPC* mRNA durch IR ist ein Teil der Antwort der Zelle nach DNA-Schäden, welche über ATM und p53 als Sensoren auf DNA-Schäden eingeleitet wird. Es wird angenommen, dass die Induktion von *XPC* nach IR über den selben Mechanismus verläuft wie die Induktion nach Bestrahlung mit UV-Licht, die bereits genauer untersucht wurde (Adimoolam und Ford 2002; Ford 2005). UV-induzierter DNA-Schaden aktiviert das Protein ATR, das p53 phosphoryliert und dadurch stabilisiert. Das phosphorylierte p53 Protein fungiert als Transkriptionsfaktor für verschiedene DNA-Reparatur- und Reparatur-assoziierte Gene, wie *CDKN1A*, *PCNA*, *GADD45A*, *DDB2* und *XPC* (Amundson et al. 2003b; Tusher et al. 2001). Mit *XPC* und *DDB2* werden Gene aus der Nukleotid-Exzisions-Reparatur aktiviert. Außer seiner Funktion in der NER wurde für *XPC* ebenfalls eine Beteiligung an der Basen-Exzisions-Reparatur gefunden, wo das *XPC*-Protein mit der Thymin-DNA-Glykosylase interagiert (Shimizu et al. 2003).

Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass erhöhte Proteinnengen von *XPC* in Abwesenheit entsprechender DNA-Schäden vitale zelluläre Prozesse stören. Es wird vermutet, dass dann *XPC* in großem Maße an DNA bindet, deren Konformation nur geringfügig verändert ist, wie es z.B. durch Phosphothiolat oder Methylphosphonat-Veränderungen sowie DNA-Fehlpaarungen verursacht sein kann. Diese treten jedoch ganz natürlich während der regulären Transkription und Replikation auf. (Hanawalt et al. 2000; Hanawalt et al. 2003; Ng et al. 2003; Sugasawa et al. 2001). Eine solche verstärkte „Fehl“-Bindung von *XPC* an die DNA kann zur Störung von Transkription und Replikation führen. Daher sollte die Expression von *XPC* streng reguliert werden, wie es auch in der Zelle durch p53 erfolgt. Ein weiterer Hinweis auf die schädliche Wirkung hoher *XPC*-Mengen kommt aus Untersuchungen an Hefen, in denen festgestellt wurde, dass die Überexpression von *RAD4*, dem *XPC*-Analog in der Hefezelle, hoch toxisch

ist (Siede und Eckardt-Schupp 1986; Wei und Friedberg 1998).

In Patienten mit ungewöhnlich hohen XPC-Proteinmengen, verursacht durch hohe mRNA-Mengen nach IR, könnte die Menge des XPC-Proteins nicht adäquat an die Art des anfallenden Schadens angepasst sein, da die meisten IR-induzierten DNA-Schäden nicht über NER, sondern hauptsächlich über andere Reparaturmechanismen repariert werden. Die hohen XPC-Mengen können zelluläre Toxizität und Zellverlust im normalen Gewebe verursachen. Massiver Zelltod durch mitotische Katastrophe und Apoptose werden als wichtige Antwort auf Bestrahlung angesehen (Dewey et al. 1995; Komarova et al. 2004). Wenn der strahlungsinduzierte Zellverlust zu hoch ist, könnte dies zu schweren akuten Nebenwirkungen im Normalgewebe führen (Dorr 2003; Hopewell et al. 2003).

Allerdings könnten zusätzlich zu der in dieser Arbeit gemessenen hohen Induktion von XPC mRNA nach IR auch andere Faktoren für das Auftreten von Strahlennebenwirkungen verantwortlich sein, da alle regulatorischen Mechanismen der zellulären XPC-Proteinmengen betrachtet werden müssen. Dazu gehören posttranslationale Modifikationen, Proteinstabilität und die Interaktion mit anderen Beteiligten des DNA-Schadenssignal- und Reparaturweges. Außerdem können andere Gewebereaktionen wie Entzündungsprozesse oder Zytokin-Produktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Nebenwirkungen im bestrahlten Normalgewebe spielen (Rosen et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Induktionsfaktoren der untersuchten Gene mit den akuten klinischen Strahlennebenwirkungen verglichen. Es wäre wünschenswert, ein „Follow-up“ bei den Patienten durchzuführen, um auch den Zusammenhang zwischen XPC-Induktion und Späteffekten zu betrachten. Akute und späte Strahlenreaktionen sind nicht zwangsläufig miteinander korreliert und können durch unterschiedliche genetische Prädisposition beeinflusst werden (Bentzen und Overgaard 1991).

Zur weiteren Etablierung und Validierung der XPC mRNA-Induktion *in vitro* als Biomarker für Strahlenüberempfindlichkeit werden zudem weitere mechanistische Analysen und molekular-epidemiologische Studien an größeren Fallzahlen benötigt.

### **4.3 Untersuchungen zur Bedeutung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit**

Im Zellmodell wurde an p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen untersucht, inwieweit *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) eine Auswirkung auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat, bzw. welche anderen DNA-Reparaturgene vom Fehlen von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) betroffen sind.

#### **4.3.1 Vergleich von p21-kompetenten und p21-defizienten Zellen**

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit in p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen wurde durch Bestimmung von Wachstum, Reparaturfähigkeit und Verteilung in die verschiedenen Zellzyklusphasen nach Bestrahlung untersucht. Das Wachstumsverhalten nach Bestrahlung beider Zelllinien unterschied sich nicht statistisch signifikant voneinander. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Untersuchungen an diesen beiden Zelllinien (Fan et al. 1997; Waldman et al. 1995a; Waldman et al. 1997; Wouters et al. 1997). Wouters *et al.* konnten im Koloniebildungstest zeigen, dass es keinen Unterschied zwischen beiden Zelltypen in der Überlebensrate nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen gibt. Wurden jedoch beide Zelllinien in Mäuse transplantiert und die Tumoren bestrahlt, zeigten p21-defiziente Zellen eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit als p21-kompetente Zellen. Genauso verhielten sich die Zellen auch im *in vivo* Koloniebildungstest, bei dem Zellen 24 h nach Bestrahlung der Maus aus den Transplantationstumoren isoliert und danach wie im *in vitro* Koloniebildungstest behandelt wurden. Vermutlich beeinflussen hier Signale aus dem Zellverband im Tumor die Sensitivität des Tumors gegenüber Strahlung (Wouters et al. 1997).

Beide Zelllinien verhielten sich im *Comet Assay* gleich, der sowohl den induzierten Schaden als auch die Reparaturkapazität bestimmt. Im Gegensatz dazu fanden McDonald et al., dass p21-defiziente Zellen 3-5-fach weniger effizient in der Reparatur von *in vitro* geschädigten  $\beta$ -Galactosidase-Reporter-Plasmiden waren (McDonald, III et al. 1996). Ein Vergleich der hier verwendeten Methode mit einem solchen Reparaturtest ist jedoch schwierig, da im *Comet Assay* die Zellen direkt bestrahlt werden, während bei der Messung der Integrität des Reportergens außerhalb der Zelle bestrahlt wird und die Zellen mit geschädigten Reportergenen transfiziert werden.

Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Zelllinien konnte nach Bestimmung der prozentualen Verteilung der Zellen entsprechend der einzelnen Zellzyklusphasen mittels

Durchflusszytometrie beobachtet werden. 24 h nach der Bestrahlung trat in den p21-kompetenten Zellen ein G0/G1-Block auf, während der prozentuale Anteil an Zellen in der S-Phase deutlich abnahm. Die p21-defizienten Zellen zeigten nach Bestrahlung keinen Block in G0/G1, der prozentuale Anteil an Zellen in S-Phase blieb gleich, während der Anteil an Zellen in G2/M-Phase zunahm, was einen Stopp des Zellzyklus in G2/M bedeutet. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Berichten über diese Zelllinien überein, wo nach  $\gamma$ -Bestrahlung der p21-kompetenten Zellen ein Abnahme an Zellen in S-Phase zu beobachten war, während in p21-defizienten Zellen der Anteil an Zellen in S-Phase auch nach Bestrahlung gleich blieb (Waldman et al. 1995b). Wouters et al. zeigten, dass p21-kompetente Zellen nach Bestrahlung in G1 und G2 blockiert werden, während die p21-defizienten Zellen keinen G1-Block aufweisen, aber kurzzeitig in G2 im Zellzyklus angehalten werden (Wouters et al. 1997). In Zellen ohne p21 finden nach DNA-Schädigung oft weitere S-Phasen statt, jedoch ohne vollständige mitotische Zellteilungen. Dies führt zu polyploiden Zellen, die später durch Apoptose eliminiert werden müssen (Waldman et al. 1997).

In p21-kompetenten und p21-defizienten HCT116-Zellen wurden Induktionsfaktoren von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA*, *TP53*, *XPC*, *DBB2* und *GADD45A* nach Bestrahlung mit 0, 2 und 5 Gy bestimmt. Eine deutliche Induktion (über Faktor 2) zeigte sich in p21-kompetenten Zellen für *CDKN1A* und *XPC*. Die Expression der anderen Gene blieb unverändert. In p21-defizienten Zellen konnte eine deutliche Induktion nach Bestrahlung für *XPC* und *GADD45A* beobachtet werden. Demnach waren die Gene, die in primären Lymphozyten durch Bestrahlung induzierbar waren (*CDKN1A*, *PCNA*, *XPC*, *DBB2*, *GADD45A*), nur teilweise auch in HCT116-Kulturzellen induzierbar. Die unterschiedliche Reaktion auf  $\gamma$ -Bestrahlung von Lymphozyten und HCT116-Zelllinien ist auf verschiedene Art erklärbar: Während die Lymphozyten primäre Zellen sind, handelt es sich bei HCT116-Zellen um kultivierte Tumorzelllinien. Auch das Herkunftsgewebe der Lymphozyten (aus dem Blut) und der HCT116-Zellen (aus dem Colon) ist unterschiedlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die p21-defizienten Zellen im Vergleich mit p21-kompetenten Zellen tatsächlich strahlenempfindlich sind, was sich jedoch nur in der Zellzyklusanalyse zeigte, während im *Comet Assay* und im Wachstum innerhalb des Beobachtungszeitraums kein Unterschied erkennbar war. Eine gestörte Mitose, wie sie in bestrahlten p21-defizienten Zellen auftritt, könnte möglicherweise auch in den Patienten für strahlenbedingte Nebenwirkungen, vor allem für weitere Tumoren als

Spätfolge der Bestrahlung, verantwortlich sein.

#### **4.3.2 Stummschaltung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*)**

Die Stummschaltung einzelner Gene mittels siRNA stellt mittlerweile eine übliche Methode zur Untersuchung von Signalwegen dar (Berns et al. 2004; Dorsett und Tuschl 2004; Kittler et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) in HCT116-Zellen mittels RNAi vermindert. Die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) sollte eine Zwischenstufe zwischen den p21-kompetenten und den p21-defizienten Zellen herstellen.

Nach der Transfektion der Zellen mit p21-siRNA konnte bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 100 nM kein toxischer Effekt der siRNA auf die Zellen festgestellt werden. Desweiteren wurde kein unspezifischer Effekt durch das Transfektionsreagenz oder die Transfektion mit Luciferase siRNA auf die RNA-Mengen beobachtet. Das Gen *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) konnte in den Zellen erfolgreich herunterreguliert werden. Mit einer siRNA-Konzentration von 100 nM wurde eine Verminderung der mRNA-Menge um 79 % nach 24 h und um 85 % nach 72 h beobachtet. Die Stärke der Herabregulierung hängt nicht nur von der eingesetzten siRNA-Konzentration und der Zeit nach der Transfektion ab, sondern auch vom Zelltyp, vom Gen, welches stummgeschaltet werden soll und von der Sequenz der siRNA sowie weiteren Faktoren (McManus und Sharp 2002). Nach Herstellerangaben sollte mit der „esiWay RNA Resource“ eine Stummschaltung des Zielgens von 70 % bis zu 90-95 % erreicht werden (RZPD 2005). Somit lag die hier erzielte Herabregulierung nicht im optimalen Bereich, aber im erwarteten Rahmen.

Nach der Reduktion von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) wurde eine Erhöhung der mRNA-Mengen von *PCNA* und *GADD45A* beobachtet. Das Protein p21 erfüllt wichtige Funktionen während der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung (Di Leonardo et al. 1994; Gartel und Tyner 2002; Kastan et al. 1991). Die N-terminale Domäne von p21 besitzt Homologien zu verschiedenen Cyklinen und cyklin-abhängigen Kinasen. Der C-Terminus von p21 interagiert, wie bereits in der Einleitung gezeigt (Abbildung 1.1 und Abbildung 1.2), mit Proteinen wie *PCNA* und *GADD45A* (Dotto 2000). Möglicherweise führt die Reduktion von *CDKN1A* mRNA und der daraus resultierenden erniedrigten p21 Protein-Menge zur Verminderung von p21/*PCNA*-sowie p21/*GADD45A*-Komplexen, welche für die Zelle wichtige regulatorische

Aufgaben erfüllen. Beim Versuch der Zelle, die Anzahl dieser Komplexe wieder auf das normale Niveau zu bringen, werden wahrscheinlich die Gene *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*), *PCNA* und *GADD45A* verstärkt transkribiert. Die mRNA von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) wird durch die siRNA schnell wieder abgebaut, so dass nur geringe mRNA-Mengen gemessen werden, während erhöhte mRNA-Mengen von *PCNA* und *GADD45A* nachweisbar bleiben und somit die Störung des physiologischen Gleichgewichts durch die Stummschaltung anzeigen. Desweiteren ist das Fehlen von p21 für die Zelle ein Signal für die Durchführung von Zellteilungen. Eine erhöhte p21-Menge, die durch DNA-Schädigung auftritt, würde die Zelle in der G1-Phase anhalten und so die Mitose verhindern. Beim Fehlen von p21 kann PCNA nicht an p21 gebunden werden, so dass PCNA zur DNA-Neusynthese zur Verfügung steht (Dotto 2000).

Nach Bestrahlung der mit p21-siRNA behandelten Zellen zeigte sich, dass die mRNA von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) auch nach der Bestrahlung reduziert war. Trotz der Reduktion der mRNA-Menge von *CDKN1A* im Vergleich zur nicht-transfizierten Probe blieb allerdings die Induzierbarkeit des Gens erhalten. So war auch in den transfizierten Proben eine deutliche Induktion der Expression von *CDKN1A* von 3-4-fach im Vergleich zur unbestrahlten Probe zu erkennen, wenn auch insgesamt auf niedrigerem Niveau. Dies bedeutet, dass das Verhalten der Zelle nach Bestrahlung vergleichbar mit nicht-transfizierten Zellen blieb, obwohl die Transfektion mit p21-siRNA zu einer Abnahme der mRNA von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) führte. Nach Bestrahlung erfolgt in der Zelle die Aktivierung von ATM und p53 (Bakkenist und Kastan 2003; Kastan und Lim 2000; Woods und Vousden 2001). Als Transkriptionsfaktor aktiviert p53 unter anderem die verstärkte Transkription von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) durch Bindung an den p53-spezifischen Promotor (Bae et al. 1995; El Deiry 1998). Diese Reaktion wird durch siRNA nicht behindert. Nach der Transfektion der Zellen mit p21-siRNA wird ein großer Teil der *CDKN1A*-mRNA abgebaut. Nach der transkriptionellen Aktivierung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) nach Bestrahlung über p53 kommt es zu einer verstärkten Produktion von *CDKN1A*-mRNA. Diese mRNA sollte durch p21-siRNA abgebaut werden, da jedoch plötzlich eine große mRNA-Menge vorhanden ist, kann der Abbau durch die siRNA nicht vollständig erfolgen, so dass bei Bestimmung der *CDKN1A*-mRNA-Menge mit der Realtime-PCR eine Induktion der Genexpression von *CDKN1A* festgestellt werden kann. Möglicherweise könnte diese Induktion dadurch verhindert werden, dass die siRNA nicht durch einmalige Transfektion gegeben wird, sondern durch permanente Gabe mit Hilfe stabiler Expression in Form eines siRNA-

exprimierenden Plasmids (Berns et al. 2004).

Aufgrund der bleibenden Induzierbarkeit von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) durch  $\gamma$ -Bestrahlung erwies sich die partielle Stummschaltung von *CDKN1A* (*p21*, *Cip1*, *WAF1*) durch siRNA nicht als ideales Modell, um die Situation in  $\gamma$ -bestrahlten Lymphozyten von Patienten nachzubilden und weitere funktionelle Untersuchungen durchzuführen. Dennoch bestätigen diese Experimente die enge Kopplung der *CDKN1A*-Expression mit der von *PCNA* und *GADD45A*, die auch in Lymphozyten sichtbar war. Eine versuchsweise Analyse, ob die Expression dieser Gene auch im Patientenkollektiv gekoppelt ist, erbrachte jedoch keine Hinweise darauf, dass die gemeinsame Betrachtung dieser Gene die klinische Strahlenempfindlichkeit besser beschreibt als die Auswertung der einzelnen Gene.





## 5 Literaturverzeichnis

1. Adimoolam S, Ford JM (2002)  
**p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene.** Proc Natl Acad Sci U S A 99:12985-12990
2. Adimoolam S, Ford JM (2003)  
**p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair.** DNA Repair (Amst) 2:947-954
3. Akerman GS, Rosenzweig BA, Domon OE, Tsai CA, Bishop ME, McGarrity LJ, Macgregor JT, Sistare FD, Chen JJ, Morris SM (2005)  
**Alterations in gene expression profiles and the DNA-damage response in ionizing radiation-exposed TK6 cells.** Environ Mol Mutagen 45:188-205
4. Al Delaimy WK, Ferrari P, Slimani N, Pala V, Johansson I, Nilsson S, Mattisson I, Wirfalt E, Galasso R, Palli D, Vineis P, Tumino R (2005)  
**Plasma carotenoids as biomarkers of intake of fruits and vegetables: individual-level correlations in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).** Eur J Clin Nutr 59:1387-1396
5. Alapetite C, Cosset JM, Bourguignon MH, Masse R (2000)  
**Genetic susceptibility to radiations. Which impact on medical practice?** Q J Nucl Med 44:347-354
6. Amundson SA, Bittner M, Fornace AJ, Jr. (2003a)  
**Functional genomics as a window on radiation stress signaling.** Oncogene 22:5828-5833
7. Amundson SA, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ, Jr. (2001)  
**Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation.** Radiat Res 156:657-61
8. Amundson SA, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ, Jr. (2000)  
**Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation.** Radiat Res 154:342-346
9. Amundson SA, Lee RA, Koch-Paiz CA, Bittner ML, Meltzer P, Trent JM, Fornace AJ, Jr. (2003b)  
**Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation.** Mol Cancer Res 1:445-452
10. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J (2002)  
**Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis-- where and how to look for it?** Radiother Oncol 64:131-140

11. Astley SB, Elliott RM, Archer DB, Southon S (2004)  
**Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes.** Br J Nutr 91:63-72
12. Bae I, Fan S, Bhatia K, Kohn KW, Fornace AJ, Jr., O'Connor PM (1995)  
**Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells.** Cancer Res 55:2387-2393
13. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003)  
**DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation.** Nature 421:499-506
14. Baumann M, Holscher T, Begg AC (2003)  
**Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project.** Radiother Oncol 69:121-125
15. BD Biosciences. Einführung in die Durchflusszytometrie. Customer Education ed. 2003.
16. Bentzen SM, Overgaard M (1991)  
**Relationship between early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy.** Radiother Oncol 20:159-165
17. Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, Brummelkamp TR, Velds A, Heimerikx M, Kerkhoven RM, Madiredjo M, Nijkamp W, Weigelt B, Agami R, Ge W (2004)  
**A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway.** Nature 428:431-437
18. Borgmann K, Roper B, El Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dork T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J (2002)  
**Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations.** Radiother Oncol 64:141-152
19. Boyum A. (1968)  
**Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents.** Scand J Clin Lab Invest Suppl 97:31-50
20. Budach W, Classen J, Belka C, Bamberg M (1998)  
**Clinical impact of predictive assays for acute and late radiation morbidity.** Strahlenther Onkol 174 Suppl 3:20-24
21. Bustin SA. (2000)  
**Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** J Mol Endocrinol 25:169-93
22. Bustin SA. (2002)

- Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.** *J Mol Endocrinol* 29:23-39
23. Bustin SA, Mueller R (2005)  
**Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis.** *Clin Sci (Lond)* 109:365-379
24. Cannell EJ, Farrell PJ, Sinclair AJ (1998)  
**Cell cycle arrest following exposure of EBV-immortalised B-cells to gamma irradiation correlates with inhibition of cdk2 activity.** *FEBS Lett* 439:297-301
25. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B (1998)  
**p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells.** *Oncogene* 16:311-320
26. Chomczynski P, Sacchi N (1987)  
**Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 162:156-9
27. Costa RM, Chigancas V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CF (2003)  
**The eukaryotic nucleotide excision repair pathway.** *Biochimie* 85:1083-1099
28. Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR, Meyer L, Nahum A, Tait D, Yarnold J, Horwich A (1999)  
**Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial.** *Lancet* 353:267-272
29. Delia D, Goi K, Mizutani S, Yamada T, Aiello A, Fontanella E, Lamorte G, Iwata S, Ishioka C, Krajewski S, Reed JC, Pierotti MA (1997)  
**Dissociation between cell cycle arrest and apoptosis can occur in Li-Fraumeni cells heterozygous for p53 gene mutations.** *Oncogene* 14:2137-2147
30. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE (1995)  
**Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33:781-796
31. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994)  
**DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts.** *Genes Dev* 8:2540-2551
32. Dickson J, Magee B, Stewart A, West CM (2002)  
**Relationship between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiation reactions: a comparison of training and validation cohorts of breast cancer patients.** *Radiother Oncol* 62:321-326
33. Dorr W. (2003)  
**Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results.** *Int J Radiat Biol* 79:531-537

34. Dorsett Y, Tuschl T (2004)  
**siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics.** Nat Rev Drug Discov 3:318-329
35. Dotto GP. (2000)  
**p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?** Biochim Biophys Acta 1471:M43-M56
36. El Deiry WS. (1998)  
**Regulation of p53 downstream genes.** Semin Cancer Biol 8:345-357
37. El Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, . (1994)  
**WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis.** Cancer Res 54:1169-1174
38. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001)  
**Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** Nature 411:494-498
39. Fan S, Chang JK, Smith ML, Duba D, Fornace AJ, Jr., O'Connor PM (1997)  
**Cells lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard.** Oncogene 14:2127-2136
40. Featherstone C, Jackson SP (1999)  
**Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions?** Mutat Res 434:3-15
41. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998a)  
**Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.** Nature 391:806-811
42. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998b)  
**Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.** Nature 391:806-811
43. Ford JM. (2005)  
**Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53.** Mutat Res 577:195-202
44. Frankenberg-Schwager M. (1990)  
**Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells.** Radiat Environ Biophys 29:273-292
45. Fransson P, Bergstrom P, Lofroth PO, Widmark A (2002)  
**Prospective evaluation of urinary and intestinal side effects after BeamCath stereotactic dose-escalated radiotherapy of prostate cancer.** Radiother Oncol 63:239-248
46. Gartel AL, Tyner AL (2002)

- The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis.** Mol Cancer Ther 1:639-649
47. Gatti RA. (2001)  
**The inherited basis of human radiosensitivity.** Acta Oncol 40:702-711
48. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA (1993)  
**Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 27:1173-1179
49. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000)  
**An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.** Nature 404:293-296
50. Hanawalt PC, Crowley DJ, Ford JM, Ganesan AK, Lloyd DR, Nouspikel T, Smith CA, Spivak G, Tornaletti S (2000)  
**Regulation of nucleotide excision repair in bacteria and mammalian cells.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol 65:183-191
51. Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR (2003)  
**Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer.** Mutat Res 544:107-114
52. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993)  
**The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.** Cell 75:805-816
53. Harrison L, Hatahet Z, Wallace SS (1999)  
**In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites.** J Mol Biol 290:667-684
54. Hendry JH. (2001)  
**Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy.** Radiother Oncol 59:117-126
55. Herbig U, Sedivy JM (2006)  
**Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story.** Mech Ageing Dev 127:16-24
56. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993)  
**Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** Biotechnology (N Y ) 11:1026-1030
57. Hoeijmakers JH. (2001)  
**Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.** Nature 411:366-374
58. Hopewell JW, Nyman J, Turesson I (2003)  
**Time factor for acute tissue reactions following fractionated irradiation: a balance between repopulation and enhanced radiosensitivity.** Int J Radiat Biol 79:513-524

- 
59. Hummerich J, Werle-Schneider G, Popanda O, Celebi O, Chang-Claude J, Kropp S, Mayer C, Debus J, Bartsch H, Schmezer P (2006)  
**Constitutive mRNA expression of DNA repair-related genes as a biomarker for clinical radio-resistance: A pilot study in prostate cancer patients receiving radiotherapy.** *Int J Radiat Biol* 82:593-604
60. Hümmerich J. (2005) **Untersuchungen zur Erkennung individueller Strahlenempfindlichkeit durch Analyse von DNA-Reparaturgenen.**
61. Hurteau GJ, Spivack SD (2002)  
**mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts.** *Anal Biochem* 307:304-315
62. Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G (1999)  
**Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:424-428
63. Jackson SP. (2001)  
**Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks.** *Biochem Soc Trans* 29:655-661
64. Jackson SP. (2002)  
**Sensing and repairing DNA double-strand breaks.** *Carcinogenesis* 23:687-696
65. Jani AB, Hellman S (2003)  
**Early prostate cancer: clinical decision-making.** *Lancet* 361:1045-1053
66. Jeggo PA. (2002)  
**The fidelity of repair of radiation damage.** *Radiat Prot Dosimetry* 99:117-122
67. Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M (1996)  
**Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy.** *Radiother Oncol* 40:101-109
68. Karran P. (2000)  
**DNA double strand break repair in mammalian cells.** *Curr Opin Genet Dev* 10:144-150
69. Kastan MB, Lim DS (2000)  
**The many substrates and functions of ATM.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:179-186
70. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991)  
**Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.** *Cancer Res* 51:6304-6311
71. Kauffmann GW, Moser E, Sauer R. Radiologie. **Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin.** Urban und Schwarzenberg, 1996.
72. Khanna KK, Jackson SP (2001)

- DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.** Nat Genet 27:247-254
73. Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo ML, Himmelbauer H (2004)  
**An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division.** Nature 432:1036-1040
74. Komarova EA, Kondratov RV, Wang K, Christov K, Golovkina TV, Goldblum JR, Gudkov AV (2004)  
**Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice.** Oncogene 23:3265-3271
75. Kuraoka I, Bender C, Romieu A, Cadet J, Wood RD, Lindahl T (2000)  
**Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells.** Proc Natl Acad Sci U S A 97:3832-3837
76. Laemmli UK. (1970)  
**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227:680-685
77. Lalle P, Moyret-Lalle C, Wang Q, Vialle JM, Navarro C, Bressac-de Paillerets B, Magaud JP, Ozturk M (1995)  
**Genomic stability and wild-type p53 function of lymphoblastoid cells with germ-line p53 mutation.** Oncogene 10:2447-2454
78. Lindl T. **Zell- und Gewebekultur.** Spektrum Akademischer Verlag ed. 2002.
79. Mariano Ruiz dA, Guirado D, Isabel NM, Lopez E, Guerrero R, Teresa VM, Villalobos M, del Moral R (2002)  
**Individualization of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity.** Radiother Oncol 62:327-333
80. Mayer C, Popanda O, Zelezny O, von Brevern MC, Bach A, Bartsch H, Schmezer P (2002)  
**DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes.** DNA Repair (Amst) 1:237-250
81. McDonald ER, III, Wu GS, Waldman T, El Deiry WS (1996)  
**Repair Defect in p21 WAF1/CIP1 -/- human cancer cells.** Cancer Res 56:2250-2255
82. McManus MT, Sharp PA (2002)  
**Gene silencing in mammals by small interfering RNAs.** Nat Rev Genet 3:737-747
83. Miura Y. (2004)

- Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging.** J Radiat Res (Tokyo) 45:357-372
84. Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D (2000)  
**A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation.** Electrophoresis 21:128-134
85. Nantz MP, Rowe CA, Nieves C, Jr., Percival SS (2006)  
**Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate.** J Nutr 136:2606-2610
86. Ng JM, Vermeulen W, van der Horst GT, Bergink S, Sugawara K, Vrieling H, Hoeijmakers JH (2003)  
**A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein.** Genes Dev 17:1630-1645
87. Nilsson S, Norlen BJ, Widmark A (2004)  
**A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer.** Acta Oncol 43:316-381
88. Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990)  
**Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay.** Radiat Res 122:86-94
89. Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H (1999)  
**Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions.** Strahlenther Onkol 175:341-346
90. Oppitz U, Schulte S, Stopper H, Baier K, Muller M, Wulf J, Schakowski R, Flentje M (2002)  
**In vitro radiosensitivity measured in lymphocytes and fibroblasts by colony formation and comet assay: comparison with clinical acute reactions to radiotherapy in breast cancer patients.** Int J Radiat Biol 78:611-616
91. Palozza P, Luberto C, Ricci P, Sgarlata E, Calviello G, Bartoli GM (1996)  
**Effect of beta-carotene and canthaxanthin on tert-butyl hydroperoxide-induced lipid peroxidation in murine normal and tumor thymocytes.** Arch Biochem Biophys 325:145-151
92. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000)  
**A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage.** Curr Biol 10:886-895
93. Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE (2001)

- Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome.** Int J Radiat Biol 77:1007-1021
94. Pfaffl MW. (2001)  
**A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic Acids Res 29:e45
95. Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, Helmbold I, Gotzes F, Schmezer P, Thielmann HW, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Bartsch H (2003)  
**Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy.** Int J Radiat Biol 55:1216-1225
96. Raaphorst GP, Malone S, Szanto J, Gray R (2000)  
**Severe normal tissue complication correlates with increased in vitro fibroblast radiosensitivity in radical prostate radiotherapy: a case report.** Int J Cancer 90:336-342
97. Rasmussen R. Rapid Cycle **Real-time PCR, Methods and Applications.** In: Meuer S and Wittwer CNK, eds. Quantification on the LightCycler. Springer Press, Heidelberg, 2001:21-34.
98. Rees E, Korn B, Falter C, Fernholz E. (2006) **siRNA Silencing of Lamin A and Quantification of the Knockdown Effect via qPCR.** Biochemica No.2.
99. Rieger KE, Chu G (2004)  
**Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells.** Nucleic Acids Res 32:4786-803
100. Roche Applied Science. (2001) **Relative Quantification.** Technical Note LC 13/2001.
101. Roche Applied Science. (2003) **Overview of LightCycler Quantification Methods.** Technical Note LC 10/ update 2003.
102. Rosen EM, Fan S, Goldberg ID, Rockwell S (2000a)  
**Biological basis of radiation sensitivity. Part 1: Factors governing radiation tolerance.** Oncology (Williston Park) 14:543-550
103. Rosen EM, Fan S, Goldberg ID, Rockwell S (2000b)  
**Biological basis of radiation sensitivity. Part 2: Cellular and molecular determinants of radiosensitivity.** Oncology (Williston Park) 14:741-757
104. Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID (1999)  
**The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation.** Cancer Invest 17:56-72
105. Rotman G, Shiloh Y (1999)  
**ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress.** Oncogene 18:6135-44

106. Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ, Flentje M (1997)  
**In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer.** *Radiother Oncol* 43:181-188
107. RZPD. (2005) **esiWay RNA Resource.** Resource Handbook .
108. Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH (2002)  
**Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52:198-204
109. Sancar A. (1996)  
**DNA excision repair.** *Annu Rev Biochem* 65:43-81
110. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004)  
**Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.** *Annu Rev Biochem* 73:39-85
111. Schagger H, von Jagow G (1987)  
**Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** *Anal Biochem* 166:368-379
112. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006)  
**The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** *BMC Mol Biol* 7:3
113. Seegenschmiedt MH. (1998)  
**Interdisciplinary documentation of treatment side effects in oncology. Present status and perspectives.** *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 3:25-29
114. Shiloh Y. (2001)  
**ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage.** *Curr Opin Genet Dev* 11:71-77
115. Shiloh Y. (2003)  
**ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.** *Nat Rev Cancer* 3:155-168
116. Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F, Sugawara K (2003)  
**Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase.** *EMBO J* 22:164-173
117. Siede W, Eckardt-Schupp F (1986)  
**DNA repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*: complementing *rad4* and *rev2* mutations by plasmids which cannot be propagated in *Escherichia coli*.** *Curr Genet* 11:205-210

118. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988)  
**A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exp Cell Res 175:184-191
119. Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F (2001)  
**A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair.** Genes Dev 15:507-521
120. Tan T, Chu G (2002)  
**p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice.** Mol Cell Biol 22:3247-3254
121. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A (1996)  
**Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients.** Int J Radiat Oncol Biol Phys 36:1065-75
122. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001)  
**Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** Proc Natl Acad Sci U S A 98:5116-5121
123. Twardella D, Chang-Claude J (2002)  
**Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view - overview of methods and results.** Radiother Oncol 62:249-260
124. Valerie K, Povirk LF (2003)  
**Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair.** Oncogene 22:5792-812
125. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001)  
**Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection.** Nat Rev Genet 2:196-206
126. Vilenchik MM, Knudson AG (2003)  
**Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer.** Proc Natl Acad Sci U S A 100:12871-12876
127. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000)  
**Surfing the p53 network.** Nature 408:307-310
128. Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH (2001)  
**Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo.** Mol Cell 8:213-224
129. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B (1995b)  
**p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells.** Cancer Res 55:5187-5190
130. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B (1995a)

- p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells.** *Cancer Res* 55:5187-5190
131. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B (1995c)  
**p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells.** *Cancer Res* 55:5187-5190
132. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, Williams J (1997)  
**Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy.** *Nat Med* 3:1034-1036
133. Wei S, Friedberg EC (1998)  
**A fragment of the yeast DNA repair protein Rad4 confers toxicity to E. coli and is required for its interaction with Rad7 protein.** *Mutat Res* 400:127-133
134. West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, Hunter RD (2001)  
**Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:10-15
135. Widel M, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A (2003)  
**Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy.** *Radiat Res* 159:713-721
136. Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN (2004)  
**Repair of radiation damage to DNA.** *Br J Cancer* 90:1297-1301
137. Woods DB, Vousden KH (2001)  
**Regulation of p53 function.** *Exp Cell Res* 264:56-66
138. Wouters BG, Giaccia AJ, Denko NC, Brown JM (1997)  
**Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism.** *Cancer Res* 57:4703-4706
139. Yang M, Kang MJ, Choi Y, Kim CS, Lee SM, Park CW, Lee HS, Tae K (2005)  
**Associations between XPC expression, genotype, and the risk of head and neck cancer.** *Environ Mol Mutagen* 45:374-379
140. Yang N, Chaudhry MA, Wallace SS (2006)  
**Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells.** *DNA Repair (Amst)* 5:43-51
141. Zhan Q. (2005)  
**Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage.** *Mutat Res* 569:133-143
142. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ (2000a)

**Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays.**

Genes Dev 14:981-993

143. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ (2000b)

**The transcriptional program following p53 activation.** Cold Spring Harb Symp Quant

Biol 65:475-482



## 6 Anhang

**Tabelle 6.1: Liste der verwendeten Primer**

Primer-Name	Accession Number		Sequenz (5'-3')	Länge Produkt [bp]	Anwendung
CLTC, 5'	NC_000017.9	for	GAC AGT GCC ATC ATG AAT CC	570	Kontrolle der Reversen Transkription
		rev	TTT GTG CTT CTG GAG GAA AAG AA		
CLTC, 3'	NC_000017.9	for	GCT CAC ATG GGA ATG TTC AC	550	Kontrolle der Reversen Transkription
		rev	ATG TTG TCA AAG TTG TCA TAA G		
GADD45 A-extern	L24498	for	ACC GAA AGG ATG GAT AAG GTG	374	Herstellung des Eichstandards
		rev	TCC TTC CAT TGA GAT GAA TGTG		
XPC-extern	AY131066	for	AGA GAA AGA AGT GAA AAG ATA AAA CTG G	390	Herstellung des Eichstandards
		rev	AAT CAG TAA GAA TAT ATG GAC CAA TTC C		
DDB2-extern	AY220533	for	TGA AGT TTA ACC CTC TCA ATA CCA AC	324	Herstellung des Eichstandards
		rev	AAA TTT TCA CTG TTT GAT CTA CGG AG		
ATLTP6-extern	AF159803	for	CTG CAA CGG TCT CAC AAC AC	183	Herstellung des Eichstandards
		rev	TCA GTG GAA GGG CTG AAC TT		
CDKN1A	AF497972	for	GTC CGT CAG AAC CCA TGC	153	Realtime-PCR
		rev	AGT GGT GTC TCG GTG ACA AA		
PCNA	AF527838	for	CTC AAG AAG GTG TTG GAG GC	147	Realtime-PCR
		rev	GTA GGT GTC GAA GCC CTC AG		
TP53	NM_000546.2	for	GCA CTG GTG TTT TGT TGT GG	181	Realtime-PCR
		rev	CCC CTG GTT AAG TAC GGT GA		
ATLTP6	AF159803	for	CAG GCT CAA ACT TCT GTG GA	131	Realtime-PCR
		rev	GGG AGA TCG ACA CCA CAT TT		
ACTB	AF582799	for	GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA	203	Realtime-PCR
		rev	GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA		
XPC	AY131066	for	ACC TGG TGA AGT GGT TCA TTG	73	Realtime-PCR
		rev	TGC AGG TTA TCT TGT TCA CTG G		
DDB2	AY220533	for	ACA CCA TCA ACA TCT GGT TTT G	81	Realtime-PCR
		rev	CGT TCC CCA CGT TGT CTC		
GADD45 A	L24498	for	GTC GAC CCC GAT AAC GTG	125	Realtime-PCR
		rev	AGG ATG TTG ATG TCG TTC TCG		
T7			TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAG GG		Amplifizierung der esiRNA Resource

**Tabelle 6.2: Induktion der Gene *CDKN1A*, *PCNA*, *TP53*, *DDB2*, *XPC* und *GADD45A* 4h nach  $\gamma$ -Bestrahlung im untersuchten Patientenkollektiv**

Patient	Induktionsfaktoren der Gene					
	<i>CDKN1A</i>	<i>PCNA</i>	<i>TP53</i>	<i>DDB2</i>	<i>XPC</i>	<i>GADD45A</i>
1	5.24	5.77	1.54	4.50	2.49	6.05
2	6.74	5.11	1.41	3.74	3.14	3.68
3	7.99	12.21	1.77	7.52	2.51	8.19
4	8.22	4.22	1.90	2.55	1.50	6.81
6	7.21	5.78	0.94	3.35	2.77	3.93
9	11.45	10.98	2.17	6.92	2.87	10.72
10	6.98	7.35	1.77	4.48	3.27	6.36
11	7.80	5.19	0.90	3.72	2.98	3.24
14	4.29	6.34	1.88	4.01	3.28	7.71
15	4.57	10.71	1.37	0.12	3.67	4.03
17	1.21	1.66	0.22	1.70	0.75	1.38
24	6.72	7.18	1.64	6.03	3.08	5.70
25	3.86	1.98	1.20	1.00	2.59	3.62
27	7.58	6.53	1.75	3.52	3.12	5.32
28	4.90	5.10	0.76	1.99	1.66	3.51
29	7.24	5.02	1.29	3.33	2.49	4.83
30	3.56	3.64	1.93	3.11	5.10	7.73
31	4.50	2.60	0.99	3.00	2.00	9.03
32	3.82	4.28	0.86	2.23	2.46	3.54
33	5.81	5.15	1.71	3.79	2.55	3.78
34	3.86	5.47	1.24	4.21	3.44	2.44
36	10.55	13.99	2.04	5.41	5.77	7.61
37	5.13	8.56	2.22	4.79	3.54	7.02
38	6.39	4.52	0.59	3.49	3.30	4.23
41	11.85	5.77	1.63	3.37	2.21	5.85
42	4.01	2.91	1.00	2.21	2.87	3.56
47	7.06	5.74	1.19	1.97	1.62	3.55
48	4.13	8.72	1.80	3.85	2.89	6.95
49	9.53	5.08	0.99	2.54	1.92	3.37
50	2.02	3.26	0.98	2.28	1.53	4.92
51	5.17	3.83	1.36	2.05	2.23	3.65
55	6.61	3.63	0.64	2.71	2.89	4.54
56	10.97	7.89	1.97	2.97	2.50	8.67
58	7.39	12.22	1.72	5.48	4.69	10.37
60	1.60	3.04	0.46	1.36	0.68	6.53
61	5.02	4.78	2.02	3.84	4.15	4.59
63	6.01	6.36	1.57	2.76	2.05	5.45
67	3.03	2.98	1.31	3.70	4.56	3.56
68	4.99	4.95	1.48	3.91	1.99	6.19
69	7.02	6.76	1.51	2.98	1.96	6.61
74	7.91	10.35	2.25	3.89	2.91	6.89
78	0.88	9.60	3.44	6.11	3.80	9.77
79	4.55	4.53	0.93	1.66	1.14	4.73
80	7.70	8.88	1.26	5.88	3.96	9.25
81	0.38	8.31	1.49	6.70	3.17	16.19
83	21.23	13.82	2.73	6.29	4.29	11.74
86	12.74	12.49	2.05	6.15	5.16	8.36
87	7.47	7.52	1.75	4.07	2.52	8.07
88	4.79	9.96	2.02	3.86	3.43	6.45
89	8.56	7.39	1.57	3.23	1.71	5.63

Patient	Induktionsfaktoren der Gene					
	<i>CDKN1A</i>	<i>PCNA</i>	<i>TP53</i>	<i>DDB2</i>	<i>XPC</i>	<i>GADD45A</i>
95	10.28	4.52	1.13	2.76	1.73	4.88
96	9.36	6.66	2.11	3.28	2.25	5.96
97	6.31	6.88	1.33	4.83	2.59	9.74
98	0.43	5.07	1.19	3.15	3.48	7.19
101	5.28	8.25	1.78	3.39	2.21	11.54
103	10.69	10.52	2.60	3.78	3.44	5.57
105	1.60	7.19	1.56	5.79	3.02	5.19
106	8.04	7.42	1.95	5.51	3.61	18.24
108	4.01	3.70	1.36	2.37	2.42	4.26
121	4.13	4.95	1.90	2.74	2.10	6.65
126	15.74	7.75	2.01	5.31	5.26	12.08
127	6.30	7.08	1.63	5.18	3.55	7.40
128	6.16	5.29	1.12	3.57	2.61	6.64
134	3.74	5.09	1.03	2.85	1.88	6.32
135	3.73	4.63	1.25	1.87	1.16	6.18
136	8.95	6.59	1.39	3.53	2.19	8.54
140	7.16	8.99	2.36	5.50	2.24	11.73
141	7.05	8.47	1.99	4.77	3.53	11.33
144	11.62	5.17	0.92	1.69	1.09	5.12
149	5.10	3.83	1.34	3.13	5.12	2.27
150	10.26	4.68	1.15	3.52	1.74	4.65
153	5.03	4.94	1.35	2.22	2.40	5.03
155	5.48	6.58	0.81	2.68	1.75	5.60
157	5.08	6.32	1.42	2.02	1.35	6.85
158	11.98	8.41	2.26	4.94	2.36	8.05
160	5.62	5.24	1.35	2.82	1.59	5.73
163	4.30	6.26	1.48	3.10	2.20	8.15
167	8.59	6.28	2.34	3.52	1.66	5.14
168	5.09	7.22	1.52	3.56	0.29	8.27
169	7.12	7.71	1.73	2.10	1.15	5.16
171	8.25	7.26	2.27	4.44	1.94	7.45
172	5.80	10.13	1.63	4.43	2.22	14.51
174	5.56	5.37	1.27	4.17	4.14	11.54
179	7.10	8.33	1.45	3.64	1.39	9.64
188	7.49	5.28	1.11	2.38	0.85	5.33
189	8.08	6.29	2.01	5.00	2.66	6.57
192	9.15	10.47	1.47	7.36	4.19	9.81
194	20.47	5.90	3.59	3.64	3.10	3.64
201	14.53	4.77	1.76	3.26	2.09	7.28
202	12.08	5.27	1.56	3.24	2.66	8.40
210	5.29	4.99	1.37	2.58	1.21	7.26
215	12.58	4.99	1.42	2.59	1.57	3.94
218	7.29	3.91	1.20	2.02	1.28	5.88
221	7.50	4.39	0.98	1.94	1.06	3.43
229	12.46	5.21	1.28	2.48	2.31	3.99
237	11.27	2.32	0.84	1.67	1.35	2.27
242	17.87	8.09	2.47	3.99	3.41	8.21
248	3.39	4.44	0.97	2.22	0.49	4.86
250	5.63	4.81	1.77	3.65	3.72	4.06

**Tabelle 6.3: Assoziation der Geninduktion von *CDKN1A*, *PCNA* und *TP53*, aufgeteilt in Terzile, mit ausgewählten Charakteristika**

	<i>CDKN1A</i> -Induktionsfaktoren				<i>PCNA</i> -Induktionsfaktoren				<i>TP53</i> -Induktionsfaktoren			
	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert
<b>Klinische Strahlenempfindlichkeit</b>												
normalempfindlich (CTC 0-2)	23 (70)	25 (76)	20 (61)		20 (61)	25 (76)	23 (70)		22 (67)	24 (73)	22 (67)	
überempfindlich (CTC 3+4)	10 (30)	8 (24)	13 (39)	0.4	13 (39)	8 (24)	10 (30)	0.1	11 (23)	9 (27)	11 (23)	0.8
<b>Alter</b>												
<= Median	16 (48)	21 (64)	14 (42)		17 (52)	17 (52)	17 (52)		16 (48)	18 (55)	17 (52)	
> Median	17 (52)	12 (36)	19 (58)	0.2	16 (48)	16 (48)	16 (48)	1.0	17 (52)	15 (45)	16 (48)	0.9
<b>BMI</b>												
<25	2 (6)	3 (9)	6 (18)		0 (0)	7 (21)	4 (12)		4 (12)	3 (9)	4 (12)	
25-29	19 (57)	22 (67)	20 (61)		18 (55)	22 (67)	21 (64)		15 (46)	23 (70)	23 (70)	
>29	12 (36)	8 (24)	7 (21)	0.4*	15 (45)	4 (12)	8 (24)	0.004*	14 (42)	7 (21)	6 (18)	0.2*
<b>Rauchverhalten</b>												
nie	14 (42)	14 (42)	14 (42)		16 (48)	12 (36)	14 (42)		19 (58)	13 (39)	10 (30)	
jemals	19 (58)	19 (58)	19 (58)	1.0	17 (52)	21 (74)	19 (58)	0.6	14 (42)	20 (61)	23 (70)	0.07
in letzten 20 Jahren nicht geraucht <sup>†</sup>	21 (70)	22 (71)	24 (75)		23 (72)	22 (67)	22 (79)		27 (84)	21 (68)	19 (63)	
in letzten 20 Jahren geraucht <sup>†</sup>	9 (30)	9 (29)	8 (25)	0.9	9 (28)	11 (23)	6 (21)	0.6	5 (16)	10 (32)	11 (37)	0.1
nie <sup>‡</sup>	14 (47)	14 (45)	14 (44)		16 (50)	12 (36)	14 (50)		19 (59)	13 (42)	10 (33)	
in letzten 20 Jahren nicht geraucht <sup>†</sup>	7 (23)	8 (26)	10 (31)		7 (22)	10 (30)	8 (29)		8 (25)	8 (26)	9 (30)	
in letzten 20 Jahren geraucht <sup>†</sup>	9 (30)	9 (29)	8 (25)	1.0	9 (28)	11 (33)	6 (21)	0.7	5 (16)	10 (31)	11 (37)	0.3
<b>Tabakkonsum (Pack-Years)<sup>#</sup></b>												
<b>Gruppen</b>												
0	14 (47)	14 (45)	14 (45)		16 (50)	12 (36)	14 (52)		19 (59)	13 (42)	10 (33)	
1-19	8 (27)	7 (23)	9 (29)		7 (22)	9 (27)	8 (30)		6 (16)	6 (20)	12 (40)	
≥ 20	8 (27)	10 (32)	8 (27)	1.0	9 (28)	12 (36)	5 (18)	0.6	7 (22)	11 (37)	8 (27)	0.1
<b>dichotomisiert bzgl. Median</b>												
0-5	14 (47)	16 (52)	14 (45)		16 (50)	14 (42)	14 (52)		19 (59)	14 (47)	11 (37)	
≥ 6	16 (53)	15 (48)	17 (55)	0.9	16 (50)	19 (58)	13 (48)	0.7	13 (41)	16 (53)	19 (63)	0.2

<sup>†</sup>Es fehlen Daten von 6 Patienten. <sup>#</sup> Es fehlen Daten von 7 Patienten. \* exakter Test nach Fisher

**Tabelle 6.4: Assoziation der Geninduktion von *XPC*, *DDB2* und *GADD45A*, aufgeteilt in Terzile, mit ausgewählten Charakteristika**

	<i>XPC</i> -Induktionsfaktoren				<i>DDB2</i> -Induktionsfaktoren				<i>GADD45A</i> -Induktionsfaktoren			
	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert
<b>Klinische Strahlenempfindlichkeit</b>												
normalempfindlich ( <i>CTC</i> 0-2)	21 (64)	25 (76)	22 (67)		21 (64)	24 (73)	23 (70)		23 (70)	22 (67)	23 (70)	
überempfindlich ( <i>CTC</i> 3+4)	12 (36)	8 (24)	11 (23)	0.5	12 (36)	9 (27)	10 (30)	0.7	10 (30)	11 (23)	10 (30)	1.0
<b>Alter</b>												
<= Median	16 (48)	21 (64)	14 (42)		19 (58)	18 (55)	14 (42)		16 (48)	18 (55)	17 (52)	
> Median	17 (52)	12 (36)	19 (58)	0.2	14 (42)	15 (45)	19 (58)	0.4	17 (52)	15 (45)	16 (48)	0.9
<b>BMI</b>												
<25	3 (9)	7 (21)	1 (3)		4 (12)	2 (6)	5 (15)		3 (9)	4 (12)	4 (12)	
25-29	18 (55)	20 (61)	23 (70)		19 (58)	23 (70)	19 (58)		18 (55)	22 (67)	21 (65)	
>29	12 (36)	6 (18)	9 (27)	0.1*	10 (30)	8 (24)	9 (27)	0.7*	12 (36)	7 (21)	8 (24)	0.7*
<b>Rauchverhalten</b>												
nie	18 (55)	16 (48)	8 (24)		18 (55)	9 (27)	15 (45)		16 (48)	11 (23)	15 (45)	
jemals	15 (45)	17 (52)	25 (76)	0.03	15 (45)	24 (73)	18 (55)	0.07	17 (52)	22 (37)	18 (55)	0.4
in letzten 20 Jahren nicht geraucht <sup>+</sup>	25 (78)	25 (81)	17 (57)		27 (82)	16 (53)	24 (80)		24 (73)	18 (60)	25 (83)	
in letzten 20 Jahren geraucht <sup>+</sup>	7 (22)	6 (19)	13 (43)	0.07	6 (18)	14 (47)	6 (20)	0.02	9 (27)	12 (40)	5 (17)	0.1
nie <sup>+</sup>	18 (56)	16 (52)	8 (27)		18 (55)	9 (30)	15 (50)		16 (48)	11 (37)	15 (50)	
in letzten 20 Jahren nicht geraucht <sup>+</sup>	7 (22)	9 (29)	9 (30)		9 (27)	7 (23)	9 (30)		8 (24)	7 (23)	10 (33)	
in letzten 20 Jahren geraucht <sup>+</sup>	7 (22)	6 (19)	13 (43)	0.1	6 (18)	14 (47)	6 (20)	0.08	9 (27)	12 (40)	5 (17)	0.4
<b>Tabakkonsum (Pack-years)<sup>#</sup></b>												
<b>Gruppen</b>												
0	18 (56)	16 (52)	8 (28)		18 (55)	9 (30)	15 (52)		16 (48)	11 (37)	15 (52)	
1-19	6 (19)	7 (22)	11 (38)		8 (24)	7 (23)	9 (31)		6 (18)	12 (40)	6 (21)	
≥ 20	8 (25)	8 (26)	10 (34)	0.2	7 (21)	14 (47)	5 (17)	0.08	11 (33)	7 (23)	8 (28)	0.3
<b>dichotomisiert bzgl. Median</b>												
0-5	18 (56)	16 (52)	10 (35)		18 (55)	11 (37)	15 (52)		17 (52)	12 (40)	15 (79)	
≥ 6	14 (44)	15 (48)	19 (65)	0.2	15 (45)	19 (63)	14 (48)	0.3	16 (48)	18 (60)	14 (21)	0.6

<sup>+</sup>Es fehlen Daten von 6 Patienten. <sup>#</sup> Es fehlen Daten von 7 Patienten. \* exakter Test nach Fisher

**Tabelle 6.5: Assoziation der Geninduktion von *CDKN1A*, *PCNA* und *TP53*, aufgeteilt in Terzile, mit dem Antioxidantienstatus**

	<i>CDKN1A</i> -Induktionsfaktoren				<i>PCNA</i> -Induktionsfaktoren				<i>TP53</i> -Induktionsfaktoren			
	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert
<b>Ascorbinsäure</b>												
<= Median	21 (64)	12 (38)	18 (55)		14 (42)	16 (48)	22 (67)		15 (45)	19 (58)	18 (55)	
> Median	12 (36)	20 (62)	15 (45)	0.1	19 (58)	17 (52)	11 (33)	0.1	18 (55)	14 (42)	15 (45)	0.6
<b><math>\alpha</math>-Carotin<sup>#</sup></b>												
<= Median	14 (47)	16 (50)	19 (59)		17 (55)	16 (50)	16 (52)		13 (41)	20 (65)	16 (50)	
> Median	16 (53)	16 (50)	13 (41)	0.6	14 (45)	16 (50)	15 (48)	0.9	18 (59)	11 (35)	16 (50)	0.2
<b><math>\beta</math>-Carotin<sup>#</sup></b>												
<= Median	13 (43)	18 (56)	19 (59)		15 (48)	15 (47)	20 (65)		12 (39)	22 (71)	16 (50)	
> Median	17 (47)	14 (44)	13 (41)	0.4	16 (52)	17 (53)	11 (35)	0.3	19 (61)	9 (29)	16 (50)	0.04
<b>Canthaxanthin<sup>#</sup></b>												
<= Median	20 (67)	17 (53)	14 (44)		19 (61)	15 (47)	17 (55)		21 (68)	18 (59)	12 (38)	
> Median	10 (33)	15 (47)	18 (56)	0.2	12 (39)	17 (53)	14 (45)	0.5	10 (32)	13 (41)	20 (62)	0.048
<b>Cryptoxanthin<sup>#</sup></b>												
<= Median	15 (50)	16 (50)	19 (59)		15 (48)	15 (47)	20 (65)		15 (48)	21 (68)	14 (44)	
> Median	15 (50)	16 (50)	13 (41)	0.7	16 (52)	17 (53)	11 (35)	0.3	16 (52)	10 (32)	18 (56)	0.1
<b>Lutein<sup>#</sup></b>												
<= Median	17 (57)	12 (38)	22 (69)		19 (61)	16 (50)	16 (48)		20 (65)	15 (48)	16 (50)	
> Median	13 (43)	20 (62)	10 (31)	0.04	12 (39)	16 (50)	15 (52)	0.6	11 (35)	16 (52)	16 (50)	0.4
<b>Lycopin<sup>#</sup></b>												
<= Median	16 (53)	12 (38)	20 (62)		16 (52)	14 (44)	18 (58)		14 (45)	18 (58)	16 (50)	
> Median	14 (47)	20 (62)	12 (38)	0.1	15 (48)	18 (56)	13 (42)	0.5	17 (55)	13 (42)	16 (50)	0.6
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol<sup>#</sup></b>												
<= Median	15 (50)	16 (50)	21 (66)		14 (45)	17 (53)	21 (68)		18 (58)	16 (52)	18 (56)	
> Median	15 (50)	16 (50)	11 (34)	0.4	17 (55)	15 (47)	10 (32)	0.2	13 (42)	15 (48)	14 (44)	0.9
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol<sup>#</sup></b>												
<= Median	14 (47)	16 (50)	18 (44)		18 (58)	12 (38)	18 (58)		14 (45)	19 (61)	15 (47)	
> Median	16 (53)	16 (50)	14 (56)	0.7	13 (42)	20 (62)	13 (42)	0.2	17 (55)	12 (39)	17 (53)	0.4

<sup>#</sup> Es fehlen Daten von 5 Patienten

**Tabelle 6.6: Assoziation der Geninduktion von *XPC*, *DDB2* und *GADD45A*, aufgeteilt in Terzile, mit dem Antioxidantienstatus**

	<i>XPC</i> -Induktionsfaktoren				<i>DDB2</i> -Induktionsfaktoren				<i>GADD45A</i> -Induktionsfaktoren			
	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert	1. Tertil n (%)	2. Tertil n (%)	3. Tertil n (%)	p-Wert
<b>Ascorbinsäure</b>												
<= Median	15 (45)	16 (48)	21 (64)		13 (39)	17 (52)	22 (67)		12 (36)	18 (55)	22 (67)	
> Median	18 (55)	17 (52)	12 (36)	0.3	20 (61)	16 (48)	11 (33)	0.08	21 (64)	15 (45)	11 (33)	0.04
<b><math>\alpha</math>-Carotin<sup>#</sup></b>												
<= Median	19 (58)	12 (39)	18 (60)		14 (45)	18 (58)	17 (53)		14 (47)	19 (61)	16 (48)	
> Median	14 (42)	19 (61)	12 (40)	0.2	17 (55)	13 (42)	15 (47)	0.6	16 (53)	12 (39)	17 (52)	0.5
<b><math>\beta</math>-Carotin<sup>#</sup></b>												
<= Median	18 (55)	15 (48)	17 (57)		14 (45)	18 (58)	18 (56)		13 (43)	17 (55)	20 (57)	
> Median	15 (45)	16 (52)	13 (43)	0.8	17 (55)	13 (42)	14 (44)	0.6	17 (57)	14 (45)	15 (43)	0.4
<b>Canthaxanthin<sup>#</sup></b>												
<= Median	17 (52)	18 (58)	16 (53)		17 (55)	17 (55)	17 (53)		21 (70)	12 (39)	18 (55)	
> Median	16 (48)	13 (42)	14 (47)	0.9	14 (45)	14 (45)	15 (47)	1.0	9 (30)	19 (61)	15 (45)	0.049
<b>Cryptoxanthin<sup>#</sup></b>												
<= Median	19 (58)	14 (45)	17 (57)		14 (45)	18 (58)	18 (56)		15 (50)	14 (45)	21 (64)	
> Median	14 (42)	17 (55)	13 (43)	0.5	17 (55)	13 (42)	14 (44)	0.5	15 (50)	17 (55)	12 (36)	0.3
<b>Lutein<sup>#</sup></b>												
<= Median	22 (67)	16 (52)	13 (43)		17 (55)	18 (58)	16 (50)		19 (63)	14 (45)	18 (55)	
> Median	11 (33)	15 (48)	17 (57)	0.2	14 (45)	13 (42)	16 (50)	0.8	11 (37)	17 (55)	15 (45)	0.4
<b>Lycopin<sup>#</sup></b>												
<= Median	16 (48)	12 (39)	20 (67)		10 (32)	19 (61)	19 (59)		15 (50)	15 (48)	18 (55)	
> Median	17 (52)	19 (61)	10 (33)	0.09	21 (68)	12 (39)	13 (41)	0.04	15 (50)	16 (52)	15 (45)	0.9
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol<sup>#</sup></b>												
<= Median	18 (55)	17 (55)	17 (57)		15 (48)	19 (61)	18 (56)		17 (57)	13 (42)	22 (67)	
> Median	15 (45)	14 (45)	13 (43)	1.0	16 (52)	12 (39)	14 (44)	0.6	13 (43)	18 (58)	11 (33)	0.1
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol<sup>#</sup></b>												
<= Median	19 (58)	13 (42)	16 (53)		16 (52)	16 (52)	16 (50)		16 (53)	13 (42)	19 (58)	
> Median	14 (42)	18 (58)	14 (47)	0.4	15 (48)	15 (48)	16 (50)	1.0	14 (47)	18 (58)	14 (42)	0.4

<sup>#</sup> Es fehlen Daten von 5 Patienten



## 7 Veröffentlichungen

### Publikationen

Wiebalk, K., Schmezer, P., Kropp, S., Chang-Claude, J., Celebi, O., Debus, J., Bartsch, H., Popanda, O. (2006). **Radiation-induced expression of XPC mRNA as a possible biomarker for developing adverse reactions during radiotherapy**, zur Veröffentlichung eingereicht

Arnold, K., Kim, M.K., Frerk, K., Edler, L., Savelyeva, L., Schmezer, P., Wiedemeyer, R. (2006). **Lower level of BRCA2 protein in heterozygous mutation carriers is correlated with an increase in DNA double strand breaks and an impaired DSB repair**. *Cancer Lett* 2006, 243, 90-100.

### Posterbeiträge

Frerk, K., Schmezer, P., Kropp, S., Chang-Claude, J., Celebi, O., Debus, J., Bartsch, H., Popanda, O. **mRNA expression of XPC as biomarker for sensitivity to ionizing radiation**. *Workshop on Radiation Damage to DNA*, Antalya, Mai 2006

Popanda, O., Frerk, K., Woelfelschneider, A., Huemmerich, J., Debus, J., Chang-Claude, J., Bartsch, H., Schmezer, P. **DNA repair gene expression as biomarker for acute sensitivity to ionizing radiation**. *35<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society*, Kos, Juli 2005

Schmezer, P., Frerk, K., Chang-Claude, J., Debus, J., Celebi, O., Huemmerich, J., Zelezny, O., Bartsch, H., Popanda, O. **Transcriptional inducibility of CDKN1A and PCNA as potential biomarker for predicting cellular radiation hypersensitivity**. *96<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR)*, Anaheim, CA, USA, April 2005

Frerk, K., Schmezer, P., Debus, J., Chang-Claude, J., Bartsch, H., Popanda, O. **mRNA expression of CDKN1A and PCNA as biomarkers for sensitivity to ionizing radiation: studies in lymphocytes from prostate cancer patients**. *8<sup>th</sup> Meeting of the DNA-Reparatur-Netzwerk e.V.*, Ulm, September 2004



## 8 Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bei der Begleitung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Priv.-Doz. Dr. Odilia Popanda und Herrn Dr. Peter Schmezer bedanken.

Herrn Prof. Dr. Helmut Bartsch danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion in der Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Für die gute Zusammenarbeit im gemeinsamen Projekt mit den Prostatakrebspatienten danke ich Frau Prof. Dr. Jenny Chang-Claude, Leiterin der Arbeitsgruppe für Genetische Epidemiologie am Deutschen Krebsforschungszentrum, und ihren Mitarbeiterinnen Dr. Silke Kropp, Sabine Behrens und Kati Smit.

Für ihre wertvollen Anregungen und Hilfe bei Fragen zu Zellkultur und Durchflusszytometrie möchte ich Karin Klimo, Gerlinde Pappa und Lydia Pan ganz besonders danken.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. Annette Kopp-Schneider und Herrn Dr. Marc Weimer aus der Abteilung Biostatistik.

Weiterhin danke ich Dr. Monica Hollstein und Annette Weninger für die Einweisung in den Agilent 2100 Bioanalyser sowie die Erlaubnis zur Nutzung dieses Geräts.

Mein größter Dank jedoch gilt Reinhard Gliniorz, Jörg Hümmerich, Dr. Claudia Mayer, Priv.-Doz. Dr. Odilia Popanda, Werner Popanda, Dr. Peter Schmezer, Peter Waas, Dr. Gisela Werle-Schneider, Andreas Wölfelschneider und Otto Zelezny aus der Arbeitsgruppe „Genetische Toxikologie und DNA-Reparatur“ für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die hervorragende Atmosphäre sowohl im Labor als auch privat, durch die die vergangenen Jahre etwas ganz besonderes für mich geworden sind.

Ganz herzlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während des Studiums und der Doktorarbeit immer unterstützt haben.



