

Aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie  
(Prof. Dr. rer.nat. Dr. med Clemens-F. Hess)  
Im Zentrum Radiologie  
Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Oxidativer Stress als Biomarker für die (Neben-) Wirkungen von  
Strahlentherapie:  
Bestimmung von Isoprostanspiegeln und Genexpressionsprofilen in  
Patientenproben**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Friedrich Kluge  
aus  
Vechta

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: PD Dr. med. R. Hermann

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer.nat. Virsik-Köpp

3. Berichterstatter/in: PD. Dr. med. Liersch

Tag der mündlichen Prüfung: Dienstag, den 29. November 2011

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Klinische Bedeutung der Strahlentherapie in der Onkologie.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Zelluläre Wirkungen der Strahlentherapie.....</i>	<i>1</i>
1.3	<i>Generierung und Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffverbindungen .....</i>	<i>2</i>
1.3.1	Entstehung von ROS .....	2
1.3.2	Detoxifizierung von ROS .....	5
1.4	<i>Isoprostane als Marker für oxidativen Stress.....</i>	<i>7</i>
1.5	<i>Genexpressionsprofile in der Onkologie.....</i>	<i>8</i>
1.5.1	Charakterisierung von Tumoren.....	8
1.5.2	Hilfe zur Therapieentscheidung.....	9
1.5.3	Tumormarker .....	9
1.5.4	Therapiemarker.....	9
1.6	<i>Zielsetzung .....</i>	<i>10</i>
1.7	<i>Arbeitsprogramm .....</i>	<i>10</i>
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Chemikalien .....</i>	<i>13</i>
2.2	<i>Verbrauchsmaterial .....</i>	<i>14</i>
2.3	<i>Geräte.....</i>	<i>14</i>
2.4	<i>Kits .....</i>	<i>15</i>
2.5	<i>Lösungen und Puffer.....</i>	<i>16</i>
2.6	<i>Software.....</i>	<i>16</i>
2.7	<i>Primer für real-time-PCR.....</i>	<i>17</i>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1	<i>Klinische Patientencharakteristika.....</i>	<i>18</i>
3.1.1	Isoprostane beim Rektumkarzinom .....	18
3.1.2	Isoprostane beim Prostatakarzinom.....	19
3.1.3	Genexpression Rektumkarziom.....	20
3.1.3.1	Pilotstudie .....	20
3.1.3.2	Bestätigungsstudie .....	21
3.2	<i>Probengewinnung für Isoprostane.....</i>	<i>22</i>
3.3	<i>Isoprostane Elisa .....</i>	<i>22</i>
3.4	<i>RNA-Probengewinnung.....</i>	<i>23</i>

---

3.5	<i>RNA-Isolierung</i> .....	24
3.6	<i>cDNA-Synthese</i> .....	25
3.7	<i>Quantitative real-time-PCR</i> .....	25
3.8	<i>Gelelektrophorese</i> .....	29
3.9	<i>Statistik</i> .....	30
3.9.1	Deskriptive Statistik.....	30
3.9.2	Analytische Statistik .....	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
4.1	<i>Isoprostane: Qualität des Elisa</i> .....	32
4.2	<i>Isoprostane</i> .....	33
4.2.1	Gesamtgruppe Rektumkarzinom .....	33
4.2.2	Toxizität beim Rektumkarzinom .....	34
4.2.3	Gesamtgruppe Prostatakarzinom .....	35
4.3	<i>Pilotstudie zur Genexpression</i> .....	36
4.3.1	Effekte in der Gesamtgruppe .....	36
4.3.2	Genexpression und Toxizität .....	40
4.3.3	Genexpression und Tumorregressionsgrad.....	41
4.4	<i>Bestätigungsstudie zur Genexpression</i> .....	44
4.4.1	Effekte in der Gesamtgruppe .....	44
4.4.2	Genexpression und Tumorregression .....	46
4.4.3	Genexpression und andere klinische Endpunkte .....	48
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
5.1	<i>Auswirkungen von Strahlentherapie auf die Isoprostan-Spiegel in Serum- und Urinproben</i> .....	49
5.2	<i>Auswirkungen von Strahlentherapie auf die Expression von 10 Genen im peripheren Blut von Patienten</i> .....	50
5.3	<i>Kritische Betrachtung und Verbesserungsvorschläge</i> .....	53
5.4	<i>Ausblick</i> .....	54
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungen 29 - 38</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>64</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
ATP2B4	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4 (PMCA4)
BHT	Butylhydroxytoluol
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT	Katalase
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1
cDNA	komplementäre oder copy DNA
CGD	<i>chronic granulomatous diseases</i>
CTC	<i>common toxicity criteria</i>
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide
CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide
ddH <sub>2</sub> O	(doppelt destilliertes) Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase
DTT	Dithiotreitol
et. al.	und andere
5-FU	5-Fluorouracil
G6PD	Glucose-6-phosphat dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase
GC/MS	<i>gas chromatography/mass spectrometry</i>
ggfs.	gegebenenfalls
GPX1	Glutathion-Peroxidase 1

GPX2	Glutathion-Peroxidase 2
GSH	Gluthation
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
Gy	Gray
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LAG	Lymphabflussgebiet
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
OD	optische Dichte
RIA	Radioimmunoassay
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
TRG	Tumorregressionsgrad
TXN	thioredoxin
u.a.	unter anderem
UBC	ubiquitin C
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Bedeutung der Strahlentherapie in der Onkologie

Die Strahlentherapie ist neben der Chirurgie, der Chemotherapie, der antihormonellen Therapie, der Immuntherapie und der „targeted therapies“ eine der wesentlichen Therapieelemente bei der Behandlung von Krebserkrankungen. Sie wird sowohl als primär-kurative Therapie (z.B. bei inoperablen Kopf-Hals-Tumoren) als auch neoadjuvant oder adjuvant in kurativen Konzepten genutzt. Häufig wird sie zur Strahlensensibilisierung sequentiell oder simultan mit einer Chemotherapie kombiniert (Radiochemotherapie). Eine typische Indikation für eine neoadjuvante Radiochemotherapie ist das lokal fortgeschrittene Rektumkarzinom. Eine adjuvante Bestrahlung ist beispielsweise beim Mammakarzinom obligat, wenn eine brusterhaltende Therapie durchgeführt wurde.

Auch in palliativen Situationen wird die Strahlentherapie eingesetzt beispielsweise zur Schmerzlinderung oder Verbesserung der Stabilität bei Knochenmetastasen. Ansonsten unstillbare Tumorblutungen oder aber disseminierte Hirnmetastasen sind Domänen der Radioonkologie.

## 1.2 Zelluläre Wirkungen der Strahlentherapie

Ionisierende Strahlung führt in den bestrahlten Zellen zur Radiolyse des Wassers. Die dabei entstehenden Radikale schädigen alle zellulären Strukturen, u.a. innerhalb der Zellkerne die DNA, an der sie Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden und abnorme Molekülverbindungen auslösen können (Herrmann und Baumann 1997). Der Großteil dieser DNA-Schäden wird von enzymatischen Reparaturmechanismen schnell und effektiv repariert. Der geringe Anteil an nicht bzw. falsch reparierten DNA-Schäden wird heute als der wichtigste Mechanismus für die biologische Wirkung einer Bestrahlung (Mutation oder Zelltod) angesehen.

Pro Gy entstehen in jeder Zelle etwa 4000 – 5000 DNA-Schäden, überwiegend Basenschäden und Einzelstrangbrüche sowie ca. 40 Doppelstrangbrüche. Diese Schäden werden von Reparaturenzymen erkannt, die u.a. direkt in die Zellzyklus-Kontrolle eingreifen können (Dahm-Daphi et al. 1993, Murray und Hunt 1993). Im Zellzyklus wird zwischen dem G1- und G2-Checkpoint unterschieden. Hier wird im Falle von detektierten DNA-Schäden der Zellzyklus angehalten (G1- bzw. G2-Block). Durch diesen Zeitgewinn können verschiedene Multienzymkomplexe die DNA reparieren. Während des Zellzyklus ist die Zelle in der

Mitose und der G2-Phase am strahlensensibelsten, während sie in der S-Phase resistenter ist. Bei einem irreparablen DNA-Schaden gibt es die Möglichkeit des direkten und des reproduktiven Zelltodes. Im Falle des direkten Zelltodes geht die Zelle über einen G1-Block in die Apoptose, ausgelöst durch eine spezifische Phosphorylierung des Proteins p53. Diese Folgen der Strahlentherapie sind entscheidend bei der Wirkung auf die Normalgewebe, d.h. bei der Genese von Nebenwirkungen der Strahlenbehandlung. Der reproduktive Zelltod hingegen bedeutet den Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit bei bösartigen Zellen. Er basiert auf dem Auftreten dizentrischer Chromosomen nach fehlerhafter Doppelstrangbruchreparatur. Diese können bei nachfolgenden Mitosen zu Anaphasebrücken zwischen den beiden Tochterzellkernen führen, wodurch die Zelle die eingeleitete Mitose nicht vollenden kann (Mitose-assoziiertes Zelltod). Dadurch stirbt die Zelle zwar nicht direkt, sie kann sich jedoch nicht mehr teilen und ist damit für den Patienten „onkologisch entschärft“. Diese zelluläre Wirkung der Strahlentherapie spielt eine zentrale Rolle bei der Behandlung bösartiger Gewebe. Wesentliche Einflussfaktoren auf das Überleben einer Zelle nach Bestrahlung sind die genetische (intrinsische) Strahlenempfindlichkeit, die Zellzyklusphase, die Fraktionierung der Strahlendosis sowie die Anwesenheit von Sauerstoff (Tubiana 1990).

### 1.3 Generierung und Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffverbindungen

#### 1.3.1 Entstehung von ROS

Reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen in jeder Zelle als Nebenprodukt einer Vielzahl physiologischer Vorgänge vor allem in den Mitochondrien. Sie werden einerseits als potentiell schädlich betrachtet, erfüllen aber andererseits wichtige Aufgaben innerhalb zellulärer Signalwege oder zur Abtötung von Pathogenen in phagozytierenden Zellen. Einen Überblick über die ROS gibt nachstehende Tabelle 1.

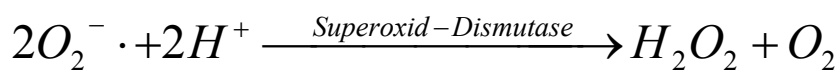
ROS-Bezeichnung	Chemisches Symbol	Intrazelluläre Halbwertszeit $t_{1/2}$
Hydroxyl-Radikal	$\cdot\text{OH}$	$10^{-9}$ s
Alkoxy-Radikal	$\text{R-O}\cdot$	$10^{-6}$ s
Superoxidanion-Radikal	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$10^{-4}$ s
Singulett-Sauerstoff	$^1\text{O}_2$	$10^{-3}$ s
Peroxy-Radikal	$\text{R-OO}\cdot$	0,1 s
Ubisemiquinon-Radikal	$\text{UQH}\cdot$	0,1 s



Peroxyinitrit	$\text{ONOO}^-$	0,1 s
Hypochlorige Säure	$\text{HOCl}$	0,1 s
Stickstoffmonoxid	$\text{NO}^\bullet$	0,4 s
Wasserstoffperoxid	$\text{H}_2\text{O}_2$	1,0 s

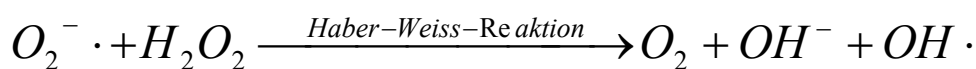
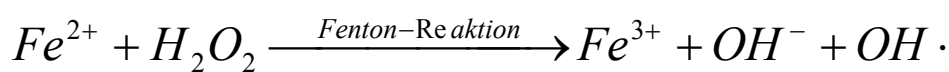
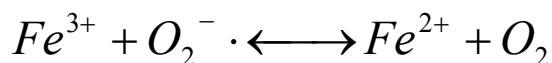
**Tabelle 1: ROS - sortiert nach ihrer intrazellulären Halbwertszeit (nach Sies 1993, S. 214)**

Das membranpermeable Wasserstoffperoxid ist wegen seiner langen Halbwertszeit eine zentrale Verbindung des ROS-Stoffwechsels. Es steht über die Superoxid-Dismutase mit dem Superoxidanion-Radikal in Verbindung.



**Abbildung 1: Reaktion der Superoxid-Dismutase**

Über die Haber-Weiss-Reaktion, eine zentrale Reaktion im Stoffwechsel der ROS, entstehen aus Wasserstoffperoxid und Superoxidanion-Radikalen unter anderem Hydroxylradikale (Halliwell und Gutteridge 1984) Diese gelten unter den ROS als die reaktionsfreudigste und somit auch toxischste Verbindung. Die Haber-Weiss-Reaktion ist metallkatalysiert und setzt sich aus zwei Teilreaktionen zusammen: Der Superoxid-vermittelten Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  einerseits und der Fenton-Reaktion andererseits.



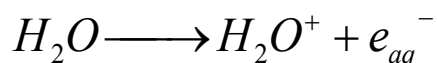
**Abbildung 2: Fenton und Haber-Weiss-Reaktion**

Durch das Enzym Katalase wird Wasserstoffperoxid vor allem in den Peroxisomen zu Wasser und molekularem Wasserstoff abgebaut.

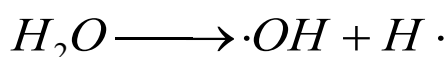
Das dabei entstehende Hydroxylradikal kann direkt mit der DNA, anderen Makromolekülen und Membranlipiden reagieren. Typische DNA-Schäden sind dabei Einzel- und Doppelstrangbrüche, Modifikationen der DNA-Basen, DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Fragmentierungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts. Wegen seiner extrem kurzen Halbwertszeit reagiert das Hydroxylradikal praktisch nur am Ort seiner Entstehung, weshalb seine Reaktionen auch als „Chemie der reaktiven Stelle“ bezeichnet werden.

Unter dem Einfluss ionisierender Strahlung laufen noch eine Reihe weitere Reaktionen ab, die mit der Bildung von ROS einhergehen. Für die biologische Wirksamkeit einer Radiotherapie

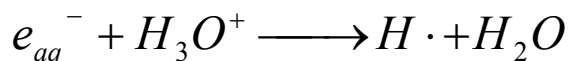
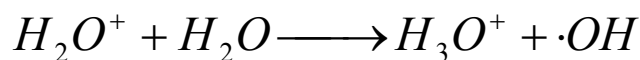
spielen diese ROS eine zentrale Rolle. Etwa 70% der Schäden, die durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden, entstehen nicht durch eine direkte Interaktion zwischen Photon oder Elektron und der DNA, sondern werden indirekt über die Radiolyse des Wassers vermittelt. Das  $H_2O$ -Molekül wird dabei in verschiedene Radikale zerrissen. Es entstehen vor allem atomarer Wasserstoff und Hydroxyl-Radikale. Die Radikalbildung erfolgt dabei durch direkte Strahlenwirkung sowie durch Folgereaktionen der dabei entstehenden Produkte.



**Abbildung 3: Ionisation**

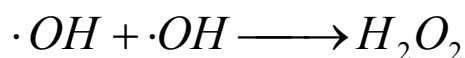


**Abbildung 4: Spaltung**



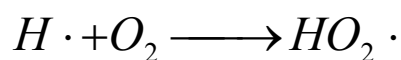
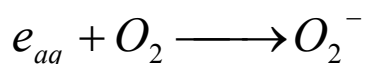
**Abbildung 5: Folgereaktionen**

Die Produkte reagieren aufgrund ihrer hohen Reaktivität weiter zu stabileren Verbindungen, zum Teil zurück zu Wasser, zum Teil aber auch zu dem unter den ROS langlebigeren und biologisch sehr aktiven Wasserstoffperoxid.



**Abbildung 6: Generierung von Wasserstoffperoxid**

Der Effekt von locker ionisierender Strahlung ist in Anwesenheit von Sauerstoff größer, man spricht dabei vom „Sauerstoffeffekt“. Dabei spielt wahrscheinlich die vermehrte Bildung von Radikalen, insbesondere von Hydroxyl-Radikalen, eine Rolle (Barilla und Lokajicek 2000).



**Abbildung 7: Primärreaktionen mit Sauerstoff**

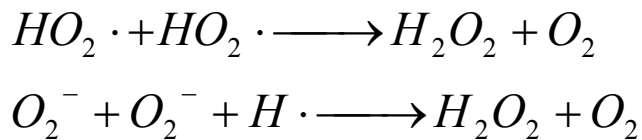


Abbildung 8: Folgereaktionen zu Wasserstoffperoxid

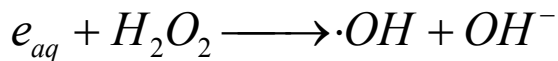


Abbildung 9: Bildung von Hydroxyl-Radikalen

### 1.3.2 Detoxifizierung von ROS

Da biologische Zellen der Radikalbildung als konstitutivem Mechanismus der Evolution ausgesetzt sind, haben sich effektive Mechanismen zur Detoxifizierung entwickelt. Man unterscheidet zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Mitteln der Radikalabwehr.

Zu den nicht-enzymatischen Mechanismen der ROS-Detoxifizierung zählen eine Reihe von Biomolekülen, die in der Lage sind freie Radikale abzufangen und so andere Makromoleküle vor der Reaktion mit ihnen zu schützen. Beispiele für solche Antioxidantien sind  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) und Glutathion (Sies 1993).

Die drei wichtigsten Enzyme im Stoffwechsel der ROS sind die Superoxid-Dismutasen, die Katalase und die Glutathion-Peroxidasen.

Die Superoxid-Dismutasen katalysieren die Bildung von Wasserstoffperoxid aus Superoxid-Radikalen und Protonen. Es existieren drei Isoformen, die an unterschiedlicher Lokalisation in- und außerhalb der Zelle gefunden werden. Die SOD1 kommt im Zytoplasma vor, und eine Vielzahl von Mutationen dieses Gens werden mit der familiären und seltener auch mit der sporadischen Form der amyotrophen Lateralsklerose in Verbindung gebracht (Krawczak und Cooper 1997, Deng et al. 1993). Dabei scheint allerdings nicht die enzymatische Aktivität der SOD1 ursächlich zu sein, sondern eher ein neues funktionelles Protein, das als Produkt des mutierten Gens entsteht (Pardo et al. 1995). Die SOD2 kommt dagegen in den Mitochondrien vor, der hauptsächlichen Quelle von ROS. Im Gegensatz zur SOD1 sind Knock-out-Mäuse für die SOD2 entweder nicht lebensfähig oder erleiden schwere neurodegenerative Schäden (Lebovitz et al. 1996). Eine dritte Isoform, die SOD3, ist ein sekretorisches Protein, das in vielen extrazellulären Kompartimenten nachgewiesen wurde.

Die Katalase baut Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab und wird bei oxidativem Stress verstärkt exprimiert (Hunt et al. 1998). Ein vollständiges Fehlen von Katalase-Aktivität führt zum Krankheitsbild der Akatalasämie (Takahara-Syndrom), das verschiedene

biochemische Prozesse beeinflusst und möglicherweise das Risiko des Auftretens von oralen Gangränen und Diabetes mellitus erhöht (Goth et al. 2004).

Die Glutathion-Peroxidasen können sowohl Wasserstoffperoxid, als auch Lipidperoxide unter Verbrauch von Glutathion entgiften. Es existieren mehrere Isoformen mit unterschiedlicher Lokalisation und Substratspezifität. Die GPX1 wird in fast allen Geweben exprimiert. Knock-Out-Mäuse sind phänotypisch wenig auffällig, zeigen aber eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch Wasserstoffperoxid und andere Substanzen (Ho et al. 1997; de Haan et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist eine Überexpression der GPX1 bei Mäusen mit Adipositas und erhöhter Insulinresistenz assoziiert (McClung et al. 2004). Die GPX2 kommt überwiegend im Gastrointestinaltrakt vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung alimentär aufgenommener Peroxide (Chu et al. 1993). GPX3 kommt überwiegend extrazellulär vor (Brigelius-Flohe 1999), und die GPX4 existiert im Gegensatz zu den anderen Peroxidasen als Monomer und ist wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften mit Lipidmembranen assoziiert (Ursini et al. 1985, Thomas et al. 1990). Darüber hinaus gibt es auch eine GPX5 und GPX6, die nur in speziellen Geweben exprimiert werden (Brigelius-Flohe 2006).

Zusätzlich zu den bereits genannten gibt es noch eine Vielzahl von Enzymen, die direkt an der Abwehr oxidativer Zellschäden beteiligt sind.

Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist das Schlüsselenzym des Pentosephosphatweges, der NADPH und damit den notwendigen Co-Faktor für die Reduktion von verbrauchtem Glutathion bereitstellt. Ein G6PD Mangel führt zum Krankheitsbild des Favismus, der durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress gekennzeichnet ist (Mehta et al. 2000).

Die Gruppe der Glutathion-S-Transferasen katalysiert die Konjugation von Glutathion an eine Vielzahl von körperfremden organischen Verbindungen. Die in extrahepatischen Geweben am stärksten exprimierte Gruppe ist dabei die GSTP1, die auch in vielen Tumoren überexprimiert wird (Hayes und Pulford 1995).

Die Familie der Thioredoxine besteht aus kleinen Proteinen, die in ihrer reduzierten Form als Oxidoreduktasen aktiv sind. Dabei sind sie funktionell als Co-Faktoren eng mit der Thioredoxin-Reduktase verknüpft. Beim Menschen sind eine zytosolische und eine mitochondriale Form bekannt. Zusammen erfüllen die Thioredoxine und die dazugehörige Reduktase verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle, unter anderem wirken sie als Co-Faktoren bei der DNA-Synthese mit (Powis und Montfort 2001), verhindern unter bestimmten Umständen die Apoptose (Powis und Montfort 2001, Powis et al. 1998) und sind Teil der

Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (Berggren et al. 2001). Daneben sind sie auch an pathologischen Prozessen beteiligt, beispielsweise sind Thioredoxine bei vielen Tumorerkrankungen übermäßig exprimiert (Miyazaki et al. 1998, Nakamura et al. 2000, Nishiyama et al. 2001) und stellen beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und beim kolorektalen Karzinom einen negativen Prognosefaktor dar (Kakolyris et al. 2001, Raffel et al. 2003). In Zellkulturen wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Expression des zytosolischen Thioredoxins die Strahlenempfindlichkeit signifikant vermindert (Demizu et al. 2008).

Eine Sonderstellung unter den hier untersuchten Genen nehmen CYBA und CYBB ein, die beiden membranständigen Untereinheiten der NADPH-Oxidase. Die NADPH-Oxidase ist eine der Hauptquellen für Superoxid und wichtig für die mikrobiozide Aktivität von Phagozyten. Sie ist damit nicht an der Abwehr von reaktiven Sauerstoffverbindungen beteiligt. Mutationen in einem der beiden Gene führen zu Erkrankungen aus der Gruppe der CGD (Alvarez-Cardona et al. 2009). Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Expression der NADPH-Oxidase und strahlungsinduziertem Zelltod (Liu et al. 2008).

#### **1.4 Isoprostane als Marker für oxidativen Stress**

Isoprostane entstehen *in vivo* nichtenzymatisch durch die von freien Radikalen verursachte Peroxidation der Arachidonsäure (Roberts und Milne 2009). Insbesondere die F(2)-Isoprostane (F(2)-IsoPs) sind stabile Moleküle, die in verschiedenen Körperflüssigkeiten bestimmt werden können. Sie werden als der verlässlichste Marker für oxidativen Stress beim Menschen angesehen (Jahn et al. 2008). Darüber hinaus haben die F(2)-Isoprostane vielfältige biologische Wirkungen, wie z.B. eine Vasokonstriktion der Vasa afferentia der renalen Glomeruli, der Retina-Gefäße und der kleinen Gefäße im Gehirn. In Leberzellen von Ratten wurden vermehrte DNA-Synthese, Zellproliferation und vermehrte Kollagen-Synthese beobachtet (Comporti et al. 2008).

Erhöhte Isoprostanspiegel wurden beispielsweise in Plasma und Urin von aktiven Rauchern gemessen (Morrow et al. 1995). Neuere Studien zeigten auch, dass passives Rauchen ebenfalls mit erhöhten Isoprostanspiegeln korreliert ist: Dies wurde bei Kindern rauchender Eltern (Sinzinger et al. 2003) und bei Erwachsenen, die unter definierten Bedingungen Zigarettenrauch ausgesetzt waren, gezeigt (Ahmadzadehfar et al. 2006).

Gleichfalls erhöht waren die Isoprostanspiegel verschiedener Kompartimente bei Patienten mit der Alzheimerschen Erkrankung (Grossman et al. 2005, Casadesus et al. 2007, Pratico et al. 1998), in Plasma und Urin bei Diabetes mellitus (Davi et al. 2003), Hypercholesterinämie (Davi et al. 2004) und Adipositas (Keaney et al. 2003). Erhöhte Isoprostanspiegel im Urin scheinen auch ein eigenständiger Risikofaktor für das Auftreten einer Arteriosklerose zu sein (Morrow 2005).

Einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Isoprostanspiegel und ionisierender Strahlung deutet eine Studie aus dem Jahr 2002 an (Wolfram et al. 2002). Hier wurden die Isoprostanspiegel in Plasma, Serum und Urin bei 42 Patienten vor und nach einer Radioiodtherapie gemessen. Die Isoprostanspiegel waren in allen Kompartimenten signifikant erhöht im Vergleich zum Kontrollwert vor Beginn der Therapie.

In einer Studie von Camphausen et al. wurden die Isoprostane im Urin von Patienten bestimmt, die eine perkutane Bestrahlung der Prostata aufgrund eines Prostatakarzinoms erhielten (Camphausen et al. 2004). Hier konnte kein Anstieg der Isoprostanspiegel gezeigt werden.

## **1.5 Genexpressionsprofile in der Onkologie**

### **1.5.1 Charakterisierung von Tumoren**

Zunächst erscheint es interessant zu sein, inwieweit Genexpressionsprofile dazu benutzt werden können, Tumore genauer als mit den bisher üblichen Methoden zu klassifizieren. Ein Beispiel dafür ist innerhalb der extrem heterogenen Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome die Unterscheidung zwischen einem Burkitt-Lymphom und einem diffus-großzelligen Lymphom. Diese Unterscheidung ist zwar von großer klinischer Bedeutung, aber anhand der etablierten Kriterien lassen sich die Erkrankungen nicht immer sicher voneinander unterscheiden. Hier haben zwei Studien gezeigt, dass es möglicherweise ein typisches Genexpressionsmuster gibt, das zur Diagnosestellung bestimmt werden kann (Hummel et al. 2006; Dave et al. 2006).

### **1.5.2 Hilfe zur Therapieentscheidung**

Bei verschiedenen Tumoren wird zur Zeit intensiv untersucht, inwieweit Genexpressionsprofile des Tumors dazu benutzt werden können, das Ansprechen auf eine Therapie vorauszusagen und ggfs. die Therapieentscheidung anzupassen. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom, die neoadjuvant radiochemotherapiert wurden, konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die bei Respondern und Non-Respondern signifikant unterschiedlich exprimiert wurden (Ghadimi et al. 2005). In der prospektiven Beobachtung dieser Patienten konnte auch nachgewiesen werden, dass ein Teil dieser Gene eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen Patienten mit lokalem Rezidiv und rezidivfreien Patienten zeigt (Liersch et al. 2009).

Auch bei Patientinnen mit Brustkrebs scheinen Genexpressionsprofile zur Risiko- und damit Therapiestratifizierung geeignet zu sein. In einer Studie mit 159 Patientinnen konnten diese anhand des Expressionsmusters von 64 Genen in eine Hochrisiko- und eine Niedrigrisikogruppe unterteilt werden. Diese Risikoeinteilung könnte genutzt werden, sich für oder gegen eine adjuvante Therapie zu entscheiden (Pawitan et al. 2005).

### **1.5.3 Tumormarker**

Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet für Genexpressionsprofile ist die Diagnostik von Krebserkrankungen. Herkömmliche Tumormarker sind, von einigen Ausnahmen wie z. B. dem PSA-Wert beim Prostatakarzinom abgesehen, nicht zur Diagnostik, sondern lediglich zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen geeignet.

In einer Studie an Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde ein Set von 5 Genen identifiziert, deren Expression im peripheren Blut als diagnostischer Marker für diese Erkrankung geeignet zu sein scheint (Han et al. 2008).

### **1.5.4 Therapiemarker**

Ebenfalls von klinischem Interesse wäre ein Biomarker, der während einer neoadjuvanten oder adjuvanten Therapie das Ansprechen des Tumors anzeigen kann und zugleich mit geringem Aufwand bestimmbar ist. Bisher wurden Genexpressionsprofile mit einer Aussage über das Ansprechen des Tumors direkt aus Tumormaterial untersucht. Während einer

Strahlen- oder Chemotherapie steht dieses aber nicht zu Verfügung. Ein Ausweg wäre die Bestimmung von Genexpressionsprofilen aus zirkulierenden Leukozyten. Damit wäre eine Aussage über die Therapieempfindlichkeit der individuellen Zellen (sowohl des Normalgewebes als auch der Tumore) möglich.

## **1.6 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit soll der prognostische Wert der Bestimmung von Isoprostanspiegeln im Urin und Serum während der neoadjuvanten Therapiephase bei Rektumkarzinom-Patienten sowie bei Prostatakarzinom-Patienten während einer primären Strahlentherapie untersucht werden. Als klinische Endpunkte werden dabei das Auftreten einer therapieinduzierten Toxizität  $\geq$  II° nach CTC im Beckenbereich gewertet. Darüber hinaus wird das histologische Ansprechen der Rektumkarzinome auf die Induktionstherapie mit den gemessenen Isoprostanspiegeln korreliert.

Um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen, wird die Genexpressionsveränderung einer Reihe von Zielgenen, die am Stoffwechsel rund um ROS beteiligt sind, in Leukozyten aus dem Blut dieser Patienten gemessen. Auch hier gelten als klinische Endpunkte das Auftreten einer therapieinduzierten Toxizität  $\geq$  II° nach CTC im Beckenbereich und das histologische Ansprechen des Karzinoms.

## **1.7 Arbeitsprogramm**

Im ersten Schritt dieser Arbeit sollten die Isoprostan-Spiegel bei Patienten mit einem Prostatakarzinom bzw. einem Rektumkarzinom gemessen werden. Die Rekrutierung von geeigneten Patienten und Probensammlung war nur noch für die Rektumkarzinom-Patienten notwendig, da bei einer Reihe von Patienten mit Prostatakarzinom bereits vor Beginn dieser Arbeit Proben gesammelt und eingefroren worden waren. Nach Etablierung und Testung des Versuchsprotokolls wurden die Proben mit dem Isoprostan-ELISA-Kit gemessen.

Darüber hinaus sollte bei Patienten mit Rektumkarzinom die Expression einer Reihe von Genen, die mit reaktiven Sauerstoffspezies im Zusammenhang stehen, in peripheren Leukozyten gemessen werden. Hierzu mussten zunächst geeignete Ziel- und Normalisierungsgene sowie passende Primersequenzen ausgewählt und getestet werden.



Abschließend sollten die Daten ausgewertet und mögliche Zusammenhänge zwischen Messdaten und den klinischen Endpunkten statistisch analysiert werden. Dieser Teil der Arbeit sollte zunächst im Rahmen einer Pilotstudie an wenigen Patienten getestet werden, um anschließend die interessantesten Befunde an einem größeren Kollektiv zu bestätigen.

Daraus ergaben sich im Einzelnen folgende Arbeitsschritte:

1. Bestimmung der Isoprostan-Spiegel im Urin von Prostatakarzinom-Patienten
  - a. Standardisierung des Versuchsprotokolls und Testen des ELISA-Kits mit in vitro bestrahlten Blut- und Urinproben.
  - b. Aufarbeitung und Aliquotierung der bereits vor Beginn dieser Arbeit gesammelten Urinproben.
  - c. Messung der Isoprostanspiegel in allen Urinproben.
  - d. Auswertung der photometrischen Messung und Standardisierung der Ergebnisse auf die Kreatininkonzentration im Urin.
  
2. Bestimmung der Isoprostanspiegel in Serum und Urin von Rektumkarzinom-Patienten
  - a. Sammlung von Serum- und Urinproben von 17 geeigneten Patienten
  - b. Messung der Isoprostan-Spiegel in allen Proben
  - c. Auswertung der photometrischen Messung und für die Urinproben Standardisierung auf die Kreatininkonzentration im Urin.
  
3. Probensammlung und Aufarbeitung
  - a. Sammlung von RNA-Proben mit dem Pax Blood RNA Kit an drei Zeitpunkten vor, während und am Ende der Radiochemotherapie
  - b. Isolierung der RNA nach dem Protokoll des Pax Blood RNA Kits
  - c. Umschreiben der isolierten RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA und Einstellen der Proben auf eine einheitliche cDNA-Konzentration.
  - d. Für die Pilotstudie zunächst Auswahl von 16 geeigneten Patienten
  - e. Für die Bestätigungsstudie Bearbeitung aller verfügbaren Patienten
  
4. Etablierungsphase für die Genexpressionsanalyse
  - a. Auswahl geeigneter Gene für die Expressionsanalyse

- b. Auswahl und Testung geeigneter Primer für die rt-PCR, Kontrolle mittels Verdünnungsreihe, Schmelzkurve und Gel-Elektrophorese
  - c. Auswahl und Testung geeigneter Normalisierungsgene
5. Genexpressionsanalyse
- a. Messung aller Proben mittels rt-PCR
  - b. Auswertung der rt-PCR-Ergebnisse, Normalisierung auf mindestens zwei geeignete Normalisierungsgene aus einem Pool von 6 Genen
6. Statistische Auswertung
- a. Statistische Auswertung der Isoprostan-Spiegel und der Genexpressionsprofile, Testung sowohl auf globale Unterschiede als auch auf Unterschiede hinsichtlich Toxizität und Tumorregression.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Agarose <i>Ultra Pure</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Butylhydroxytoluol	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan
DNA-Größenstandard (für Gele, 100 bp- Leiter)	Rapidozym, Berlin
Ethanol	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid (1% in H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
RNase Zap	Ambion, Austin, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
<i>Ultra Pure</i> Wasser	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Einweg-Pasteurpipetten, 3 ml	Roth, Karlsruhe
PAXgene™ Blood RNA Tube	PreAnalytiX, vertrieben von Becton Dickinson, Heidelberg
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen RNase-, DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Kisker, Steinfurt
Platten, Thermo fast 384-well	ABgene, Epsom
Platten, Thermo fast 96-well	ABgene, Epsom
Primer (Design nach gewünschter Sequenz, siehe Tabelle 2)	MWG Eurofins, Ebersberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml	greiner bio-one, Frickenhausen
Röhrchen 5 ml	Bioscience
Spitzen für Multipipette plus (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2,5, 25, 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Taqman Adhesive Optical Covers	Applied Biosystems, Darmstadt

## 2.3 Geräte

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Dri-Block DB-3	Techne, Jahnsdorf
Elektrophorese-Kammer (ComPhor Mtl Maxi)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophorese-Netzteil (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen

Feinwaage B 210s	Sartorius, Göttingen
Fluor-S <sup>TM</sup> MultiImager (für Gelfotografie)	BioRad, Hercules USA
Kühlschrank VIP Series -86° C	Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Mikroliter-Küvette für Photometer (Label Guard <sup>TM</sup> )	Implen, München
Mikroplatten-Reader (96-Well, Tecan ULTRA)	Tecan, Crailsheim
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Multifuge 1s	Heraeus, Hanau
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
<i>Peltier Thermal Cycler</i> PTC – 200	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (Genie 2 <sup>TM</sup> )	Schütt, Göttingen
Vortexer (MS 2 <i>Minishaker</i> )	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen

## 2.4 Kits

PAXgene Blood RNA Kit	Qiagen, Hilden
<i>Real-time-PCR-Mastermix</i> mit SYBR <sup>®</sup> green	USB, Staufen
Isoprostane-Elisa-Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor

## 2.5 Lösungen und Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ddH <sub>2</sub> O	1 M
BHT 5mg/ml auch 1:10 und 1:50 mit Ethanol verdünnt verwendet	BHT Ethanol	5 mg/ml
KOH 15%wt/vol	KOH ddH <sub>2</sub> O	150 mg/ml
TE-Puffer, pH 7,5 eingestellt mit HCl	Tris EDTA	10 mM 1 mM
Probenpuffer für Gelelektrophorese	Bromphenolblau Ficoll Puffer Typ 400 in 1% TBE	0,25 % (v/v) 15 % (v/v)
TBE-Puffer	Tris	1 M

## 2.6 Software

Adobe Photoshop: Bildbearbeitung

MS Office: Programme für Textverarbeitung, Präsentationen und Tabellenkalkulation

SDS 2.1 (Applied Biosystems): Auswertung von Expressionsmessungen, die mit dem TaqMan 7900 HAT durchgeführt wurden

XFluor4 (Tecan): Programm zur Auswertung von Daten, die mit dem Tecan-Mikroplattengerät gemessen wurden

SPSS Version 12.0: Grafische Darstellung von Messdaten und Testung auf mögliche Assoziationen

Quantity One S Version 4.2.1 (BioRad): Grafische Darstellung und Auswertung von Gelbildern

## 2.7 Primer für *real-time-PCR*

Gene	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer	Referenz
<b><u>Referenzgene</u></b>			
GAPDH <sup>2</sup>	CCCTTCATTGACCTCAACTACAT	ACGATACCAAAGTTGTCATGGAT	Calcagno et al. 2006
HPRT1 <sup>2</sup>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	Calcagno et al. 2006
PMCA4	ATCTGCATAGCTTACCGGGACT	TGCCAGCTTGTTTGCATTTGGCAATA	Calcagno et al. 2006
SDHA	CCCGAGGTTTTCACTTCACTGT	CCAGTTGTCCTCCTCCATGTTC	Cicinnati et al. 2008
UBC	CGGTGAACGCCGATGATTAT	ATCTGCATTGTCAAGTGACGA	Cicinnati et al. 2008
YWHAZ	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	Vandesompele et al. 2002
<b><u>ROS-Zielgene</u></b>			
CAT	ACTTTGAGGTCACACATGACATT	CTGAACCCGATTCTCCAGCA	Wang und Seed 2003
CYBA	CGCTGGCGTCCGGCCTGATCCTCA	ACGCACAGCCGCCAGTAGGTAGAT	Kim et al. 2005
CYBB	GCTGTTCAATGCTTGTGGCT	TCTCCTCATCATGGTGCACA	Morawietz et al. 2006
G6PD	ATCGACCACTACCTGGGCAA	TTCTGCATCACGTCCCGBA	Ohl et al. 2005
GPX1	GCTTCCCGTGCAACCAGTTT	CTTGAGGGAATTCAGAATCTCT	Tajouri et al. 2003
GPX2	GGACATCAGGAGAACTGTCAGA	GTCCTTCAGGTAGGCGAAGAC	Wang und Seed 2003
GSTP1	CACCAACTATGAGGCGGGCAA	ATCAGCAGCAAGTCCAGCA	Hurteau und Spivack 2002
SOD1	AGGGCATCATCAATTTGAGC	GCCCACCGTGTCTTCTGGA	Wang und Seed 2003
SOD2	AACCTCAGCCCTAACGGTG	AGCAGCAATTTGTAAGTGTCCC	Wang und Seed 2003
TXN	CAAGCCTTTCTTTTATTCCCTCT *	GCAACATCCTGACAGTCATCCA	Wang und Seed 2003
<b><u>Positivkontrolle</u></b>			
CDKN1A	GGAAGACCATGTGGACCTGT	ACTGCAGGCTTCCTGTGG	Zidek 2005

**Tabelle 2: Primer für die *real-time-PCR***

## 3 Methoden

### 3.1 Klinische Patientencharakteristika

#### 3.1.1 Isoprostane beim Rektumkarzinom

Untersucht wurden 17 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom, die in den Jahren 2007 und 2008 behandelt wurden. In diesen Tumorstadien besteht die Indikation zur neoadjuvanten Radiochemotherapie. Alle Patienten erhielten eine Bestrahlung des Beckens bis zu einer kumulativen Gesamtdosis von 50,4 Gy. Gleichzeitig wurden im Rahmen der CAO/ARO/AIO-04-Studie zwei Chemotherapien miteinander verglichen. Arm A erhielt 1000mg/m<sup>2</sup> KOF 5-FU als kontinuierliche Infusion an den Tagen 1-5 und 29-33 der Behandlung. Arm B erhielt 250mg/m<sup>2</sup> KOF 5-FU als kontinuierliche Infusion an den Tagen 1 – 14 und 22 – 35 und 50mg/m<sup>2</sup> KOF Oxaliplatin als Kurzinfusion an den Tagen 1, 8, 22 und 29. Weitere Eigenschaften des Patientenkollektivs werden in Tabelle 3 aufgeführt.

<b><u>Alter [Jahre]</u></b>	69 (±9)
<b><u>Geschlecht</u></b>	<b><u>n</u></b>
männlich	12
weiblich	5
<b><u>Chemotherapie</u></b>	<b><u>n</u></b>
5-FU mono	7
5-FU + Oxaliplatin	10
<b><u>Begleiterkrankungen</u></b>	<b><u>n</u></b>
keine	6
kardiovaskulär	8
Diabetes mellitus	4
sonstige	7
<b><u>Strahlentoxizität</u></b>	<b><u>n</u></b>
CTC II ≥ ° 2 in Blase und/oder Darm	4
CTC II < ° 2 in Blase und/oder Darm	13
<b><u>Zielvolumen [cm<sup>3</sup>]</u></b>	1783 (±292,96)

Tabelle 3: Eigenschaften der Patienten in der Gruppe Rektumkarzinom



### 3.1.2 Isoprostane beim Prostatakarzinom

Untersucht wurden 17 Patienten mit einem Prostatakarzinom im Stadium T1 bis T2. Bei allen Patienten wurde eine primäre Radiotherapie durchgeführt, in den meisten Fällen ergänzt um eine simultane und adjuvante Hormontherapie. Bestrahlt wurde die Prostataloge sowie zusätzlich – je nach individueller Situation – die Samenblasen und das pelvine Lymphabflussgebiet. Die kumulative Gesamtdosis betrug 72 Gy. Alle weiteren Eigenschaften der Stichprobe sind in Tabelle 4 aufgelistet.

<b><u>Alter [Jahre]</u></b>	74 ( $\pm 6$ )
<b><u>Bestrahlungsgebiet</u></b>	<b><u>n</u></b>
Prostataloge	15
Prostataloge und pelvines LAG	2
<b><u>Hormontherapie</u></b>	<b><u>n</u></b>
GNRH-Analoga	6
Antiandrogene	4
beide Substanzgruppen	5
keine	1
Orchiektomie	1
<b><u>Begleiterkrankungen</u></b>	<b><u>n</u></b>
keine	5
kardiovaskulär	11
Diabetes mellitus	3
sonstige	5
<b><u>Strahlentoxizität</u></b>	<b><u>n</u></b>
CTC II $\geq$ 2 in Blase und/oder Darm	2
CTC II $<$ 2 in Blase und/oder Darm	15
<b><u>Zielvolumen [cm<sup>3</sup>]</u></b>	216,75 ( $\pm 68,43$ )

Tabelle 4: Eigenschaften der Patienten in der Gruppe Prostatakarzinom

### 3.1.3 Genexpression Rektumkarziom

#### 3.1.3.1 Pilotstudie

Für die Untersuchung von Genexpressionsprofilen wurden 16 Patienten ausgewählt, die ebenfalls innerhalb der CAO/ARO/AIO-04-Studie radiochemotherapiert wurden. Sie ließen sich in zwei etwa gleich große Gruppen mit starken bzw. geringen strahlenbedingten Nebenwirkungen aufteilen. Die übrigen Charakteristika sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

<b><u>Alter [Jahre]</u></b>	60 (±8)
<b><u>Geschlecht</u></b>	<b><u>n</u></b>
männlich	11
weiblich	5
<b><u>Chemotherapie</u></b>	<b><u>n</u></b>
5-FU mono	9
5-FU + Oxaliplatin	7
<b><u>Begleiterkrankungen</u></b>	<b><u>n</u></b>
keine	2
kardiovaskulär	5
Diabetes mellitus	5
<b><u>Strahlentoxizität</u></b>	<b><u>n</u></b>
CTC II $\geq$ 2 in Blase und/oder Darm	7
CTC II $<$ 2 in Blase und/oder Darm	9
<b><u>Tumorregressionsgrad</u></b>	<b><u>n</u></b>
TRG 1	1
TRG 2	4
TRG 3	8
TRG 4	3
<b><u>Nodalstatus</u></b>	<b><u>n</u></b>
N0	10
N1	3
N2	3

Tabelle 5: Eigenschaften der Patienten für die Genexpressionsanalyse (Pilotstudie)

### 3.1.3.2 Bestätigungsstudie

Zur Bestätigung der Befunde aus der Pilotstudie wurden für die Bestätigungsstudie insgesamt 75 Patienten inklusive der Patienten aus der Pilotstudie rekrutiert. Es handelt sich dabei ausnahmslos um Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie im Rahmen der CAO/ARO/AIO-04-Studie bei lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom. Die Charakteristika der Patienten aus der Bestätigungsstudie sind in Tabelle 6 aufgeführt.

<b><u>Alter [Jahre]</u></b>	63 ( $\pm 11$ )
<b><u>Geschlecht</u></b>	<b><u>n</u></b>
männlich	38
weiblich	21
<b><u>Chemotherapie</u></b>	<b><u>n</u></b>
5-FU mono	30
5-FU + Oxaliplatin	29
<b><u>Strahlentoxizität</u></b>	<b><u>n</u></b>
CTC II $\geq$ 2 in Blase und/oder Darm	39
CTC II $<$ 2 in Blase und/oder Darm	19
<b><u>Tumorregressionsgrad</u></b>	<b><u>n</u></b>
TRG 1	4
TRG 2	10
TRG 3	36
TRG 4	4
<b><u>Nodalstatus</u></b>	<b><u>n</u></b>
N0	37
N1	16
N2	3

Tabelle 6: Eigenschaften der Patienten für die Genexpressionsanalyse (Bestätigungsstudie)

## 3.2 Probengewinnung für Isoprostane

Für die Isoprostane-Messung wurden von 17 Patienten mit Prostatakarzinom Urinproben und von 17 Patienten mit Rektumkarzinom Urin- und Serumproben gesammelt.

Die Proben der Rektumkarzinompatienten wurden unmittelbar nach der Gewinnung in 1 ml Portionen aliquotiert und bei -80 C eingefroren. Um eine ex-vivo-Entstehung von Isoprostanen zu verhindern, waren die verwendeten Monovetten mit BHT präpariert worden, so dass sich nach Abnahme eine Konzentration von 0,005% BHT in der Probe einstellte.

Die Proben der Prostatakarzinompatienten wurden genauso unmittelbar nach der Gewinnung aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Da diese Proben schon vor Beginn dieser Dissertationsarbeit gewonnen worden waren, konnte die Zugabe von BHT erst kurz vor Beginn der Aufarbeitung erfolgen. Hierzu wurden die Proben vor dem Auftauen mit 11% Vol. einer BHT-Lösung überschichtet. Nach dem Auftauen stellte sich so ebenfalls eine Konzentration von 0,005% BHT in der Probe ein.

## 3.3 Isoprostane Elisa

Die Bestimmung der Isoprostane erfolgte mit einem Elisa-Kit der Firma Cayman Chemical. Die quantitative Messung beruht dabei auf folgendem Prinzip: Die 96-well Platte ist bereits mit einem monoklonalen Mausantikörper beschichtet, der spezifisch IgG-Antikörper bindet. Die Proben werden nun zusammen mit 8-Isoprostane Tracer (an 8-Isoprostane gekoppelte AChE) und 8-Isoprostane Antiserum (8-Isoprostane spezifischer Kaninchen Antikörper) inkubiert. Dabei konkurrieren die in den Proben enthaltenen Isoprostane mit dem Tracer um die Bindungsstellen des Antiserums und gleichzeitig binden die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe an den Maus-Antikörper der Platte. Die an die Platte gebundene Menge von 8-Isoprostan-Tracer ist umgekehrt proportional zum 8-Isoprostangehalt der Probe. In fünf Waschschritten mit einem speziellen Puffer werden alle nicht gebundenen Reagenzen entfernt, insbesondere überschüssiger Tracer. Anschließend werden alle Kavitäten mit Ellman's Reagenz befüllt und für ca. 60 min im Dunkeln inkubiert. Ellman's Reagenz enthält Acetylthiocholin, welches von der AChE in Thiocholin und Acetat gespalten wird. Das Thiocholin reagiert weiter bis zu der farbigen Verbindung 5-thio-2-nitrobenzoesäure, die bei 412 nm ein Absorptionsmaximum hat.

Die Aufbereitung der Proben führte ich nach den Vorgaben von Cayman Chemicals durch. Zunächst wurden die Proben zur Entfernung von Sedimenten zentrifugiert. In 1 ml des Überstands wurde mit Kaliumhydroxidlösung eine alkalische Hydrolyse durchgeführt, um sowohl freie als auch veresterte Isoprostane messen zu können. Im Anschluss wurden Proteinverunreinigungen mit Ethanol ausgefällt. Nach Verdampfung des Ethanols unter Stickstoff wurde die Probe mit  $\text{KH}_2\text{O}_4$  Lösung auf einen pH von 7,4 eingestellt und so für den Elisa verwendet.

Nach der Inkubation wurde die Absorption aller Wells mit dem Mikroplatten-*Reader* gemessen. Neben den zu messenden Proben in Dreifachbestimmung befinden sich auf der Platte noch eine 8-Punkt-Standardkurve in Doppelbestimmung, eine Leerprobe in Doppelbestimmung (Blank, Blk), unspezifische Bindung (non-specific-binding, NDB) in Doppelbestimmung, maximale Bindung (maximum binding,  $B_0$ ) in Dreifachbestimmung sowie ein Well mit maximaler Enzymaktivität (total activity, TA).

In allen Urinproben wurde durch das Zentrallabor der UMG die Kreatininkonzentration bestimmt. Durch eine Normierung auf die Kreatininkonzentration werden die Isoprostan-Werte im Spontanurin unabhängig von der 24-h-Urinausscheidung des Patienten.

Die Absorptionswerte des Elisa wurden in ein von der Firma Cayman Chemical bereitgestelltes Excel-Sheet eingegeben, welches aus der Standardgerade, dem Verdünnungsgrad der Proben und den Probenwerten die Isoprostan-Konzentration in allen Proben berechnet. Im Falle der Serumproben wurde diese Konzentration direkt für die statistische Analyse verwendet, bei den Urinproben erfolgte vorher noch eine Normierung auf die Kreatininkonzentration im Urin.

### **3.4 RNA-Probengewinnung**

Bei allen Patienten wurde Blut in PAX-Röhrchen asserviert, die bereits mit einer RNA stabilisierenden Lösung vorbefüllt waren. Die Zeitpunkte der Probenentnahmen orientierte sich dabei an der Chemotherapie mit 5-FU, die Proben der Zeitpunkte 1 und 2 wurden nach jeweils 3g kumulativer 5-FU Dosis der beiden Schemata entnommen. Damit ergeben sich für die einzelnen Entnahmezeitpunkte folgende kumulativen Strahlentherapiedosen:

Entnahme- zeitpunkt	Kumulative Strahlentherapiedosis	Kumulative Strahlentherapiedosis
	Arm A	Arm B
Tag 0	0	0
Tag 1	7,2 Gy	18 Gy
Tag 2	43,2 Gy	45 Gy

**Tabelle 7: Kumulative Strahlentherapiedosis zum Zeitpunkt der RNA-Asservierung**

### 3.5 RNA-Isolierung

Die anschließende Isolierung erfolgte unter Anwendung des PAXgene Blood RNA Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei ist zu beachten, dass RNA sehr empfindlich gegenüber ubiquitär vorkommenden RNAsen ist. Daher sind saubere Arbeitsbedingungen unerlässlich, die durch RNase-freie Einwegmaterialien, abgetrennte Arbeitsbereiche und die Säuberung von Arbeitsflächen, Geräten und Handschuhen durch RNase-Zap-Lösung erreicht werden.

Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen wurden die PAX Röhrchen über Nacht bei Raumtemperatur aufgetaut. Zur Bestimmung der Menge und der Qualität der isolierten RNA wurde eine photometrische Messung mit dem Biophotometer der Firma Eppendorf durchgeführt. Dabei wird die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Hier haben Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum und das Photometer ist so eingestellt, dass eine OD von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Verunreinigungen mit Proteinen haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, sodass das Verhältnis OD260/OD280 ein Maß für die Reinheit der RNA Proben darstellt. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 entspricht dabei einer hohen Reinheit der RNA bzw. einer geringen Verunreinigung mit Protein. Das Photometer verfügt über eine Messzelle, die für den Mikroliter-Bereich geeignet ist (LabelGuard™, Firma Implen). Für jede Messung wurden 3 µl der RNA benutzt. Der Leerwert für die Messung wurde mit dem Elutionsmedium des Blood-RNA-Kits bestimmt. Alle mit der Probe in Kontakt stehenden Teile wurden nach jeder Messung mit Ethanol gereinigt.

### 3.6 cDNA-Synthese

Für die Quantifizierung der mRNA ist es notwendig, diese in cDNA umzuschreiben. Dies wird durch das Enzym reverse Transkriptase ermöglicht, das zu den mRNA Strängen komplementäre cDNA Moleküle synthetisiert. Um jede beliebige RNA Sequenz umschreiben zu können, werden degenerierte Primer (dN6) aus sechs Nukleotiden in allen denkbaren Kombinationen verwendet.

Zunächst wird eine Menge von 1 µg RNA mit Wasser auf ein Volumen von 17,5 µl ergänzt und mit 1 µl (0,1 U) dN6-Primer vermischt. Nach kurzer Zentrifugation wird dieser Ansatz bei 72° C für 10 Minuten im Thermocycler inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Anschließend wird wieder kurz zentrifugiert und der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt.

Dann werden 11,5 µl des Reaktions-Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) dazugegeben, der Ansatz erneut zentrifugiert und bei 42 °C für eine Stunde im Thermocycler inkubiert. Im Idealfall wurde nun die gesamte RNA in den Proben in cDNA umgewandelt. Da die Effizienz der reversen Transkriptase jedoch variabel ist, müssen die quantitativen Messungen der Zielgene später auf eine Reihe von Referenzgenen normalisiert werden. Abschließend werden die Proben mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt und bei -22°C gelagert

	je Probe
5x RT-Puffer	6,00 µl
0,1 M DTT	3,50 µl
10mM dNTPs	1,00 µl
RNAse-Inhibitor (30U/µl)	1,00 µl
SuperScript II Reverse-Transkriptase (200U/µl)	0,25 µl
Gesamt	11,75 µl

Tabelle 8: Mastermix für cDNA-Synthese

### 3.7 Quantitative *real-time*-PCR

Die qRT-PCR wurde in dieser Arbeit benutzt, um den Expressionszustand von 10 Zielgenen und einer Positiv-Kontrolle zu bestimmen. Hierzu wurden die cDNA-Fragmente spezifisch amplifiziert und die Menge der Produkte nach jedem Zyklus gemessen (*real time*). Um Artefakte durch Variabilitäten der reversen Transskription zu eliminieren, wurden darüber hinaus 6 Referenz- bzw. Normalisierungsgene gemessen.

Jeder Zyklus der PCR besteht aus den drei Phasen Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Nach der Denaturierung bei 95°C liegen die cDNA-Fragmente als Einzelstränge vor und ermöglichen so die Bindung der spezifischen Primer (Oligonukleotide). Diese Bindung erfolgt in der *Annealing*-Phase an den zu amplifizierenden Bereich der cDNA. Anschließend wird der Primer in der Elongationsphase von der Polymerase komplementär zur cDNA-Vorlage verlängert. Als Substrat dienen der Polymerase desoxy-Nukleotidtriphosphat-Bausteine (dNTPs), die im Überschuss vorliegen. Bei der verwendeten Polymerase handelt es sich um ein *hot-start*-Enzym, welches von einem Antikörper blockiert ist und zunächst durch einen 10 bis 15 minütigen initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C aktiviert werden muss. Dadurch wird eine unerwünschte vorzeitige Amplifikation (z.B. von Primerdimeren) bei Raumtemperatur oder während der Aufheizphase im Taqman verhindert. Im ersten Zyklus der PCR wird die als Einzelstrang vorliegende cDNA mit dem jeweils komplementären Partner zur Doppelstrang-cDNA ergänzt. In allen weiteren Zyklen, in der Regel 40 - 45, wird die cDNA idealerweise verdoppelt.

Die Zunahme der Amplifikate wird über ein Fluoreszenzsignal nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Als Detektor wird hier die DNA-interkalierende Verbindung SYBR<sup>®</sup>-Green verwendet. SYBR<sup>®</sup>-Green liefert nur dann ein Fluoreszenzsignal, wenn es in doppelsträngige DNA eingelagert wird, so dass die Stärke des Fluoreszenzsignals mit der vorhandenen Menge an dsDNA korreliert. Für alle Proben wird bestimmt, wann das Fluoreszenzsignal eine bestimmte Stärke (sog. *Cycle threshold*, Ct) erreicht. Dieser Wert wird umso eher erreicht, je mehr cDNA Moleküle des amplifizierten Bereichs und damit je mehr mRNA Moleküle in der ursprünglichen Probe vorhanden waren. Die Ct-Werte müssen im linearen Bereich der typischerweise sigmoidalen Verlaufskurve der Fluoreszenzstärke liegen. Für die Auswertung werden diese Werte miteinander verglichen.

Die qRT-PCR-Messungen wurden in Thermo-Fast 384er-Platten von ABgene in insgesamt 10 µl Probenvolumen (3 µl cDNA) in Doppelbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine 5-Punkt-Standardreihe und eine Wasserprobe als Leerkontrolle mitgeführt. Die genauen PCR-Bedingungen für jedes einzelne Gen können der Tabelle 9 entnommen werden.



<u>Gene</u>	<u>Annealing</u>	<u>Annealing</u>	<u>Elongation</u>	<u>Elongation</u>	<u>Zykluszahl</u>
<b><u>Referenzgene</u></b>					
GAPDH	30 s	60° C	60 s	72° C	45
HPRT1	30 s	60° C	60 s	72° C	45
PMCA4	30 s	60° C	60 s	72° C	45
SDHA	30 s	60° C	60 s	72° C	40
UBC	20 s	60° C	40 s	72° C	45
YWHAZ	20 s	65° C	30 s	72° C	40
<b><u>Zielgene</u></b>					
CAT	30 s	65° C	60 s	72° C	45
CYBA	30 s	60° C	60 s	72° C	45
CYBB	30 s	55° C	60 s	72° C	45
G6PD	30 s	55° C	60 s	72° C	45
GPX1	30 s	60° C	60 s	72° C	45
GPX2	30 s	60° C	60 s	72° C	45
GSTP1	30 s	55° C	60 s	72° C	45
SOD1	30 s	55° C	60 s	72° C	45
SOD2	30 s	55° C	60 s	72° C	45
TXN	30 s	60° C	60 s	72° C	45
<b><u>Positivkontrolle</u></b>					
CDKN1A	20 s	64° C	40 s	72° C	40

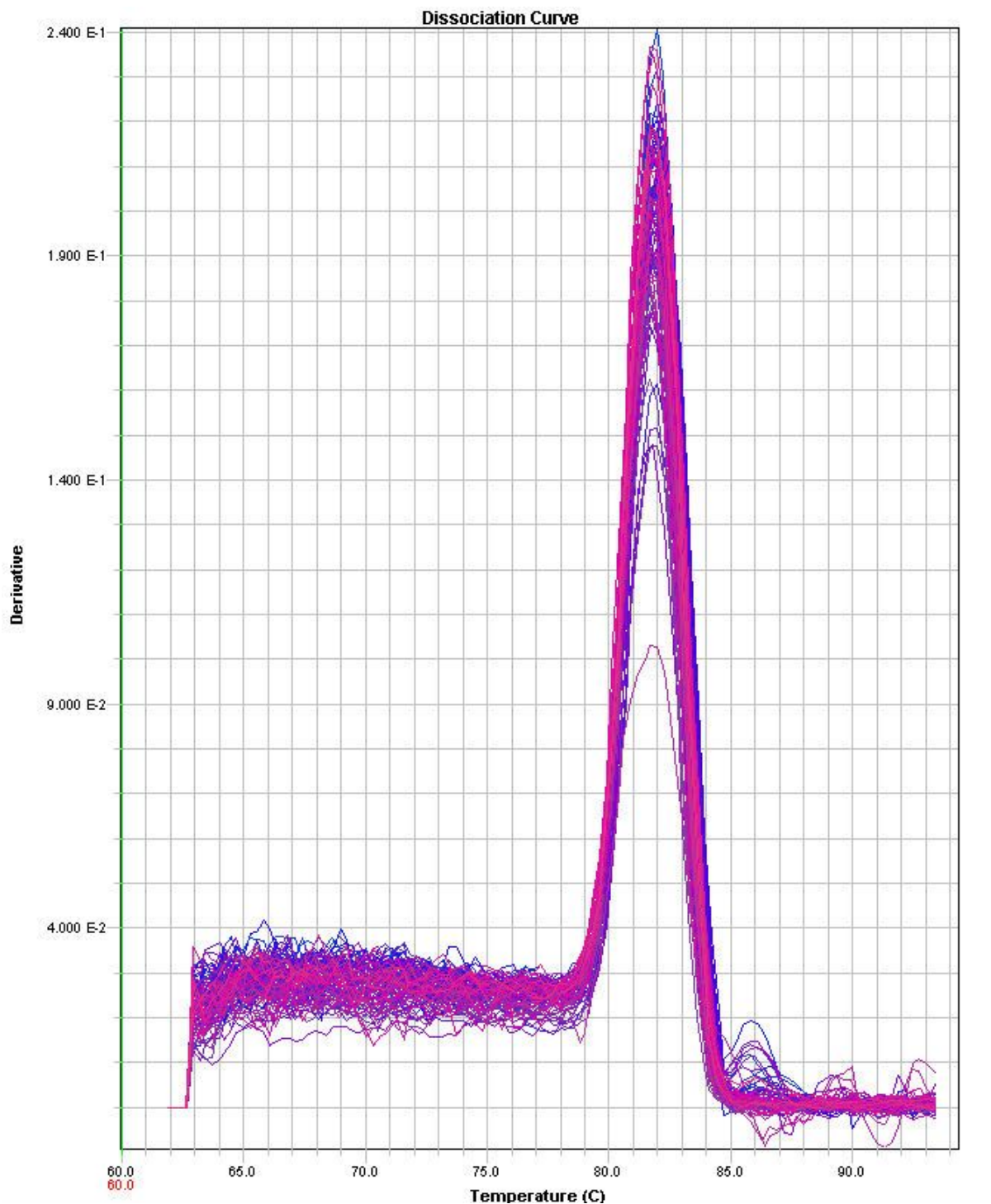
**Tabelle 9: PCR-Bedingungen**

Zur Sicherstellung der Qualität der qRT-PCR werden drei Verfahren eingesetzt. Die Effektivität der verwendeten Primer wird anhand einer auf jeder Platte mitgeführten 5-Punkte-Standardreihe überprüft. Die Standardgerade sollte zumindest näherungsweise eine Verdoppelung der cDNA-Menge pro Zyklus zeigen. Zweitens wird am Ende der Reaktion eine Schmelzkurve aufgezeichnet, die nur einen scharfen Peak zeigen sollte. Damit wird sichergestellt, dass das verwendete Primerpaar spezifisch an die Zielsequenzen bindet und keine Nebenprodukte bildet. Die Spezifität der Primer wird weiterhin mithilfe einer Gelelektrophorese überprüft.

Die in der qRT-PCR gewonnenen Daten wurden zunächst mit der geräteeigenen Software SDS 2.1. ausgewertet. Die so gewonnenen Ct-Werte wurden anschließend in Excel weiterverarbeitet. Dabei erfolgte zunächst eine Normierung auf ein gewichtetes Mittel aus

mindestens 2 geeigneten Referenzgenen. Ein Referenzgen war dann für die Normierung geeignet, wenn seine Expressionsstärke ähnlich der des Zielgens war.

In einem zweiten Schritt wurden die Expressionswerte der Zeitpunkte 1 und 2 auf die Kontrolle zum Zeitpunkt 0 bezogen, so dass für die statistische Auswertung der prozentuale Anstieg der Expressionstärke in Bezug auf den Ausgangswert vor Therapie herangezogen wurde.



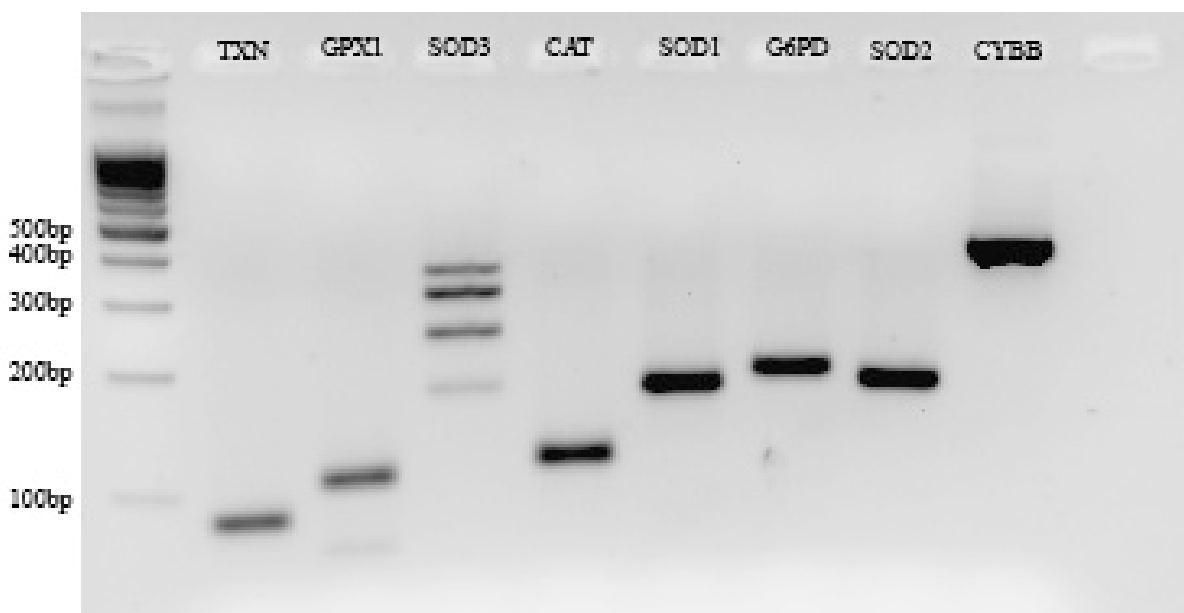
**Abbildung 10: Beispielhafte Schmelzkurve der Katalase. Alle untersuchten Gene erfüllten die gleichen Anforderungen an die Schmelzkurve.**

### 3.8 Gelelektrophorese

Um auszuschließen, dass bei der PCR Nebenprodukte entstehen, die fälschlicherweise bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt werden, wurden für alle Gene die PCR-Produkte auf einem Agarosegel sichtbar gemacht. Die Nukleinsäuren wandern bei der Gelelektrophorese im elektrischen Feld mit einer von ihrer Größe abhängigen Geschwindigkeit zur Anode. Kleine DNA-Fragmente können leichter durch die Poren des Agarosegels wandern und legen so in der gleichen Zeit eine längere Strecke zurück als größere DNA-Fragmente. Der Trennbereich der Gelelektrophorese hängt von der Porengröße und damit von der Konzentration der Agarose ab.

Zur Herstellung des Gels wird die nötige Menge Agarose abgewogen, mit TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend kühlt das Gel bei Raumtemperatur ab, etwa bei 55° - 60 C werden pro 50 ml Gelvolumen 2,5 µl einer 1-prozentigen Lösung Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid (EtBr) interkaliert mit doppelsträngiger DNA und kann unter UV-Licht detektiert werden. Das Gel wird nun in die mit Kämmen vorbereitete Elektrophoresekammer gegossen und kühlt weiter bis zur Verfestigung ab.

Jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit Glycerol-Ladepuffer werden in die Taschen des Gels pipettiert, außerdem wird ein 100 bp-Längenstandard mitgeführt, um später die Fragmentlängen bestimmen zu können. Dabei zeigten alle in dieser Arbeit untersuchten Gene eine einzelne scharfe Bande mit der korrekten Fragmentlänge.



**Abbildung 11: Beispielhaftes Foto eines Elektrophoresegels. Für alle verwendeten Primer wurde die Spezifität auf gleiche Weise nachgewiesen.**

## **3.9 Statistik**

### **3.9.1 Deskriptive Statistik**

Bei der deskriptiven Statistik handelt es sich zusammengefasst um die reine Darstellung der Messdaten, beispielsweise in Tabellen oder verschiedenen Diagrammformen. In dieser Arbeit kamen neben der tabellarischen Auflistung der Messdaten ausschließlich Boxplots zur Darstellung.

Boxplots zeichnen sich durch eine sehr übersichtliche Darstellung von Messgrößen und ihrer Streuung aus und ermöglichen auch die Darstellung von Zusammenhängen zwischen den Messdaten und klinischen Endpunkten. Dabei markiert die fettgedruckte horizontale Linie den Median und wird von der „Box“ umgeben. Die untere und obere Begrenzung der Box repräsentieren das erste und das dritte Quartil, Q1 und Q3. Der Abstand zwischen Q1 und Q3 wird als Interquartilabstand (IQA) bezeichnet und enthält die Hälfte der Messwerte. Die orthogonal zueinander stehenden Linien unter- und oberhalb der Box markieren den gesamten Streubereich unter der Voraussetzung, dass kein Messwert weiter als 1,5 IQAs von der Box entfernt liegt. Messwerte mit einem noch größeren Abstand zur Box von mindestens 1,5 IQAs und höchstens 3 IQAs werden als Ausreißer bezeichnet und mit einem Kreis dargestellt. Die Extremwerte mit mehr als 3 IQAs Abstand zur Box markiert man mit einem Stern.

### **3.9.2 Analytische Statistik**

Bei der Auswahl geeigneter Testverfahren muss zunächst einmal zwischen parametrischen und nicht-parametrischen Tests unterschieden werden. Die für einen parametrischen Test geforderte besondere Verteilung der Daten kann mit bestimmten Tests wie z. B. dem Shapiro-Wilk-Test nachgewiesen werden. Dazu ist allerdings eine Fallzahl von wenigstens  $n=40$  erforderlich, die in dieser Arbeit nur in der Bestätigungsstudie erreicht wird. Die dort erhobenen Daten sind nicht normalverteilt, so dass für die Analysen in meiner Arbeit ausschließlich nicht-parametrische Tests zu Anwendung kommen.

Alle statistischen Tests wurden von der Software SPSS (Version 12.0) berechnet. Als Grenze für statistische Signifikanz legten wir  $p<0,05$  fest, bei multiplem Testen passte ich diese Grenze nach den üblichen Regeln an.

Im Einzelnen wurden folgende Testverfahren benutzt:

<b><u>Test</u></b>	<b><u>Anwendung</u></b>
Jonckheere-Terpstra-Test	Prüft, ob sich mehrere unabhängige Gruppen hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable (z. B. Tumorregressionsgrad) unterscheiden.
Mann-Whitney-U-Test	Prüft, ob zwei voneinander unabhängige Gruppen zur gleichen Grundgesamtheit gehören.
Spearman's Rangkorrelationskoeffizient	Prüft, ob die Werte zweier Gruppen miteinander korrelieren.
Wilcoxon-Rangsummentest	Prüft, ob zwei paarweise voneinander abhängige Verteilungen zur gleichen Grundgesamtheit gehören.

**Tabelle 10: Statistische Tests**

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isoprostane: Qualität des Elisa

In diesem Teil der Arbeit wurde die Markersubstanz 8-iso-PGF in den zwei komplexen biologischen Matrices Urin und Serum untersucht. Um die Reliabilität des Tests zu erhöhen, wurden alle Proben dreifach gemessen. Der mittlere Variationskoeffizient ist in der nachfolgenden Tabelle 11 zu finden. Dieser Parameter wird berechnet, indem man den Mittelwert der Quotienten aus Standardabweichung und Mittelwert aller Einzelproben bildet. Dabei gilt, dass ein mittlerer Variationskoeffizient von höchstens 0,3 noch als akzeptabel erachtet werden kann.

<b><u>Rektum-Ca</u></b>	<b><u>Min</u></b>	<b><u>Q1</u></b>	<b><u>Q2</u></b>	<b><u>Q3</u></b>	<b><u>Max</u></b>
Urin T0	0.03	0.06	0.09	0.22	0.54
Urin T1	0.01	0.09	0.12	0.19	0.55
Urin T2	0.02	0.05	0.10	0.17	0.54
Serum T0	0.02	0.13	0.22	0.25	0.28
Serum T1	0.11	0.14	0.15	0.22	0.26
Serum T2	0.01	0.11	0.15	0.19	0.25
<b><u>Prostata-Ca</u></b>	<b><u>Min</u></b>	<b><u>Q1</u></b>	<b><u>Q2</u></b>	<b><u>Q3</u></b>	<b><u>Max</u></b>
Urin T0	0.01	0.05	0.07	0.09	0.22
Urin T1	0.01	0.08	0.10	0.21	0.67
Urin T2	0.01	0.06	0.12	0.14	0.59

**Tabelle 11: Mittlerer Variationskoeffizient der Isoprostan-Messwerte. Dabei stellt die Tabelle die Bandbreite dieses Parameters anhand von Minimum, Maximum sowie dem 1., 2. und 3. Quartil dar.**

## 4.2 Isoprostane

### 4.2.1 Gesamtgruppe Rektumkarzinom

<u>Messwerte</u>	<u>Min</u>	<u>Q1</u>	<u>Q2</u>	<u>Q3</u>	<u>Max</u>
Urin T0 [ng/mmol Kreatinin]	60.47	100.18	121.29	242.15	944.91
Urin T1 [ng/mmol Kreatinin]	47.96	90.55	143.79	267.19	962.95
Urin T2 [ng/mmol Kreatinin]	58.51	91.71	153.86	310.34	1595.45
Serum T0 [pg/ml]	556.81	2805.55	5699.19	10824.31	11807.26
Serum T1 [pg/ml]	705.75	2527.45	5554.66	10930.84	18661.14
Serum T2 [pg/ml]	729.95	2033.27	2314.75	10775.24	21438.98

Tabelle 12: Isoprostan-Messwerte in der Gruppe Rektumkarzinom, dargestellt sind Minimum, Maximum sowie das 1., 2. und 3. Quartil.

Betrachtet man die Gesamtgruppe von 17 Patienten, dann zeigt sich weder im Urin noch im Serum eine signifikante Veränderung der Isoprostanspiegel im Verlauf der Behandlung. Die Isoprostanwerte in Urin und Serum waren nicht miteinander korreliert.

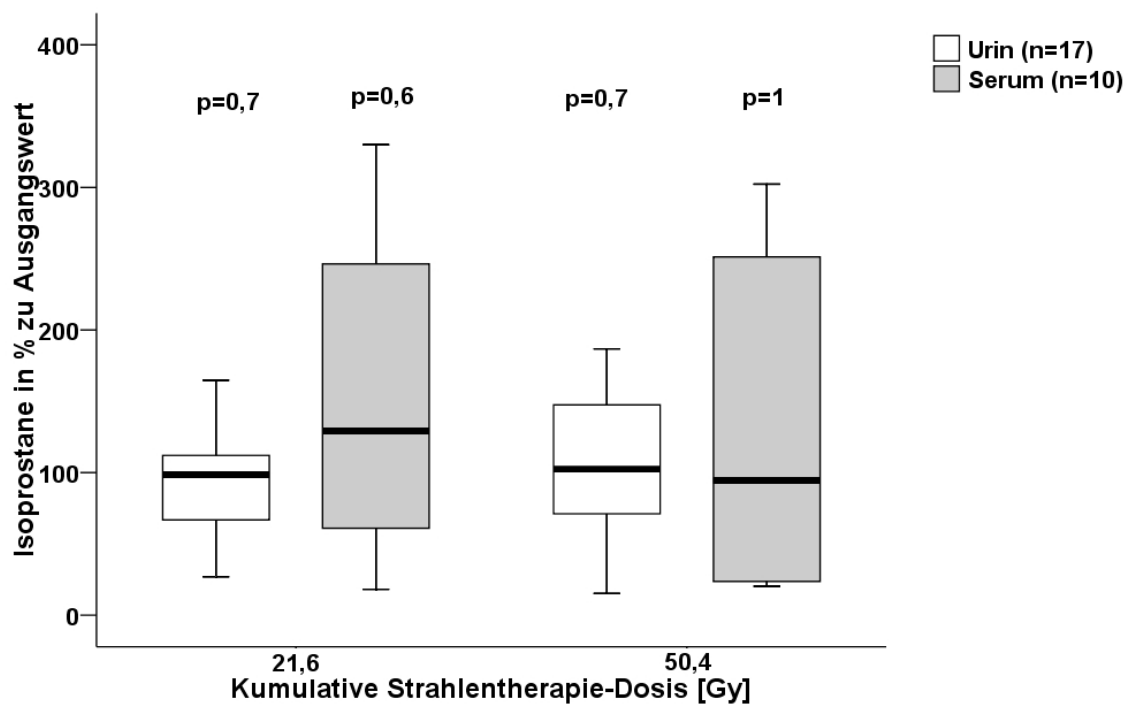


Abbildung 12: Isoprostan-Gesamtgruppe, p-Werte aus Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

#### 4.2.2 Toxizität beim Rektumkarzinom

Allerdings zeigten die Patienten mit CTC-Toxizität Grad II oder höher an Darm, Blase oder Haut zum Zeitpunkt T1 (nach 21,6 Gy) einen signifikant niedrigeren Isoprostan-Spiegel im Urin als die Patienten mit geringerer Toxizität ( $p=0,03$ , Abbildung 13). Im Serum konnte diese Veränderung nicht nachgewiesen werden (Abbildung 29).

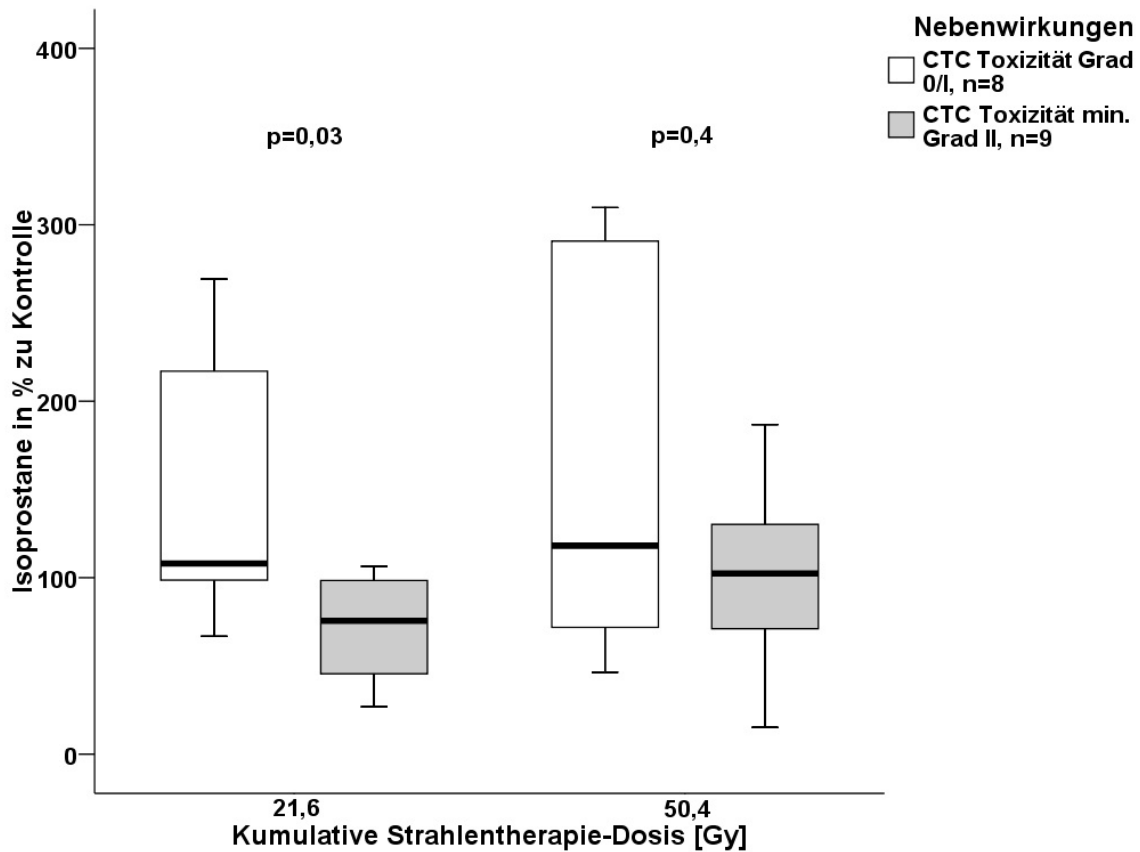


Abbildung 13: Isoprostane im Urin, p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test



### 4.2.3 Gesamtgruppe Prostatakarzinom

<u>Messwerte</u>	<u>Min</u>	<u>Q1</u>	<u>Q2</u>	<u>Q3</u>	<u>Max</u>
Urin T0 [ng/mmol Kreatinin]	14.17	22.60	28.51	35.74	46.46
Urin T1 [ng/mmol Kreatinin]	13.74	22.12	32.18	38.20	54.48
Urin T2 [ng/mmol Kreatinin]	15.46	21.16	24.53	32.88	129.32

Abbildung 14: Isoprostane Messwerte in der Gruppe Prostatakarzinom, dargestellt sind Minimum, Maximum sowie das 1., 2. und 3. Quartil.

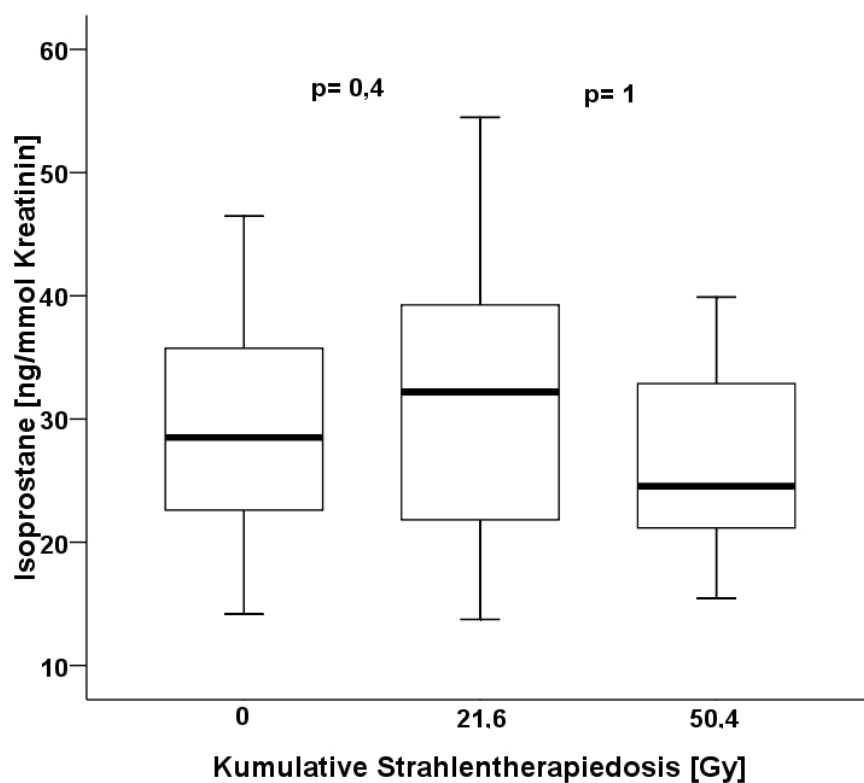


Abbildung 15: Isoprostane Prostatakarzinom, p-Werte aus Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

In der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Isoprostanspiegeln und der Strahlenbehandlung nachgewiesen werden. Auch eine weitere Aufteilung nach der Art der systemischen Therapie zeigte keine signifikanten Veränderungen. Da in dieser Gruppe zu wenige Patienten höhergradige Nebenwirkungen hatten, war eine Analyse auf Zusammenhänge mit diesem Parameter nicht möglich. Gleiches gilt für einen möglichen Zusammenhang zwischen Patienten mit alleiniger Bestrahlung der Prostataloge und Patienten mit Bestrahlung der Prostataloge und des pelvinen Lymphabflussgebietes.

### 4.3 Pilotstudie zur Genexpression

#### 4.3.1 Effekte in der Gesamtgruppe

<u>Gen</u>	<u>Tag 1 zu Ausgangswert (in %)</u>			<u>Tag 2 zu Ausgangswert (in %)</u>		
	<u>Median [%]</u>	<u>Bereich [%]</u>	<u>(IQA) p-Wert</u>	<u>Median [%]</u>	<u>Bereich (IQA) [%]</u>	<u>p-Wert</u>
<b>CAT</b>	91	46-309	(62-152) 0.8	122	50-439	(112-214) <b>0.009</b>
<b>CDKN1A</b>	249	57-778	(139-350) <b>0.003</b>	357	46-706	(160-484) <b>0.003</b>
<b>CYBA</b>	127	65-182	(96-145) <b>0.03</b>	137	32-220	(100-185) <b>0.05</b>
CYBB	102	72-279	(78-158) 0.3	121	54-423	(77-193) 0.1
G6PD	106	48-383	(87-185) 0.3	166	33-833	(112-209) 0.07
<b>GPX1</b>	155	35-706	(102-245) <b>0.02</b>	220	100-1615	(130-296) <b>0.001</b>
GPX2	89	51-158	(67-107) 0.1	110	29-200	(73-130) 1
GSTP1	89	64-231	(74-115) 0.6	116	82-245	(95-166) 0.7
SOD1	126	28-270	(90-160) 0.2	115	18-180	(90-161) 0.6
SOD2	99	60-289	(72-157) 0.5	165	32-520	(66-197) 0.3
TXN	92	42-281	(71-152) 0.8	88	55-345	(83-151) 0.3

**Tabelle 13: Prozentuale Veränderung der Expression (p-Wert nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)**

Folgende Veränderung der Genexpression im gesamten Patientenkollektiv ist zu sehen: Die in Tabelle 13 fettgedruckten und im folgenden als signifikant beschriebenen Effekte sind nominal statistisch signifikant mit einem Grenzwert von  $p=0,05$ .

Die Katalase wird am Ende der Bestrahlung im Median 22% stärker exprimiert als vor der Therapie ( $p=0,009$ ). Zum Zeitpunkt 1 zeigt die Katalase noch keine signifikante Veränderung.

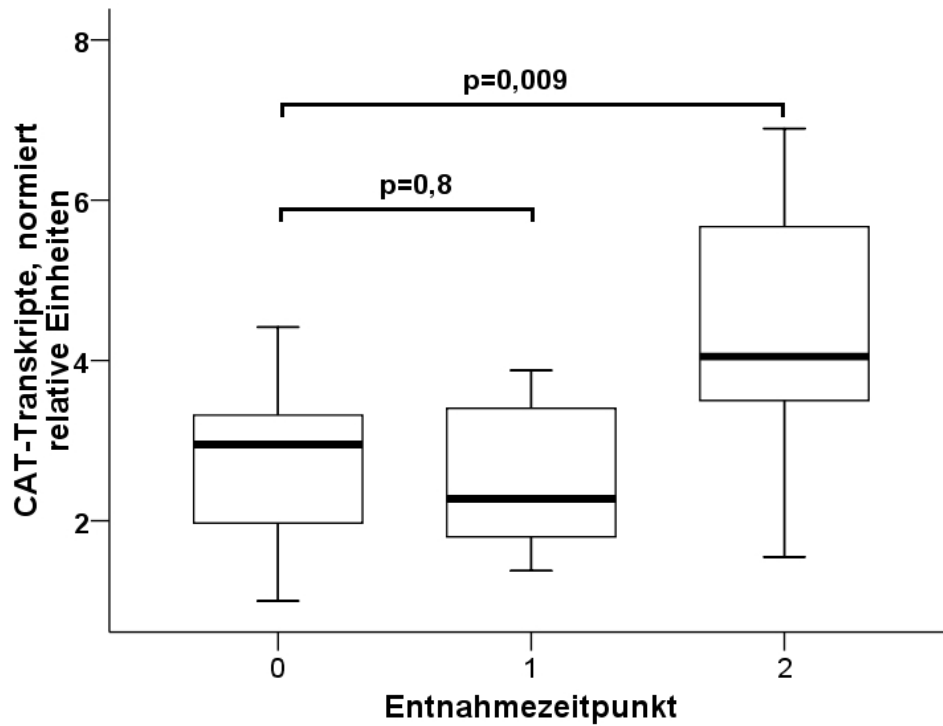


Abbildung 16: Transkripte der Katalase in relativen Einheiten, normiert

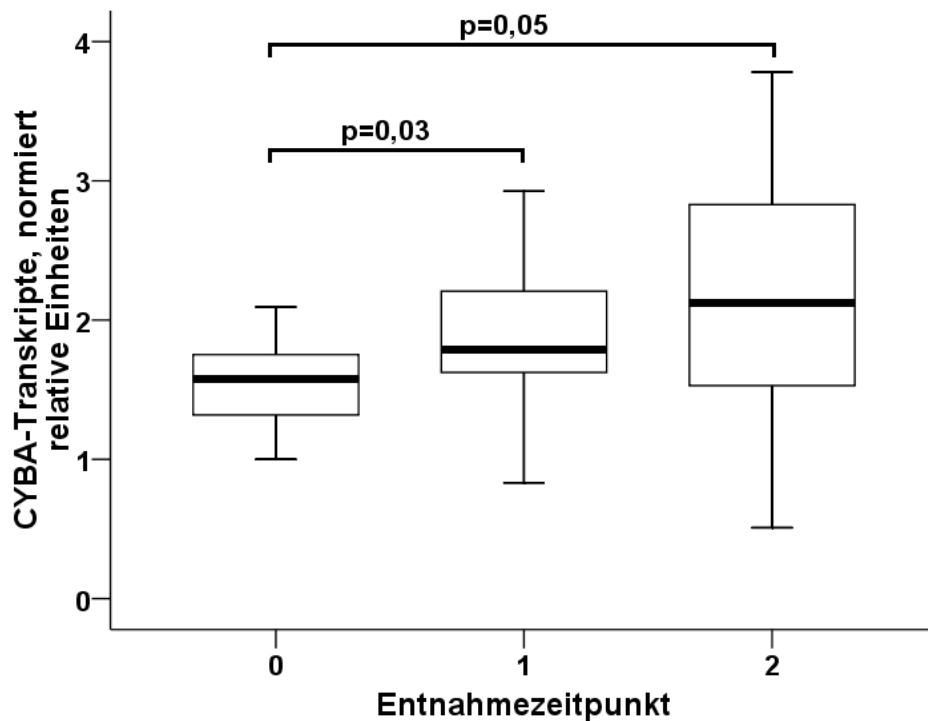


Abbildung 17: Transkripte von CYBA in relativen Einheiten, normiert

CYBA wird zu beiden Zeitpunkten stärker exprimiert als vor Beginn der Bestrahlung (27% und  $p=0,03$  bzw. 37% und  $p=0,05$ ).

Die GPX1 wird ebenfalls an beiden Zeitpunkten signifikant stärker exprimiert, an Tag 1 um 55% ( $p=0,02$ ) sowie an Tag 2 um 120% ( $p=0,001$ ).

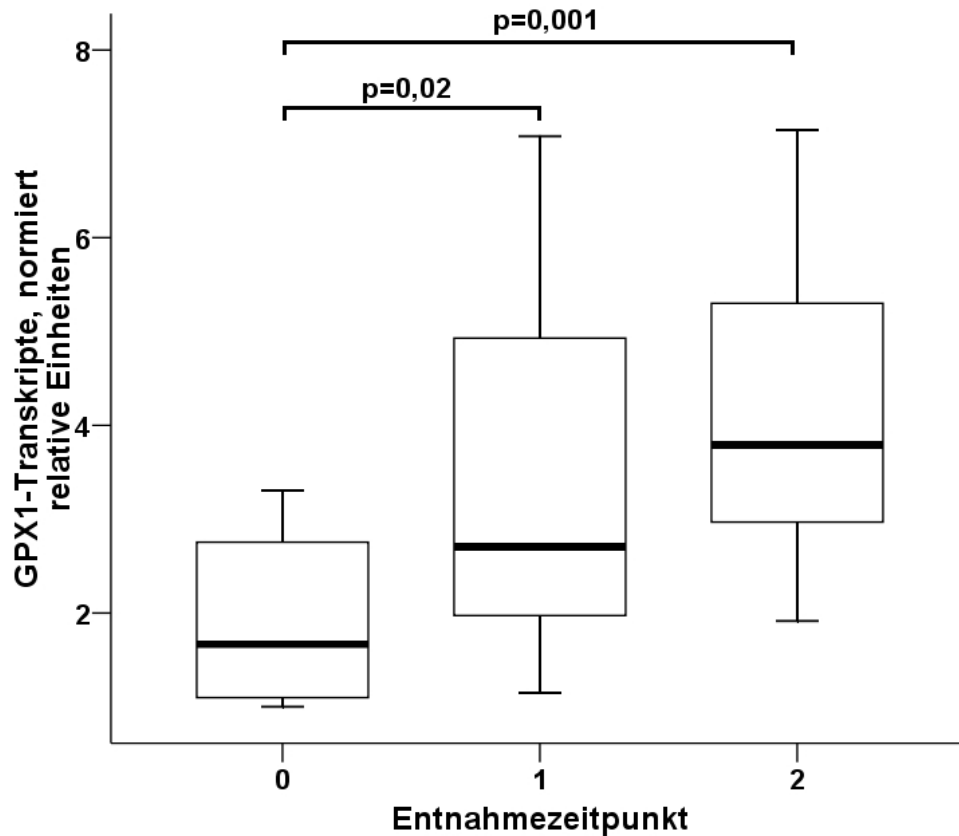


Abbildung 18: Transkripte der Glutathionperoxidase 1 in relativen Einheiten, normiert

Alle anderen Gene zeigen keine signifikante Veränderung während der Radiochemotherapie.

Keines der 10 beobachteten Gene zeigt einen signifikanten Rückgang der Expression.

Die Expression des als Positivkontrolle bestimmten Gens CDKN1A steigt an Tag 1 um 149% ( $p=0,003$ ) und an Tag 2 um 257% ( $p=0,003$ ) signifikant an (Abbildung 19).

Da hier 20 Parameter (10 Genen an je 2 Zeitpunkten) untersucht wurden, muss der nominal statistische Grenzwert nach konservativem Bonferroni-Adjustieren auf multiples Testen durch 20 geteilt werden. Dies ergibt als Grenzwert  $p=0,0025$ .

Nach dieser Adjustierung bleibt nur noch die Induktion der GPX1 am Entnahmezeitpunkt 2 signifikant ( $p=0,001$ ). Bei diesem Effekt gibt es keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Chemotherapie-Armen ( $p=1$  im Mann-Whitney-U-Test).

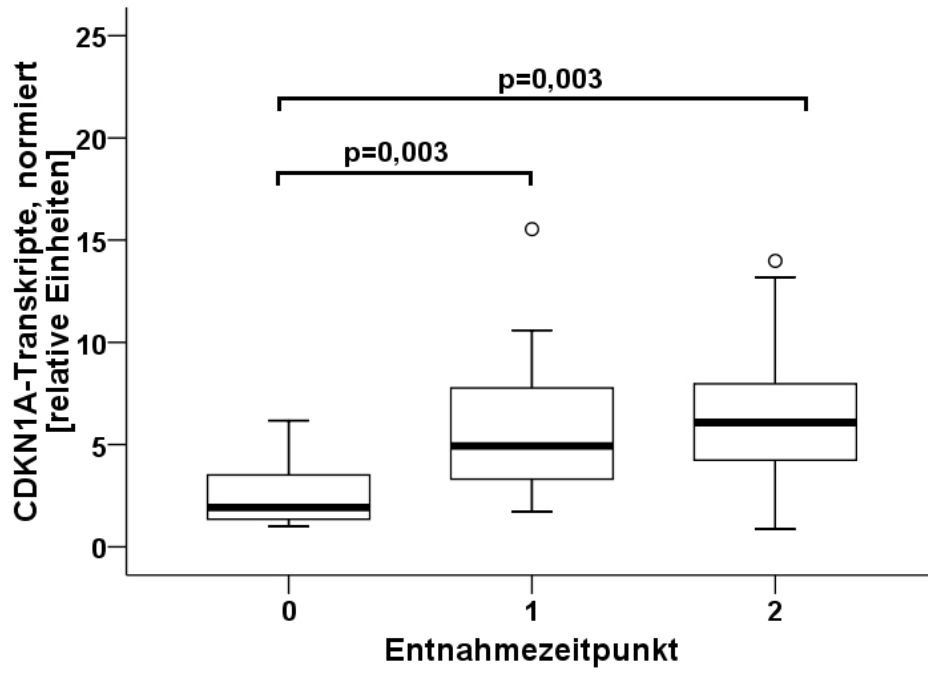


Abbildung 19: Transkripte der CDKN1A in relativen Einheiten, normiert

### 4.3.2 Genexpression und Toxizität

Zur weiteren Analyse wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen mit niedriger bzw. hoher strahlungsbedingter Toxizität aufgeteilt. Hierbei galt als Kriterium für eine hohe Toxizität eine CTC Toxizität von mindestens Grad II an Blase oder Darm.

Die bereits unter 4.3.1 beschriebenen Gene zeigen dabei folgende Veränderungen:

<b>Gen</b>	<b>Tag 1 zu Ausgangswert (in %)</b>			<b>Tag 2 zu Ausgangswert (in %)</b>	
	<b>Tox</b>	<b>Median (Bereich) [%]</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Median (Bereich) [%]</b>	<b>p-Wert</b>
CAT	0	62 (46-306)	0,1	118 (96-436)	0,3
	1	138 (68-201)		211 (50-439)	
CDKN1A	0	320 (86-562)	0,9	418 (46-705)	1
	1	203 (57-778)		268 (77-706)	
CYBA	0	132 (86-182)	<b>0,03</b>	114 (32-187)	0,2
	1	99 (65-141)		174 (59-220)	
GPX1	0	155 (35-706)	0,5	168 (100-506)	0,2
	1	154 (86-567)		258 (130-1615)	

**Tabelle 14: Genexpression und Toxizität, p-Werte nach Mann-Whitney-U-Test**

Die graphische Darstellung dieser Veränderungen findet sich in den Abbildungen 30 bis 37 im Anhang.

Nur das Gen CYBA zeigt eine nominal statistisch signifikante Veränderung. Zum Entnahmezeitpunkt 1 exprimiert die Gruppe mit höherer Toxizität weniger Kopien von CYBA ( $p=0,03$ ). Nach Adjustierung auf multiples Testen ist dieser Effekt nicht mehr signifikant.

Alle anderen Gene inkl. der hier nicht gezeigten zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Strahlentoxizität und Expression.

### 4.3.3 Genexpression und Tumorregressionsgrad

<u>Gen</u>	<u>Tag 1 zu Ausgangswert (in %)</u>			<u>Tag 2 zu Ausgangswert (in %)</u>	
	<u>TRG</u>	<u>Median (Bereich)</u>	<u>p-Wert</u>	<u>Median (Bereich)</u>	<u>p-Wert</u>
CAT	1	46	<b>0,02</b>	96	<b>0,002</b>
	2	70 (62-96)		113 (50-122)	
	3	96 (50-201)		157 (112-311)	
	4	197 (138-306)		436 (172-439)	
CDKN1A	1	348	0,9	508	0,1
	2	293 (57-473)		423 (77-706)	
	3	157 (86-778)		213 (160-704)	
	4	320 (139-562)		141 (46-459)	
TXN	1	81	0,9	83	<b>0,01</b>
	2	132 (48-281)		86 (66-88)	
	3	85 (42-184)		148 (55-248)	
	4	109 (49-176)		335 (154-345)	

**Tabelle 15: Genexpression und Tumorregressionsgrad (p-Wert nach Jonkheere-Terpstra-Test)**

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Genexpression und dem Tumorregressionsgrad zeigt die Katalase folgenden Befund: Die Expression der Katalase war zu beiden untersuchten Zeitpunkten umso stärker, je höher der Tumorregressionsgrad war. Dieses Ergebnis war nominal statistisch an beiden Tagen signifikant. (Tag 1:  $p=0,02$ ; Tag 2:  $p=0,002$ ), auch nach Adjustierung auf multiples Testen ist der Effekt an Tag 2 signifikant (Abbildungen 20 und 21).

Einen ähnlichen Befund zeigte das Gen TXN. Hier war an Tag 1 noch keine Veränderung in Abhängigkeit vom Tumorregressionsgrad zu sehen. An Tag 2 war die Expression von TXN dann wie bei der Katalase umso stärker, je höher der Tumorregressionsgrad war. Auch hier war das Ergebnis nominal statistisch signifikant ( $p=0,01$ ), hielt aber der Adjustierung auf multiples Testen nicht stand (Abbildungen 22 und 23).

Die Expression des als Positivkontrolle mitgeführten Gens CDKN1A war nicht signifikant vom Tumorregressionsgrad abhängig. An Tag 2 war eine Tendenz erkennbar, dass die Expression von CDKN1A mit höherem Tumorregressionsgrad schwächer würde. Dies war allerdings mit  $p=0,1$  nicht signifikant (Abbildung 38).

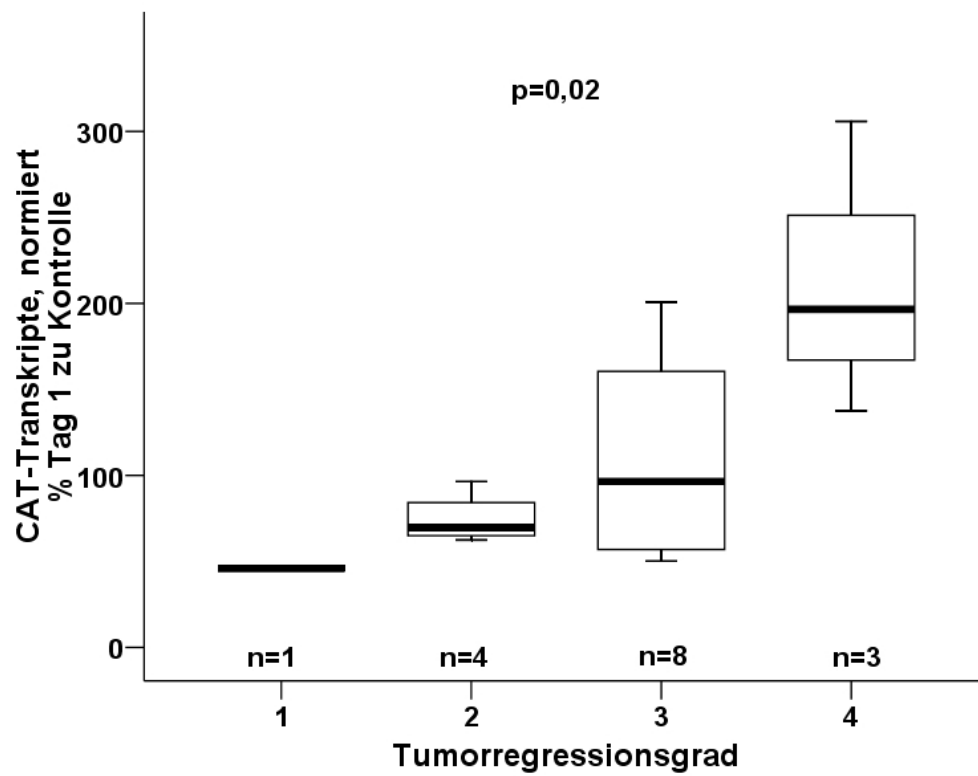


Abbildung 20: Katalase an Tag 1

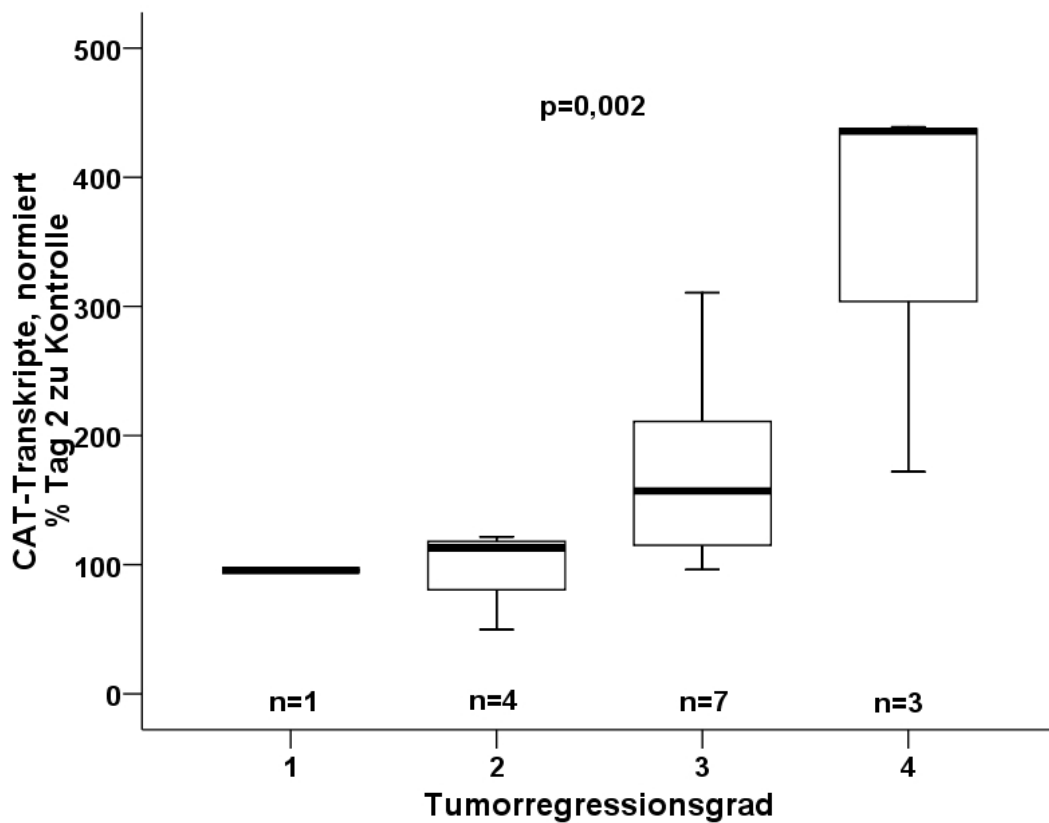


Abbildung 21: Katalase an Tag 2



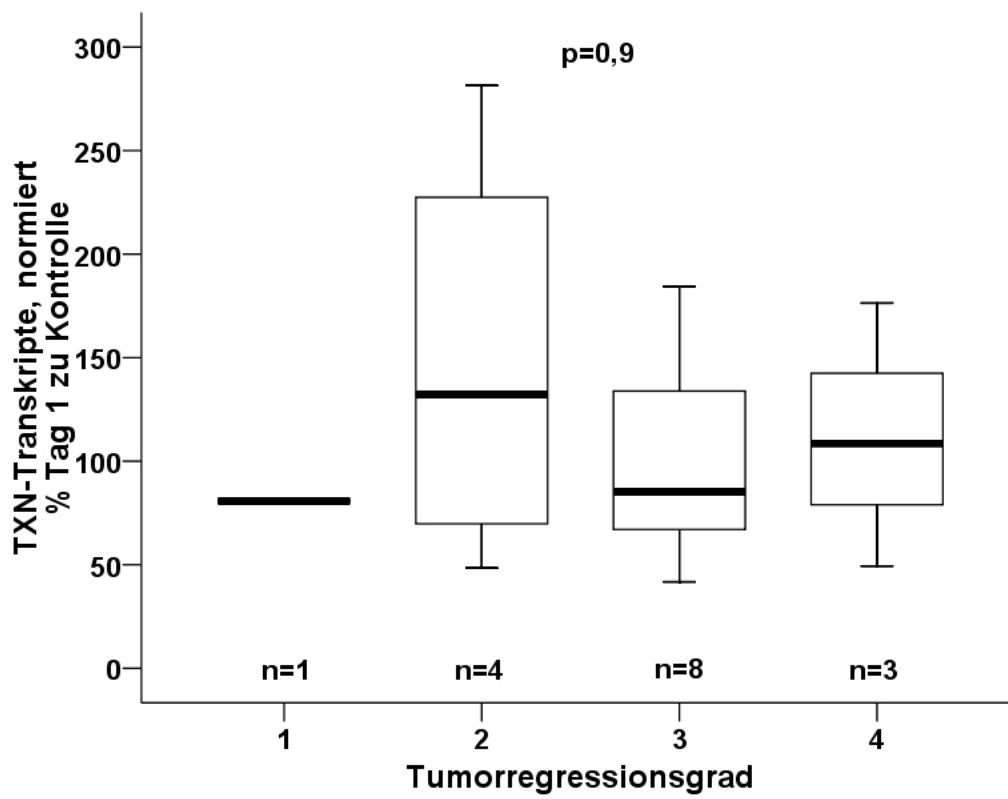


Abbildung 22: TXN an Tag 1

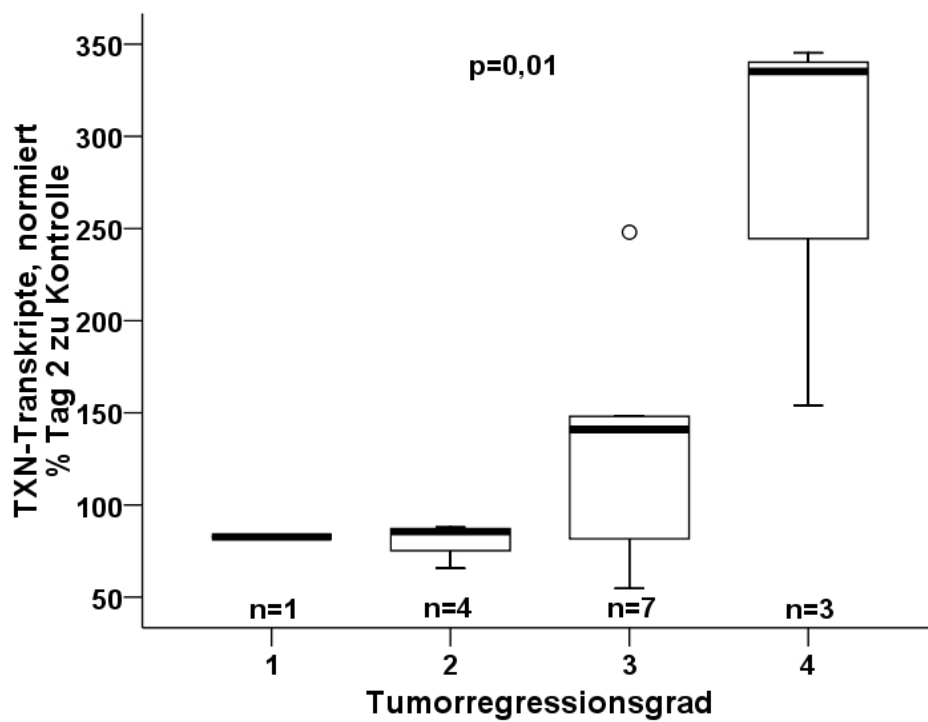


Abbildung 23: TXN an Tag 2

## 4.4 Bestätigungsstudie zur Genexpression

### 4.4.1 Effekte in der Gesamtgruppe

<u>Gen</u>	<u>Tag 1 zu Ausgangswert (in %)</u>			<u>Tag 2 zu Ausgangswert (in %)</u>		
	<u>Median</u> <u>[%]</u>	<u>Bereich</u> <u>[%]</u>	<u>(IQA)</u> <u>p-Wert</u>	<u>Median</u> <u>[%]</u>	<u>Bereich (IQA)</u> <u>[%]</u>	<u>p-Wert</u>
CAT	102	26-308 (77-143)	0,633	126	6-438 (79-172)	<b>0,021</b>
GPX1	126	14-910 (89-236)	<b>0,001</b>	165	41-1419 (104-272)	<b>1*10<sup>-6</sup></b>
TXN	99	36-368 (75-151)	0,783	100	22-390 (78-133)	0,922

**Tabelle 16: Expressionsstärke in der Gesamtgruppe in der Bestätigungsstudie (p-Werte nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)**

In der Bestätigungsstudie konnten zwei Befunde aus der Pilotstudie reproduziert werden. Die Katalase wird in beiden Fällen zum späteren Entnahmezeitpunkt induziert, allerdings erreicht dieser Befund bei größerer Fallzahl einen schlechteren p-Wert von  $p=0,021$  und hält damit einer Adjustierung auf multiples Testen nicht stand.

Die ebenso schon in der Pilotstudie gesehene Induktion der GPX1 konnte zuverlässig reproduziert werden. Die Expressionsstärke der GPX1 erreicht zum ersten Entnahmezeitpunkt im Median 126% des Ausgangswertes und zum zweiten Entnahmezeitpunkt im Median 165% des Ausgangswertes. Dieser Effekt ist mit  $p=0,001$  und  $p=0,000001$  hochsignifikant.

Bei der Expression der TXN gibt es keine Veränderung während der Therapie.

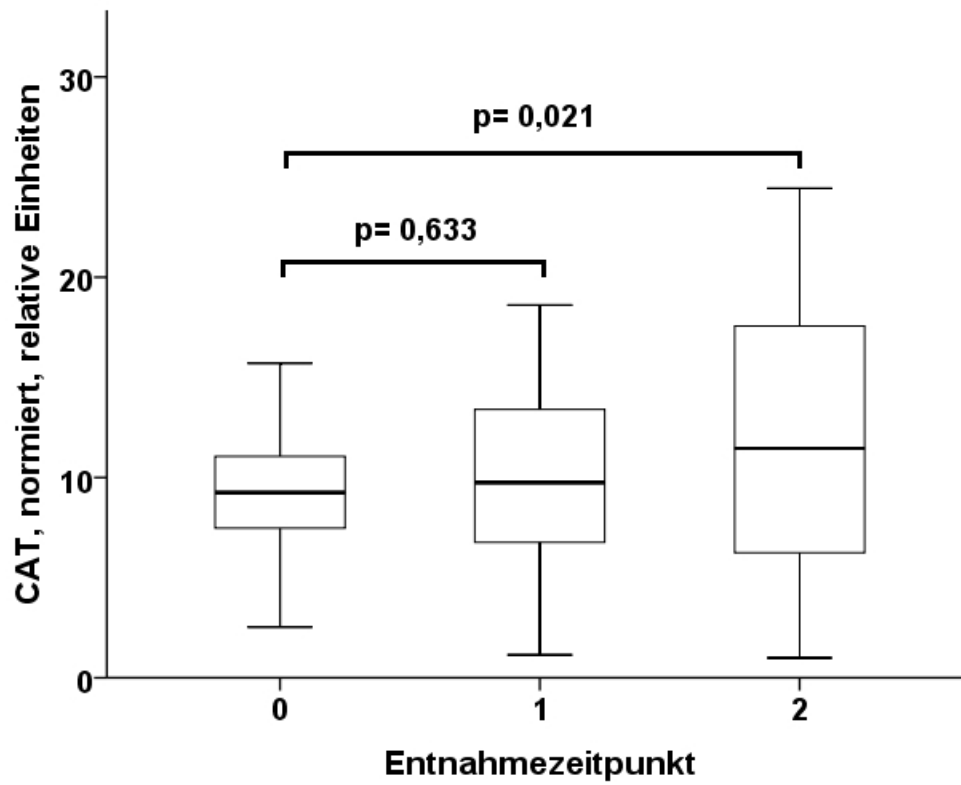


Abbildung 24: Katalase in der Bestätigungsstudie

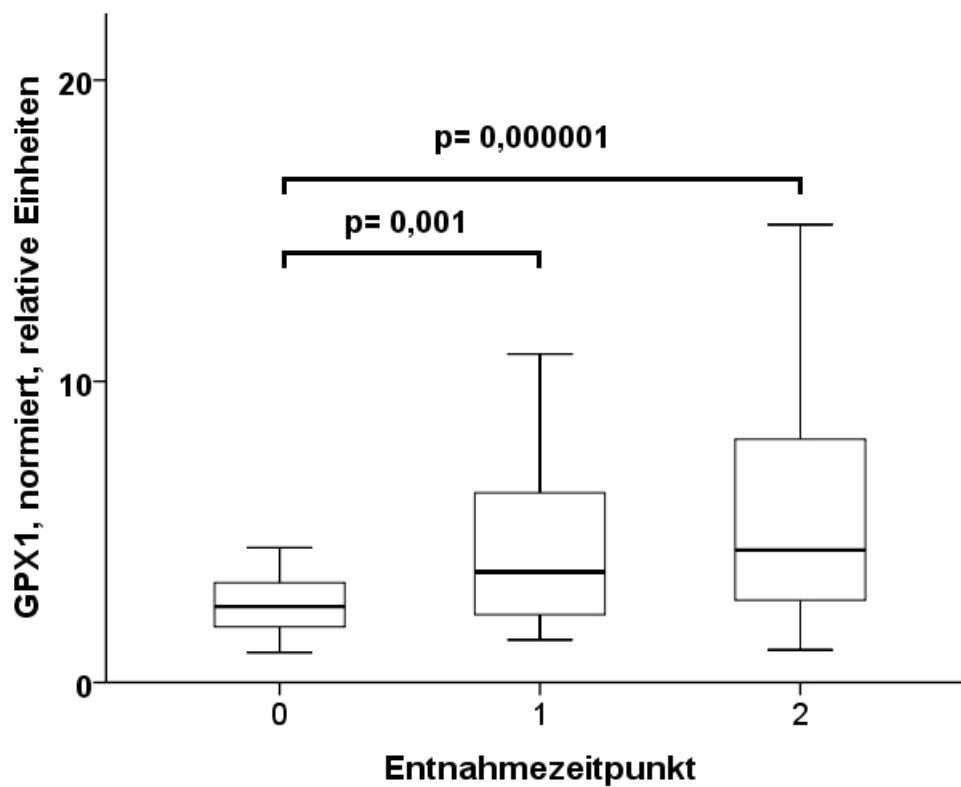


Abbildung 25: GPX1 in der Bestätigungsstudie

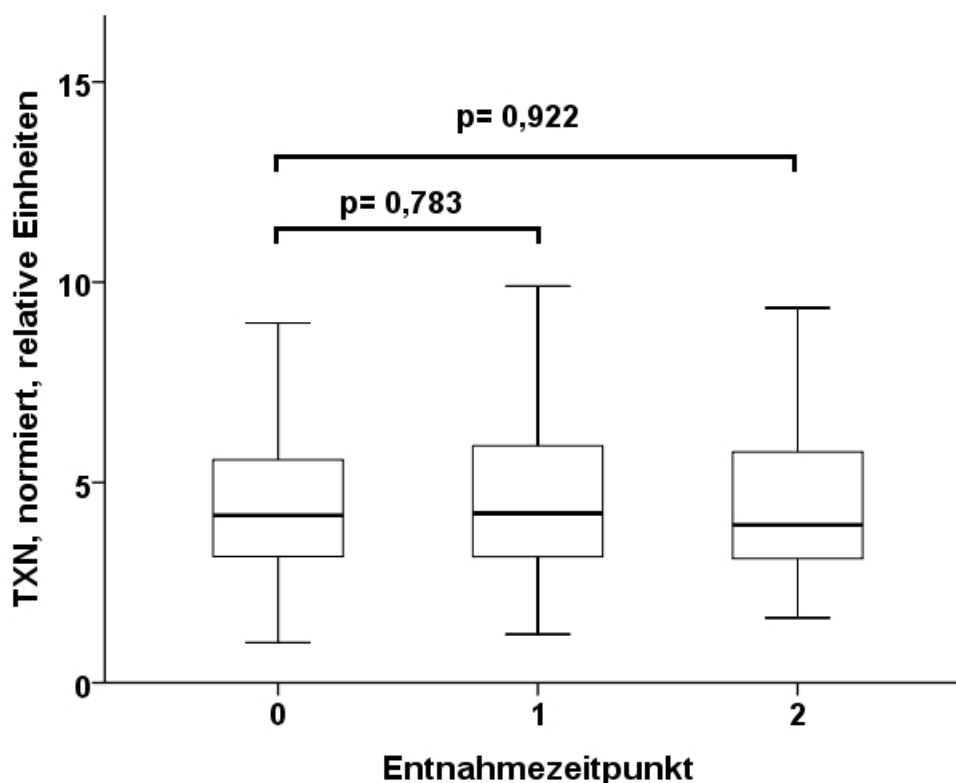


Abbildung 26: TXN in der Bestätigungstudie

#### 4.4.2 Genexpression und Tumorregression

<u>Gen</u>	<u>TRG</u>	<u>Tag 1 zu Ausgangswert (in %)</u>		<u>Tag 2 zu Ausgangswert (in %)</u>	
		<u>Median (Bereich)</u>	<u>p-Wert</u>	<u>Median (Bereich)</u>	<u>p-Wert</u>
CAT	≤ 3b	97 (26-308)	0,9	122(27-390)	0,8
	4	105 (80-113)		126 (46-171)	
TXN	≤ 3b	99 (36-368)	0,2	100 (27-390))	<b>0,03</b>
	4	138 (109-159)		238 (95-306)	

Tabelle 17: Expressionsstärke und Tumorregressionsgrad in der Bestätigungstudie (p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test)

Die in der Pilotstudie signifikante Induktion der CAT in Abhängigkeit vom Tumorregressionsgrad konnte in der Bestätigungstudie nicht mehr gezeigt werden. Es gab keine Abhängigkeit der Expressionsstärke von den Tumorregressionsgraden 1 bis 4 im Jonkheere-Terpstra-Test sowie keinen Unterschied zwischen den Gruppen mit TRG≤3b bzw. TRG=4 im Mann-Whitney-U-Test.

Auch bei TXN konnte die ordinale Aufreihung der Expressionsstärke mit steigendem Tumorregressionsgrad nicht reproduziert werden. Allerdings wird TXN in der Gruppe mit einem Tumorregressionsgrad von 4 induziert. Dieser Befund war auch schon in der Pilotstudie signifikant und konnte in der Bestätigungstudie reproduziert werden.

Betrachtet man diesen Effekt im gesamten Kollektiv aus beiden Studien, dann hält er mit  $p=0,002$  auch einer Adjustierung auf multiples Testen stand.

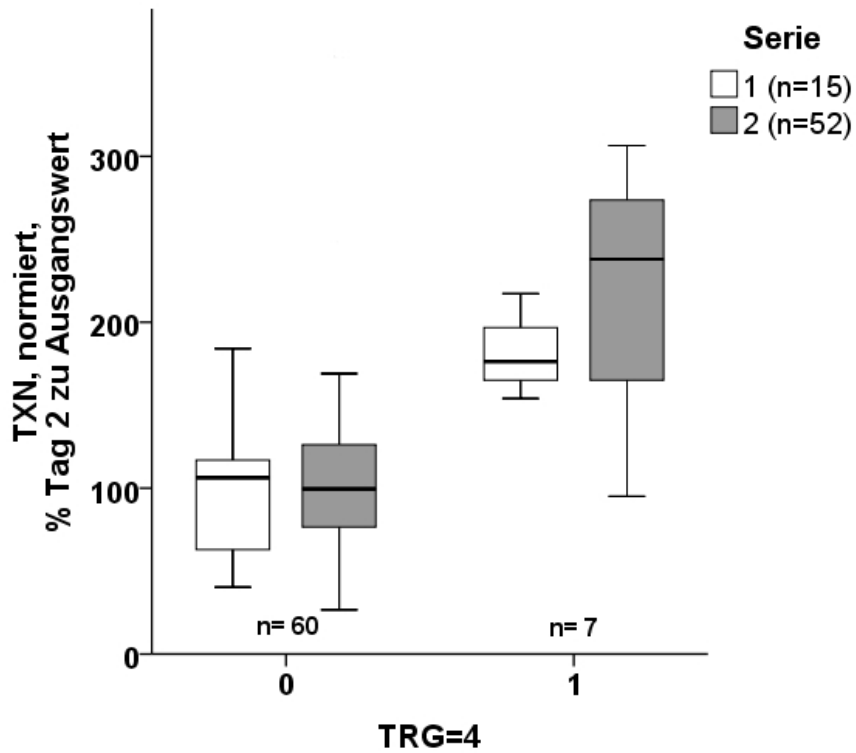


Abbildung 27: TXN und Tumorregression,  $p=0,02$  in Serie 1 (Pilotstudie) und  $p=0,03$  in Serie 2 (Bestätigungsstudie)

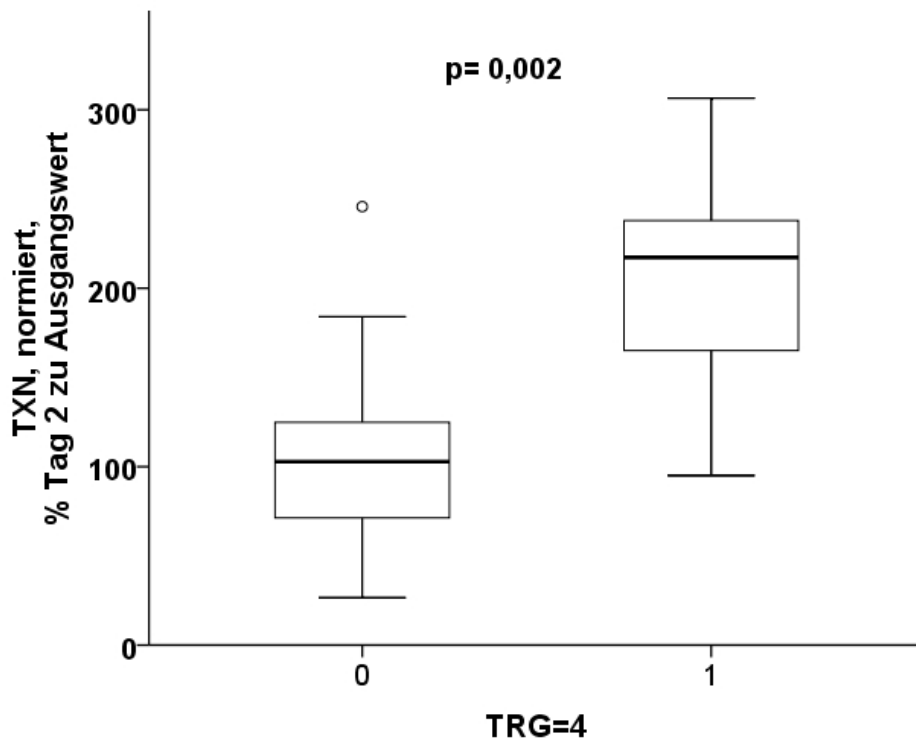


Abbildung 28: Expression und Tumorregression, beide Serien

#### **4.4.3 Genexpression und andere klinische Endpunkte**

Bei den drei in der Bestätigungsstudie untersuchten Genen zeigten sich abgesehen von den bereits beschriebenen keine weiteren Assoziationen mit klinischen Charakteristika der Patienten. Insbesondere korrelierten die Expressionswerte nicht mit dem Nodalstatus, der therapiebedingten Toxizität und der Art der Chemotherapie.

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswirkungen von Strahlentherapie auf die Isoprostan-Spiegel in Serum- und Urinproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Isoprostane als Biomarker für die oxidativen Wirkungen einer perkutanen Strahlentherapie eignen.

Die Auswirkungen von Strahlentherapie auf die DNA wurden auf der Ebene von Chromosomenaberrationen bereits untersucht. Dabei sind Chromosomenschäden ein zuverlässiger Marker für die Wirkung von Ionisierender Strahlung. Das Ausmaß des Zellschadens, angezeigt durch das Proliferationsvermögen der bestrahlten Zellkulturen, korrelierte dabei mit den chromosomalen Schädigungen (Rave-Frank et al. 2001).

Die Isoprostane sind inzwischen etablierte Biomarker für oxidativen Stress und eignen sich für die Analyse in vivo (Milne et al. 2007, Callewaert und Sloan 2010). Sie könnten also auch geeignet sein, die durch eine therapeutische Bestrahlung verursachten reaktiven Sauerstoffspezies bzw. ihre Auswirkungen anzuzeigen.

Wolfram et al. fanden im Jahr 2002, dass bei 42 Patienten nach einer Radioiodtherapie die Isoprostane-Spiegel in Plasma, Serum und Urin signifikant im Vergleich zum Ausgangswert erhöht waren (Wolfram et al. 2002).

Ein Zusammenhang zwischen ionisierender Strahlung und Isoprostanspiegeln wurde in einer Arbeit aus dem Jahr 2004 untersucht (Camphausen et al. 2004). Dort wurden Urinproben von 15 Patienten mit einem Prostatakarzinom vor und während einer Strahlentherapie gesammelt und anschließend mit einem Radioimmunoassay die Isoprostanspiegel in diesen Proben bestimmt. Die Isoprostanespiegel veränderten sich unter Bestrahlung nicht. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit an 17 Prostatakarzinom-Patienten sowohl im Urin als auch im Serum bestätigt werden. Im Unterschied zu Camphausen et al. verwendeten wir zur Analyse einen Elisa.

Als mögliche Ursache für das Nichtansprechen der Isoprostane auf die Strahlentherapie diskutierten Camphausen et al. das geringe Bestrahlungsvolumen bei der Therapie des Prostatakarzinoms. Auch in dieser Arbeit war das bestrahlte Volumen der Prostatakarzinompatienten mit einem mittleren Planungszielvolumen von  $216,75 \text{ cm}^3$  möglicherweise zu klein, um eine Veränderung bei einem systemisch gemessenen Parameter zu verursachen. Der Zeitpunkt der Probenentnahme scheint nur von untergeordneter

Bedeutung zu sein, denn bei der Untersuchung von Rauchern fielen die Isoprostanspiegel erst nach etwa 2 Wochen ab (Morrow et al. 1995). Die Expositionsdauer gegenüber der Noxe – in diesem Fall der ionisierenden Strahlung – ist aber bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten erheblich kürzer als in anderen Studien zu Isoprostanen.

Als geeignet für die Untersuchung größerer Bestrahlungsvolumina wählte ich Patienten aus, die bei einem Rektumkarzinom neoadjuvant radiochemotherapiert wurden. Das Planungszielvolumen war bei diesen Patienten mit  $1734 \text{ cm}^3$  etwa acht mal so groß wie bei den Patienten mit Prostatakarzinom. Auch bei diesen Patienten veränderten sich die Isoprostanspiegel nicht signifikant während der Bestrahlung. Lediglich in der Subgruppen-Analyse zeigte sich ein interessanter Befund: Patienten, die keine höhergradigen Nebenwirkungen aufwiesen, hatten in der Mitte der Strahlentherapie mehrheitlich höhere Isoprostanspiegel als vor Therapie. Im Unterschied dazu fanden sich zu diesem Zeitpunkt bei der Mehrheit der Patienten mit Nebenwirkungen niedrigere Isoprostanspiegel im Vergleich zum Ausgangswert. Zum Ende der Strahlentherapie war dieser Unterschied nicht mehr erkennbar. Eine schlüssige biologische Erklärung für diesen Befund, der der ursprünglichen Hypothese entgegengerichtet ist, kann im Moment nicht gegeben werden. Ohnehin ist wegen der geringen Fallzahl eine verlässliche Aussage hier nicht möglich.

## **5.2 Auswirkungen von Strahlentherapie auf die Expression von 10 Genen im peripheren Blut von Patienten**

Zusätzlich zur Bestimmung der Isoprostane sollte in dieser Arbeit auch das Expressionsverhalten einer Reihe von Genen untersucht werden, die allesamt im Stoffwechsel der ROS eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu vielen anderen Studien, in denen das Expressionsprofil einer Vielzahl von Genen mittels genomweiter Expressionsarrays untersucht wurde, wählte ich gezielt 10 Gene aus, deren Genprodukte in einem Zusammenhang mit der Wirkung von ionisierender Strahlung stehen könnten.

Dabei maß ich insbesondere bei den Genen Katalase, Thioredoxin und Glutathionperoxidase 1 signifikante Veränderungen.

Die Katalase spielt als zentrales Enzym des ROS-Stoffwechsels eine herausragende Rolle. Die Induktion von Apoptose in Tumorzellen über interzelluläre Signalwege wird durch die Katalase inhibiert. Diese Signalwege sind bei menschlichen Tumorzellen zum Teil ausgeschaltet und können durch die Inhibition der Katalase reaktiviert werden (Heinzelmann und Bauer 2010, Bechtel und Bauer 2009). Diese Mechanismen scheinen auch bei der Wirkung von ionisierender Strahlung eine Rolle zu spielen. Anhand von Keratinozyten wurde



gezeigt, dass die Strahlenempfindlichkeit dieser Zellen bzw. ihre Apoptoserate von der ROS-Produktion nach Bestrahlung abhängt. Es wurden zwei verschiedene Zelllinien untersucht, die unterschiedliche Veränderungen der Gene CAT, GPX und SOD zeigten und auch unterschiedlich strahlenempfindlich waren. Die Aktivität dieser drei Gene wurde 2 Stunden nach der Bestrahlung mit 20 Gy gemessen und war gegenüber der Kontrolle deutlich erniedrigt (Isoir et al. 2006). Ähnliche Effekte wurden auch an weiteren Zelltypen beobachtet. Isolierte Glioblastomzellen mit besonders hoher Strahlenresistenz exprimieren Enzyme wie SOD, CAT und GPX bis zu 5-fach stärker als normale Glioblastomzellen (Lee et al. 2004). In einer strahlenempfindlichen Zelllinie humaner Kolon-Zellen wurden ebenfalls Veränderungen in der Aktivität von SOD, CAT und GPX gefunden, wobei in dieser Studie die Veränderung der Katalase im Vergleich zu den anderen Enzymen eher in den Hintergrund trat (Tulard et al. 2003).

Auch bei Untersuchungen *in vivo* konnte die Bedeutung der Katalase bestätigt werden. Bei Patienten mit Brustkrebs nach Bestrahlung wurden deutliche Veränderungen der Expression von SOD2, CAT und TXN auf Ebene der Proteine nachgewiesen (Yeghiazaryan et al. 2007). In dieser Arbeit schienen sich diese Ergebnisse zunächst zu bestätigen. In der Pilotstudie stieg die Expression der Katalase nach der Strahlenbehandlung signifikant an. Bei der Subgruppenanalyse der Patienten mit unterschiedlichen Tumorregressionsgraden war ebenfalls signifikant, dass die Überexpression der Katalase umso größer war, je besser der Tumor auf die Behandlung ansprach. Im größeren Kollektiv der Bestätigungsstudie konnte dieser Zusammenhang nicht reproduziert werden. Lediglich die Induktion der Katalase in der Gesamtgruppe am zweiten Entnahmezeitpunkt bestätigte sich. Ursache für den nicht reproduzierbaren Befund aus der Pilotstudie ist möglicherweise die zu geringe Fallzahl sowie die Selektion von Patienten mit besonders hoher bzw. besonders niedriger Toxizität.

Die Thioredoxine sind in der Literatur ebenfalls Gegenstand einer Reihe von Studien, die sich mit den Zusammenhängen von oxidativem Stress, Tumorentstehung und Strahlenempfindlichkeit befassen.

Thioredoxine wurden zunächst in *Escherichia coli* entdeckt (Laurent et al. 1964) und dort als Prädiktor für die Strahlenempfindlichkeit dieser Bakterien identifiziert. Ein höherer Gehalt an Thioredoxin korrelierte dabei mit einer geringeren Strahlenempfindlichkeit (Lunn und Pigiet 1987). Dieser Zusammenhang zwischen TXN und Strahlenempfindlichkeit war in Folge noch Gegenstand weiterer Studien, die allerdings zum Teil widersprüchliche Ergebnisse hatten. An humanen Plattenepithelkarzinomzellen führte die Inhibition der Thioredoxin-Reduktase, die funktionell eng mit Thioredoxin verknüpft ist, zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit der

Zellen (Javvadi et al. 2010). In einer anderen Zelllinie hingegen, z. B. bei humanen Fibrosarkomzellen, führte die Überexpression von TXN zu erhöhter Empfindlichkeit gegen ionisierende Strahlen (Byun et al. 2005). Nach in-vitro-Bestrahlung von humanen Lymphozyten wurde eine Induktion der TXN beobachtet (Hoshi et al. 1997).

In der Pilotstudie dieser Arbeit zeigte TXN ein ähnliches Verhalten wie die Katalase. Zum Zeitpunkt 2, gegen Ende der Strahlentherapie, war die Expressionsstärke des Gens umso mehr angestiegen, je besser das Ansprechen des Tumors gemessen am Tumorregressionsgrad war. Anders als bei der Katalase war dieser Effekt zum Zeitpunkt 1 noch nicht sichtbar. In der Bestätigungsstudie konnte dieser Effekt reproduziert werden. Zwar besteht keine lineare Abhängigkeit zwischen TXN-Induktion und Tumorregressionsgrad wie in der Pilotstudie, stattdessen zeigen praktisch nur die Patienten mit einem TRG=4 eine Induktion der TXN. Dieser Grad des Ansprechens, bzw. eine vollständige oder fast vollständige Regression des Tumors nach neoadjuvanter Vorbehandlung ist im Vergleich mit den Graden 1 – 3 mit einer wesentlich besseren Prognose korreliert (Guillem et al. 2005, Beddy et al. 2008).

Ein weiteres wichtiges Enzym ist die Glutathion-Peroxidase 1. Bereits 1984 konnte ein Zusammenhang zwischen der GPX und ionisierender Strahlung gezeigt werden. Hier wurden Meerschweinchen bestrahlt und anschließend die Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Blut gemessen, dabei stieg die Enzymaktivität mit der Höhe der applizierten Dosis signifikant an (Erden und Bor 1984). In einem Fallbericht eines Patienten mit kutanen Strahlenschäden nach akzidenteller Exposition von über 25 Gy wurden an verschiedenen stark geschädigten Hautstellen Proben entnommen und Expressionsprofile erstellt. Die Expression von GPX1 stieg in den normal abheilenden Hautarealen signifikant an, während in den schlecht heilenden, stärker exponierten Hautarealen keine Induktion der GPX1 stattfand (Benderitter et al. 2007). Augenscheinlich ist die Induktion der GPX1 eine Reaktion auf eine Strahlenexposition und spielt bei der Regeneration des Normalgewebes eine Rolle. Weitere Artikel stützen diese These: Bestrahlt man die Epiphysenfuge von Ratten, steigt die Expression von GPX1 im Knorpel signifikant an (Pritchard et al. 2010). Bei Mäusen steigt die GPX-Aktivität im Ileum nach Bestrahlung deutlich an. Hierfür ist allerdings die GPX2 verantwortlich, die im Gastrointestinaltrakt gegenüber der GPX1 die größere Rolle spielt. Im Jejunum ist die GPX-Aktivität geringer und wird auch nicht durch die Bestrahlung induziert. Dieser Befund ist mit einer schnelleren Regeneration des Epithels im Jejunum assoziiert (Esworthy et al. 2000).

Weitere Hinweise über die Bedeutung der GPX1 lieferte die Untersuchung von GPX1-Knock-out Mäusen. GPX1-defiziente Mäuse erscheinen zunächst phänotypisch unauffällig,

reagieren aber empfindlicher auf in-vivo erzeugten oxidativen Stress als Wildtyp-Mäuse (Cheng et al. 1998, Fu et al. 1999). In einer anderen Arbeit bestrahlte man GPX1-defiziente Mäuse und fand bei ihnen eine höhere Zahl an DNA-Schäden als bei Mäusen mit normaler Aktivität der GPX1 (Baliga et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde die GPX1 in beiden Studien hochsignifikant induziert. Der Effekt der Pilotstudie konnte in der Bestätigungsstudie reproduziert werden und erreichte dabei ein noch deutlich höheres Signifikanzniveau. Die Induktion der GPX1 war unabhängig von allen bisher evaluierten klinischen Endpunkten und von der Art der Chemotherapie. Das ebenfalls induzierte Gen CDKN1A wurde zwar in der Bestätigungsstudie nicht erneut gemessen, in der Pilotstudie allerdings waren GPX1 und CDKN1A nicht miteinander korreliert. Die Induktion der GPX1 scheint daher ein strahlentherapiebedingter Effekt zu sein, der von der als Positivkontrolle etablierten Induktion der CDKN1A (Amundson et al. 2004) unabhängig ist. Inwieweit dieser Effekt klinisch relevant ist, kann bisher noch nicht beantwortet werden, da noch keine Daten über den längerfristigen Verlauf der hier untersuchten Patienten vorliegen.

### **5.3 Kritische Betrachtung und Verbesserungsvorschläge**

Die Patientenkollektive, an denen in dieser Arbeit Isoprostanspiegel bestimmt wurden, waren mit jeweils 17 Patienten zu klein, um klare Aussagen über biologische Effekte treffen zu können. Die Befunde sind als Tendenzen zu verstehen, die noch an einem größeren Kollektiv untersucht werden müssen. Das größere Problem bei den Isoprostanmessungen dieser Arbeit war sowohl die recht hohe Streuung innerhalb der Dreifachbestimmungen, als auch die hohe interindividuelle Streuung. Eine Aufreinigung der Proben mit Hilfe einer Immunabsorption hätte die Qualität der Messungen verbessern können, aber die auf dem Markt erhältlichen Produkte waren entweder nicht praktikabel oder hätten den finanziellen Rahmen dieses Projekts überschritten. Die beschriebenen Ergebnisse müssen daher mit Vorsicht bewertet werden. Vor der Fortführung der Isoprostanmessung an einer größeren Fallzahl sollte die Messmethode optimiert werden.

In der Literatur waren zum Zeitpunkt der Laborexperimente nur wenige Studien zu finden, die wie ich zur Messung der Isoprostane einen Elisa verwandten. Die überwiegende Zahl der Untersuchungen nutzte GC/MS oder in einigen Fällen auch einen RIA.

Inzwischen gibt es eine größere Zahl von Untersuchungen zur Analyse der Isoprostane mittels Elisa (Callewaert und Sloan 2010). Es erscheint mir empfehlenswert zu sein, auf die Analyse von Plasma- oder Serumproben zu verzichten und lediglich Urin zu sammeln. Die Gewinnung

von Urinproben ist einfach durchzuführen und für den Patienten wenig belastend. Der genaue Zeitpunkt der Urinabgabe spielt keine Rolle, die Isoprostanspiegel unterscheiden sich weder zwischen verschiedenen Tagesportionen noch zwischen Spontan- und 24h-Urin (Helmerson und Basu 1999). Voraussetzung für die Verwendbarkeit von Spontanurin ist die Normalisierung der Messwerte auf den Kreatiningehalt des Urins. Zudem werden im Urin *ex vivo* keine Isoprostane gebildet, sodass auf eine Vorbehandlung der Probengefäße beispielsweise mit BHT verzichtet werden kann (Morrow et al. 1990). Eine Lagerung der Proben bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ist ausreichend.

Für die Analyse bietet die Firma Oxford Biomedical Research ein Kit speziell für Urinproben an, das ohne aufwendige Aufreinigungsschritte auskommt (Callewaert und Sloan 2010). Unverzichtbare Schritte in der Probenaufarbeitung sind hingegen die Verwendung eines geeigneten Mediums zur Verdünnung, um Interferenzen mit dem Elisa zu minimieren (Callewaert und Sloan 2010) und die Behandlung mit einer Glucuronidase, um auch konjugierte Isoprostane dem Elisa zugänglich zu machen (Yan et al. 2010).

Die Pilotstudie auf dem Gebiet der Genexpressionsanalyse beruhte auf den Daten von 16 nach dem Kriterium der strahlenbedingten Toxizität vorselektierten Patienten. Die Befunde müssen daher sehr kritisch betrachtet werden. Aus diesem Grund dienten diese Daten lediglich als Anhalt, interessante Zielgene für die Bestätigungsstudie auszuwählen.

## 5.4 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob sich unter den untersuchten Parametern ein Biomarker findet, der bei leichter Bestimmbarkeit noch während der Therapie Nebenwirkungen oder Ansprechen vorraussagen kann.

Auf dem Gebiet der Isoprostane fand sich ein interessanter Befund, nämlich ein geringerer Isoprostanspiegel in der Patientengruppe mit stärkeren Nebenwirkungen. Sollte sich dieser Befund bestätigen, könnten die Isoprostane tatsächlich geeignet sein, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nebenwirkungen vorrauszusagen und damit eine Anpassung der Therapie zu ermöglichen. Wegen der bisher zu geringen Fallzahl und den beschriebenen Unzulänglichkeiten der Methode muss dieser Zusammenhang aber zunächst in einer Folgestudie weiter untersucht werden.

Eindrücklicher waren die Befunde, die bei der Genexpressionsanalyse gefunden wurden. Die quantitative *real-time*-PCR ist in der Abteilung Klinische Pharmakologie, in der diese

Analysen durchgeführt wurden, sehr gut etabliert und liefert präzise und reproduzierbare Ergebnisse. Hier kommt es vor allem darauf an, die Fallzahl weiter zu erhöhen und die Befunde auch mit klinischen Daten aus dem langfristigen Verlauf der Patienten wie beispielsweise dem *overall survival* und dem *disease free survival* zu vergleichen.

In der Zukunft wird auch die Frage beantwortet werden müssen, inwieweit Varianten (SNPs) der hier untersuchten Gene einen Einfluss auf das Expressionsprofil oder die klinischen Endpunkte haben. Die hierfür erforderliche Fallzahl hängt dabei sowohl von der Stärke des durch die Genvariante verursachten Effekts, als auch von der Häufigkeit der Variante in der Bevölkerung ab. Die in dieser Arbeit erreichte Fallzahl von  $n=75$  reicht aber in keinem Fall aus.

Eine interessante Erkenntnis aus dieser Arbeit ist noch, dass eine Fallzahl von etwa  $n=20$  ausreicht, um eine moderate Zahl von Genen auf biologische Effekte zu „screenen“. Von den 3 in der Pilotstudie als vielversprechend bewerteten Befunden konnten immerhin 2 an einer größeren Gruppe bestätigt werden. In zukünftigen Untersuchungen kann auf diese Weise mit vergleichsweise geringem Aufwand geprüft werden, ob bestimmte Gene für die Expressionsanalyse geeignet sind.

Der Grundgedanke dieser Arbeit auf dem Feld der Genexpressionsanalyse war es, anhand einer biologischen Hypothese gezielt eine überschaubare Zahl von Genen auszuwählen und deren Expressionsprofil zu analysieren. Dieser Ansatz erscheint nicht nur durch die Ergebnisse dieser Arbeit aussichtsreich, auch in anderen Projekten der Klinischen Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen konnten auf diesem Weg interessante Befunde erhoben werden. Beispielsweise wird in einer zur Zeit laufenden Untersuchung die Expression des Gens DPD untersucht, welches das wesentliche Enzym für den Abbau von 5-FU ist. (Information von F. Lornsen, Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität Göttingen, 2010)

Die Entdeckung eines Biomarkers, der die Wirkungen oder Nebenwirkungen einer onkologischen Therapie vorhersagen kann, würde einen deutlichen Fortschritt in der Behandlung von Tumorerkrankungen bedeuten. Besonders die etablierten Therapiemodalitäten wie die Strahlentherapie oder eine Chemotherapie mit 5-FU könnten mit Hilfe eines solchen Markers individueller dosiert und optimiert werden. Auch unter gesundheitsökonomischen Aspekten wäre ein solcher Marker vorteilhaft, denn sowohl die Strahlentherapie als auch eine Therapie mit einem klassischen Chemotherapeutikum wie 5-FU sind vergleichsweise kostengünstige Therapiemodalitäten.

## 6 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes und die dritthäufigste krebisbedingte Todesursache beim Mann. Bei der Behandlung des Prostatakarzinoms kommt die Strahlentherapie regelmäßig in verschiedenen Stadien der Erkrankung und in unterschiedlichen Applikationsformen zum Einsatz.

Das Rektumkarzinom gehört mit einer Inzidenz von etwa 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Insbesondere bei den lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen gehört die Strahlentherapie im Rahmen einer neoadjuvanten Vorbehandlung zur multimodalen Behandlung dieses Tumors.

Um den Zusammenhang zwischen der tumoriziden Wirkung ionisierender Strahlung und der Bildung von ROS besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit Isoprostanspiegel als Marker oxidativen Stresses und die Expressionsprofile einiger für den ROS-Stoffwechsel wichtiger Gene untersucht. Als Untersuchungsmaterial wurden Blut- und Urinproben von Patienten mit einem Rektumkarzinom gewonnen, welche im Rahmen der CAO/ARO/AIO-04-Studie neoadjuvant radiochemotherapiert wurden, sowie Blut- und Urinproben von Patienten mit einem Prostatakarzinom, die eine definitive Radiotherapie der Prostata erhielten.

Zur Analyse der Isoprostanspiegel wurde ein Elisa der Firma CaymanChemicals verwandt. Die Untersuchung der Genexpressionsprofile erfolgte nach Isolierung von mRNA und Prozessierung in cDNA mittels quantitativer *realtime*-PCR. Die nötigen Primerpaare wurden der Literatur entnommen.

Die Untersuchung der Isoprostanspiegel beim Prostatakarzinom zeigte keine signifikanten Veränderungen.

Bei den Rektumkarzinompatienten zeigte die Bestimmung der Isoprostanspiegel, dass Patienten mit geringgradigen Nebenwirkungen tendenziell höhere Isoprostanspiegel im Urin aufweisen. Dieser Befund soll mit optimierter Methodik in einer Folgestudie weiter untersucht werden.

Bei der Untersuchung von Genexpressionsprofilen fanden sich folgende signifikante Befunde: Die GPX1 wurde unabhängig von Therapieschema und klinischen Charakteristika der Patienten induziert (126% vom Ausgangswert an Tag 1,  $p=0,001$  und 165% vom Ausgangswert an Tag 2,  $p=0,000001$ ).

Die Katalase wurde ebenfalls unabhängig von Therapieschema und Patientencharakteristika induziert. Im Gegensatz zur GPX1 tritt diese Induktion aber erst an Tag 2 auf (126% vom Ausgangswert,  $p=0,021$ ).

TXN zeigte einen interessanten Zusammenhang zwischen der Expression und dem Tumorregressionsgrad. Bei Patienten mit einem Tumorregressionsgrad von 4, d.h. einem starken Ansprechen auf die neoadjuvante Vorbehandlung, stieg die Expressionsstärke dieses Gens an (238% vom Ausgangswert,  $p=0,03$ ).

Diese Befunde deuten alle darauf hin, dass es möglich ist, anhand der Untersuchung von Blut- oder Urinproben Aussagen über das Therapieansprechen oder die Prognose von Patienten mit einem Rektumkarzinom zu machen. Um diesen Hinweisen weiter nachzugehen, ist es allerdings erforderlich, diese Untersuchungen auf größere Patientenkollektive und die Miteinbeziehung von Genvarianten (SNPs) auszuweiten.

## 7 Abbildungen 29 - 38

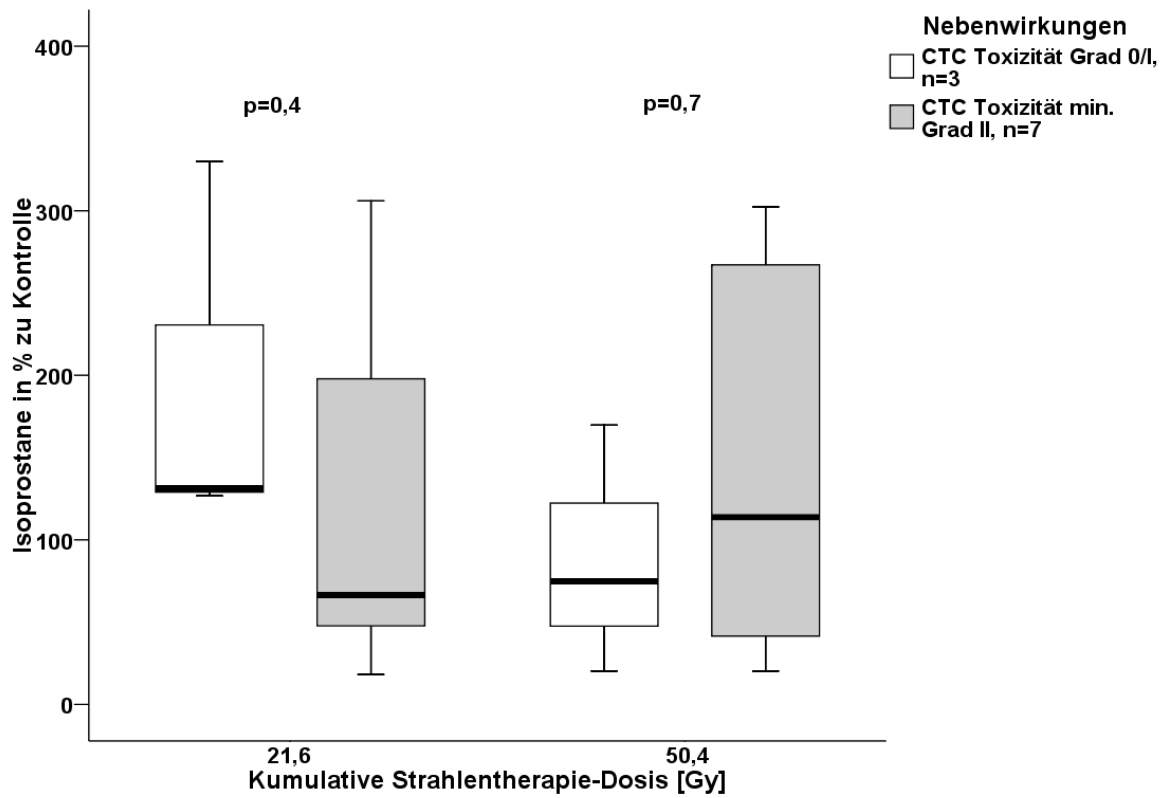


Abbildung 29: Isoprostane im Serum, p-Werte aus Mann-Whitney-U-Test



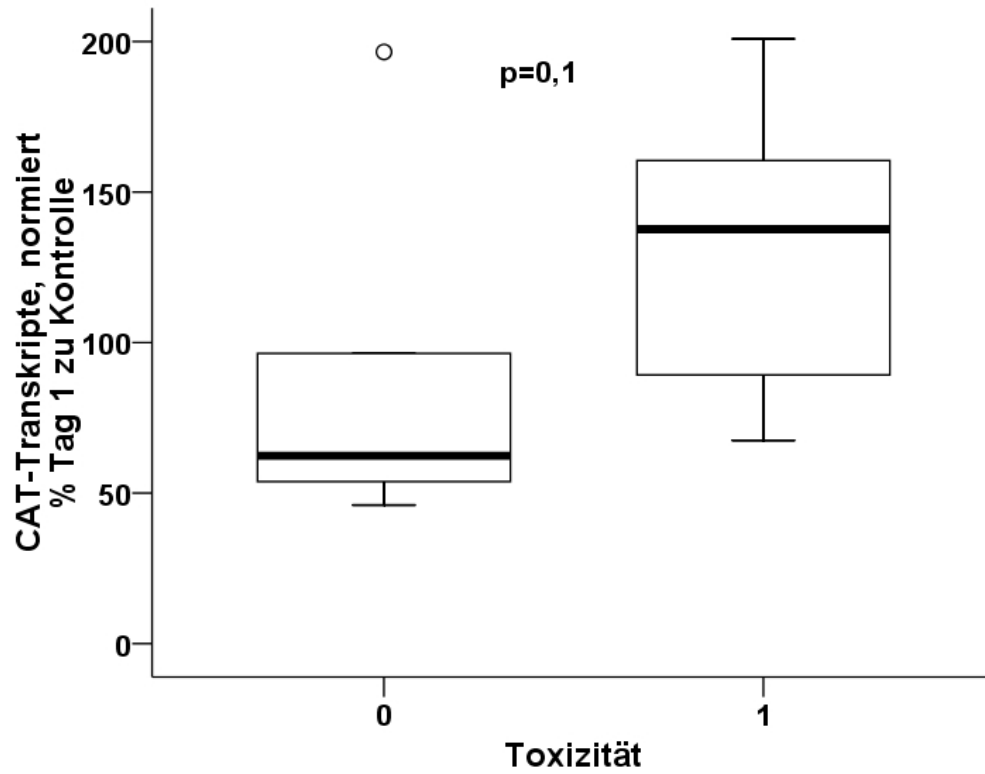


Abbildung 30: Katalase an Tag 1

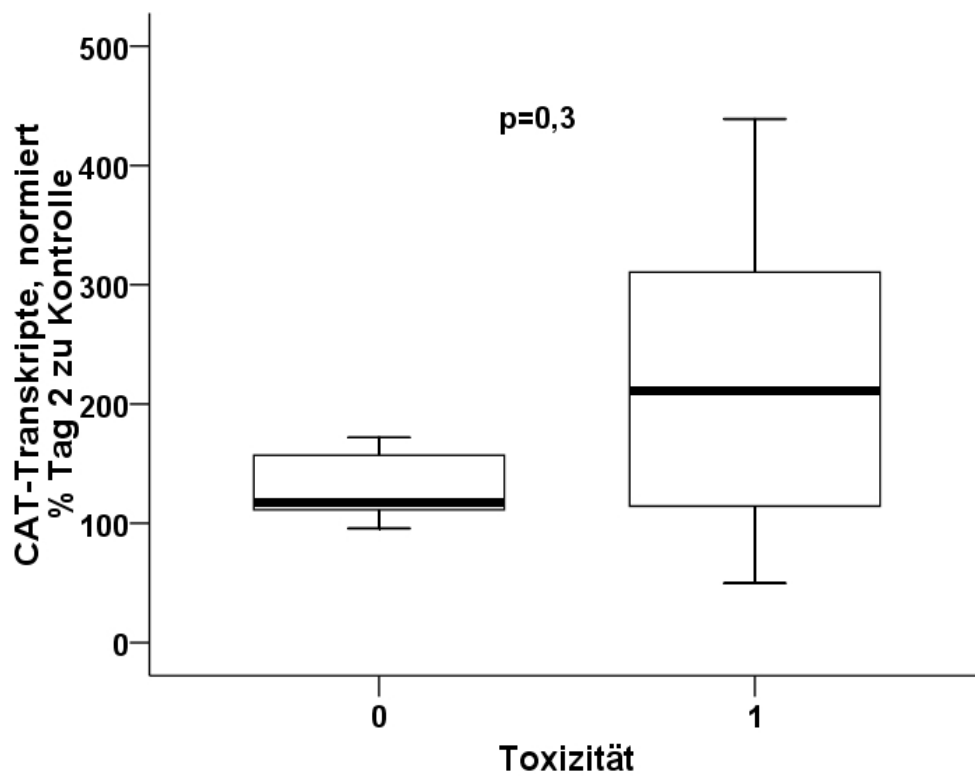


Abbildung 31: Katalase an Tag 2

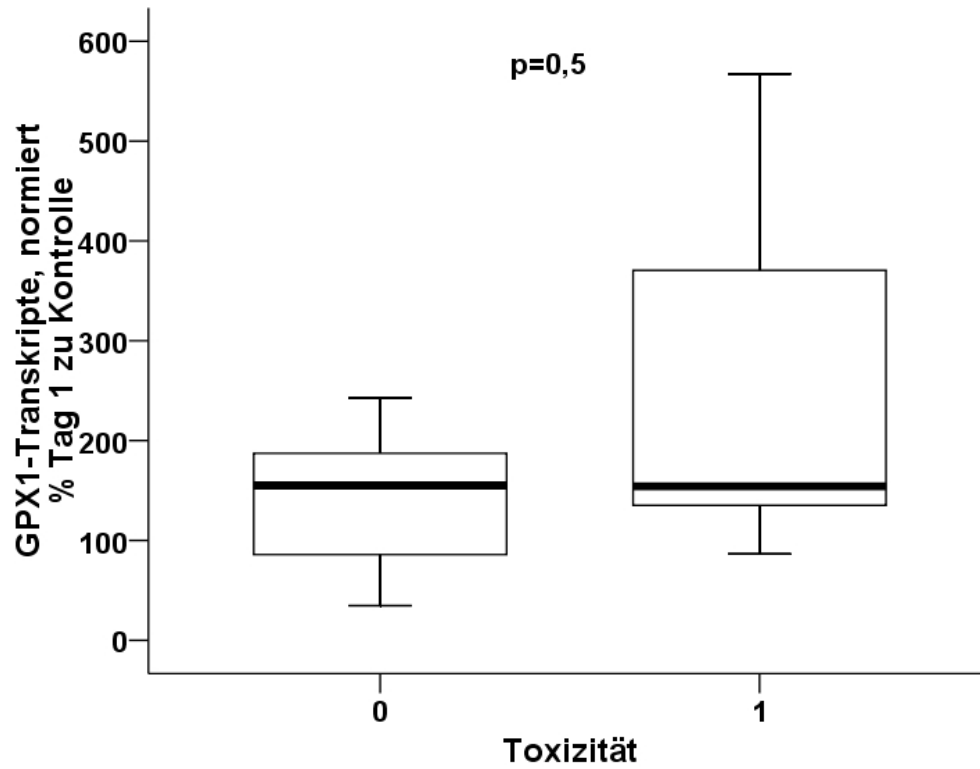


Abbildung 32: CYBA an Tag 1

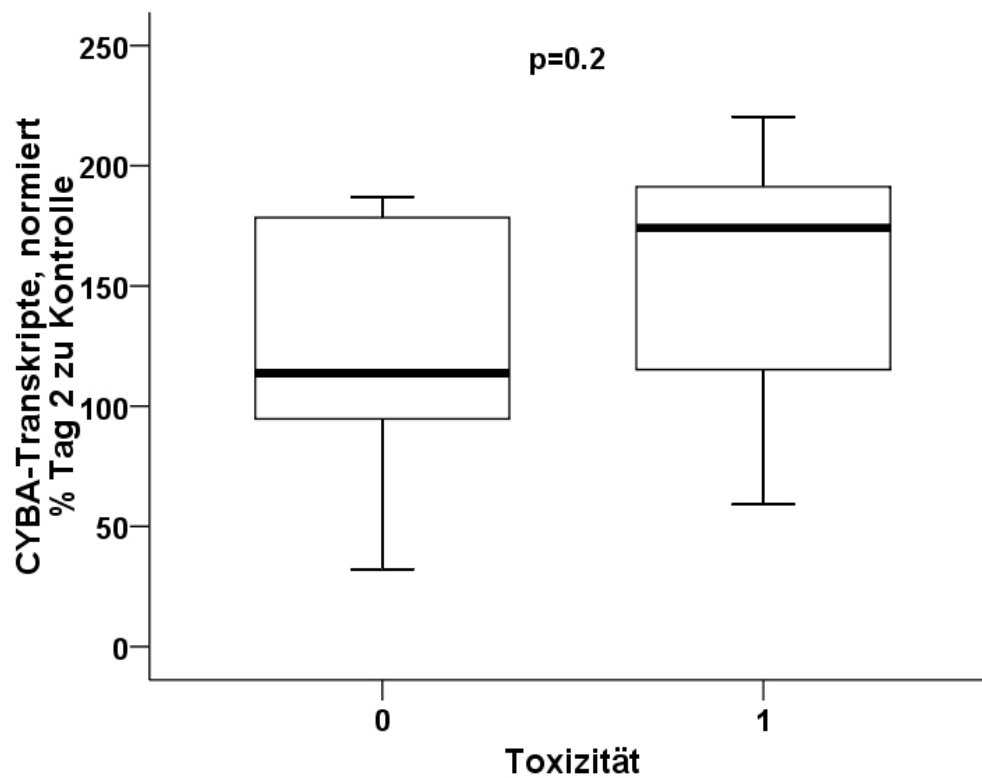


Abbildung 33: CYBA an Tag 2

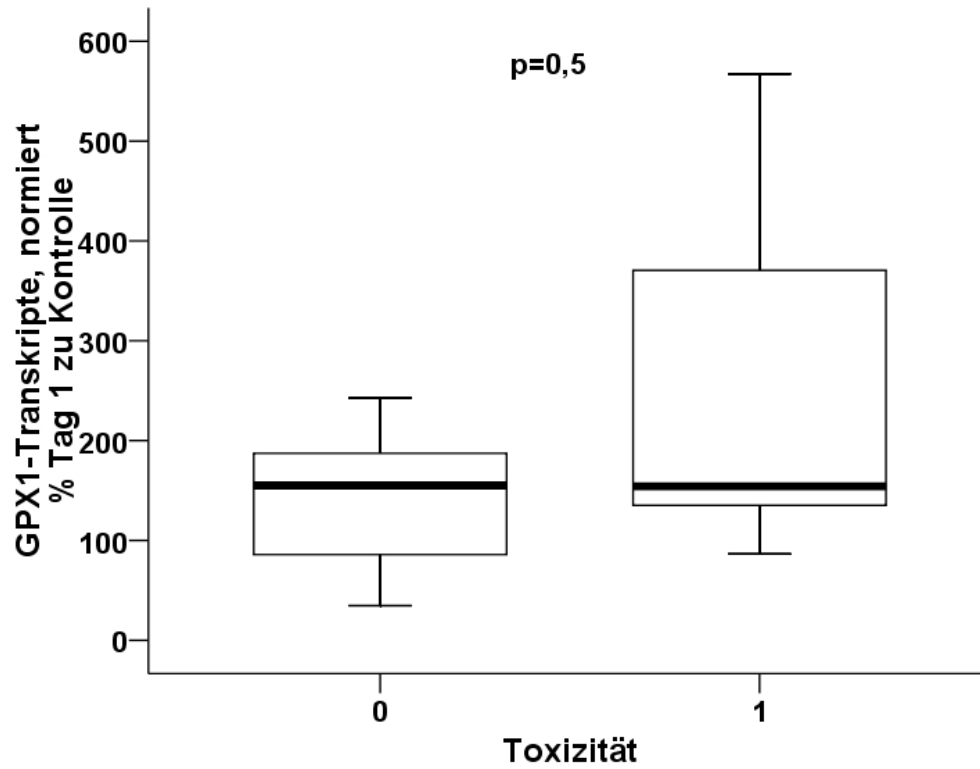


Abbildung 34: GPX1 an Tag 1

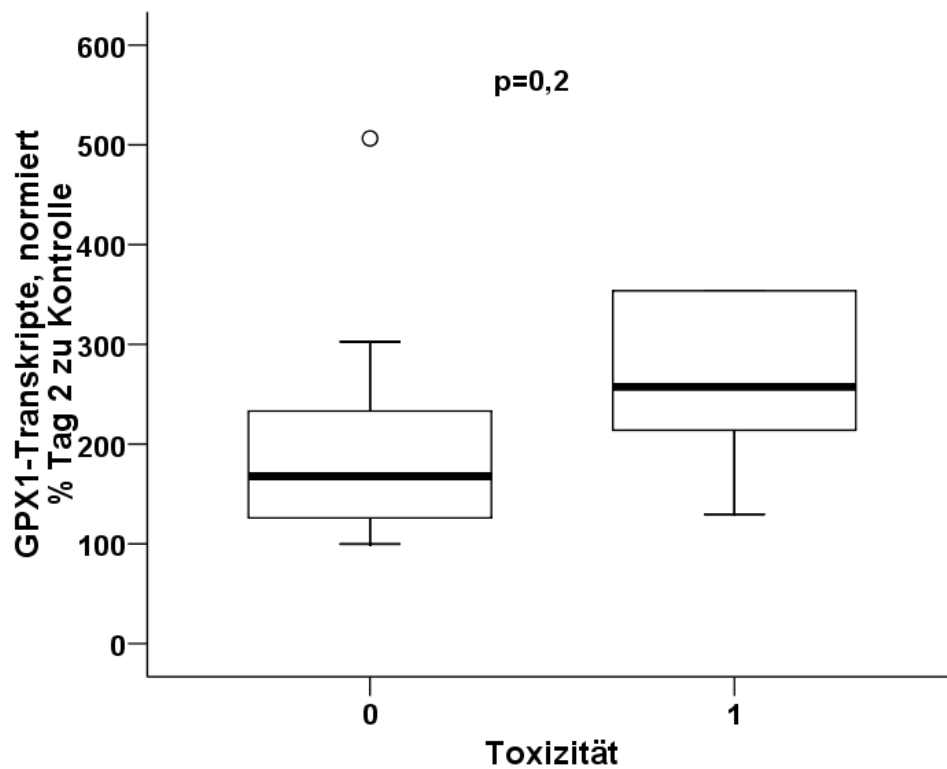


Abbildung 35: GPX1 an Tag 2

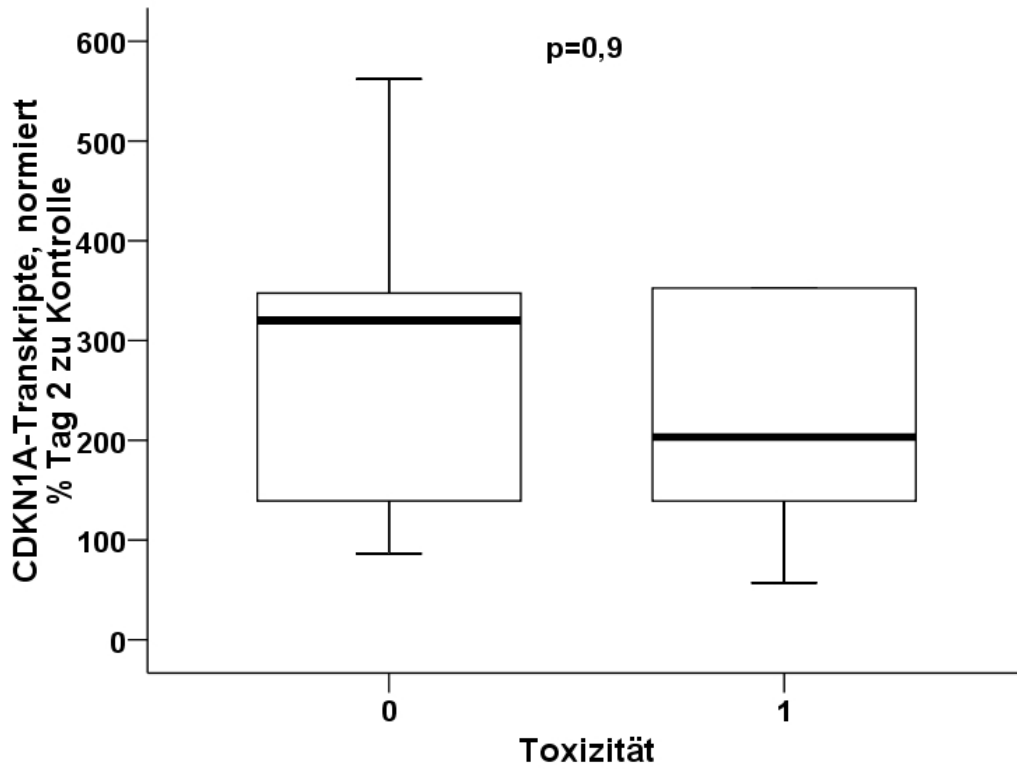


Abbildung 36: CDKN1A an Tag 1

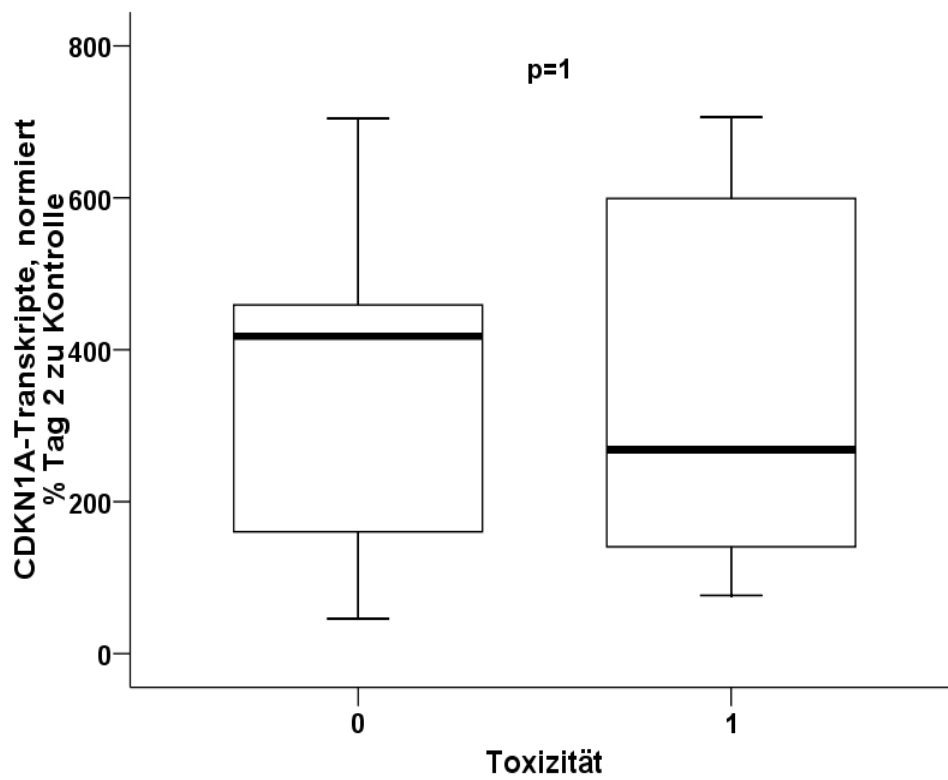


Abbildung 37: CDKN1A an Tag 2

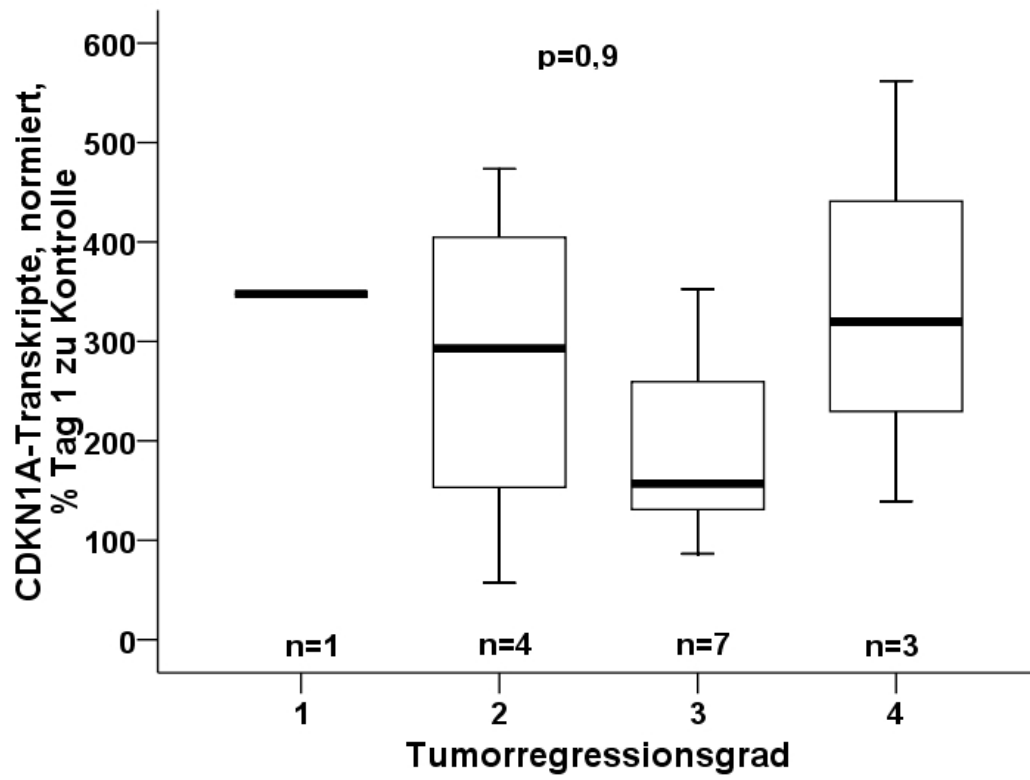


Abbildung 38: CDKN1A an Tag 1

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahmadzadehfar H, Oguogho A, Efthimiou Y, Kritz H, Sinzinger H (2006): Passive cigarette smoking increases isoprostane formation. *Life Sci* 78 (8), 894-897
- Alvarez-Cardona A, Yamazaki-Nakashimada MA, Espinosa-Padilla SE (2009): [Chronic granulomatous disease]. *Rev Alerg Mex* 56 (5), 165-174
- Amundson SA, Grace MB, McLeland CB, Epperly MW, Yeager A, Zhan Q, Greenberger JS, Fornace AJ, Jr. (2004): Human in vivo radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. *Cancer Res* 64 (18), 6368-6371
- Baliga MS, Diwadkar-Navsariwala V, Koh T, Fayad R, Fantuzzi G, Diamond AM (2008): Selenoprotein deficiency enhances radiation-induced micronuclei formation. *Mol Nutr Food Res* 52 (11), 1300-1304
- Barilla J, Lokajicek M (2000): The role of oxygen in DNA damage by ionizing particles. *J Theor Biol* 207 (3), 405-414
- Bechtel W, Bauer G (2009): Catalase protects tumor cells from apoptosis induction by intercellular ROS signaling. *Anticancer Res* 29 (11), 4541-4557
- Beddy D, Hyland JM, Winter DC, Lim C, White A, Moriarty M, Armstrong J, Fennelly D, Gibbons D, Sheahan K (2008): A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 15 (12), 3471-3477
- Benderitter M, Isoir M, Buard V, Durand V, Linard C, Vozenin-Brotans MC, Steffanazi J, Carsin H, Gourmelon P (2007): Collapse of skin antioxidant status during the subacute period of cutaneous radiation syndrome: a case report. *Radiat Res* 167 (1), 43-50
- Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, Powis G (2001): Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392 (1), 103-109
- Brigelius-Flohe R (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27 (9-10), 951-965
- Brigelius-Flohe R (2006): Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 387 (10-11), 1329-1335
- Byun HS, Cho EW, Kim JS, Moon MS, Yum JJ, Kim KC, Kim IG (2005): Thioredoxin overexpression in HT-1080 cells induced cellular senescence and sensitization to gamma radiation. *FEBS Lett* 579 (19), 4055-4062
- Calcagno AM, Chewning KJ, Wu CP, Ambudkar SV (2006): Plasma membrane calcium ATPase (PMCA4): a housekeeper for RT-PCR relative quantification of polytopic membrane proteins. *BMC Mol Biol* 7 29

- Callewaert DM, Sloan C (2010): Enzyme immunoassay of isoprostanes. *Methods Mol Biol* 610, 435-449
- Camphausen K, Menard C, Sproull M, Goley E, Basu S, Coleman CN (2004): Isoprostane levels in the urine of patients with prostate cancer receiving radiotherapy are not elevated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (5), 1536-1539
- Casadesus G, Smith MA, Basu S, Hua J, Capobianco DE, Siedlak SL, Zhu X, Perry G (2007): Increased isoprostane and prostaglandin are prominent in neurons in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 2, 2
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF, Jr., Lei XG (1998): Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 128 (7), 1070-1076
- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS (1993): Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 268 (4), 2571-2576
- Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S (2008): Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* 8, 350
- Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C (2008): F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44 (3), 247-256
- Dahm-Daphi J, Dikomey E, Pyttlik C, Jeggo PA (1993): Repairable and non-repairable DNA strand breaks induced by X-irradiation in CHO K1 cells and the radiosensitive mutants xrs1 and xrs5. *Int J Radiat Biol* 64 (1), 19-26
- Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G et al. (2006): Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354 (23), 2431-2442
- Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Basili S, Ciabattini G, Patrono C (2003): Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 107 (25), 3199-3203
- Davi G, Falco A, Patrono C (2004): Determinants of F2-isoprostane biosynthesis and inhibition in man. *Chem Phys Lipids* 128 (1-2), 149-163
- de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS et al. (1998): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 273 (35), 22528-22536
- Demizu Y, Sasaki R, Trachootham D, Pelicano H, Colacino JA, Liu J, Huang P (2008): Alterations of cellular redox state during NNK-induced malignant transformation and resistance to radiation. *Antioxid Redox Signal* 10 (5), 951-961

- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP et al. (1993): Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261 (5124), 1047-1051
- Erden M, Bor NM (1984): Changes of reduced glutathion, glutathion reductase, and glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochem Med* 31 (2), 217-227
- Esworthy RS, Mann JR, Sam M, Chu FF (2000): Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (2), G426-436
- Fu Y, Cheng WH, Porres JM, Ross DA, Lei XG (1999): Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27 (5-6), 605-611
- Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C, Fuzesi L, Langer C, Becker H, Liersch T et al. (2005): Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 23 (9), 1826-1838
- Goth L, Rass P, Pay A (2004): Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* 8 (3), 141-149
- Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, Moore P, Van Deerlin V, Pratico D, Clark CM, Coslett HB, Chatterjee A et al. (2005): Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 57 (5), 721-729
- Guillem JG, Chessin DB, Cohen AM, Shia J, Mazumdar M, Enker W, Paty PB, Weiser MR, Klimstra D, Saltz L et al. (2005): Long-term oncologic outcome following preoperative combined modality therapy and total mesorectal excision of locally advanced rectal cancer. *Ann Surg* 241 (5), 829-836; discussion 836-828
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984): Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984, 1, 1396-1397
- Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, Song ZY, Li HM, Geng XP, Zhu LX et al. (2008): Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14 (2), 455-460
- Hayes JD, Pulford DJ (1995): The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30 (6), 445-600
- Heinzelmann S, Bauer G (2010): Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells. *Biol Chem* 391 (6), 675-693
- Helmersson J, Basu S (1999): F2-isoprostane excretion rate and diurnal variation in human urine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61 (3), 203-205



Herrmann T, Baumann B:

Klinische Strahlenbiologie

Gustav Fischer Verlag, Jena 1984

Ho YS, Maguenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD (1997): Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272 (26), 16644-16651

Hoshi Y, Tanooka H, Miyazaki K, Wakasugi H (1997): Induction of thioredoxin in human lymphocytes with low-dose ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta* 1359 (1), 65-70

Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, Bernd HW, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC et al. (2006): A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354 (23), 2419-2430

Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, Featherstone T, Golden W, Von Kapp-Herr C, Hock RA, Gomez RA, Parsian AJ, Spitz DR (1998): Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* 58 (17), 3986-3992

Hurteau GJ, Spivack SD (2002): mRNA-specific reverse transcription-polymerase chain reaction from human tissue extracts. *Anal Biochem* 307 (2), 304-315

Isoir M, Buard V, Gasser P, Voisin P, Lati E, Benderitter M (2006): Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation. *J Dermatol Sci* 41 (1), 55-65

Jahn U, Galano JM, Durand T (2008): Beyond prostaglandins--chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (32), 5894-5955

Javvadi P, Hertan L, Kosoff R, Datta T, Kolev J, Mick R, Tuttle SW, Koumenis C (2010): Thioredoxin reductase-1 mediates curcumin-induced radiosensitization of squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 70 (5), 1941-1950

Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Powis G, Souglakos J, Sivridis E, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL (2001): Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7 (10), 3087-3091

Keaney JF, Jr., Larson MG, Vasani RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ (2003): Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (3), 434-439

Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2005): A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 97 (7), 629-636

Krawczak M, Cooper DN (1997): The human gene mutation database. *Trends Genet* 13 (3), 121-122

- Laurent TC, Moore EC, Reichard P (1964): Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B. *J Biol Chem* 239 3436-3444
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996): Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (18), 9782-9787
- Lee HC, Kim DW, Jung KY, Park IC, Park MJ, Kim MS, Woo SH, Rhee CH, Yoo H, Lee SH et al. (2004): Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int J Mol Med* 13 (6), 883-887
- Liersch T, Grade M, Gaedcke J, Varma S, Difilippantonio MJ, Langer C, Hess CF, Becker H, Ried T, Ghadimi BM (2009): Preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: correlation of a gene expression-based response signature with recurrence. *Cancer Genet Cytogenet* 190 (2), 57-65
- Liu Q, He X, Liu Y, Du B, Wang X, Zhang W, Jia P, Dong J, Ma J, Wang X et al. (2008): NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 377 (3), 775-779
- Lornsen FJ, Göttingen: persönliche Mitteilung, 2010
- Lunn CA, Pigiet VP (1987): The effect of thioredoxin on the radiosensitivity of bacteria. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51 (1), 29-38
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG (2004): Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (24), 8852-8857
- Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ (2000): Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13 (1), 21-38
- Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson Roberts L, 2nd, Morrow JD (2007): Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol* 433 113-126
- Miyazaki K, Noda N, Okada S, Hagiwara Y, Miyata M, Sakurabayashi I, Yamaguchi N, Sugimura T, Terada M, Wakasugi H (1998): Elevated serum level of thioredoxin in patients with hepatocellular carcinoma. *Biotherapy* 11 (4), 277-288
- Morawietz H, Erbs S, Holtz J, Schubert A, Krekler M, Goettsch W, Kuss O, Adams V, Lenk K, Mohr FW et al. (2006): Endothelial Protection, AT1 blockade and Cholesterol-Dependent Oxidative Stress: the EPAS trial. *Circulation* 114 (1 Suppl), I296-301
- Morrow JD (2005): Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2), 279-286
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, 2nd (1990): A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (23), 9383-9387

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ, 2nd (1995): Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 332 (18), 1198-1203

Murray A, Hunt T:

The cell cycle

Oxford University Press, New York 1993

Nakamura H, Bai J, Nishinaka Y, Ueda S, Sasada T, Ohshio G, Imamura M, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J (2000): Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 24 (1), 53-60

Nishiyama A, Masutani H, Nakamura H, Nishinaka Y, Yodoi J (2001): Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life* 52 (1-2), 29-33

Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A et al. (2005): Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* 83 (12), 1014-1024

Pardo CA, Xu Z, Borchelt DR, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW (1995): Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (4), 954-958

Pawitan Y, Bjohle J, Amler L, Borg AL, Egyhazi S, Hall P, Han X, Holmberg L, Huang F, Klaar S et al. (2005): Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res* 7 (6), R953-964

Powis G, Montfort WR (2001): Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41 261-295

Powis G, Kirkpatrick DL, Angulo M, Baker A (1998): Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chem Biol Interact* 111-112 23-34

Pratico D, V MYL, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA (1998): Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J* 12 (15), 1777-1783

Pritchard MR, Horton JA, Keenawinna LS, Damron TA Microarray (2010): Analysis of Irradiated Growth Plate Zones following Laser Microdissection Shows Later Importance of Differentially Expressed Genes during Radiorecovery. *Cells Tissues Organs* 192 (4) 240-249

Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, Powis G (2003): Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med* 142 (1), 46-51

Rave-Frank M, Virsik-Kopp P, Pradier O, Nitsche M, Grunefeld S, Schmidberger H (2001): In vitro response of human dermal fibroblasts to X-irradiation: relationship between radiation-

- induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. *Int J Radiat Biol* 77 (12), 1163-1174
- Roberts LJ, 2nd, Milne GL (2009): Isoprostanes. *J Lipid Res* 50 Suppl S219-223
- Sies H (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215 (2), 213-219
- Sinzinger H, Oguogho A, Pilz H (2003): Increased isoprostanes in children of smoking parents. *Adv Exp Med Biol* 525 213-215
- Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AE, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR (2003): Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 119 (2), 170-183
- Thomas JP, Geiger PG, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW (1990): Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1045 (3), 252-260
- Tubiana M:  
Introduction to radiobiology  
Taylor & Francis, London-New York-Philadelphia 1990
- Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon FH, Luccioni C, Bravard A (2003): Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med* 35 (1), 68-77
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985): The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 839 (1), 62-70
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 (7), RESEARCH0034
- Wang X, Seed B (2003): A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 31 (24), e154
- Wolfram RM, Budinsky AC, Palumbo B, Palumbo R, Sinzinger H (2002): Radioiodine therapy induces dose-dependent in vivo oxidation injury: evidence by increased isoprostane 8-epi-PGF(2 alpha). *J Nucl Med* 43 (9), 1254-1258
- Yan Z, Mas E, Mori TA, Croft KD, Barden AE A (2010): significant proportion of F2-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Anal Biochem* 403 (1-2), 126-128
- Yeghiazaryan K, Mamlouk S, Trog D, Moenkemann H, Braun M, Kuhn W, Schild H, Golubnitschaja O (2007): Irradiated breast cancer patients demonstrate subgroup-specific regularities in protein expression patterns of circulating leukocytes. *Cancer Genomics Proteomics* 4 (6), 411-418

Zidek LM: "Populationshäufigkeit und funktionelle Bedeutung angeborener Polymorphismen in den Genen des *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1* (TGFB1) und dessen Rezeptor (TGFBR1)." Diplomarbeit im III. Zoologischen Institut - Entwicklungsbiologie, Biologische Fakultät, Georg-August-Universität Göttingen. 2005

## **Danksagung:**

Hiermit möchte ich mich bei allen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht zur Seite standen, herzlich bedanken:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Clemens-F. Hess für die freundliche Vermittlung meines Doktorvaters und die Möglichkeit der Dissertation in der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie sowie Herrn Prof. Dr. J. Brockmöller für die Möglichkeit, den Laborteil meiner Arbeit in der Abteilung Klinische Pharmakologie durchzuführen;

Herrn PD Dr. Robert M. Herrmann für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die stets hilfreiche und geduldige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Besonders danke ich ihm für die angenehme Arbeitsatmosphäre, sein großes Vertrauen in mich und die stete Rückendeckung seit Aufnahme dieser Arbeit;

Frau Dipl. Biologin M. Rave-Fränk für das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen rund um diese Arbeit und die fachliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Schirmer, der mit seiner stets geduldigen und einfallreichen Betreuung entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Trotz einiger Hindernisse und Sackgassen trieb er mich immer wieder mit neuen Ideen voran und sorgte durch seine freundliche und unkomplizierte Arbeitsweise für eine kreative Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Abteilungen Strahlentherapie und Radioonkologie bzw. Klinische Pharmakologie gilt mein Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit.