

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
(Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C.-F. Hess)  
im Zentrum Radiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

GENETISCHE DETERMINANTEN  
IN DER GENESE UND STRAHLENTHERAPIE  
DES PROSTATAKARZINOMS

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

vorgelegt von  
Manuel Guhlich

aus  
Gießen

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. A. Hille

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. M. Schirmer

3. Berichterstatterin: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Prostatakarzinom	1
1.2	Therapiemöglichkeiten	2
1.2.1	<i>Active Surveillance</i>	3
1.2.2	Operation	3
1.2.3	Hormontherapie (adjuvant in kurativer Situation und palliativ)	3
1.2.4	Strahlentherapie	4
1.2.4.1	Perkutane Strahlentherapie (primär und adjuvant)	5
1.2.4.2	Brachytherapie (HDR-Boost, <i>Seeds</i> )	5
1.3	Nebenwirkungen in der Strahlentherapie	6
1.3.1	Akute und chronische Proktitis	6
1.3.2	Akute und chronische Zystitis	7
1.4	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (TGFB)	8
1.4.1	TGFB-Liganden	9
1.4.2	TGFB und Prostatakrebs	10
1.4.3	TGFB-Genetik und Prostatakrebs	11
1.4.4	Bedeutung des TGFB-Signalwegs in der Strahlentherapie	12
1.5	Zielsetzung	13
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1	Geräte	14
2.2	Verbrauchsmaterial	14
2.3	Chemikalien	15
2.4	Kits und Assays	15
2.5	Primersequenzen	16
2.6	Software	17
2.7	Datenbanken	17
<b>3</b>	<b>Patientenkollektiv und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Patientenkollektiv	19
3.2	Dokumentation der Toxizität	21
3.3	Auswahl der zu genotypisierenden TGFB1-Marker	22
3.4	Isolierung und Quantifizierung der DNA	23
3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.5.1	Multiplex-PCR (M-PCR)	25
3.5.2	Genotypisierung durch Primerextension (SNaPshot™)	25

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
4.1	Stratifizierung des Patientenkollektivs .....	28
4.1.1	Allgemeine Patientendaten .....	28
4.1.2	Tumor-spezifische Charakteristika .....	28
4.1.3	Therapie-Modalitäten .....	30
4.1.4	Akuttoxizität .....	34
4.1.5	Spättoxizität .....	35
4.2	TGFB1-Keimbahn-Genetik.....	36
4.2.1	Haplotypen.....	40
4.3	Epidemiologie des Prostatakarzinoms und TGFB1-Genetik .....	40
4.4	TGFB1-Keimbahngenetik und Radiotherapie-bedingte Toxizität.....	43
4.4.1	Adjustierung auf potenzielle Störvariablen .....	47
4.4.2	Subanalysen nach Lokalisation der Toxizitäten .....	48
4.4.3	Betrachtung in Abhängigkeit von den einzelnen Toxizitätsgraden.....	51
4.4.4	Haplotypen und kombinierte Alleleffekte .....	53
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1	Auftreten von Toxizität .....	54
5.1.1	Akuttoxizität .....	54
5.1.2	Spättoxizität .....	55
5.2	Auswertungen der SNP-Analysen.....	56
5.2.1	TGFB1-Keimbahngenetik und Radiotherapie-bedingte Toxizität .....	57
5.2.1.1	Die Variante Arg25Pro .....	57
5.2.1.2	Die Variante rs10417924 .....	60
5.2.1.3	Die Variante Leu10Pro .....	61
5.3	Auftreten des Prostatakarzinoms und TGFB1-Genetik .....	62
5.3.1	Berechnung des haploiden Genotyps (Haplotyp).....	63
5.4	Kritische Betrachtung.....	64
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CI	<i>confidence interval</i> , Konfidenzintervall
CTC	<i>common toxicity criteria</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphate
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eV	Elektronenvolt
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FL	Fragmentlänge
G	Guanin
Gy	Gray
HDR	<i>High Dose Rate</i>
IL1	Interleukin 1
Kap.	Kapitel
kbp	<i>kilo base pairs</i> , entspricht 1,000 bp
LAG	Lymphabflussgebiet
LAP	<i>latency-associated peptide</i>
LENT/SOMA	<i>late effects on normal tissues / subjective objective management analysis</i>
LD	<i>linkage disequilibrium</i> , Kopplungsungleichgewicht
LDR	<i>Low Dose Rate</i>
LHRH	luteinisierendes Releasing-Hormon
LTBP	<i>latent transformal growth factor binding protein</i>
MAF	mittlere Allelfrequenz

MeV	Megaelektronenvolt
M-PCR	Multiplex-Polymerasekettenreaktion
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
M-Status	Metastasenstadium
n.a.	nicht anwendbar
ng / µl	Nanogramm / Mikroliter
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-Status	Nodalstadium
o.ä.	oder ähnlich
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>plateletderived growth factor</i>
PSA	prostataspezifisches Antigen I
RR	relatives Risiko
R-Status	Residualstadium
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i> , Einzelnukleotidpolymorphismus
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>TGFB/TGFB</i>	<i>transforming growth factor beta</i> (Gen- bzw. Proteinname)
TGFB1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TGFB2	<i>transforming growth factor beta 2</i>
TGFB3	<i>transforming growth factor beta 3</i>
<i>TGFB1 / TGFB1</i>	<i>transforming growth factor beta receptor 1</i> (Gen- bzw. Proteinname)
<i>TGFB2 / TGFB2</i>	<i>transforming growth factor beta receptor 2</i> (Gen- bzw. Proteinname)
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
T-Stadium	Tumorstadium
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UTR	<i>untranslated Region</i> , nicht-translatierte Region
WHO	<i>World Health Organisation</i>

z.B. zum Beispiel

95 %-CI *95 %-confidence interval*, 95 %-Konfidenzintervall

Für die Abkürzung der Aminosäuren wurde der Drei-Buchstaben-Code verwendet.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Genetische Architektur des <i>TGFBI</i> -Gens mit LD-Plot von Genpolymorphismen.....	23
Abb. 2	Verteilung der Tumorstadien bei ED nach TNM-Einteilung .....	29
Abb. 3	Verteilung des <i>Gleason Scores</i> bei ED in der Gesamtkohorte von 509 Patienten .....	29
Abb. 4	Flussdiagramm der rekrutierten Patienten für die zu untersuchenden Fragestellungen.....	33
Abb. 5	Akutnebenwirkung Zystitis. ....	34
Abb. 6	Akutnebenwirkung Proktitis.....	34
Abb. 7	Spätnebenwirkungen Proktitis .....	35
Abb. 8	Spätnebenwirkungen Zystitis.....	35
Abb. 9	LD der zehn untersuchten <i>TGFBI</i> -SNPs.....	39
Abb. 10	Prozentuale Verteilung der Genotypen von rs1800470 in Bezug auf die Akuttoxizität. ....	48
Abb. 11	Prozentuale Verteilung der Genotypen von rs1800471 in Bezug auf die Spättoxizität .....	49
Abb. 12	Prozentuale Verteilung der Genotypen von rs10417924 in Bezug auf die Spättoxizität.....	50
Abb. 13	Spättoxizitätsgrade in Abhängigkeit von Arg25Pro. ....	52
Abb. 14	Spättoxizitätsgrade in Abhängigkeit von rs10417924. ....	52

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Primerliste der PCR sowie der SNaPshot™-Reaktion .....	16
Tab. 2	T-Stage des TNM-Systems nach UICC 2010.....	20
Tab. 3	N- und M-Stage des TNM-Systems nach UICC 2010 .....	20
Tab. 4	R-Stage des TNM-Systems nach UICC 2010 .....	20
Tab. 5	<i>Gleason Score</i> (Konsensus Konferenz der „International Society of Urological Pathology“, 2005).....	21
Tab. 6	Standard-Bedingungen der PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase .....	25
Tab. 7	Multiplex-PCR-Reaktionsansatz .....	25
Tab. 8	Reaktionsansatz 1. Aufreinigung.....	26
Tab. 9	Reaktionsansatz SNaPshot™-Reaktion.....	26
Tab. 10	Fluoreszenzfarbstoffe mit Farbgebung der ddNTPs.....	27
Tab. 11	Reaktionsbedingungen für SNaPshot™-PCR .....	27
Tab. 12	Übersicht der Behandlungssubgruppen .....	32
Tab. 13	Übersicht der strahlungsassoziierten Toxizität auf die Organe Enddarm und Harnblase im Akut- sowie Spätstadium.....	36
Tab. 14	Für die Genotypisierung ausgewählte SNPs mit eindeutiger rs-Nummer gemäß Datenbank dbSNP.....	37
Tab. 15	Darstellung der errechneten Haplotypen .....	40
Tab. 16	Assoziationen von <i>TGFBI</i> -Polymorphismen zur Epidemiologie des Prostatakarzinoms .....	41
Tab. 17	Genotyp-Verteilung von rs7254679 bei Gesunden und Patienten .....	42
Tab. 18	Toxizitätsverteilung der 241 Patienten für die Genotyp-Assoziationsanalysen .....	44
Tab. 19	Assoziationen von <i>TGFBI</i> -Polymorphismen zur Akut- und Spättoxizität bei Strahlentherapie des Prostatakarzinoms .....	46
Tab. 20	Verteilung des Leu10Pro-Polymorphismus in den einzelnen Graden der Akuttoxizität nach CTC .....	51

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

Prostatakrebs ist die bei Männern am zweithäufigsten diagnostizierte Krebsart weltweit mit geschätzten 903500 Neuerkrankungen 2008 und steht mit geschätzten 258 400 Todesfällen im Jahr 2008 auf Platz 6 der krebsassoziierten Todesursachen (Jemal et al. 2011). In Deutschland ist Prostatakrebs mit einem Anteil von circa 26 % die häufigste neu diagnostizierte Krebserkrankung und führt dabei zu etwa 10 % der Krebssterbefälle (RKI/GEKID 2010).

Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren, während Erkrankungen vor dem 50. Lebensjahr als äußerst selten gelten. Damit zählt das Alter neben hormonellen Faktoren, der positiven Familienanamnese sowie ethnischer Herkunft (Taylor et al. 1994) zu den Hauptrisikofaktoren der Erkrankung (Hautmann 2010).

Diätetischen Faktoren wird eine unabhängige Rolle als Risikofaktor zugeschrieben. So konnte kürzlich eine Studie an 47911 Männern eine inverse Beziehung zwischen Kaffeekonsum und dem Risiko zu erkranken nachweisen (Wilson et al. 2011), während Adipositas mit geringerem Risiko für niedrigmalignen und höherem Risiko für hochmalignen Prostatakrebs korrelierte (Rodriguez et al. 2007).

Seit der Einführung der Screeninguntersuchungen nach erhöhten prostataspezifischen Antigen (PSA) - Werten im Serum bei Männern ab dem 45. Lebensjahr ist die altersspezifische Erkrankungsrate seit 1980 in Deutschland um 110 % angestiegen. In Konsequenz führt dies dazu, dass die Erkrankungszahlen bei Männern zwischen 50 und 69 Jahren steigen, während gleichzeitig bei Männern über 75 Jahren die Neuerkrankungszahlen sinken (RKI/GEKID 2010).

Nach Feststellung erhöhter Serum-PSA-Werte wird bei den Patienten eine transrektale Stanzbiopsie durchgeführt, um das Prostatagewebe histologisch auf Malignität zu überprüfen. Im Falle nachgewiesener Malignitätskriterien wird der *Gleason Score* der Krebszellen ermittelt. Ursprünglich wurden dabei die histologischen Schnitte nach fünf Stufen von gut differenziert (1) bis schlecht differenziert (5) eingeteilt und die am häufigsten gefundene sowie die am zweithäufigsten gefundene Differenzierungsart addiert. Nachdem Untersuchungen (Gleason 1996; Lange und Narayan 1983; Oliveira et al. 2010) bei OP-Präparaten zeigten, dass das *Gleason Grading* nach Stanzbiopsie oft zu niedrig ausfiel, wurde 2005 eine Neudefinition durchgeführt. Der *Gleason Score* setzt sich nun aus dem häufigsten

und dem aggressivsten Muster zusammen (Epstein et al. 2005). Interessant ist, dass in mehreren Untersuchungen die signifikant höhere Lymphknotenmetastasierung von *Score 7* als *Score 6* nachgewiesen werden konnte (Epstein et al. 1996; McNeal et al. 1990).

Ein hoher *Score* geht also mit einer erhöhten Malignität und daher schlechteren Prognose für den Patienten einher.

## 1.2 Therapiemöglichkeiten

Prostatakrebs ist der Krebs des alten Mannes. Bei Autopsien von 80jährigen Männern wurde eine Prävalenz von 80 % festgestellt, trotz alledem versterben die meisten Männer vielmehr *mit* Prostatakrebs als *an* Prostatakrebs (Bostwick et al. 2004).

Je nach Tumorstadium, Lebenserwartung und Begleiterkrankungen sowie Wunsch des Patienten bieten sich kurative, beobachtende oder palliative Therapiemöglichkeiten an.

Da das Prostatakarzinom ein vergleichsweise langsam wachsender Tumor ist, kann bei Patienten mit lokal begrenztem Wachstum und guter Zelldifferenzierung das Konzept des *Active Surveillance* diskutiert werden, bei welchem der Tumor ohne Therapie engmaschig kontrolliert wird. Dem gegenüber steht das *Watchful Waiting*, das bei Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren empfohlen wird, egal, in welchem Stadium sich der Tumor befindet. Hierbei wird erst bei fortschreitender Symptomatik palliativ therapiert.

Patienten mit lokal begrenzten Tumoren, die eine Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren sowie eine niedrige Komorbidität aufweisen, sollten kurativen Therapiemöglichkeiten zugeführt werden. Hierbei haben sich bei verschiedenen Untersuchungen (D'Amico et al. 2002; D'Amico et al. 1998; Kupelian et al. 2004; Potters et al. 2004; Stokes 2000; Zincke et al. 1994) die relative Gleichwertigkeit der perkutanen Strahlentherapie mit der chirurgischen radikalen Prostatektomie bezüglich des biochemisch rezidivfreien Überlebens belegen lassen.

Unterschiede zeigen sich in den therapieassoziierten Nebenwirkungsspektren, welche sich bei der radikalen Prostatektomie vor allem als Harninkontinenz und Impotenz (McCammon et al. 1999; Shrader-Bogen et al. 1997), bei der Strahlentherapie vor allem durch rektale und urogenitale Dysfunktionen manifestieren (McCammon et al. 1999; Ohashi et al. 2007).

Als Palliativmaßnahmen bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom bietet sich sowohl die Hormontherapie als auch die Strahlentherapie zur lokalen Kontrolle sowie Leidenslinderung an.

### 1.2.1 *Active Surveillance*

Das Konzept des *Active Surveillance* kann zum Tragen kommen, wenn der Tumor im Stadium T1c und T2a mit einem PSA-Wert  $\leq 10$  ng/ml und der *Gleason Score*  $\leq 6$  ist, der Tumor in  $\leq 2$  Stanzen der Biopsie zu finden war sowie  $\leq 50\%$  einer Stanze mit Tumoranteilen durchwachsen war (Klotz 2005). Dabei wird keine Therapie durchgeführt, aber der Tumor engmaschig durch PSA-Kontrollen sowie digital-rektale Untersuchungen überwacht (DGU 2011).

### 1.2.2 Operation

Die radikale Prostatektomie ist das chirurgische Standardverfahren der Tumorthherapie bei lokal begrenztem Prostatakarzinom. Ziel ist die Entfernung der Prostata in ihrer Kapsel, den distalen Samenleitern und der Samenblasen (Hautmann 2010). Dabei haben sich drei Zugangswege etabliert: neben dem retropubischen und dem perinealen steht seit wenigen Jahren auch der laparoskopische Zugang zur Verfügung (Michel et al. 2003). Die Wahl des Operationsverfahrens richtet sich nach der Tumorausbreitung. Bei bereits fortgeschrittener Tumorausbreitung wird der retropubische Weg gewählt, da so auch eine lokoregionäre Lymphadenektomie durchgeführt werden kann.

Trotz nervenschonender Technik wurden in einer Studienzusammenfassung Operationsnachteile in Form von Harninkontinenz, abhängig von Operationsmethode und Design der Studie, zwischen 4 und 47% angegeben. Harnröhrenstrikturen traten bei bis zu 25 % der operierten Patienten auf (Michl et al. 2003). Erektile Dysfunktion wurde 18 Monate postoperativ in einer großen amerikanischen Studie (1291 Teilnehmer, lokalisiertes Prostatakarzinom) von durchschnittlich 59,9 % der Patienten angegeben (Stanford et al. 2000).

### 1.2.3 Hormontherapie (adjuvant in kurativer Situation und palliativ)

Das Wachstum der Prostata sowie der Prostatakarzinomzellen ist abhängig vom Angebot an Dihydrotestosteron (Wilson et al. 1993). Demnach kann eine chemisch-pharmakologische oder chirurgische Kastration in der Therapie des Prostatakarzinoms indiziert sein.

Die chirurgische Kastration spielt heutzutage eine untergeordnete Rolle, da der Verlust des Skrotalinhaltes psychisch als sehr traumatisch empfunden wird. Sie wird daher nur in palliativen Stadien eingesetzt, in welchen der initial erhöhte Hormonspiegel zu Schmerzen führen kann.

Pharmakologisch kann auf verschiedene Weise in den Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophysenvorderlappen, Sertolizellen und Leydigzellen sowie Nebennierenrinde eingegriffen werden.

Luteinisierendes-Releasing-Hormon (LHRH) - Analoga bewirken eine Überstimulation der LHRH-Rezeptoren und bewirken so eine Verminderung der Expression. LHRH-Antagonisten blockieren die Rezeptoren kompetitiv. Steroidale oder nicht-steroidale Antiandrogene blockieren die Androgenrezeptoren kompetitiv und verhindern so die Wirkung des Testosterons auf die Zielzelle. 5- $\alpha$ -Reduktasehemmer hemmen die Umwandlung von Testosteron in den aktiveren Metaboliten Dihydrotestosteron, sie sind allerdings nicht zur Monotherapie indiziert.

Nach Heidenreich gelten aktuell folgende Indikationen für eine hormonelle Kastration: In kurativer Situation für alle lokal fortgeschrittenen Karzinome sowie in palliativer Situation für alle metastasierten und / oder lymphknoteninfiltrierenden Karzinome (Heidenreich et al. 2008).

#### 1.2.4 Strahlentherapie

Am 8. November 1895 entdeckte Wilhelm Conrad Röntgen in Würzburg die nach ihm benannten Röntgenstrahlen (Röntgen 1896). Dabei handelt es sich um elektromagnetische Wellen mit einem Spektrum zwischen 100 Elektronenvolt (eV) und mehreren Mega-elektronenvolt (MeV), die in der Lage sind, Materie zu durchdringen.

Bereits ein Jahr nach dieser Entdeckung wurde die Röntgenstrahlung durch den Wiener Arzt Leopold Freund zur Bestrahlung eines benignen Naevus eingesetzt (Bamberg et al. 2003). Seit dieser Zeit, als die schädigende Wirkung der Strahlung wissenschaftlich noch wenig bekannt war, hat sich eine große Entwicklung abgespielt.

In der modernen perkutanen Strahlentherapie wird mit Linearbeschleunigern gearbeitet, welche nach dreidimensionaler Bestrahlungsplanung Photonen- oder Elektronenstrahlung, den anatomischen und pathologischen Kriterien des Bestrahlungsziels angepasst, in modulierten Energiedosen erzeugen können.

Heutzutage gehört die Strahlentherapie neben der Chirurgie und der medikamentösen Therapie zur Basis der Krebsbekämpfung. Physikalisch-biologische Grundlage der Strahlungswirkung ist die Absorption und Interaktion ionisierender Strahlung auf die Zellen des Körpers. Der überwiegende Teil der Strahlung wird von intra- sowie interzellulärem Wasser aufgenommen, welches in der Radiolyse über verschiedene Reaktionsschritte

Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff erzeugt. Diese wirken als Radikale und zerstören so die das Zellerbgut tragende Desoxyribonukleinsäure. Übersteigen die Schäden am Erbgut die Reparaturfähigkeit der Zelle, so führt dies zum Zelltod.

Da gesunde Zellen über eine bessere Reparaturfähigkeit verfügen als Tumorzelle wird die applizierte Strahlendosis auf einen längeren Zeitraum ausgedehnt [Fraktionierung auf 1,8 – 2 Gray (Gy) / Tag]. So wird das gesunde Gewebe im Bereich der Bestrahlung geschont und Nebenwirkungen gemindert bei maximaler Wirkung auf entartete Zellen (Lohr und Wenz 2007). Nichtsdestotrotz können nach wie vor bei strahlentherapeutisch behandelten Patienten Nebenwirkungen auftreten, auf welche in Kap. 1.3 näher eingegangen wird.

#### 1.2.4.1 Perkutane Strahlentherapie (primär und adjuvant)

In der Therapie des Prostatakarzinoms ist die perkutane Bestrahlung mit Photonenstrahlen eine primäre Therapieoption bei lokal begrenzten Tumoren. Nach Studienlage wird dabei eine Dosis von mindestens 70 – 72 Gy eingesetzt (Dearnaley et al. 2007; Kuban et al. 2008; Peeters et al. 2006).

Bei Tumoren des mittleren und hohen Risikoprofils wird von der S3-Leitlinie Prostatakarzinom (DGU 2011) zusätzlich eine neoadjuvante bzw. adjuvante hormonablativ Therapie empfohlen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Kombination das Überleben der Patienten verlängert.

#### 1.2.4.2 Brachytherapie (HDR-Boost, Seeds)

Brachytherapie ist die interne Strahlentherapie. Man unterscheidet zwischen der *Low Dose Rate* (LDR)- und der *High Dose Rate* (HDR)-Brachytherapie.

LDR besteht aus der dauerhaften Implantation von etwa reiskorngroßen Strahlungsquellen, sogenannten *Seeds*, in die Prostata. Diese Methode wurde erstmals 1972 mit Jod-125 beschrieben (Whitmore et al. 1972), alternativ wird auch Palladium-103 eingesetzt, welches sich durch eine deutlich kürzere Halbwertszeit auszeichnet (60 versus 17 Tage).

Diese Therapieoption eignet sich sehr gut für niedrig maligne Tumoren bis Stadium T2a, N0, M0, initialem PSA  $\leq 10$  ng/ml, *Gleason Score*  $\leq 6$ , Tumornachweis in weniger als 50 % der Stanzproben sowie einem Prostatavolumen unter 50 cm<sup>3</sup> [*The GEC ESTRO Handbook of Brachtherapy* (Ash et al. 2000)].

HDR-Brachytherapie wird in Kombination mit perkutaner Bestrahlung durchgeführt. Vor, im Verlauf oder nach Abschluss der perkutanen Radiatio wird im Afterloadingverfahren eine

Dosiseskalation durch kurzzeitige Applikation von Strahlungsquellen (Iridium-192, Halbwertszeit 72 Tage) durchgeführt, wobei die applizierte Strahlendosis um den Faktor 1000 höher ist als bei der LDR (Wahlgren et al. 2007).

In Kombination mit perkutaner Radiatio wird die HDR als Primärtherapie bei Tumoren im Intermediär- sowie im Hochrisikostadium bis cT3 angeboten. Kontraindiziert ist die HDR bei Tumoren im Stadium T4, IPSS-Score > 8, Restharn > 80 ml, Prostatavolumen > 60 ml sowie Miktionsvolumen < 10 ml/s (DGU 2011).

### 1.3 Nebenwirkungen in der Strahlentherapie

Als Nebenwirkungen der Strahlentherapie der Prostatatage sind besonders die Proktitis und die Zystitis zu nennen, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird. Nach der internationalen Klassifikation *RTOG/EORTC-Toxicity Criteria* werden die Nebenwirkungen nach klinischen Kriterien in Grad 1 – 5 eingeteilt, wobei 1 für „leicht“ und 5 für „Nebenwirkungen mit Todesfolge“ steht. Im klinischen Alltag sind Grad 1 und 2 häufig anzutreffen, Grad 3 ist bereits deutlich seltener, Grad 4 und Grad 5 fast nie anzutreffen.

Neben Proktitis und Zystitis gehört auch die radiogen bedingte Dermatitis zu den typischen Nebenwirkungen (Dearnaley et al. 1999). Die strahleninduzierten Wirkungen können dabei im Zeitraum der Bestrahlungen, aber auch noch Monate und Jahre später auftreten und dabei die Lebensqualität der Betroffenen zum Teil stark beeinträchtigen (Ajlouni 1999; Eton und Lepore 2002; Lilleby et al. 1999; Shrader-Bogen et al. 1997).

Nach internationalem Übereinkommen (Trotti et al. 2000) bezeichnet man Toxizität, die von Beginn bis 90 Tage nach Beginn der Bestrahlung auftritt, als Akutnebenwirkung, später auftretende Schäden als Spät- bzw. chronische Strahlenschäden. Eine im Jahr 2008 veröffentlichte Studie konnte eine deutliche Risikoerhöhung für Spättoxizität feststellen, wenn Patienten bereits unter akuten Reaktionen zu leiden hatten (sog. konsekutive Spätfolge) (Zelefsky et al. 2008).

#### 1.3.1 Akute und chronische Proktitis

Die akute Proktitis ist die am häufigsten beobachtete Nebenwirkung bei Bestrahlung der Prostata. In verschiedenen Untersuchungen (Hille et al. 2005b; Koper et al. 1999; Peeters et al. 2005; Pollack et al. 2002; Storey et al. 2000) zeigten sich bei bis zu 76 % der Patienten Grad 1 und bei bis zu 44 % Grad 2 der Beschwerdesymptomatik, die sich vor allem durch

erhöhten StuhlDrang, erhöhte Stuhlfrequenz, Diarrhö und Blut- sowie Schleimbeimengungen auszeichnet.

Die akute Proktitis bildet sich in der Regel innerhalb weniger Monate posttherapeutisch zurück, die chronische Proktitis tritt definitionsgemäß mit einer Latenz von mindestens 90 Tagen auf und ist durch o.g. Symptome sowie Schmerzen und Krämpfe charakterisiert.

Forschungen ergaben für die chronische Grad 1-Proktitis eine Inzidenz von 20–40 % innerhalb der ersten 3 Jahre nach Behandlung (Denham et al. 1999; Koper et al. 2004; Michalski et al. 2005), für die chronische  $\geq$  Grad 2-Proktitis bis zu 37 % innerhalb der ersten 4 Jahre (Cozzarini et al. 2003; Denham et al. 1999; Fiorino et al. 2002; Smit et al. 1990; Storey et al. 2000; Wachter et al. 2001; Zapatero et al. 2004).

Auch bei Behandlung der Proktitis wird nach dem zeitlichen Auftreten der Beschwerden unterteilt. In der akuten Phase wird symptomatisch z.B. Cinchocain lokal in Form von schmerzlindernder Salbe eingesetzt und/oder Loperamid zur Kontrolle der Stuhlfrequenz. Bei ausgeprägter Symptomatik können über einen kurzen Zeitraum lokal Kortikoide eingesetzt werden.

In randomisierten Studien wurden Sucralfat, ein Saccharosesulfatderivat sowie Misoprostol, ein Prostaglandin, zur Prävention der akuten radiogen induzierten Proktitis untersucht (Hille et al. 2005b; Hille et al. 2005a; Kneebone et al. 2001). Dabei konnten jedoch keine prophylaktischen Wirkungen nachgewiesen werden.

Bei Darmtoxizität der Spätphase wird mit Sucralfat-Klysmen sowie Fettsäure-Klysmen (Hanson et al. 2012; Pinto et al. 1999) behandelt, desweiteren besteht die Möglichkeit zur oralen Therapie mit Sulfasalazin, einem nicht-steroidalen Antiphlogistikum, sowie Pentoxifyllin in Kombination mit Tocopherol (Hille et al. 2005b).

Weitere, therapieresistente Beschwerden können nach neuen Erkenntnissen durch hyperbare Sauerstofftherapie (Oliai et al. 2012) sowie Laserkoagulation (Hanson et al. 2012; Rustagi und Mashimo 2011) behandelt werden.

### 1.3.2 Akute und chronische Zystitis

Die akute Zystitis ist die zweithäufigste therapieassoziierte Nebenwirkung der Strahlentherapie der Prostata. Sie wird nach klinischen Parametern in den sog. Harnscore eingeteilt und ist ebenfalls in Grad 1 bis Grad 5 eingeteilt. Charakteristische Symptome sind Hämaturie, Dysurie, vermehrter Harndrang, Harnverhalt und Blasenkrämpfe. Studien zufolge

erleiden ca. 50 % der Patienten keine oder nur milde Symptome (Grad 0–1) der akuten Zystitis, ca. 40 % Grad 2 und 13 % heftigere Gewebsreaktionen (Grad 3) (Peeters et al. 2005).

Charakteristischerweise zeigt sich auch deutliche Abnahme der Symptome in den Wochen nach Therapieende. Eine Chronifizierung der Beschwerden zeigt sich in 10–30 % der Betroffenen (Peeters et al. 2005).

Therapeutisch werden hier Spasmolytika eingesetzt sowie auf eine erhöhte Trinkmenge und Infektbehandlung verwiesen (Lohr und Wenz 2007). In intensiven Fällen der späten, hämorrhagischen Zystitis scheint die hyperbare Sauerstofftherapie in der Behandlung positiven Einfluss zu zeigen (Chong et al. 2005; Neheman et al. 2005; Oliai et al. 2012; Yoshida et al. 2008).

#### 1.4 *Transforming Growth Factor beta* (TGFB)

TGFB ist ein interzellulär wirkendes Zytokin, welches namensgebend für die Klasse der TGFB-Superfamilie steht. Es hat entscheidenden Einfluss auf diverse Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung, Migration und Adhäsion, Wachstumsinhibierung bis hin zur Apoptose.

Seine Wirkung innerhalb der Zelle vermittelt TGFB über die Bindung an membranständige Rezeptoren, welche ihrerseits intrazellulär SMAD-Moleküle aktivieren, die als Transkriptionsfaktoren für eine Vielzahl von Zielgenen wirken. Abhängig vom Zellkontext kann so eine große Anzahl an Zellantworten ausgelöst werden. Im Umkehrschluss kann eine Dysregulation dieses Signalwegs zu einer entsprechend großen Anzahl an Genexpressionsänderungen führen, was zu pathologischen Reaktionen führen können.

In der Funktion als Mediator bei Bildung der extrazellulären Matrix kann ein erhöhter Spiegel an TGFB zu Fibrose führen (Border und Noble 1994). Dies tritt unter anderem bei der radiogen bedingten Fibrose auf (Leask und Abraham 2004; Martin et al. 2000).

TGFB spielt eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Wandstruktur von Venen und Arterien (Grainger 2007). Es konnte gezeigt werden, dass TGFB die Bildung von extrazellulärer Matrix steigert sowie die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen hemmt (Bjorkerud 1991; Grainger et al. 1994a; Ignatz et al. 1987; Ignatz und Massague 1987; Penttinen et al. 1988).

Diese Studien führen zusammen mit dem Nachweis, dass bei Mäusen mit geringerer TGFB-Aktivität vermehrt atherosklerotische Läsionen nachgewiesen wurden (Grainger et al. 1994b) dazu, dass TGFB ein Schutz vor Atherosklerose zugeschrieben wird.

In der Karzinogenese spielt TGF $\beta$  bei mindestens vier der sechs Veränderungen von physiologischer Zellfunktion zu maligner Transformation (Hanahan und Weinberg 2000) eine Rolle: Die Insensibilität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Umgehung von Apoptoseinduktion, Induktion von Tumorneoangiogenese sowie Tendenz zu Gewebeeinfiltration und Metastasierung (Millet und Zhang 2007).

Während TGF $\beta$  *in vivo* eine Wachstumsinhibition induziert, sind einige Tumorzellen in der Lage, diesen Mechanismen zu entgehen oder die Wirkung gar umzudrehen; erhöhte Spiegel des Proteins können so zur auto- oder parakrinen Wachstumsstimulation genutzt werden (Gold 1999). So gehen erhöhte TGF $\beta$ -Spiegel bei diversen Tumoren (z.B. des Pankreas, Colon, Magen, Lunge, Endometrium, Brust, Knochen und Prostata) mit einer schlechteren Prognose einher.

Aktuell wird davon ausgegangen, dass im Verlauf der Tumorgenese die wachstumssupprimierenden Wirkungen auf die Zellen verloren gehen, während die Faktoren, welche Neoangiogenese sowie Metastasierung fördern, verstärkt zum Tragen kommen. Hinweise hierauf finden sich in diversen Untersuchungen (Blobe et al. 2000; Gallier et al. 2006), unter anderem in Glioblastoma-Zelllinien (Seoane et al. 2004) und Mammakarzinomen (Gomis et al. 2006).

Im Rahmen von Invasion und Migration der Tumorzellen wird die regulatorische Wirkung von TGF $\beta$  auf die Produktion sowie adhäsive Eigenschaften der extrazellulären Matrix genutzt (Massague 1990): Durch erhöhte proteolytische Aktivität sowie verbesserte Adhäsion der Zellen an Matrixproteine wird die Zellmigration und Metastasierung erleichtert (Maehara et al. 1999).

TGF $\beta$  wirkt immunsuppressiv, wodurch das Tumorwachstum unterstützt wird. Es unterdrückt die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (Norgaard et al. 1995) und hilft den Zellen, sich trotz exprimierter Tumorantigene der Kontrolle durch lokal wirkende Immunzellen zu entziehen (Torre-Amione et al. 1990).

### 1.4.1 TGF $\beta$ -Liganden

Aktuell sind drei Isoformen des TGF $\beta$ -Proteins bekannt, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 sowie TGF $\beta$ 3. Diese Isoformen zeichnen sich durch eine hohe Homologie von 64-85% an der biologisch wirksamen C-Region aus (Massague 1990).

TGF $\beta$ 2 wird vor allem in epithelialem und neuronalen Zellverbänden exprimiert, TGF $\beta$  3 findet sich vornehmlich in mesenchymalen Zellen. TGF $\beta$ 1 wird insbesondere im Endothel,

Bindegewebe und hämatopoetischen Zelllinien, generell allerdings in praktisch allen Zellen des Körpers exprimiert (Blobe et al. 2000). Es ist daher die am besten quantitativ nachweisbare Isoform im peripheren Blut.

TGFB ist ein dimeres Polypeptid, das intrazellulär zunächst als Propeptid synthetisiert wird und über Cysteinreste zum Dimer zusammengefügt wird (Shi und Massague 2003). Bei der Dimerisierung der Polypeptidketten ist das *latency-associated Peptide* (LAP) vonnöten, welches im selben Leserahmen wie TGFB liegt (Gray und Mason 1990). Bevor TGFB die Zelle verlässt, wird das LAP abgespalten, wobei die Peptide nun noch über hydrophobe Wechselwirkungen stabil zusammengehalten werden (Dubois et al. 1995; Gentry et al. 1988). Diesem Komplex aus TGFB und LAP lagert sich ein weiteres Protein an, welches nach wissenschaftlicher Auffassung für die chemische Bindung des Komplexes sowie Aktivierung, Sekretion und Wegweiser zu extrazellulären Effektorstellen von TGFB verantwortlich ist – das *latent transformal growth factor binding protein* (LTBP) (Oklu und Hesketh 2000). Anschließend wird der Komplex sezerniert. Bemerkenswert ist, dass die Abfolge von proteolytischer Spaltung zwischen TGFB und LAP, Anlagerung von LTBP und Komplexsekretion innerhalb von 30 min stattfindet (Miyazono et al. 1991). Das Zusammenspiel des Komplexes lässt sich so vorstellen, dass LAP als Detektor, LTBP als Lokalisator und TGFB als Effektor fungieren (Annes et al. 2003; Munger et al. 1999).

Zur Aktivierung von TGFB stehen nun verschiedene Mechanismen bereit: Thrombospondin-1, ein Matrix-Glycoprotein, spielte bei in-vivo-Untersuchungen eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung aus dem Komplex (Crawford et al. 1998). Weitere Möglichkeiten sind Spaltung durch Plasmin, ein pH-Wert < 3,5 und auch ionisierende Strahlung (Barcellos-Hoff 1993; Barcellos-Hoff et al. 1994).

Das humane TGFB1 hat seinen Genlocus auf Chromosom 19q.13.1 mit einer Länge von 26,2 *kilo base pairs* (kbp). Repliziert und translatiert hat es eine Länge von 390 Aminosäuren (AS), davon sind die letzten 112 C-terminalen AS das eigentliche TGFB1. Die ersten 29 N-terminalen AS sind Signalpeptid, darauf folgen 249 AS, die als LAP fungieren.

#### 1.4.2 TGFB und Prostatakrebs

Welche Rolle TGFB im Prostatakrebs spielt ist trotz intensiver Forschungsarbeit auf diesem Gebiet weiterhin in großen Teilen unklar. Unter physiologischen Bedingungen wird in der Prostata nur wenig TGFB exprimiert (Ilio et al. 1995), wobei sowohl die Level des Proteins als auch die Anzahl der Rezeptoren bei Androgenentzug reversibel steigen (Kim et al. 1996a;

Landström et al. 1996; Soultz et al. 2006). In malignen Tumoren der Prostata wird vermehrt TGF $\beta$  gebildet (Truong et al. 1993). Dabei korrelieren die steigenden Werte mit der Malignität der Zellen (Perry et al. 1997). Untersuchungen lassen vermuten, dass die inhibitorische Wirkung auf die Zellvermehrung dabei ausgeschaltet wird, wobei die motilitätssteigernde Wirkung von den Zellen zu Migration und Infiltration genutzt wird (Barrack 1997; Igotz und Massagué 1986). Interessanterweise geht mit Erhöhung der TGF $\beta$ -Level eine verminderte Expression der TGF $\beta$ -Rezeptoren TGF $\beta$ -RI und TGF $\beta$ -RII einher, welches die erhöhte Ligandenzahl unwirksam macht (Guo et al. 1997; Hellawell und Brewster 2002).

Ein Verlust der Rezeptoren führt zu einer schlechteren Prognose für den Patienten. Dabei spielt der TGF $\beta$ -RI die entscheidende Rolle: In Studien wurden signifikante Korrelationen zwischen Rezeptorverlust und Tumorausbreitung, *Gleason Score*, Überlebenszeit sowie Rezidivfreiheit nachgewiesen (Kim et al. 1998; Kim et al. 1996b). Dies unterstützt die These, dass TGF $\beta$  beim Tumorwachstum eine verstärkende Rolle spielt.

### 1.4.3 TGF $\beta$ -Genetik und Prostatakrebs

Eine Fall-Kontroll-Studie mit 653 Prostatakrebspatienten zu 1476 Kontrollprobanden aus dem Jahr 2008 konnte darstellen, dass in dem untersuchten Kollektiv ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen an C-509T im *TGF $\beta$* -Gen und der Prognose des Prostatakarzinoms besteht. Der TT-Genotyp hatte demnach einen protektiven Effekt bezüglich des Differenzierungsgrades des Tumors, ebenso schützte dieser Genotyp vor einer schlechten Tumorprognose (Brand et al. 2008).

Im Gegensatz dazu zeigte eine Analyse mit 492 Patienten eine Assoziation zwischen dem TT-Allel und höhergradigen Tumoren (Ewart-Toland et al. 2004). Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch das unterschiedliche Studiendesign sowie unterschiedliche Probandengruppen erklären.

Im Rahmen einer Untersuchung an über 1300 Prostatakrebspatienten wurden die Genotypen 800G>A, 509C>T, Ex1-327T>C, Ex1-282C>G und Ex5-73C>T untersucht, wobei keine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Karzinoms gefunden werden konnte (Kang et al. 2007a).

#### 1.4.4 Bedeutung des TGFB-Signalwegs in der Strahlentherapie

In der Strahlentherapie sind die therapieassoziierten unerwünschten Wirkungen vor allem lokal, d.h. im Bereich des bestrahlten Gewebes, zu finden. Bei onkologischen Erkrankungen stellt dies einen Gegensatz zu den systemischen Wirkungen einer Chemotherapie dar. Wie bereits beschrieben werden die Nebenwirkungen in akut und chronisch unterteilt, wobei es sich in aller Regel um Entzündungsreaktionen des Normalgewebes handelt. Chronische Entzündungsreaktionen münden in einer Vielzahl von Fällen in Fibrosierung des Gewebes (Martin et al. 1993), wobei das Risiko einer Fibrosierung interindividuell sehr unterschiedlich ist (Jung et al. 2001).

Grundlage der Fibrose ist eine unkontrollierte gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix, die sich als chronischer Prozess über viele Jahre hinzieht. Dabei wird nach und nach das Parenchym der betroffenen Organe verdrängt, somit die Organfunktionen limitiert oder in extremer Ausprägung komplett blockiert. Einige bekannte Beispiele der Sklerosierung sind Leberzirrhose, Sklerodermie oder Artherosklerose. Der kausale Zusammenhang zwischen TGFB-Signalweg und Sklerose wurde in Veröffentlichungen hinreichend belegt (Border und Noble 1994; Leask und Abraham 2004; Xavier et al. 2004). Bestrahlung führt im Gewebe zur Induktion der Zytokinproduktion, z.B. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 (IL1), *fibroblast growth factor* (FGF), *plateletderived growth factor* (PDGF) und auch TGFB (Dent et al. 2003).

Bei Mäusen, die  $\beta$ -Strahlung ausgesetzt waren sowie bei Schweinen, welche  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt waren, konnten bereits nach zwei bzw. sechs Stunden erhöhte TGFB-Level auf mRNA bzw. Proteinebene nachgewiesen werden (Martin et al. 2000). Erhöhte TGFB-Level konnten auch bei chirurgischen Resektaten fibrosierten Gewebes bis zu 20 Jahre nach Radiatio nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten auch in Gewebeproben nach Strahlenunfällen reproduziert werden (Vozenin-Brotons et al. 1999).

TGFB kann in aktivierter Form nach Bestrahlung chemotaktisch neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen aktivieren, die ihrerseits eine Vielzahl an Zytokinen, u.a. TGFB sezernieren. Die ausgeschütteten Zytokine führen zu Fibroblastenaktivierung, welche ihrerseits Matrixproteine bilden. Dies führt zur Fibrose des betroffenen Gewebes (Xavier et al. 2004).

## 1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Hypothese der Modulation von organspezifischen unerwünschten Nebenwirkungen der Radiotherapie durch Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) im *TGFBI*-Gen erstellt.

Primäre Zielgröße der Arbeit war eine Prüfung des Einflusses der SNPs im *TGFBI*-Gen auf radiotherapieassoziierte Akut- und Spättoxizität. Die Prüfung erfolgte unter der von unserer Arbeitsgruppe vorpublizierten Hypothese (Schirmer et al. 2012), dass es sich bei rs1800471 (Arg25Pro) um eine Variante handelt, welche ein Marker für erhöhte radiotherapieassoziierte Toxizität darstellen könnte, weitere SNPs wurden in die Analyse mit einbezogen.

Als sekundäre Zielgröße sollten mögliche Beziehungen zwischen *TGFBI*-Varianten und erkrankungsspezifischen Parametern (TNM-Status, PSA-Wert bei Diagnosestellung, *Gleason Score*) sowie dem Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, analysiert werden.

Das Studiendesign sah dafür eine retrospektive Kohortenstudie an Prostatakrebspatienten vor, die sich zwischen 2001 und 2010 in der universitären Strahlentherapie Göttingens vorstellten. Zur Evaluation der Zielgrößen sollte eine ausreichend große Patientenkohorte rekrutiert werden, um verlässliche Aussagen zu erhalten. Die Analyse der SNPs sollte sich auf die gesamte Genvariabilität von *TGFBI* beziehen, die zu untersuchenden Varianten wurden durch Datenbank- und Literaturrecherche ermittelt. Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen zur Durchführung der Studie lag vor (Antragsnummer 22/9/04).

Akut- und Spättoxizität wurden anhand des CTC- bzw. LENT/SOMA-Score dokumentiert. Die erforderliche Genanalyse sollte aus peripher-venösem Vollblut (Leukozyten) erfolgen, das während der Therapie oder im Rahmen der regelmäßigen Nachsorgetermine entnommen wurde. Ob die analysierten SNPs auch einen Einfluss auf das Risiko haben, ein Prostatakarzinom zu entwickeln, sollte durch Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Allele bzw. Genotypkonfigurationen mit einer gesunden Kontrollgruppe geprüft werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Kühlschrank	Siemens, München
Mikroliter-Küvette für Photometer (LabelGuard™)	Implen, München
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well), Master-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (96-Well), PTC-200 Peltier	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Typ „Research“, „Reference“	
Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierer 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Stauschlauch zur Blutentnahme	Prämeta, Troisdorf
Vortexer (MS 2 minishaker)	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific, Großbritannien

### 2.2 Verbrauchsmaterial

Alkoholisches Haut-Desinfektionsspray (Kodan®)	Schülke & Mayr, Norderstedt
Butterflys	LDKS Oversan, Gemonio, Italien
Monovetten Kalium-EDTA, 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom, Großbritannien

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom, Großbritannien
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom, Großbritannien
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Multipipette plus (Combitip Plus 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Streifen (8er) für PCR-Platten	Abgene, Epsom, Großbritannien
Tupfer (aus Zellstoff)	Hartmann, Heidenheim

### 2.3 Chemikalien

dNTP-Set	Abgene, Epsom, Großbritannien
Exonuklease I	USB, Staufen
GeneScan™ LIZ® 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
HiDi-Lösung (mit Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer (s. Tab. 1)	MWG-Biotech, Ebersberg
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	USB, Staufen

### 2.4 Kits und Assays

EZ1 DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
SNaPshot™-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

## 2.5 Primersequenzen

**Tab. 1 Primerliste der PCR sowie der SNaPshot™-Reaktion. FL (bp) = Fragmentlänge des replizierten DNA-Abschnitts in Basenpaaren.**

<sup>1</sup>Diese Primer wurden aus der Arbeit von J. H. Janke (Janke 2009) übernommen, <sup>2</sup>aus (Schirmer et al. 2012)

SNP	PCR forward primer (5' → 3')	PCR reverse primer (5' → 3')	FL (bp)	Extended Primer (5' → 3')
rs10417924	AGCCCAGGCGACAGAGCAAGA <sup>1</sup>	GCCTGTGTGCTGTTTGGTATGGATG <sup>2</sup>	397	(CTGA) <sub>3</sub> CTCGTGCTGGGGACACACA <sup>1</sup>
rs1800468	GGACCCAGAACGGAAGGAGAGTCAG	TGCTGCATGGGGACACCATCTACA <sup>1</sup>	550	TGAGGGACTCTGCCTCCAAC <sup>1</sup>
rs1800469	"	"	"	(ACTG) <sub>4</sub> GGGGCAACAGGACACCTGA <sup>1</sup>
rs1800470	CCCCACCACACCAGCCCTGTT	GCTTCACCAGCTCCATGTTCGATAGTCTTG	185	A <sub>16</sub> GCAGCGGTAGCAGCAGC
rs1800471	"	"	"	A <sub>7</sub> GTGCTGACGCCTGGCC
rs2241713	ATGCCCCACTTGCAGAAGAGGCTAC <sup>1</sup>	CAGCAACAACCACGGAAACCAAGAC <sup>1</sup>	711	(CTGA) <sub>4</sub> CTATCACAACCCTGTGAGGTAA <sup>1</sup>
rs2241717	TCGGCTGGTTACAAGGTCCACCTAG	CCAGCTTGGCAACAGAGTGAGACAC	119	AGAACACAAAACCATACAATCCTAGAAC
rs2278422	GGCTCCTTCACCACCAGATCTTAG	GTTGCACAAGCTGGTCTTGAAGTC	575	A <sub>10</sub> GACCTCAATTTGTTTCATTGACAG
rs6508976	AGCTGACAGCTCTGGGGTGGAGTC <sup>1</sup>	AGGGGGAGAAACCACTTCTCAAGGT <sup>2</sup>	437	T(CTGA) <sub>9</sub> GCAGCTGGGACTAAAGGC <sup>1</sup>
rs7254679	GGGGCTTTCTCTACCCACCAATC <sup>2</sup>	GGACAAGTGCTGGCTGCACATTC <sup>1</sup>	517	(GACT) <sub>4</sub> GCGGGGCAGGGGAGG <sup>2</sup>
rs8179181	TCATCTTCGCCTCTTGCCTTGTG <sup>1</sup>	CCGTGGATGGTCATCTGGCTTCTTAC <sup>1</sup>	815	(ACTG) <sub>5</sub> ACTTGCAGGCAGGAGAGACGC <sup>1</sup>

## 2.6 Software

### **Applied Biosystems 3100 Data Collection Software Version 1.0**

Automatische Datenerhebung mit dem 3100 Genetic Analyser Sequenzierer

### **Applied Biosystems GeneScan Analysis Version 3.5.1**

Manuelle Auswertung der SNP-Analysen im Sequenzierer

### **HaploView-Software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>)**

Grafische Aufbereitung von Daten aus den Genotyp-Datenbanken

### **Microsoft Office 2007, 2010, 2013**

Tabellenkalkulation und Niederschrift der Arbeit

### **Phase-Software (Version 2.1)**

Software zur Berechnung der Haplotypen

### **SPSS Statistics Version 12.0**

Statistische Software zur Berechnung und grafischer Darstellung von Messdaten und Überprüfung möglicher Assoziationen. Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. med. M.Sc. M. Schirmer, Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen, durchgeführt.

## 2.7 Datenbanken

### **NCBI (<http://www.nih.gov/>)**

National Center for Biotechnology Information; Informationen zu Genen und dokumentierten Polymorphismen wurden dieser Datenbank entnommen.

### **dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)**

Umfassende Datenbank des NCBI mit Annotation von Einzelnukleotidpolymorphismen.

### **Datenbanken zur Bestimmung des genetischen *linkage disequilibrium* (LD)**

Damit ein LD zwischen Genvarianten angegeben werden kann, ist deren Bestimmung an denselben DNA-Proben erforderlich. Dazu gibt es mittlerweile mehrere Datenbanken. Für meine Arbeit wurden die Einträge in HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>) und IIPGA ([http://innateimmunity.net/IIPGA2/index\\_html](http://innateimmunity.net/IIPGA2/index_html)) verwendet.

HapMap ist ein globales Projekt, das 2002 ins Leben gerufen wurde. Forscher aus der ganzen Welt sind an dem Projekt beteiligt. Ziel war es, die genetische Variabilität in unterschiedlichen menschlichen Ethnizitäten Genom-weit zu erfassen. Dabei lag die Annahme zu Grunde, dass die genetische Variabilität von eng benachbarten genomischen Bereichen durch einzelne Genpolymorphismen repräsentiert wird. Die HapMap-Datenbank speist sich vorwiegend aus Daten von SNP-Arrays, d.h. Ausprägungen von genetischen Markern in gewissen Abständen über das Genom hinweg. Die Aussagekraft der HapMap-Datenbank hängt demzufolge wesentlich von der Dichte der analysierten genetischen Marker ab. Zum Zeitpunkt meiner Dissertation waren für die kaukasische Bevölkerungsgruppe etwa vier Millionen solcher Marker bei 174 Individuen in HapMap annotiert. Dies bedeutet jedoch keine vollständige genetische Charakterisierung wie dies typischerweise bei Resequenzierungsdaten der Fall ist. Insbesondere bei selteneren Genvarianten ( $< 5\%$ ) ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass diese nicht alle durch in HapMap gelistete Genpolymorphismen erfasst sind.

Die IIPGA-Datenbank ist eine Sammlung von Polymorphismen, welche Einträge für Gene mit Bezug zu inflammatorischen Prozessen, z.B. dem TGFB-Signalweg, enthält. Diese Daten beruhen auf 23 kaukasischen Individuen und erlauben somit lediglich Aussagen über häufig vorkommende Genpolymorphismen.

### 3 Patientenkollektiv und Methoden

Die vorliegende Dissertation beinhaltet eine klinische Studie mit molekular-genetischen Analysen. Das klinische Kollektiv umfasst Patienten mit Prostatakarzinom. Molekular-genetisch wurden Keimbahnvarianten des *TGFBI*-Gens betrachtet.

#### 3.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Untersuchung wurden 509 Prostatakrebspatienten eingeschlossen, welche sich zwischen März 2001 und September 2010 in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen vorstellten. Während der laufenden Therapie oder im Rahmen der Nachsorgetermine erfolgte die Studienblutentnahme. Die klinischen Daten wurden den Patientenakten entnommen.

Als allgemeine Charakteristika wurden Alter bei Erstdiagnose (ED) und *Body Mass Index* (BMI) der Patienten erfasst. Krankheitsspezifisch wurden Familienanamnese, das vorliegende Prostatamalignom und gegebenenfalls weitere Malignome betrachtet. Bezüglich des Prostatamalignoms wurde das TNM-Stadium nach den *Union for International Cancer Control* (UICC)-Kriterien aus dem Jahr 2010 eingeteilt. Bei diesem in den folgenden Tab. 2 und Tab. 3 dargestellten, international angewandten System wird die Tumorausbreitung nach anatomischen Grenzen eingeteilt.

**Tab. 2 T-Stage des TNM-Systems nach UICC 2010**

Stage	Tumorausbreitung
Tx	keine Beurteilung möglich
T0	kein Anhalt für Primärtumor
T1	klinisch nicht erkennbarer Tumor
T1a	zufälliger histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des entnommenen (resezierten) Gewebes
T1c	Tumor durch Biopsie diagnostiziert
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor infiltrierte die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor infiltrierte mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor infiltrierte in beide Lappen
T3	Überschreitung der Organkapsel
T3a	extrakapsuläre Ausbreitung
T3b	Samenblaseninfiltration
T4	Tumor ist fixiert oder infiltrierte benachbarte Strukturen

**Tab. 3 N- und M-Stage des TNM-Systems nach UICC 2010**

Metastasen	Tumorausbreitung
Nx	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionalen Lymphknoten befallen
N1	regionaler Lymphknotenbefall
Mx	nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastase(n)
M1	Fernmetastase(n)

Erweiternd zur TNM-Klassifikation wird bei prostatektomierten Patienten beurteilt, ob bei der Operation das gesamte Tumorgewebe entfernt werden konnte oder noch Tumorgewebe vorhanden ist. Die Differenzierung der Residualtumoren wird in Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4 R-Stage des TNM-Systems nach UICC 2010**

Stage	Residualtumor
Rx	Residualtumor nicht beurteilbar
R0	kein Residualtumor
R1	mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor
R2	makroskopisch nachgewiesener Residualtumor

Darüber hinaus wurden tumorspezifische Parameter (PSA sowie *Gleason Score*, s. Tab. 5) ermittelt.

**Tab. 5 *Gleason Score* (Konsensus Konferenz der „International Society of Urological Pathology“, 2005), es werden stets 2 Grade addiert (s.o.)**

<i>Gleason Score</i>	Histologische Kriterien
Grad 1	gut abgegrenzter Tumorknoten, ohne Infiltrate dicht gepackte, uniforme Tumordrüsen mittlerer Größe
Grad 2	weitgehend abgegrenzte Tumorknoten mit kleinen Ausläufern dicht gepackte, gering variable Tumordrüsen mittlerer Größe
Grad 3	Grad 3a: unscharfe Tumordinfiltrate, unregelmäßige Tumordrüsen Grad 3b: wie 3a, aber kleine und sehr kleine Drüsenschläuche Grad 3c: kribriiforme Tumorzellproliferate
Grad 4	Grad 4a: fusionierte kleine, mittlere oder große Drüsen, unregelmäßig, infiltrierend Grad 4b: wie 4a, aber zahlreiche große Tumorzellen
Grad 5	Grad 5a: wie 3c, aber scharf abgegrenzte, papilläre und kribriiforme Proliferate mit zentralen Nekrosen Grad 5b: Tumorzellvermehrung, solide oder strangförmige Tumorzellproliferate

Für die Auswertung der Strahlentherapie-assoziierten Nebenwirkungen wurde die Art der Bestrahlung sowie der Grad der Akut- und Spättoxizität an Blase und Enddarm dokumentiert. Die beobachtete Toxizität sollte dann mit der genetischen Variabilität in *TGFBI* in Beziehung gesetzt werden. Dazu wurden über bioinformatische Methoden genetische Marker ausgewählt. Diese genetischen Daten wurden auch dahingehend untersucht, ob sie auch die Entstehung von Prostatakarzinomen beeinflussen; letzteres erfolgte durch Abgleich mit einer gesunden Kontrollpopulation von 264 Personen identischer Ethnizität (Kaukasier).

### 3.2 Dokumentation der Toxizität

Die durch die Radiotherapie verursachte Toxizität wurde an den Organen Enddarm und Harnblase dokumentiert und anschließend ausgewertet.

Die Akuttoxizität wurde im Verlauf der Therapie einmal wöchentlich nach *common toxicity criteria* (CTC) (Trotti et al. 2000) erhoben. Die Dokumentation der Spättoxizität erfolgte nach *late effects on normal tissues / subjective objective management analysis* (LENT/SOMA) (Seegenschmiedt et al. 2000) in der klinischen Nachsorge der Tumorpatienten, welche sich in Abständen von einem Jahr insgesamt fünfmal in der Tumornachsorge der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen vorstellten.

### 3.3 Auswahl der zu genotypisierenden *TGFB1*-Marker

Für diese Arbeit waren ausschließlich genetische Varianten des Normalgewebes im Bereich von *TGFB1* von Interesse. Bei einer Allelfrequenz von mindestens 1% spricht man hier von einem Genpolymorphismus. Als Auswahlkriterien für die im Rahmen dieser Arbeit zu bestimmenden *TGFB1*-Genpolymorphismen dienten einerseits Literaturbefunde, andererseits sollte darüber hinaus auch die weitere genetische Variabilität in diesem Genbereich abgebildet werden. Für das seltenere Allel wurde für diese Arbeit eine Mindestallelfrequenz (MAF) von 5% gefordert.

In der Literatur sind insbesondere vier Genvarianten im 5'-Bereich von *TGFB1* häufig im Hinblick auf funktionelle oder klinische Endpunkte untersucht worden (s. Kap. 1.4.3). Dies sind vor dem Transkriptionsstartpunkt die SNPs *-800G>A* (rs1800468) und *-509C>T* (rs1800469) sowie in der 5'- *untranslated region* (UTR) die SNPs *Leu10Pro* (rs1800470) und *Arg25Pro* (rs1800471). Für einen häufigen Intron-SNP (rs2278422) war ebenfalls ein klinischer Bezug berichtet worden (Iuliano et al. 2009). Ein weiterer intronischer SNP mit hoher MAF war in der eigenen Arbeitsgruppe identifiziert worden (rs2241717), der in einer bestimmten Kombination mit den zuvor genannten SNPs, einem so genannten Haplotyp, mutmaßlich die Strahlensensibilität beeinflusst (Schirmer et al. 2011). Außer diesen sechs Kandidaten sollten weitere SNPs analysiert werden, welche die genetische Variabilität von Kaukasiern im Genbereich von *TGFB1* ±10 kb flankierender Sequenzen gemäß der HapMap-Datenbank (Stand Juli 2010) mit einer Mindestallelfrequenz von 10% erfassen. Von den zuvor angesprochenen sechs Kandidaten-SNPs war lediglich einer (rs1800469) in HapMap enthalten. Die übrigen fünf plus ein nur in der Datenbank annotierter triallelischer SNP (rs6508976 mit Allelfrequenzen von 69, 23 und 8% für Kaukasier) wurden an DNA-Proben von 60 unverwandten kaukasischen Teilnehmern des HapMap-Projekts genotypisiert. Das paarweise LD aller dieser SNPs wurde mit der Software HaploView visualisiert (Abb. 1). Mit dem in HaploView implementierten Tagging-Algorithmus sollte ein Satz von genetischen Markern ermittelt werden, welcher diese genetische Variabilität nach den o.g. Kriterien mit einer Stringenz von  $r^2 = 0,8$  abbildet. Dies wird durch die zehn in Abb. 1 eingerahmten SNPs erreicht, wobei für den trialleischen SNP die beiden häufigen Allele zu Grunde gelegt wurden. Diese zehn Genpolymorphismen wurden dann an genomischer DNA aus peripheren Blutzellen der oben beschriebenen Patientenkohorte mit Prostatakarzinom analysiert.

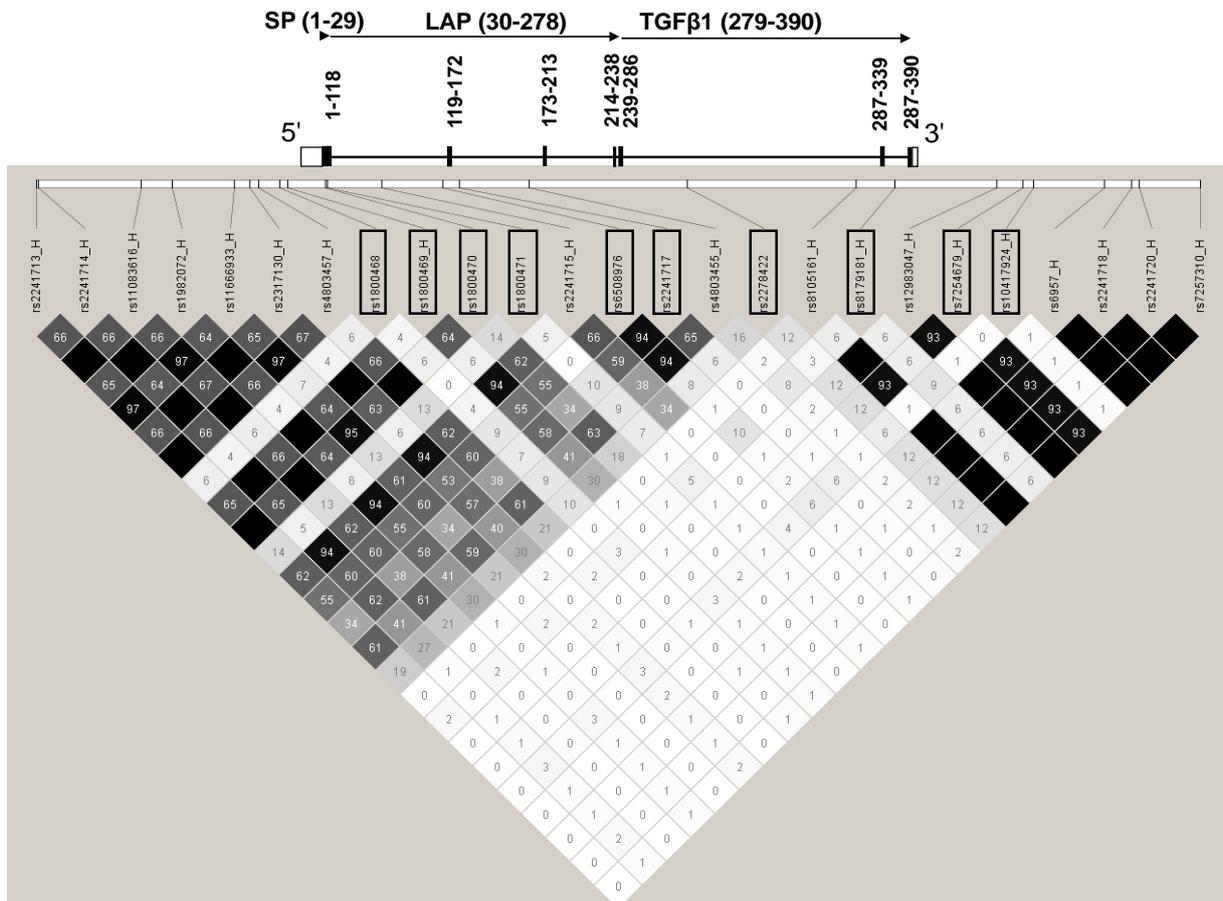


Abb. 1 Genetische Architektur des *TGFBI*-Gens mit LD-Plot von Genpolymorphismen. Im oberen Bildteil sind der Abfolge von Signalpeptid (SP), *Latency-associated peptide* (LAP) und reifem TGFBI auf Proteinebene die genetischen Elemente (Introne als horizontale, Exone als vertikale Linien) in 5'-3'-Richtung zugeordnet. Die Zahlenangaben entsprechen den Aminosäurekodons. Der untere Bildteil zeigt einen paarweisen LD-Plot zwischen SNPs (mit rs-Nummer bezeichnet) für die SNPs im Genbereich von *TGFBI*  $\pm 10$  kb mit mindestens 10% MAF aus dem HapMap-Projekt (mit „H“ nach der rs-Nummer bezeichnet) sowie sechs zusätzlich typisierte Genpolymorphismen. Die Nummern in den Rauten zeigen den paarweisen  $r^2$ -Wert des LD zwischen den jeweiligen SNPs an, dabei gilt: je höher das LD zwischen zwei Markern, desto dunkler der Farbton der dargestellte Raute. Die Zahlen geben das LD in % an, wobei eine schwarze Raute ohne Zahl ein LD von 100% bedeutet. Die mit Rechtecken markierten SNPs decken die dargestellte genetische Variabilität mit einem  $r^2$ -Wert von 0,80 ab.

### 3.4 Isolierung und Quantifizierung der DNA

Die Analyse der genomischen DNA erfolgte aus 2,7 ml *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA)-antikoaguliertem, peripher venösem Vollblut. Dieses wurde nach Blutentnahme bis zur DNA-Extraktion bei  $-20$  °C gelagert. Anschließend wurde das BioRobot EZ1 DNA Blood 350  $\mu$ l Kit in Verbindung mit dem BioRobot EZ1 System (beide Qiagen, Hilden) genutzt, um genomische DNA zu gewinnen.

Dieses vollautomatische Verfahren soll im Folgenden kurz erläutert werden. Die im Blut enthaltenen Zellen werden zunächst durch Proteinase K lysiert. Es binden magnetische Partikel an die DNA-Doppelhelix, darauf folgt die Trennung von DNA und übrigen Zellbestandteilen durch ein magnetisches Feld. Nach Aufreinigung der magnetisieren DNA

wird das magnetische Feld deaktiviert, was daraufhin die Eluierung der DNA-Lösung ermöglicht.

Diese Methode erlaubt es, aus ca. 350 µl Vollblut ca. 200 µl DNA-Lösung zu isolieren, welche anschließend im Biophotometer 6313 (Eppendorf, Hamburg) quantifiziert wird. Dabei wird die Absorption bei 260 nm vor dem mit ddH<sub>2</sub>O geeichten Hintergrund gemessen. Als Zielwert sind Konzentrationen von  $\geq 40$  ng/µl angestrebt, um eine ausreichende DNA-Amplifizierung zu gewährleisten. Die Proben werden anschließend mit ddH<sub>2</sub>O individuell auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt und auf 96-Well-PCR-Platten aufgebracht.

### 3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein 1987 von K. Murriss etabliertes Verfahren zur *in-vitro* Amplifikation von zuvor determinierten Nukleinsäure-Fragmenten (Saiki et al. 1988). Das Prinzip der Vervielfältigung beruht dabei auf einer Abfolge von drei Schritten, welche in Zyklen (z.B. 25-40x) wiederholt werden: Denaturierung, Hybridisierung und Synthetisierung der DNA-Sequenz.

Im Reaktionsansatz befinden sich neben den Oligonukleotidprimern (welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz determinieren) die vier Nukleotidbasen der DNA [Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T)], ein DNA-Template sowie eine hitzebeständige DNA-Polymerase (sog. Taq-Polymerase, isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*). Zusätzlich zu diesem klassischen Reaktionsansatz wird im Labor, in welchem diese Arbeit entstand, Q-Solution (Qiagen) genutzt, welches die Amplifikation von GC-reichen Regionen erleichtert.

Die Denaturierung der Doppelhelix erfolgt durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95 °C. Nach Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen können sich die ausgewählten Primer komplementär an die zu amplifizierenden Abschnitte binden (*Annealing*). Dazu wird die Temperatur auf ca. 55 °C gesenkt. Nach Bindung am DNA-Strang fungieren die gewählten Primer als Startpunkt für den Einbau der Nukleotidbasen durch die Taq-Polymerase. Dieser Reaktionsschritt findet bei ca. 72 °C statt, was dem Temperatur-optimum der genutzten Polymerase entspricht. Die sog. „Elongation“ des DNA-Abschnitts läuft stets in 3'-5' Richtung ab, wobei dem ursprünglichen DNA-Abschnitt (Matrize) komplementären Nukleotidbasen angelagert werden.

Zusätzlich zu diesen drei sich wiederholenden Reaktionsschritten wird eine initiale Denaturierung bei 95 °C durchgeführt. Ebenso erfolgt nach Beendigung des letzten Zyklus

ein finaler Elongationsschritt. Dieser soll sicherstellen, dass noch nicht vollständige DNA-Synthetisierungen komplettiert werden. Die folgende Tab. 6 führt die Standard-PCR-Bedingungen auf.

**Tab. 6 Standard-Bedingungen der PCR mit *Taq*-Polymerase**

Phase	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 35 Zyklen
Anlagerung	50–70 °C	30 s	
Verlängerung	72 °C	1 min/kb	
terminale Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	8 °C	∞	

### 3.5.1 Multiplex-PCR (M-PCR)

Werden während einer PCR mehrere Primerpaare simultan eingesetzt, so nennt man dieses Verfahren Multiplex-PCR (M-PCR): Diese Methode erlaubt es, eine Vielzahl von DNA-Fragmenten simultan zu vervielfältigen. Die Struktur der vorliegenden Arbeit erlaubte es, dieses komfortable Vervielfältigungssystem zu nutzen und so alle gewünschten Genfragmente in wenigen Arbeitsschritten zu amplifizieren.

Die folgende Tab. 7 bildet ein Standard-Reaktionsansatz einer M-PCR ab. Die dazu gewählten Primer waren einzeln jeweils in TE-Puffer gelöst und wurden im gemeinsamen Primer-Pool dann auf eine Konzentration von 2 µM verdünnt.

Der Primer-Pool ist in Tab. 1 des Kap. 2.5 aufgeführt. Im folgenden Abschnitt folgt die Beschreibung der Genotypisierung durch Primerextension, durch welche die SNP-Auswertung ermöglicht wird.

**Tab. 7 Multiplex-PCR-Reaktionsansatz**

	Volumen / Reaktion
Multiplex-MasterMix (Qiagen)	6 µl
Primer-Pool	1,2 µl
Q-Solution (5x)	1,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	1,6 µl

### 3.5.2 Genotypisierung durch Primerextension (SNaPshot™)

Die Genotypisierung durch Primerextension ermöglicht es, verschiedene SNPs in einem Arbeitsschritt zu erfassen. Eine Beschreibung der zu genotypisierenden TGFB1-Marker ist

bereits in Kap. 3.2 dargestellt. Für die Primerextension wird zunächst eine M-PCR zur Vervielfältigung der Genombereiche, welche an den gesuchten Polymorphismus grenzen, durchgeführt.

Das (M-) PCR-Reaktionselet wird anschließend aufgereinigt. Dies geschieht durch Hinzugabe der Restriktionsenzyme Exonuklease 1 (Exo 1) sowie *shrimp alkaline phosphatase* (SAP). Diese deaktivieren sowohl die Primer-DNA (durch Exo 1) als auch die Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) (durch SAP) der M-PCR irreversibel.

**Tab. 8 Reaktionsansatz 1. Aufreinigung**

	Volumen / Reaktion
10x RX-Puffer	0,6 µl
Exo 1	0,705 µl
SAP	1,695 µl

Pro 6 µl M-PCR-Produkt wird 0,71 µl Exo 1 und 1,70 µl SAP in 0,6 µl 10x RX-Puffer gemischt und diese in 384-Well-Platten vorgelegt. Nach Zugabe der 6 µl PCR-Produkt werden die Reaktionsplatten bei 37 °C für 2 h Stunden inkubiert. Darauf folgte eine 15-minütige Hitzedeaktivierung der Verdauungsenzyme bei 80 °C, bevor die eigentliche SNaPshot™-Reaktion ansteht.

**Tab. 9 Reaktionsansatz SNaPshot™-Reaktion**

	Volumen / Reaktion
ddH <sub>2</sub> O	2 µl
Mastermix (beinhaltet ddNTPs)	0,5 µl
PrimerPool	0,5 µl

Das Prinzip der Reaktion beruht darauf, dass anstelle der bei einer typischen PCR eingesetzten dNTPs in der SNaPshot-Reaktion™ Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet werden. Ihnen fehlt am 3'-Ende eine Hydroxygruppe, was zur Folge hat, dass im Anschluss an die DNA-Anlagerung im Rahmen der Elongation keine weiteren Basen hinter den Primer binden können. Die ddNTPs sind fluoreszenzfarbstoffmarkiert (s. Tab. 10) und lassen sich im nächsten Schritt durch eine Sequenzierung grafisch darstellen. Anhand dessen lassen sich SNPs detektieren.

**Tab. 10 Fluoreszenzfarbstoffe mit Farbgebung der ddNTPs**

ddNTP	Fluoreszenzfarbstoff	Farbe
A	dR6G	grün
C	dTAMRA <sup>TM</sup>	schwarz
G	dR110	blau
T	dROX <sup>TM</sup>	rot

Vom SNaPshot<sup>TM</sup>-Reaktionsansatz werden je 3 µl auf einer 384-Well-PCR-Platte vorgelegt und 2 µl der amplifizierten DNA hinzugegeben. Im Anschluss wird die Reaktion (s. Tab. 12) im PCR-Gradienten-Cycler gestartet.

**Tab. 11 Reaktionsbedingungen für SNaPshot<sup>TM</sup>-PCR**

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95 °C	10 s	}26 Zyklen
Anlagerung	50 °C	5 s	
Verlängerung	60 °C	30 s	

Nach der SNaPshot<sup>TM</sup>-PCR ist es erneut erforderlich, einen Aufreinigungsschritt durchzuführen. Dabei werden jene ddNTPs deaktiviert, welche im vorherigen Reaktionsschritt nicht zur DNA-Elongation verwendet wurden. Zu jeder Probe werden 0,5 µl SAP-Puffer (10x) und 0,5 µl SAP (1 U/µl) zugegeben. Darauf folgt die Inkubation für 30 min bei 37 °C. Die so durchgeführte Deaktivierung beugt unerwünschten Folgereaktionen und Auswertungsstörungen vor.

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wird auf 96-Well-Sequenzierplatten zu je 1 µl der Proben je 10 µl einer Mischung aus dem Längenstandard Genescan<sup>TM</sup>-LIZ<sup>®</sup> 120 und HiDi Formamid (Verhältnis 1:200) hinzugegeben. Darauf folgt die Denaturierung der Primer. Diese wird durch Hitzedeaktivierung (5 min bei 95 °C) durchgeführt. Eine mögliche Renaturierung der Primer soll durch das zugegebene Formamid ebenso wie anschließendes sofortiges Überführen der Proben auf Eis verhindert werden.

Die Kühlung der Proben wird für 10 min aufrecht erhalten. Darauf folgt die Montage der 96-Well-Sequenzierplatte auf einen Sequenzierplattenträger. Dieser wird mit einer Gummimatte abgedeckt, in einen Rahmen gespannt und in den Biophotometer 6313 (Eppendorf, Hamburg) eingebracht.

Im Anschluss wurden die erhobenen Daten mittels GeneScan Analysis Software (Version 3.5.1) grafisch aufgearbeitet und ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

Grundlage dieser Untersuchung bildete ein Kollektiv von 509 Patienten mit Prostatakarzinom, welche in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Leitung Prof. Hess) der Universitätsmedizin Göttingen zwischen März 2001 und September 2010 behandelt wurden. Primäre Zielgröße war dabei ein möglicher Einfluss der ererbten Variabilität des *TGFBI*-Gens auf die Radiotherapie-bedingte Toxizität, sowohl in der Akutphase der Therapie ( $\leq 3$  Monate nach Beginn) als auch im längerfristigen Verlauf ( $> 3$  Monate). Sekundäre Zielparameter stellten mögliche Beziehungen zwischen *TGFBI*-Genvarianten und Tumorspezifischen Parametern (TNM-Status, PSA-Wert bei Diagnosestellung sowie *Gleason Score*) sowie einen möglichen Zusammenhang zwischen der *TGFBI*-Keimbahn-Genetik und dem Risiko für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms (durch Vergleich mit gesundem Kontrollkollektiv) dar.

Zunächst wird die Zusammensetzung des Kollektivs der Patienten mit Prostatakarzinom anhand allgemeiner, Tumor-spezifischer und Therapie-bedingter Kenngrößen beschrieben. Dann folgen die genetischen Analysen und deren Assoziationsprüfung entsprechend den oben genannten primären und sekundären Zielgrößen.

### 4.1 Stratifizierung des Patientenkollektivs

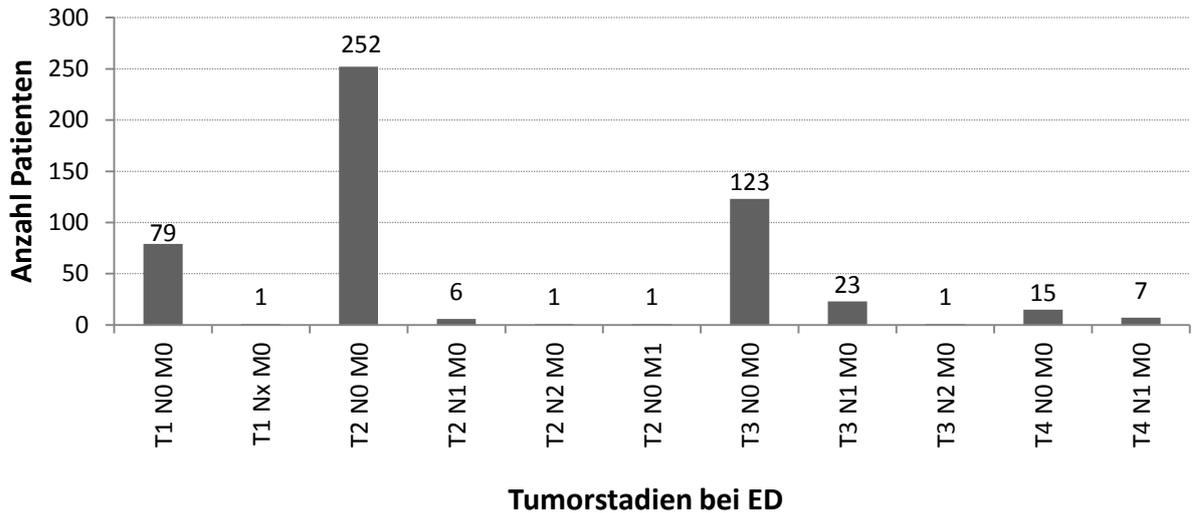
#### 4.1.1 Allgemeine Patientendaten

Das Alter der Patienten bei Erstdiagnose reichte von 47 bis 83 Jahre (Mittelwert 62, Median 68 Jahre). Der BMI der Patienten betrug 14,9 – 43,5 kg/m<sup>2</sup> mit einem Mittelwert von 28,9 und einem Median von 28,1 kg/m<sup>2</sup> (nach WHO-Definition 2008 im Bereich der Präadipositas).

Familienanamnestisch fanden sich bei 37 Patienten weitere Prostatakarzinome, bei insgesamt 158 Patienten andere Tumoren. Zum Zeitpunkt der ED eines Prostatakarzinoms war bei 51 Personen anamnestisch ein Zweittumor bekannt.

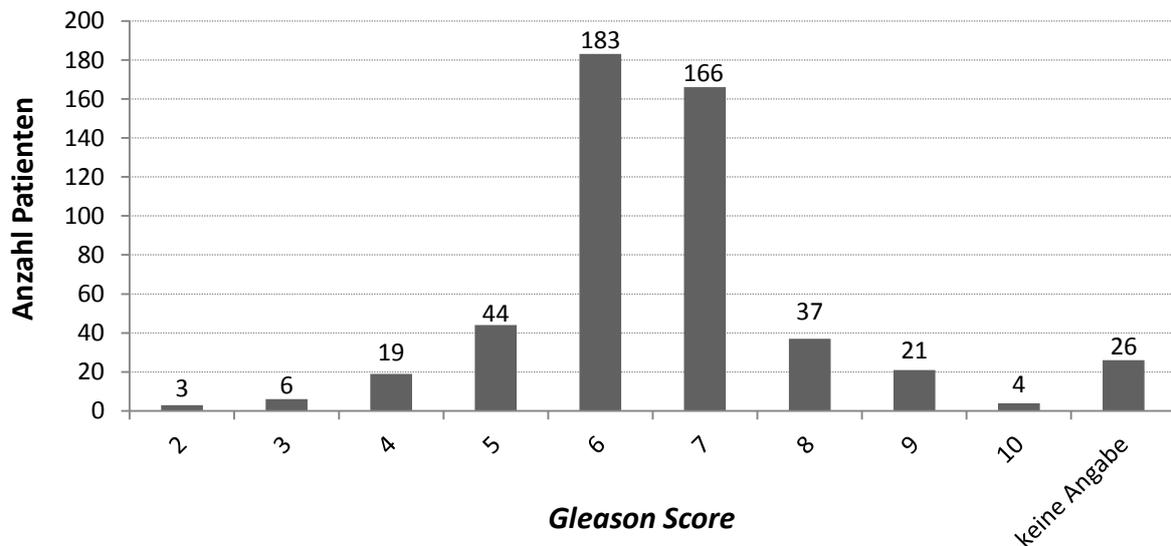
#### 4.1.2 Tumor-spezifische Charakteristika

Das Tumorstadium der Prostatakarzinome bei ED wurde nach dem TNM-System der UICC 2010 gescort. Eine kompakte Übersicht der Tumorstadien zeigt Abb. 2.



**Abb. 2** Verteilung der Tumorstadien bei ED nach TNM-Einteilung. Die Angaben beziehen sich auf das unselektierte Gesamtkollektiv von 509 Patienten. Hier herrschten in absteigender Reihenfolge v.a. T2, T3 sowie T1-Tumore vor, bei welchen eine N0- sowie M0-Situation vorlag.

Die Verteilung des *Gleason Scores* bei ED ist in Abb. 3 veranschaulicht. Bei 228 Patienten wurde ein Score  $\geq 7$  festgestellt, im Mittelwert betrug er 6,4 und im Median 6 Punkte. Bei Diagnosestellung bewegte sich das PSA der Patienten zwischen 0,8 und 186 ng/ml (Mittelwert 15,1; Median 9,4 ng/ml).



**Abb. 3** Verteilung des *Gleason Scores* bei ED in der Gesamtkohorte von 509 Patienten. Score 6 und Score 7 sind überhäufig angetroffene *Gleason-Scores* bei ED. Es gilt zu beachten, dass Studien bei *Gleason Score* 7 eine signifikant höhere LK-Metastasierung als Score 6 nachgewiesen haben (s. auch Kap. 1.1). Für 26 Patienten war retrospektiv kein *Gleason Score* eruierbar.

Bei 98 Patienten wurde im Zeitraum von 7 – 182 Monaten nach ED ein biochemisches Tumorrezidiv festgestellt (Mittelwert 48,9, Median 39 Monate). Von diesen 98 Patienten erhielten 22 Patienten eine strahlentherapeutische Erstlinientherapie, 74 Patienten erhielten eine strahlentherapeutische Zweitlinientherapie. Drei Patienten erlitten wiederholt Rezidive im Abstand von 15 – 67 Monaten. Entsprechend der Definition der Konsenskonferenz der *American Society for Therapeutic Radiology and Oncology* aus dem Jahr 2005 wurde ein Anstieg des basalen PSA um 2 ng/ml als Rezidiv gewertet (Roach et al. 2006). Abb. 4 geht auf die Verteilung der Patienten mit Tumorrezidiv näher ein, Tab. 12 zeigt die Einteilung der Patienten mit Rezidiv in die Subgruppen (s.u.). Bei ED des Prostatakarzinoms wurden bei einem Patienten bereits Fernmetastasen festgestellt. Weitere acht Patienten erlitten im Verlauf der Erkrankung Fernmetastasen. Die Dauer zwischen ED und Diagnose der Fernmetastasierung betrug zwischen 0 und 123 Monaten (Mittelwert 50 Monate, Median 34).

#### 4.1.3 Therapie-Modalitäten

Von den insgesamt 509 Patienten wurden in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen 411 Patienten im Rahmen der ED bestrahlt. Bei 74 Patienten wurde die Strahlentherapie wegen eines biochemischen Rezidivs (s.o.) vorgenommen. Bei all diesen Patienten war die Prostataloge zuvor noch nicht bestrahlt worden.

Elf Patienten wurden an einer anderen Einrichtung bestrahlt oder es wurde keine Strahlentherapie durchgeführt. Bei weiteren elf Patienten wurde die Therapie vor Verabreichung der Zieldosis abgebrochen. Zwei Patienten wurden nicht im Bereich der Prostataloge bestrahlt. Diese 24 Patienten wurden für die weitere Analyse nicht berücksichtigt.

Eine antiandrogene Therapie wurde bei 308 der 498 in Göttingen behandelten Patienten vor, parallel zu oder nach Abschluss der Radiatio eingeleitet. Bei den Patienten mit Tumorrezidiv wurde die antiandrogene Therapie in 54 von 100 Fällen nach Bekanntwerden des Rezidivs begonnen. Darunter befanden sich 35 Patienten, welche die Bestrahlung wegen des biochemischen Rezidivs erhielten sowie 19 Patienten, die keine Bestrahlung des Tumorrezidivs erhielten. Unter den neun Patienten mit dokumentierten Fernmetastasen erhielten sieben Patienten eine antiandrogene Therapie.

Von den oben genannten neun Patienten mit Fernmetastasen erhielten acht eine in palliativer Intention durchgeführte Bestrahlung der Metastasen im Dosisbereich von 24 – 45 Gy.

Das Gesamtkollektiv der Patienten wurde nach Art der strahlentherapeutischen Therapie in insgesamt 12 Subgruppen aufgeteilt. Abb. 4 veranschaulicht in einem Flussdiagramm die von uns vorgenommene Einteilung der initialen Kohorte von 509 Patienten. Die folgende Tab. 12 zeigt die Therapieschemata der Subgruppen. Darüber hinaus stellt sie Informationen des Erkrankungs- (Rezidiv und Metastasen) bzw. Therapieverlaufs (Antiandrogene) dar.

**Tab. 12 Übersicht der Behandlungssubgruppen. Die Patienten wurden anhand ihrer Therapieschemata in die dargestellten Subgruppen 1-12 eingeteilt. Patienten, über die keine Therapiedaten vorhanden waren, wurden in Gruppe n.a. zusammengefasst. Diese Subgruppe wurde alleinig für epidemiologische Fragestellungen ausgewertet. Für die Auswertung der Toxizität wurden Patienten der Subgruppen 2, 3, 4, 6 und 7 eingeschlossen. Neben der Definition der Subgruppe nach Art der Radiatio und Strahlendosis wird das Patientenkollektiv bezüglich aufgetretener Rezidive und Metastasen sowie durchgeführter antiandrogener Therapie aufgeschlüsselt. Die ganzen Zahlen der letzten drei Spalten beziehen sich jeweils auf die Gesamtanzahl der Patienten in der jeweiligen Subgruppe. Ebenso verhält es sich mit dem prozentualen Anteil, welcher in Klammern dargestellt ist. LDR = low dose rate, HDR = high dose rate, LAG = Lymphabflussgebiet.**

Sub- gruppe	Definition der Subgruppe nach Art der Radiatio	Strahlendosis (Gy)	Anzahl Patienten	Rezidiv bekannt (%)	Metastasen bekannt (%)	Antiandrogene Therapie (%)
1	postoperativ, perkutan mit Lymphabflussgebiet	59 – 60	107	6 (5,6)	2 (1,9)	73 (68,2)
2	primär dosisreduziert perkutan und HDR	64 – 66	16	2 (12,5)	1 (6,3)	14 (87,5)
3	primär perkutan und HDR	68	34	1 (2,9)	-	16 (47,1)
4	primär perkutan ohne LAG	72	146	5 (3,4)	-	92 (63)
5	postoperativ, perkutan mit LAG	60,4 – 61	27	1 (3,7)	-	23 (85,2)
6	primär perkutan und HDR mit LAG	68,4 – 68,6	16	-	-	11 (68,8)
7	primär perkutan mit LAG	71	35	7 (20)	2 (5,7)	30 (85,7)
8	primär LDR (Seedimplantation)	145 – 160	30	-	-	9 (30)
9	perkutane Rezidivbestrahlung	64 – 66	63	63 (100)	3 (4,8)	30 (47,6)
10	primär perkutan mit LAG bei Rezidiv	71	4	4 (100)	-	4 (100)
11	primär perkutan ohne LAG bei Rezidiv	72	6	6 (100)	-	5 (83,3)
12	perkutan und HDR ohne LAG bei Rezidiv	68	1	1 (100)	-	1 (100)
Summen der am Prostatakarzinom behandelten Patienten			485	96 (19,8)	8 (1,6)	308 (63,5)
n.A.	abgebrochen, nur Metastasen bestrahlt o.ä.	-	24	2 (8,3)	1 (4,2)	15 (62,5)
Gesamtsummen			509	98 (19,3)	9 (1,8)	323 (63,5)

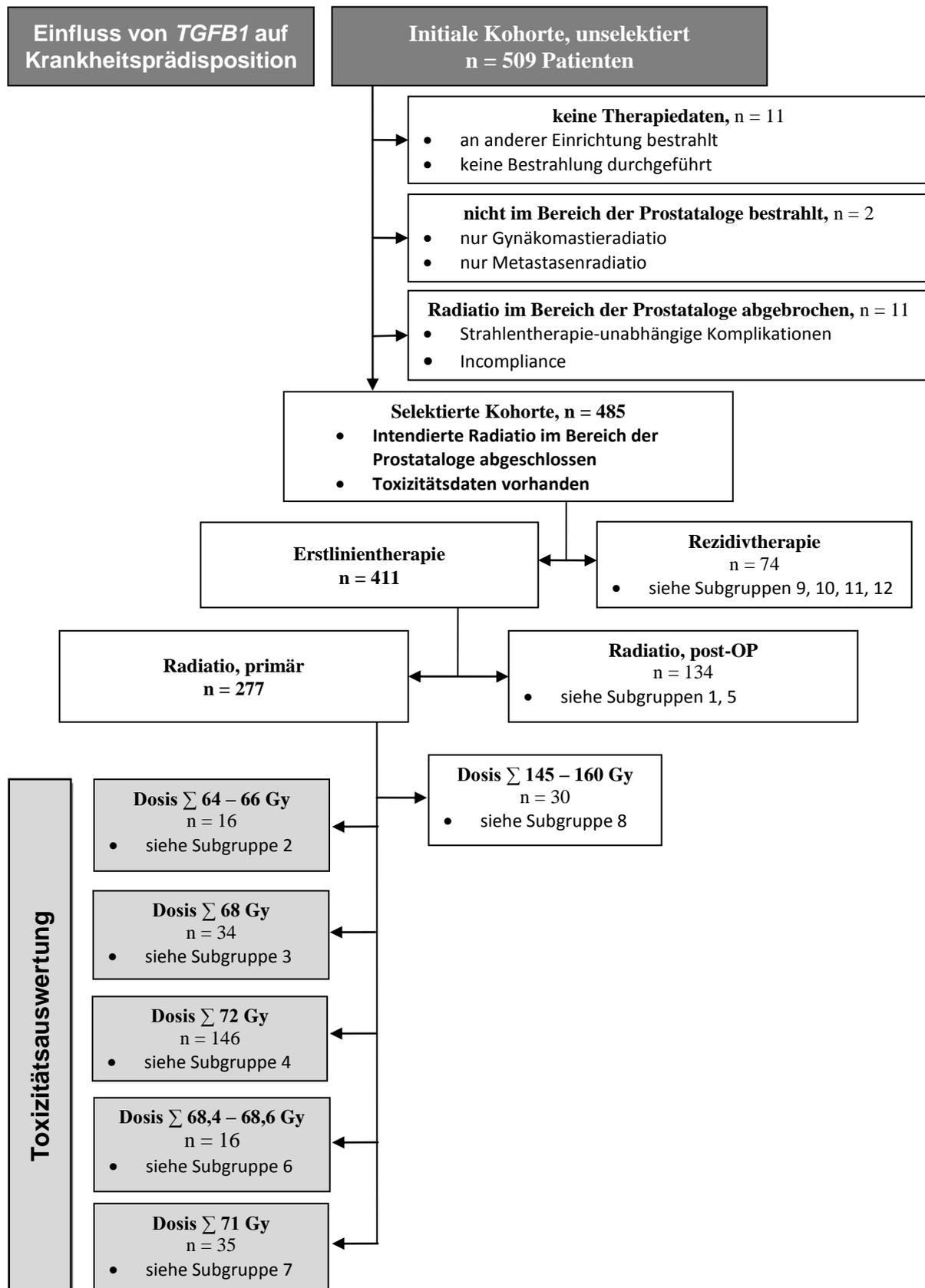


Abb. 4 Flussdiagramm der rekrutierten Patienten für die zu untersuchenden Fragestellungen. Für die Auswertung eines möglichen Einflusses von *TGFB1* auf die Krankheitsprädisposition wurde das unselektierte Gesamtkollektiv betrachtet, für die Toxizitätsauswertung die nach Behandlung selektierten Subgruppen 2, 3, 4, 6 und 7 mit primärer Radiatio im Dosisbereich von 64 bis 72 Gy (zur genaueren Beschreibung der Subgruppen siehe obige Tab. 12).

#### 4.1.4 Akuttoxizität

Die folgenden Abbildungen (Abb. 6 und Abb. 5) veranschaulichen die Akutnebenwirkungen der selektierte Kohorte (Radiatio im Bereich der Prostata abgeschlossen, Toxizitätsdaten vorhanden,  $n = 485$ ) im Verlauf der Therapie. Der größte Anteil der Patienten erleidet in der akuten Phase der Bestrahlung Enddarmreaktion ersten Grades. Patienten ohne Akuttoxizität sind die zweitgrößte Gruppe, gefolgt von Patienten mit Akuttoxizität von Grad 2. Grad 3 sowie Grad 4 sind seltene Phänomene. In der vorliegenden Studie erlitten lediglich drei Patienten Grad 3-Reaktionen.

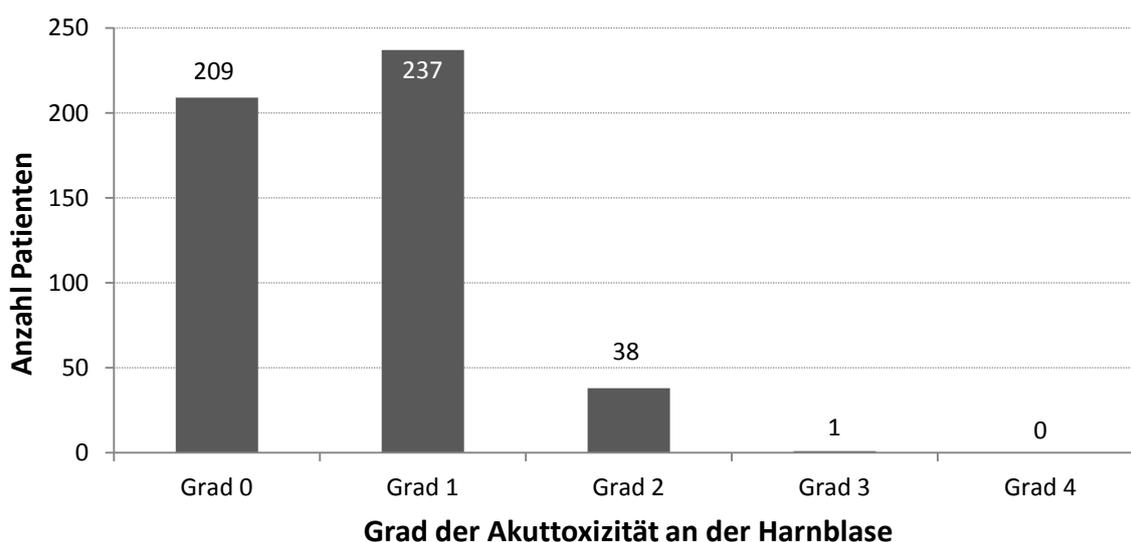


Abb. 5 Akutnebenwirkung Zystitis. Die Toxizitätsgrade wurden nach CTC bestimmt.

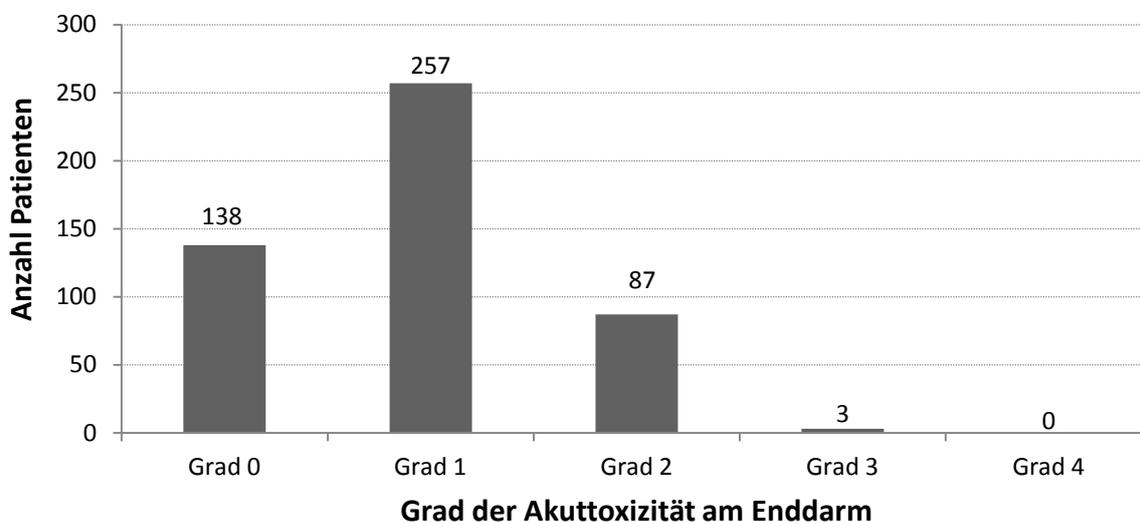


Abb. 6 Akutnebenwirkung Proktitis. Die Toxizitätsgrade wurden nach CTC bestimmt.

### 4.1.5 Spättoxizität

Nebenwirkungen der Radiatio, welche sich ab dem 90. Tag nach Beginn der strahlentherapeutischen Behandlung manifestieren, werden als Spättoxizität definiert. Ein Großteil der Patienten kann ohne Spättoxizität aus der Therapienachsorge entlassen werden. Tritt Spättoxizität auf, so handelt es sich größtenteils um Toxizität von Grad 1 oder Grad 2. Es gilt zu beachten, dass die Einteilung der Spättoxizität im Gegensatz zur Akuttoxizität bis Grad 5 (Toxizität mit Todesfolge) reicht. Bei 70 der 509 Patienten konnte die Spättoxizität nicht erfasst werden.

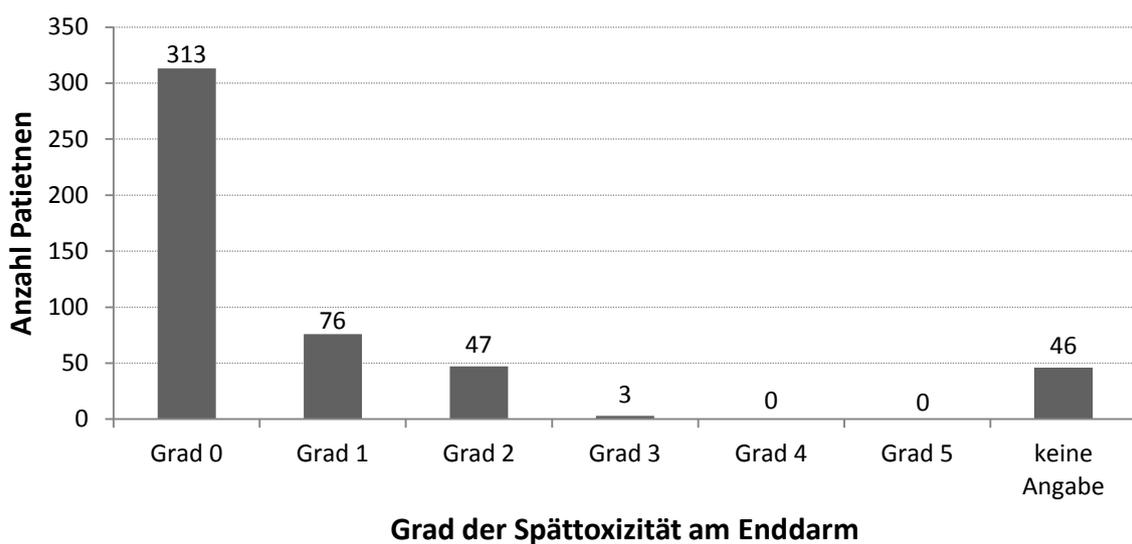


Abb. 7: Spätnebenwirkungen Proktitis. Die Toxizitätsgrade wurden nach LENT/SOMA bestimmt.

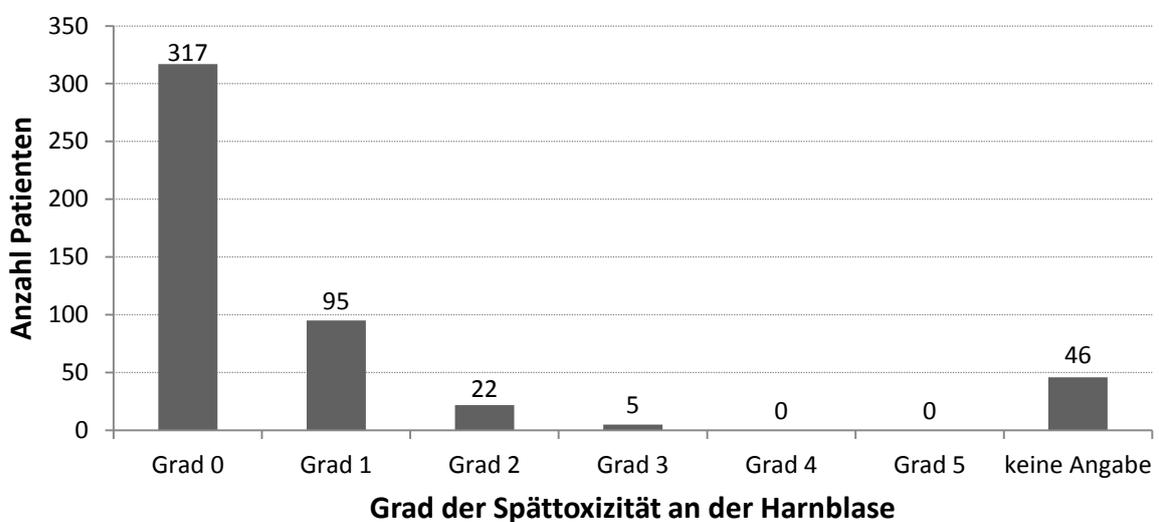


Abb. 8 Spätnebenwirkungen Zystitis. Die Toxizitätsgrade wurden nach LENT/SOMA bestimmt.

Eine Proktitis stellte sich zwischen 0 und 61 Monaten nach Therapiebeginn ein, der Mittelwert liegt hier bei 6,2 Monaten, der Median bei 0. Beschwerden im Bereich der Harnblase entwickelten die Patienten ebenfalls zwischen 0 und 61 Monaten nach Therapiebeginn; hier liegt der Mittelwert bei 12,7, der Median bei 6 Monaten.

Eine kompakte Übersicht der Toxizität zeigt Tab. 13.

**Tab. 13 Übersicht der strahlungsassoziierten Toxizität auf die Organe Enddarm und Harnblase im Akut- sowie Spätstadium. In Klammern der prozentuale Anteil am Gesamtpatientenkollektiv, gerundet auf eine Nachkommastelle. Toxizitätsgrade 4 und 5 wurden in der Untersuchung nicht manifest und daher aus Gründen der Übersicht nicht in die Tabelle aufgenommen.**

Grad der Toxizität Akut: CTC Spät: LENT/SOMA	Anzahl der Patienten (%)			
	Enddarm		Harnblase	
	Akut	Spät	Akut	Spät
0	138 (28,5)	313 (64,5)	209 (43,1)	317 (65,4)
1	257 (53,0)	76 (15,7)	237 (48,9)	95 (19,6)
2	87 (17,9)	47 (9,7)	38 (7,8)	22 (4,5)
3	3 (0,6)	3 (0,6)	1 (0,2)	5 (1,0)
Keine Angabe	-	46 (9,5)	-	46 (9,5)
	485 (100)	485 (100)	485 (100)	485 (100)

## 4.2 *TGFB1*-Keimbahn-Genetik

An genomischer DNA des zuvor beschriebenen Kollektivs von 509 Patienten mit Prostatakarzinom (Abb. 4) sollten in Bezug auf die Epidemiologie und in ausgewählten Subgruppen im Hinblick auf Radiotherapie-bedingte Toxizität die im Methodenteil aufgeführten zehn *TGFB1*-Genpolymorphismen typisiert werden. Von diesen 509 Patienten war von 505 genomische DNA verfügbar, eine Probe ließ sich nicht genotypisieren. Für die 504 genetisch analysierten Patienten sind in Tab. 14 die beobachteten Allelfrequenzen aufgeführt. Die Bestimmungsquote über alle zehn SNPs belief sich auf 97,5 %. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht als ein Maß für die Übereinstimmung zwischen den beobachteten Genotyp- und Allelfrequenzen, somit ein Kriterium für die Richtigkeit der Genotypdaten innerhalb der untersuchten Stichprobe, war bei allen zehn SNPs erfüllt (p-Werte > 0,1 entsprechend  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Darüber hinaus konnte über eine Wiederholung von 10 % der Proben (n = 46) die korrekte Bestimmung der Allele bestätigt werden. Zur externen Kontrolle der Genotypisierungsergebnisse wurde bei einer Untergruppe der Patienten (n = 84)

fünf der zehn *TGFBI*-Varianten, welche früher in anderem Zusammenhang bereits bestimmt wurden (Schirmer et al. 2011), mit meinen Daten verglichen. Dabei zeigte sich eine komplette Übereinstimmung an allen 420 Positionen.

**Tab. 14** Für die Genotypisierung ausgewählte SNPs mit eindeutiger rs-Nummer gemäß Datenbank dbSNP. <sup>1</sup>Die Angabe der Position auf Chromosom 19 ist dem aktuellen *Genome Build* GRCh37.p10 der NCBI-Datenbank entnommen. Die SNPs sind in 5'→3'-Richtung geordnet. <sup>2</sup>Beim triallelischen SNP rs6508976 sind die Allelfrequenzen für die beiden selteneren Allele angegeben.

SNP	Chromosomale Position <sup>1</sup>	Genetisches Element	Allele	MAF (%)
rs1800468	41860587	5'-Ende, -800	G>A	9,7
rs1800469	41860296	5'-Ende, -509	G>A	28,6
rs1800470	41858921	kodierend, Leu10Pro	A>G	36,2
rs1800471	41858876	kodierend, Arg25Pro	G>C	7,5
rs6508976	41854674	Intron	G>T>A	38,8 / 8,3
rs2241717	41854052	Intron	T>G	40,2
rs2278422	41845758	Intron	C>G	44,9
rs8179181	41838206	Intron	G>A	23,7
rs7254679	41833569	3'-Ende	A>G	18,0
rs10417924	41833167	3'-Ende	C>T	19,9

Für diese zehn Genpolymorphismen wurde mit Hilfe der Software HaploView das LD dargestellt. Da HaploView nur biallelische Ausprägungen berücksichtigt, wurden für die triallelische Variante jeweils für die Kombination von zwei Allelen paarweise Vergleiche mit den anderen neun Genvarianten angestellt (Abb. 9).

Bei der Betrachtung der beiden häufigen Allele der triallelischen Variante fällt ein hochgradiges LD mit dem intronischen SNP rs2241717 auf. Dies bedeutet, dass das häufigste Allel des triallelischen SNPs rs6508976 in der vorliegenden Studienpopulation fast immer gemeinsam mit dem häufigen Allel von rs2241717 vererbt wurde; entsprechendes gilt für das zweithäufige Allel von rs6508976 und das seltene Allel von rs2241717. Bei Betrachtung der beiden häufigen Allele von rs6508976 besteht auch ein deutliches LD mit dem SNP an Position -509 im Promotorbereich dieses Gens (rs1800469) sowie mit dem Aminosäureaustausch Leu10Pro in der 5'-UTR (rs1800470). Dementsprechend zeigt sich auch ein hohes LD der beiden letztgenannten SNPs.

Betrachtet man beim triallelischen SNP rs6508976 das LD für das häufigste und das seltenste Allel, erkennt man kein LD mit dem oben genannten SNP rs2241717. Hingegen liegt eine starke Beziehung zu dem Aminosäureaustausch Arg25Pro (rs1800471) und sogar ein perfektes LD von 100% mit Leu10Pro (rs1800470) vor. Das seltene Allel von rs6508976 ist hier zu 100% mit dem selteneren Allel von rs1800470 sowie zu 94% mit dem selteneren Allel von rs1800471 kombiniert. Interessanterweise besteht hier praktisch keine gemeinsame Vererbung mit dem Promotor-SNP rs1800469.

Bei Betrachtung der beiden seltenen Allele von rs6508976 ist ein hohes LD mit rs2241717 und Arg25Pro, jedoch nicht mit Leu10Pro oder dem Promotor-SNP rs1800469 zu verzeichnen.

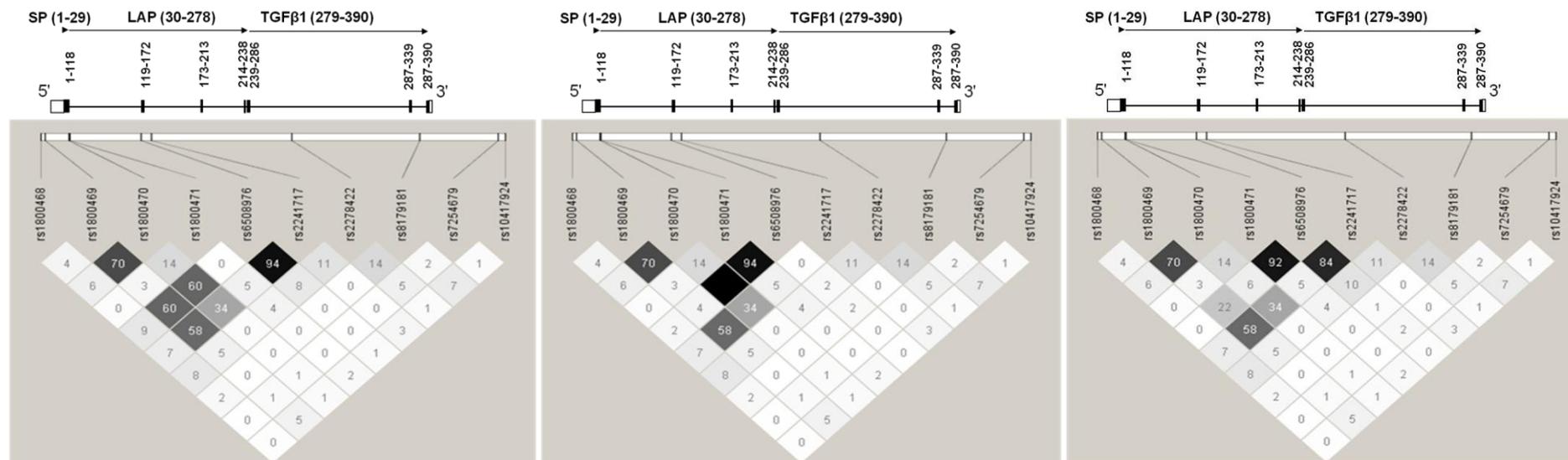


Abb. 9 LD der zehn untersuchten *TGFBI*-SNPs. Beim trialleleischen SNP kamen die Allele 1, 2 und 3 mit 52,9, 38,8 und 8,3% vor. Der LD-Plot links zeigt die Situation für Allel 1+2 an dieser Position, derjenige in der Mitte entsprechend für 1+3 und der rechte für 2+3. Diese Daten beruhen auf der Studienkohorte der 504 genetisch analysierten Patienten mit Prostatakarzinom. Zur Beschreibung des LD-Plots siehe Abb. 1 im Methodenteil.

### 4.2.1 Haplotypen

Das LD zwischen den zehn analysierten *TGFBI*-Genvarianten bildete auch die Grundlage für die Berechnung von Haplotypen. Dabei wurden diejenigen SNPs berücksichtigt, die paarweise ein substanzielles LD ( $r^2 > 0,3$ ) aufweisen. Dies war für die SNPs rs1800469, rs1800470, rs1800471, rs6508976 und rs2241717 der Fall (bei rs6508976 in unterschiedlicher Ausprägung bei den drei biallelischen Kombinationen). Dabei wurden fünf Haplotypen mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % ermittelt (Tab. 15). Daneben wurden noch sieben weitere Haplotypen gefunden, die jedoch zusammen nur 0,6 % ausmachten.

**Tab. 15 Darstellung der errechneten Haplotypen. Grau hinterlegt sind die Abweichungen der Allele vom Referenz-Haplotyp H1. Die Berechnung erfolgte mit der Software PHASE (Version 2.1).**

Haplotyp	rs1800469	rs1800470	rs1800471	rs6508976	rs2241717	Häufigkeit (%)
H1	G	A	G	G	T	52,0
H2	A	G	G	T	G	28,3
H3	G	A	G	T	G	10,7
H4	G	G	C	A	T	7,5
H5	G	A	G	G	G	1,0

Die genannten Haplotypen wurden – wie die singulären SNPs – auf Assoziationen mit Krankheitsprädisposition (Epidemiologie) und Radiotherapie-bedingter Toxizität geprüft.

### 4.3 Epidemiologie des Prostatakarzinoms und *TGFBI*-Genetik

Die Größe der vorliegenden Stichprobe erlaubte für den Aspekt der Epidemiologie eine Unterteilung in zwei Kohorten entsprechend des Datums der Erstdiagnose. Dabei umfasst die erste Kohorte Patienten, bei welchen ein Prostatakarzinom erstmals zwischen März 2001 und Dezember 2005 ( $n = 248$ ) diagnostiziert wurde und die zweite Kohorte Patienten im Zeitraum von Januar 2006 bis September 2010 ( $n = 261$ ). An genomischer DNA aus venösem Blut dieser Patienten wurden die genannten zehn Varianten im Genbereich von *TGFBI* bestimmt. Abgesehen von rs2278422 lagen für die übrigen neun dieser Genpolymorphismen Daten von 257 gesunden Probanden bereits vor, welche wie die Patienten Kaukasier waren. Die Kohorte der gesunden Probanden wurde ebenfalls in zwei Untergruppen ( $n = 129$  bzw.  $128$ ) aufgeteilt, die jeweils als Kontrollgruppe für die erste bzw. zweite Patientenkohorte dienten. Durch Vergleich von Genotyp-Frequenzen zwischen Gesunden und Patienten sollte geprüft werden, ob diese *TGFBI*-Genvarianten im Hinblick auf die Ätiologie eines Prostatakarzinoms epidemiologisch bedeutsam sind (Tab. 16).

**Tab. 16** Assoziationen von *TGFBI*-Polymorphismen zur Epidemiologie des Prostatakarzinoms. Zunächst wurde auf eine lineare Tendenz zwischen den drei Genotypen hinsichtlich des Risikos der Entwicklung eines Prostatakarzinoms getestet (entsprechender p-Wert jeweils in der Zeile des Wildtyps angegeben) nach Mantel-Haenszel-Test (modifizierter  $\chi^2$ -Test). Dann wurden für den heterozygoten (jeweils Zeile 2) und homozygoten (Zeile 3) Variantenallel-Status sowie die Kombination aus beiden (Zeile 4) die relativen Risiken (RR) mit dem 95%-Konfidenzintervall (95% CI) jeweils in Bezug zum homozygoten Wildtypallel-Status (bei letzterem RR auf 1,00 gesetzt) für jeden SNP berechnet (bei der triallelischen Variante rs6508976 die beiden selteneren Allele jeweils auf das Wildtypallel bezogen). Der dem RR jeweils zugehörige p-Wert wurde mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher ermittelt und steht in der entsprechenden Zeile. Diese Analysen wurden getrennt für beide Kohorten durchgeführt. Wurde eine Genotyp-Konstellation nicht vorgefunden, war die Berechnung des RR nicht anwendbar (als „n.a.“ bezeichnet). Assoziationen mit einem p-Wert < 0,05 sind in Fettschrift hervorgehoben.

SNP	Genotyp	Kohorte 1			Kohorte 2		
		RR	95% CI	p	RR	95% CI	p
rs1800468	GG	1,00		0,6	1,00		0,6
	GA	0,90	0,58–1,39	0,7	1,24	0,76–2,01	0,5
	AA	0,52	0,03–8,20	1,0	0,5	0,07–3,62	0,6
	GA+AA	0,89	0,58–1,36	0,6	1,18	0,74–1,87	0,6
rs1800469	CC	1,00		0,5	1,00		0,08
	CT	1,10	0,83–1,34	0,7	1,05	0,81–1,37	0,7
	TT	1,27	0,64–2,52	0,6	0,43	0,23–0,80	<b>0,01</b>
	CT+TT	1,06	0,86–1,31	0,6	0,93	0,75–1,16	0,6
rs1800470 (Leu10Pro)	TT	1,00		1,0	1,00		0,3
	TC	1,01	0,82–1,24	1,0	1,18	0,92–1,50	0,2
	CC	1,00	0,61–1,63	1,0	0,86	0,41–1,02	0,07
	TC+CC	1,01	0,85–1,19	1,0	1,05	0,86–1,24	0,7
rs1800471 (Arg25Pro)	GG	1,00		0,2	1,00		0,2
	GC	0,81	0,48–1,37	0,4	1,44	0,83–2,48	0,2
	CC	1,02	0,99–1,04	0,1	n.a.		
	GC+CC	0,75	0,45–1,24	0,3	1,44	0,83–2,48	0,2
rs6508976	CC	1,00		0,4	1,00		0,2
	CA	1,08	0,86–1,34	0,6	1,08	0,86–1,36	0,5
	AA	1,12	0,70–1,92	0,6	1,38	0,87–2,18	0,2
	CA+AA	1,07	0,90–1,26	0,5	0,99	0,83–1,16	0,9
	CC	1,00		0,9	1,00		0,3
	CT	1,42	0,62–3,29	0,5	3,44	1,58–7,52	<b>0,001</b>
	TT	0,50	0,05–5,49	0,6	n.a.		
CT+TT	1,12	0,57–2,22	0,8	1,48	0,73–3,01	0,3	
rs2241717	TT	1,00		0,6	1,00		0,09
	TG	1,05	0,86–1,27	0,7	1,05	0,85–1,30	0,7
	GG	1,10	0,73–1,64	0,8	0,62	0,40–0,94	<b>0,04</b>
	TG+GG	1,04	0,89–1,21	0,6	0,96	0,82–1,13	0,7
rs8179181	CC	1,00		0,5	1,00		0,4
	CT	1,11	0,84–1,47	0,5	0,88	0,69–1,14	0,4
	TT	1,14	0,44–2,92	1,0	0,84	0,32–2,17	0,8
	CT+TT	1,10	0,85–1,42	0,5	0,89	0,70–1,12	0,4
rs7254679	TT	1,00		<b>0,01</b>	1,00		0,2
	TC	1,63	1,06–2,48	<b>0,02</b>	1,63	1,01–2,65	<b>0,04</b>
	CC	2,24	0,76–6,54	0,1	0,62	0,17–2,25	0,5
	TC+TT	1,63	1,11–2,38	<b>0,01</b>	1,45	0,94–2,24	0,09
rs10417924	GG	1,00		0,5	1,00		0,2
	GA	1,00	0,73–1,35	1,0	0,83	0,62–1,13	0,3
	AA	0,63	0,24–1,62	0,3	0,60	0,22–1,63	0,4
	GA+AA	0,96	0,72–1,26	0,8	0,83	0,63–1,09	0,2

Von den neun im Hinblick auf die Epidemiologie eines Prostatakarzinoms untersuchten *TGFBI*-Genvarianten konnte ein reproduzierbarer Einfluss näherungsweise für rs7254679 gezeigt werden. Dabei war das Vorliegen des heterozygoten Genotyps im Vergleich zum Wildtyp in beiden Kohorten mit einem relativen Risiko von 1,63 verbunden. Dies entsprach in beiden Fällen einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  (man beachte, dass für die beiden Patientenkohorten jeweils vollständig unterschiedliche Kollektive Gesunder als Kontrollen verwendet wurden). Während in der ersten Patientenkohorte das RR für den homozygoten Variantenallel-Status noch höher war (RR von 2,24), war dies in der zweiten Kohorte nicht der Fall (0,64). Allerdings gab es in der zweiten Kohorte nur fünf Patienten mit diesem Genotyp, in der ersten hingegen 15. Daher ist insbesondere der Befund der zweiten Kohorte an dieser Stelle vorsichtig zu bewerten. Wurde ein dominanter Alleleffekt angenommen, ließ sich die Assoziation aus der ersten Kohorte in der zweiten näherungsweise bestätigen mit einem RR von 1,45 ( $p = 0,09$  nach zweiseitigem Fisher-Test). Wurde dieser Test einseitig angewandt (unter der durch die erste Kohorte definierten Hypothese einer Risikoerhöhung durch das Variantenallel), ergab sich hier ein Signifikanzniveau von 0,05.

Tab. 17 zeigt für den SNP rs7254679 die absoluten Zahlen der untersuchten Kollektive. Im Gesamtkollektiv ergab sich mit dem Mantel-Haenszel-Test, welcher einen linearen Trend in Abhängigkeit der Zahl der Variantenallele annimmt, eine statistische Assoziation mit  $p = 0,008$ . Dabei fand sich der Genotyp mit dem homozygoten Wildtyp-Allel (TT) bei 79% der Gesunden bzw. 68% der Erkrankten. Die entsprechenden Anteile für den CT-Genotyp beliefen sich auf 17% bzw. 28% und für den CC-Genotyp auf 4% in beiden Gruppen. Bei Anwendung des einseitigen exakten Tests nach Fisher auf das Gesamtkollektiv zeigte sich unter Annahme eines dominanten Effektes für das C-Allel eine Assoziation mit  $p = 0,001$  mit einem RR von 1,53 (95%-CI 1,15 – 2,04).

**Tab. 17 Genotyp-Verteilung von rs7254679 bei Gesunden und Patienten. Es sind die jeweiligen Zahlen getrennt für die beiden oben verglichenen Kohorten sowie für das Gesamtkollektiv aufgelistet. Der Unterschied zur Gesamtzahl aller Patienten ( $n = 509$ ) bzw. aller gesunder Vergleichspersonen ( $n = 257$ ) ist dadurch bedingt, dass die Genotypisierung für rs7254679 nicht in allen Fällen gelang.**

rs7254679	Kohorte 1		Kohorte 2		Gesamtkollektiv	
	Gesunde	Patienten	Gesunde	Patienten	Gesunde	Patienten
<i>TT</i>	89	141	89	183	178	324
<i>TC</i>	22	67	17	65	39	132
<i>CC</i>	4	15	4	5	8	20
Summe	115	223	110	253	225	476

Im Weiteren wurde für die Assoziation des SNPs rs7254679 mit dem generellen Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, eine Subgruppenanalyse für einzelne klinisch-prognostische Parameter vorgenommen. Dazu wurde das Gesamtkollektiv von 476 Patienten entsprechend des *Gleason Scores* ( $< 7$  versus  $\geq 7$ ), des PSA-Wertes zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ( $< 10 \mu\text{g/l}$  versus  $\geq 10 \mu\text{g/l}$ ), des T-Status ( $< 2$  versus  $\geq 3$ ), des N-Status (negativ versus positiv) sowie das Vorliegen von Zweittumoren (nein versus ja) untersucht. Auf diese fünf dichotomen Parameter wurde ein möglicher Einfluss des SNP rs7254679 unter der Annahme eines dominanten Effektes des Variantenallels, d.h. *TT* versus *TC+CC*, getestet. Während die Prostatakarzinom-bezogenen Parameter keinerlei Beziehung zu diesem SNP hatten, war dieser mit dem Vorliegen von Zweittumoren verbunden. Das relative Risiko für Patienten mit Prostatakarzinom, zusätzlich an einem Zweittumor zu leiden, war für die kombinierte Genotyp-Konstellation von *TC+CC* gegenüber dem *TT*-Wildtyp 1,49 (1,06 – 2,08) ( $p = 0,03$  nach einseitigem Fisher's exaktem Test). Wurden die 51 Patienten mit Zweittumoren mit der Gesamtkohorte der Gesunden ( $n = 225$ ) verglichen, belief sich das entsprechende RR für die Genotyp-Kombination aus *TC+CC* gegenüber *TT* auf 2,16 (1,45 – 3,21,  $p = 0,001$ ).

#### 4.4 *TGFBI*-Keimbahngenetik und Radiotherapie-bedingte Toxizität

Für die Überprüfung einer möglichen Assoziation zwischen *TGFBI*-Varianten mit Radiotherapie-assoziiertes Toxizität wurden diejenigen Patienten betrachtet, die eine primäre Strahlenbehandlung mit einer Gesamtdosis von  $\Sigma 64 - 72$  Gy erhielten (siehe Subgruppen 2, 3, 4, 6 und 7 in Flussdiagramm in Abb. 4). Auf diese Weise war eine vergleichsweise homogene Behandlungsgruppe hinsichtlich der Untersuchung genetischer Prädiktoren der radiogenen Toxizität gegeben. Das Patientenkollektiv für diese Untersuchung bestand demnach aus 247 Männern. Von diesen waren Daten während der Radiotherapie und somit auch über etwaig aufgetretene Akuttoxizität verfügbar. Von fünf dieser Patienten lag keine DNA vor (einer aus Subgruppe 3 in obigem Flussdiagramm, drei aus Subgruppe 4 und einer aus Subgruppe 7); bei einer Probe (aus Subgruppe 4) bestanden Zweifel an deren Identität. Somit belief sich der Stichprobenumfang für die Assoziationsanalysen zwischen Akuttoxizität und *TGFBI*-Keimbahngenetik auf 241. Spättoxizität konnte in 24 Fällen nicht eruiert werden; demzufolge beziehen sich die entsprechenden Analysen hier auf eine Fallzahl von 217 Patienten.

**Tab. 18 Toxizitätsverteilung der 241 Patienten für die Genotyp-Assoziationsanalysen. Der Grad der Toxizität wurde bestimmt nach CTC (akut) bzw. LENT-SOMA (spät). Toxizitätsgrade 4 und 5 (letzteres nur bei LENT-SOMA) wurden in der vorliegenden Stichprobe nicht beobachtet. Bei 24 Patienten konnte die Spättoxizität nicht bewertet werden (z.B. Nachbeobachtungszeit zu kurz, Patienten nicht zur Nachsorge erschienen).**

Grad der Toxizität	Anzahl der Patienten (%)			
	Enddarm		Harnblase	
	Akut	Spät	Akut	Spät
0	66 (27,4)	150 (62,2)	81 (33,6)	151 (62,6)
1	129 (53,5)	38 (15,8)	139 (57,7)	54 (22,4)
2	45 (18,7)	27 (11,2)	20 (8,3)	8 (3,3)
3	1 (0,4)	2 (0,8)	1 (0,4)	4 (1,7)
nicht verfügbar	0	24 (10,0)	0	24 (10,0)

Diese Toxizitätsdaten (akut n = 241, spät n = 217) wurden nun auf Assoziationen mit den zehn *TGFBI*-Genpolymorphismen (Tab. 14) geprüft. Dabei wurden die Toxizitätsgrade der Akut- und Spättoxizität dichotomisiert (< Grad 2 versus  $\geq$  Grad 2). Die Ergebnisse sind in Tab. 19 aufgelistet.

In der Auswertung der Akuttoxizität zeigten sich für die SNPs rs1800469 und rs1800470 ähnliche Assoziationen, die jedoch keine unabhängige Beobachtung darstellen in Anbetracht des hohen LD ( $r^2 = 0,70$ , Abb. 9) zwischen diesen beiden genetischen Markern. Der stärkere Effekt zeigte sich dabei für rs1800470 (Leu10Pro). Heterozygote Pro10-Träger wiesen – im Vergleich zum homozygoten Wildtyp-Allel (Leu10) – ein relatives Risiko von 0,63 (95%-Konfidenzintervall 0,43 – 0,93) in Bezug auf Akuttoxizität  $\geq$  Grad 2 auf. Das bedeutet, dass das Vorliegen eines Pro10-Allels einen schützenden Effekt hatte. Jedoch konnte kein entsprechender Effekt bei Homozygotie für Pro10 nachgewiesen werden. Dabei gilt es jedoch zu bedenken, dass nur zehn Personen mit Akuttoxizität  $\geq$  Grad 2 diesen Genotyp aufwiesen. Bei kombinierter Betrachtung unter Annahme eines dominanten Alleleffekts von Pro10 war ebenfalls eine signifikante Risikominderung nachweisbar (RR 0,74,  $p = 0,03$  nach zweiseitigem Fisher's exaktem Test). Die für die beiden häufigen Allele der triallelischen Variante rs6508976 beobachteten Assoziationen mit  $p = 0,05$  spiegeln das LD mit der Leu10Pro-Variante wider (Abb. 9, links).

Der SNP rs1800471 zeigte für heterozygote Träger der Pro25-Variante hinsichtlich der Entwicklung einer Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 ein RR von 2,23 (1,10 – 4,55) im Vergleich zu Personen mit homozygotem Arg25-Wildtyp-Allel ( $p = 0,03$ , zweiseitiger  $\chi^2$ -Test nach Pearson). Bei Anwendung des zweiseitigen exakten Tests nach Fisher wurde das nominale Signifikanzniveau knapp verfehlt ( $p = 0,06$ ); unter Berücksichtigung bereits publizierter Vorbefunde mit einem höheren Radiotoxizitätsrisiko für Pro25 (Schirmer et al. 2012) konnte

der Fisher-Test einseitig mit einer Signifikanzschwelle von 0,05 angewandt werden, welche dann mit  $p = 0,03$  auch unterschritten wurde. Das Pro25-Allel trat in der vorliegenden Kohorte von Patienten mit Prostatakarzinom mit einer MAF von 7,5 % auf (Tab. 14); in der Subgruppe für die Toxizitäts-Genotyp-Analysen mit 241 Patienten hatte keiner zwei Pro25-Allele.

Mit der Spättoxizität war mit rs10417924 noch ein zweiter SNP assoziiert. Patienten mit dem A-Variantenallel (MAF 20 % in der Studienpopulation, Tab. 14) schienen besser geschützt. In einem Modell mit angenommenem dominanten Effekt dieses Allels belief sich das RR auf 0,50 (0,20 – 0,90,  $p = 0,02$  nach zweiseitigem exaktem Test nach Fisher), verglichen mit dem GG-Genotyp. Das heißt, wenn das A-Allel vorhanden war, war das Risiko für eine Spättoxizität der Radiotherapie nur halb so hoch.

**Tab. 19** Assoziationen von *TGFBI*-Polymorphismen zur Akut- und Spättoxizität bei Strahlentherapie des Prostatakarzinoms. Zunächst wurde auf eine lineare Tendenz zwischen den drei Genotypen hinsichtlich des Risikos der Entwicklung von Toxizität getestet (entsprechender p-Wert jeweils in der Zeile des Wildtyps angegeben) nach Mantel-Haenszel-Test (modifizierter  $\chi^2$ -Test). Dann wurden für den heterozygoten (jeweils Zeile 2) und homozygoten (Zeile 3) Variantenallel-Status sowie die Kombination aus beiden (Zeile 4) die relativen Risiken (RR) mit dem 95%-Konfidenzintervall (95% CI) jeweils in Bezug zum homozygoten Wildtypallel-Status (bei letzterem RR auf 1,00 gesetzt) für jeden SNP berechnet (bei der triallelischen Variante rs6508976 die beiden selteneren Allele jeweils auf das Wildtypallel bezogen). Der dem RR jeweils zugehörige p-Wert wurde mit dem zweiseitigen exakten Test nach Fisher ermittelt und steht in der entsprechenden Zeile. Diese Analysen wurden gemeinsam für beide Kohorten durchgeführt. Wurde eine Genotyp-Konstellation nicht vorgefunden, war die Berechnung des RR nicht anwendbar (als „n.a.“ bezeichnet). Assoziationen mit einem p-Wert < 0,05 sind in Fettschrift hervorgehoben. Alle p-Werte beziehen sich auf zweiseitige Signifikanztestung.

SNP	Genotyp	Maximale Akuttoxizität $\geq$ Grad 2			Maximale Spättoxizität $\geq$ Grad 2		
		RR	95% CI	p	RR	95% CI	p
rs1800468	GG	1,00		0,4	1,00		0,5
	GA	1,25	0,70–2,34	0,4	0,77	0,32–1,85	0,6
	AA	1,62	0,15–17,54	0,6	8,92	0,83–100	0,09
	GA+AA	1,29	0,73–2,30	0,4	1,00	0,48–2,09	1,0
rs1800469	CC	1,00		0,1	1,00		0,8
	CT	0,66	0,43–1,01	<b>0,04</b>	0,85	0,54–1,35	0,6
	TT	0,77	0,33–1,80	0,6	1,06	0,39–2,90	1,0
	CT+TT	0,72	0,51–1,02	<b>0,05</b>	0,90	0,61–1,32	0,6
rs1800470 (Leu10Pro)	TT	1,00		0,2	1,00		0,4
	TC	0,63	0,43–0,93	<b>0,009</b>	0,87	0,58–1,31	0,6
	CC	0,94	0,50–1,80	1,0	1,63	0,82–3,17	0,2
	TC+CC	0,74	0,56–0,99	<b>0,03</b>	0,99	0,73–1,33	1,0
rs1800471 (Arg25Pro)	GG	1,00		0,5	1,00		<b>0,03</b>
	GC	1,26	0,62–2,58	0,5	2,23	1,10–4,55	0,06
	CC	n.a.			n.a.		
	GC+CC	1,26	0,62–2,58	0,5	2,23	1,10–4,55	0,06
rs6508976	CC	1,00		<b>0,05</b>	1,00		0,6
	CA	0,69	0,43–1,10	0,1	1,06	0,64–1,74	0,8
	AA	0,49	0,18–1,32	0,2	1,28	0,48–3,38	0,7
	CA+AA	0,69	0,47–1,03	<b>0,05</b>	1,08	0,73–1,61	0,8
	CC	1,00		0,5	1,00		0,4
	CT	0,78	0,27–2,24	0,8	1,86	0,66–5,21	0,3
	CT+TT	0,73	0,26–2,08	0,8	1,72	0,62–4,76	0,3
rs2241717	TT	1,00		0,8	1,00		0,5
	TG	0,87	0,64–1,18	0,4	0,93	0,67–1,31	0,7
	GG	0,98	0,56–1,73	1,0	0,77	0,34–1,73	0,6
	TG+GG	0,92	0,73–1,15	0,5	0,93	0,70–1,22	0,6
rs2278422	GG	1,00		0,7	1,00		0,2
	GC	1,03	0,77–1,36	1,0	1,09	0,78–1,52	0,7
	CC	1,09	0,70–1,69	0,8	1,36	0,87–2,14	0,2
	GC+CC	1,03	0,85–1,26	0,8	1,11	0,89–1,38	0,4
rs8179181	CC	1,00		0,4	1,00		0,7
	CT	0,77	0,49–1,18	0,3	1,17	0,77–1,78	0,5
	TT	1,14	0,31–4,22	1,0	0,75	0,10–5,78	1,0
	CT+TT	0,81	0,54–1,20	0,3	1,14	0,76–1,69	0,6
rs7254679	TT	1,00		0,4	1,00		1,0
	TC	0,72	0,41–1,28	0,3	1,08	0,61–1,92	0,8
	CC	0,89	0,26–3,07	1,0	0,90	0,21–3,82	1,0
	TC+CC	0,77	0,47–1,25	0,3	1,05	0,63–1,74	0,8
rs10417924	GG	1,00		0,6	1,00		<b>0,05</b>
	GA	0,76	0,47–1,22	0,3	0,43	0,20–0,90	<b>0,01</b>
	AA	1,21	0,39–3,73	0,7	0,87	0,20–3,92	1,0
	GA+AA	0,83	0,55–1,25	0,4	0,50	0,27–0,95	<b>0,02</b>

Die Befunde für Leu10Pro bezüglich Akuttoxizität und für Arg25Pro sowie rs10417924 hinsichtlich Spättoxizität werden nachfolgend eingehender analysiert. Es wird geprüft, ob die beobachteten Assoziationen nicht etwa durch andere Faktoren (z.B. Unterschiede in der kumulativen Strahlendosis, Alter der Patienten) bedingt waren. Dann ist von Interesse, ob die relativen Risiken beide dokumentierte Endorgane (Blase und Rektum) in gleicher Weise betreffen oder nicht. Abschließend wird untersucht, ob die kombinierte Betrachtung unabhängiger Genotypen (wie im Falle von Arg25Pro und rs10417924) oder die allelische Kombination von SNPs in hohem gegenseitigen LD (Haplotypen) die Risikoprädiktion gegenüber der singulären SNP-Analyse verbessern.

#### 4.4.1 Adjustierung auf potenzielle Störvariablen

Als potenzielle Variablen, die sich auf die Radiotherapie-assoziierte Toxizität auswirken können und im Studienkollektiv dokumentiert waren, wurden in Erwägung gezogen: Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose, BMI, kumulative Strahlendosis, Lymphabflussgebiet im Bestrahlungsfeld enthalten sowie ob jemals eine antiandrogene Therapie verabreicht wurde. In der univariaten logistischen Regressionsanalyse mit jedem dieser Parameter als unabhängige und der maximalen Akuttoxizität  $\geq$  Grad 2 als abhängiger Variablen lag der p-Wert eines statistischen Zusammenhanges in allen Fällen  $> 0,5$ . Damit schieden diese Faktoren als mögliche *Confounder* für den Genotyp-Effekt von Leu10Pro aus.

In Bezug auf die maximale Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 war ein höheres Alter bei Stellung der Erstdiagnose eines Prostatakarzinoms mit einem leicht erhöhten, jedoch nicht statistisch signifikanten Risiko verbunden ( $p = 0,14$  nach binärer univariater logistischer Regressionsanalyse). Die anderen zuvor genannten vier potenziellen Einschlussfaktoren wirkten sich jedoch nicht aus ( $p \geq 0,5$ ). Demzufolge wurden die Assoziationen für rs1800471 und für rs10417924 auf das Alter der Patienten in einem binären logistischen Regressionsmodell adjustiert. Der Effekt des Pro25-Variantenallels von rs1800471 wurde durch Berücksichtigung des Alters nicht beeinflusst ( $p_{\text{adj}} = 0,02$  einseitig getestet auf Basis der Befunde einer Vorarbeit, siehe (Schirmer et al. 2012)). Ebenso blieb die Assoziation von rs10417924 auf die maximale Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 durch Einschluss des Alters in das Rechenmodell unverändert ( $p_{\text{adj}} = 0,02$ , zweiseitig getestet).

#### 4.4.2 Subanalysen nach Lokalisation der Toxizitäten

Die zuvor beschriebenen Assoziationen beziehen sich auf die kombinierte Betrachtung von Proktitis und Zystitis, wobei der jeweils höchste beobachtete Toxizitätsgrad in die Auswertung einging. Nun wurde eine separate Analyse für die beiden Organe vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass der Effekt der Leu10Pro-Variante nahezu ausschließlich die Proktitis betraf (Abb. 10). Patienten mit Heterozygotie oder Homozygotie für Pro10 hatten verglichen mit Leu10/Leu10 ein auf 0,72 (0,52 – 1,01) reduziertes Risiko. Wie die kombinierte Akuttoxizität wurden auch die beiden einzelnen, nach  $< \text{Grad } 2$  und  $\geq \text{Grad } 2$  dichotomisierten akuten Organtoxizitäten nicht durch die im vorigen Kapitel beschriebenen potenziellen Störvariablen beeinflusst.

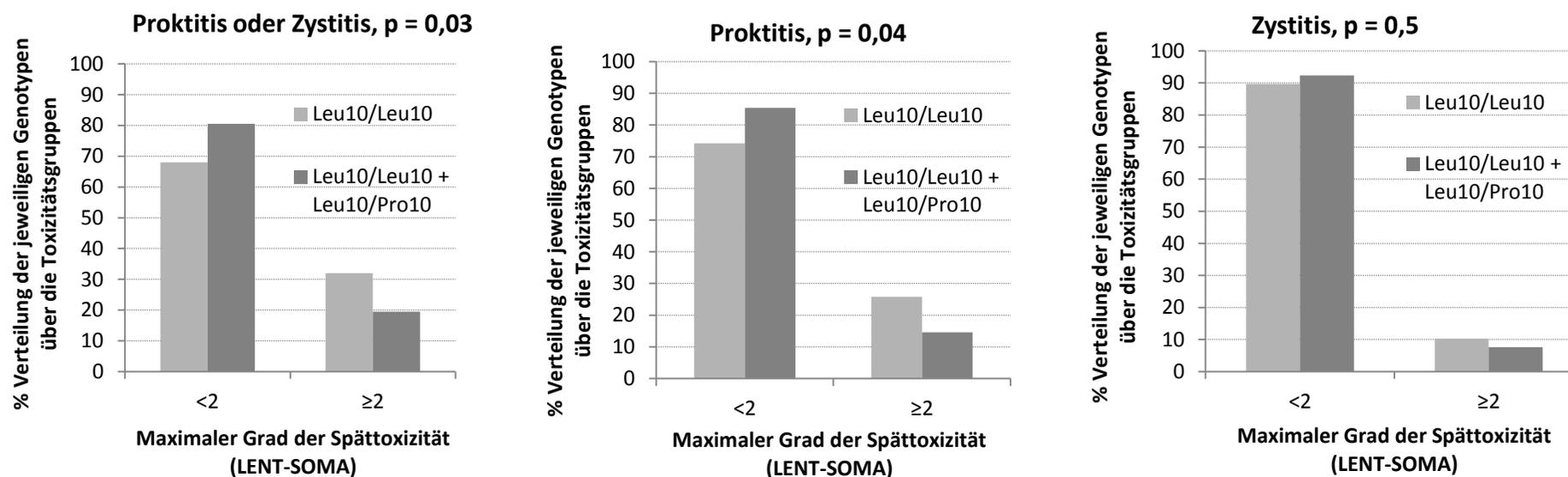


Abb. 10 Prozentuale Verteilung der Genotypen von rs1800470 in Bezug auf die Akuttoxizität. Das linke Bild zeigt die kombinierte Betrachtung von Akuttoxizität von Enddarm und Harnblase, das mittlere isoliert für Enddarm, das rechte für Harnblase. Die hellgrauen Säulen entsprechen dem Leu10/Leu10-Genotyp, die dunkelgrauen der Kombination aus Leu10/Pro10 und Pro10/Pro10. Dabei ist für jede der beiden Genotypkonstellationen die Verteilung auf die einzelnen Toxizitätsgruppen veranschaulicht; die Addition der Säulen derselben Farbe in einem Bild ergibt somit jeweils 100%.

Die durch Arg25Pro modifizierte Spättoxizität beruhte vornehmlich auf einer Beeinflussung des Zystitis-Risikos: Träger des Pro25-Allels (in der Patientenstichprobe nur heterozygot vorhanden) wiesen ein um den Faktor 2,85 (1,18 – 6,90) höheres Risiko als Individuen mit Arg25/Arg25 auf (Abb. 11).

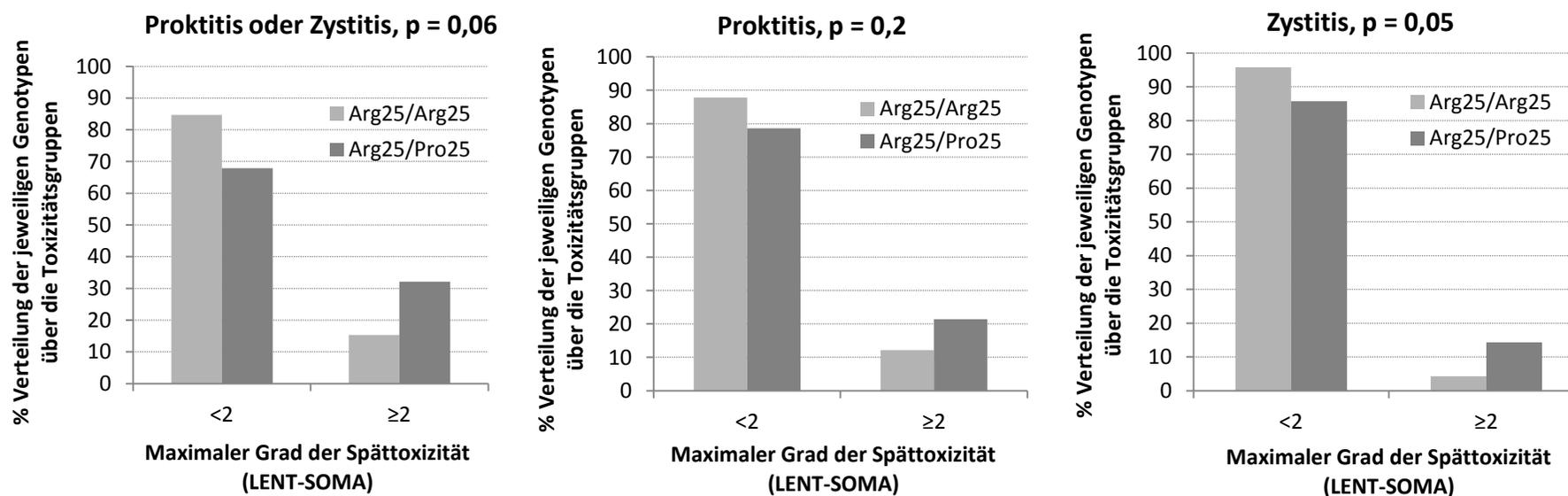


Abb. 11 Prozentuale Verteilung der Genotypen von rs1800471 in Bezug auf die Spättoxizität. Die weiteren Informationen sind gemäß den Definitionen von Abb. 10 zu verstehen.

Der zweite, mit der Spättoxizität verbundene Genpolymorphismus (rs10417924) wirkte sich auf die Proktitis, nicht auf die Zystitis aus (Abb. 12). Bei Patienten mit einem oder zwei Variantenallelen an dieser Stelle war das relative Risiko für eine chronische Proktitis  $\geq$  Grad 2 um mehr als die Hälfte auf 0,42 (0,18 – 0,94) gegenüber dem Vorliegen von zwei Wildtyp-Allelen reduziert.

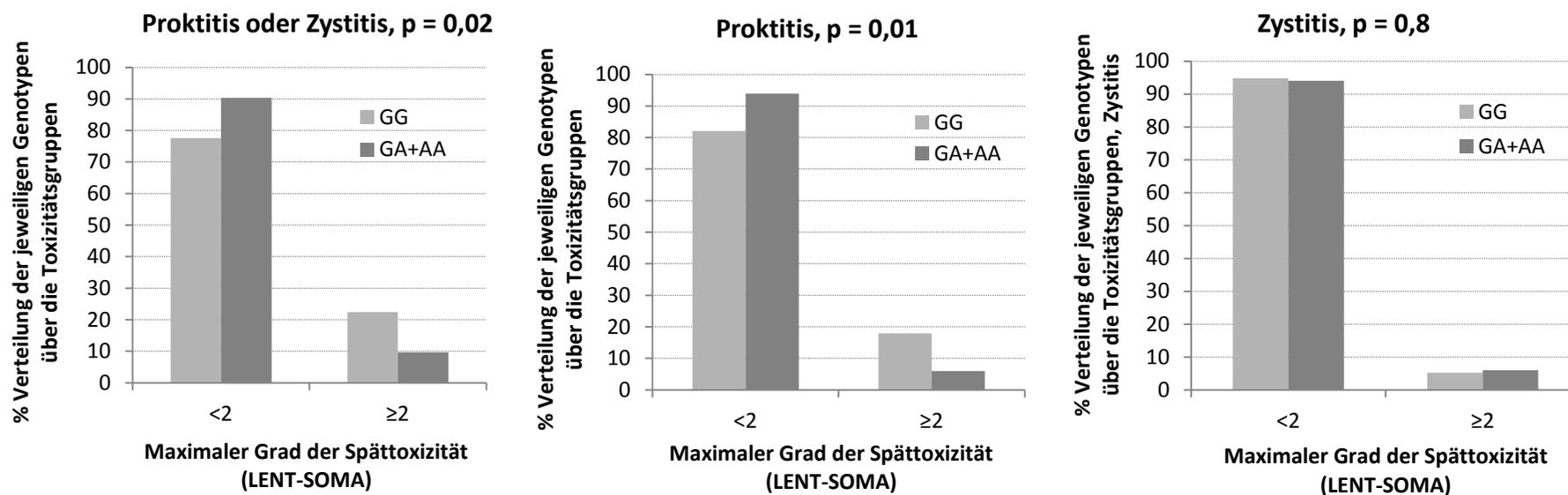


Abb. 12 Prozentuale Verteilung der Genotypen von rs10417924 in Bezug auf die Spättoxizität. Die weiteren Informationen sind gemäß den Definitionen von Abb. 10 zu verstehen.

Da sich die fünf in Kap. 4.4.1 beschriebenen potenziellen Einflussfaktoren auf die Untergruppen der chronischen Proktitis und Zystitis nicht auswirkten (alle  $p > 0,2$ ), erfolgte hier keine Adjustierung auf diese Variablen.

### 4.4.3 Betrachtung in Abhängigkeit von den einzelnen Toxizitätsgraden

Bislang wurden die Genotyp-Phänotyp-Analysen mit den Toxizitäten als dichotomisierte Variable durchgeführt ( $< \text{Grad } 2$  und  $\geq \text{Grad } 2$ ), wobei der maximal beobachtete Grad der rektalen und vesikalen Toxizität zu Grund gelegt wurde. Durch die Dichotomisierung konnten relative Risiken bzw. *Odds ratios* berechnet werden. Nun sollte geprüft werden, ob die oben beschriebenen Assoziationen auch bei Betrachtung der singulären Toxizitätsausprägungen (Grad 0 – 4) bestehen.

Mit zunehmender maximaler Akuttoxizität (gewertet wurde der jeweils höhere Wert von Blase oder Rektum) kam das Pro10-Allel seltener vor, wobei – wie oben unter Annahme eines dominanten Alleleffekts – das heterozygote oder homozygote Vorkommen kombiniert betrachtet wurde (Tab. 19). Dieser Zusammenhang mit der ordinal skalierten Toxizität als abhängiger Variable zeigte nach dem Mann-Whitney-U-Test hier nur einen statistischen Trend mit  $p = 0,09$ .

**Tab. 20** Verteilung des Leu10Pro-Polymorphismus in den einzelnen Graden der Akuttoxizität nach CTC. Es wurde – wie in Tab. 19 – ein dominanter Effekt des Pro10-Allels angenommen und daher dessen heterozygotes mit dem homozygoten Vorkommen kombiniert.

Maximale Akuttoxizität, Grad	Anzahl der Patienten	
	Leu10/Leu10	Leu10/Pro10 + Pro10/Pro10
0	12	18
1	54	98
2	30	27
3	1	1

Eine analoge Auswertung für Arg25Pro in Bezug auf die Spättoxizität ergab mit dem Mann-Whitney-U-Test über alle vier Toxizitätsgruppen keinen klaren statistischen Zusammenhang ( $p = 0,16$ ). Somit kann hier mit ansteigenden Toxizitätsgraden keine kontinuierliche Zunahme des Pro25-Allels verzeichnet werden. Vielmehr scheint das Pro25-Allel zwischen den Toxizitätsgruppen 0 und 1 einerseits sowie 2 und 3 andererseits zu diskriminieren: In den ersten beiden Gruppen ist dieses im Vergleich zum Wildtyp unter-, in den anderen beiden überrepräsentiert (Abb. 13).

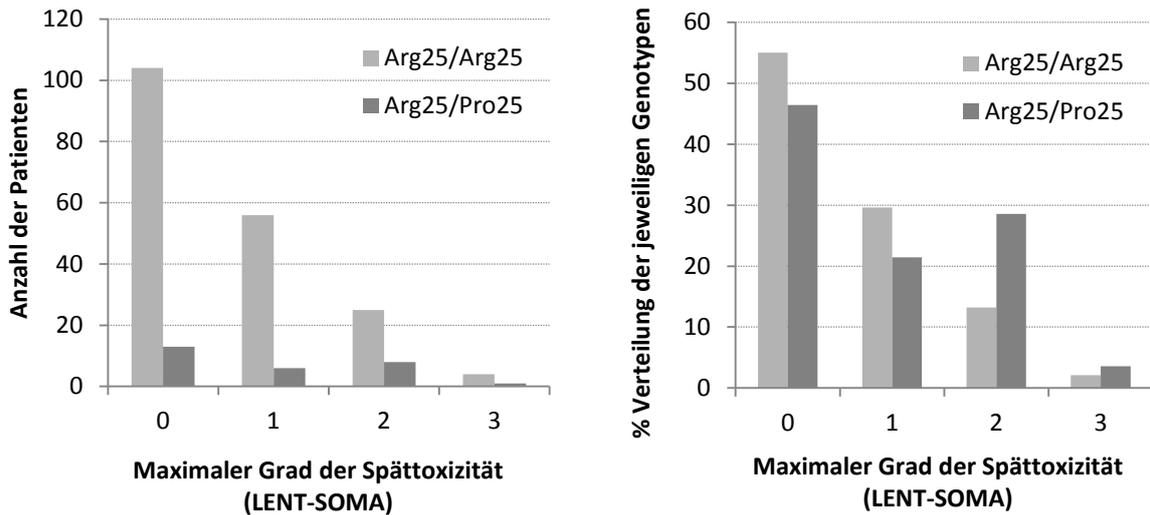


Abb. 13 Spättoxizitätsgrade in Abhängigkeit von Arg25Pro. Links sind die absoluten Patientenzahlen dargestellt. Das rechte Bild veranschaulicht die relative Verteilung; dabei ist für jede der beiden Genotypkonstellationen die Gesamtzahl von 100% auf die einzelnen Toxizitätsgruppen aufgeteilt.

Im Gegensatz zu Arg25Pro ergab sich für rs10417924 eine kontinuierliche Beziehung mit den vier Ausprägungsgraden der Spättoxizität ( $p = 0,05$  nach Mann-Whitney-U). Dies ist in nachstehender Abb. 14 veranschaulicht.

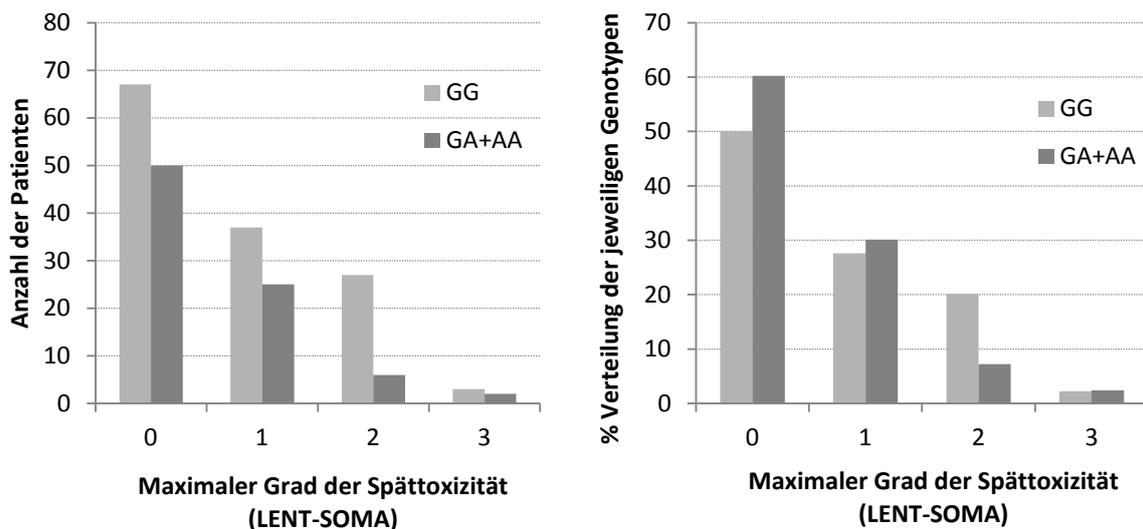


Abb. 14 Spättoxizitätsgrade in Abhängigkeit von rs10417924. Die weiteren Informationen sind gemäß den Definitionen von Abb. 13 zu verstehen

#### 4.4.4 Haplotypen und kombinierte Alleleffekte

Zwei der drei *TGFBI*-Genpolymorphismen (rs1800470 und rs1800471), die mit Akut- bzw. Spättoxizität assoziiert waren, stehen in hohem genetischen Kopplungsungleichgewicht (LD) mit weiteren der insgesamt zehn untersuchten *TGFBI*-Varianten (Abb. 9). Ein wechselseitig hohes LD besteht für fünf dieser Polymorphismen, für welche demzufolge Haplotypen berechnet wurden (Tab. 15). Fünf Haplotypen traten in der untersuchten Stichprobe mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auf. Diese wurden nun ebenfalls auf mögliche Assoziationen mit den dokumentierten Toxizitäten geprüft.

Das Pro10-Allel, welches das Risiko für eine Akuttoxizität  $\geq$  Grad 2 minderte, kommt gemäß Tab. 15 in zwei Haplotypen (H2 und H4) vor. Die zuvor beschriebene Risikominderung einer kombinierten Akuttoxizität bzw. der akuten Proktitis  $\geq$  Grad 2 durch Pro10 ist der Haplotyp-Analyse zufolge auf H2 zurückzuführen ( $p = 0,07$  in beiden Fällen, zweiseitiger Fisher's exakter Test). Dabei wurden Träger von H2 mit Patienten ohne H2 verglichen.

Das mit der Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 verbundene Pro25-Allel kam nur in einem dieser Haplotypen (H4) vor. Da dies der singulären Betrachtung von Pro25 entspricht, erübrigte sich hier die Analyse von H4 in Bezug auf die Toxizitätsdaten. Für die zweite, die Spättoxizität modulierende Variante (rs10417924) liegt kein nennenswertes LD mit einem der anderen untersuchten Genpolymorphismen vor, weshalb rs10417924 nicht in die Haplotypen-Kalkulation eingeschlossen wurde. Somit können die beiden, in meiner Studie für Spättoxizität prädisponierenden *TGFBI*-Genvarianten Arg25Pro und rs10417924 als voneinander unabhängige Variablen betrachtet werden. Die oben durch univariate Analyse dargestellte Risikoerhöhung für chronische Zystitis  $\geq$  Grad 2 für das Pro25-Allel bzw. Risikoerniedrigung für chronischer Proktitis  $\geq$  Grad 2 für das Variantenallel von rs10417924 wurde durch den jeweils anderen Genpolymorphismus nicht merklich verändert (multivariat getestet im binären logistischen Regressionsmodell). Im logistischen Regressionsmodell zeigte sich – verglichen mit dem Fisher's exakten Test – sogar ein etwas stärkerer Zusammenhang des Pro25-Allels mit der chronischen Zystitis ( $p = 0,04$  sowohl bei univariater Testung von Arg25Pro als auch zusammen mit rs10417924).

## 5 Diskussion

509 Prostatakarzinompatienten, die sich zwischen März 2001 und September 2010 in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen vorstellten, wurden in die vorliegende Arbeit eingeschlossen. Als primäre Zielgröße wurde ein Einfluss der Variabilität des *TGFBI*-Gens auf akute sowie späte Radiotherapie-bedingte Toxizität geprüft. Als sekundäre Zielgröße wurden mögliche Beziehungen zwischen *TGFBI*-Varianten und erkrankungsspezifischen Parametern (TNM-Status, PSA-Wert bei Diagnosestellung, *Gleason Score*) sowie dem Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, analysiert.

### 5.1 Auftreten von Toxizität

Grundvoraussetzung für die nachfolgende Analyse der Einflussgrößen war die exakte klinische Dokumentation der aufgetretenen Toxizität. Diese wurde durch engmaschige klinische Kontrollen sowohl während der Phase der Bestrahlung als auch in der sich anschließenden Nachsorge erreicht. Akuttoxizität wurde nach CTC-Richtlinien, Spättoxizität wurde nach LENT/SOMA klassifiziert. Die Toxizität wurde fachärztlich validiert. Neben der Dokumentation der Toxizität wurden TNM-Status, PSA-Wert bei Diagnosestellung, *Gleason Score*, antiandrogene Therapie sowie Art der Radiatio erfasst. Es erfolgte zunächst die Auswertung der Toxizität im gesamten am Prostatakarzinom therapierten Patientenkollektiv ( $n = 485$  Patienten). Die Diskussion der Toxizität in diesem Kollektiv (akut sowie spät) erfolgt im nachfolgenden Kapitel 5.1.1. Vor der anschließenden Evaluation der Einflussgrößen auf die Toxizität erfolgte die Einteilung der Patienten nach Behandlungsmodalität in verschiedene Subgruppen (s. Tab. 12, Diskussion im folgenden Abschnitt Kap. 5.4).

#### 5.1.1 Akuttoxizität

Die Akuttoxizität wurde nach CTC-Leitlinien eingeordnet. Bei 95,3 % der Patienten ( $n = 485$ ) konnte die Akuttoxizität vollständig dokumentiert werden (s. Kap. 4.1.4, Abb. 5 sowie Abb. 6). Fehlende Daten sind hier auf den Abbruch der Bestrahlung bei *Incompliance* sowie weitere, strahlentherapieunabhängige Komplikationen zurückzuführen. In der von mir durchgeführten Studie erlitten 71,5 % der Patienten unerwünschte Nebenwirkungen im Bereich des Enddarms ( $n = 347$ ), 18,5 % des Gesamtkollektivs ( $n = 90$ ) davon  $\geq$  Grad 2 nach

CTC. Im Bereich der Harnblase erlitten 56,9 % (n = 276) unerwünschte Nebenwirkungen, darunter 8,0 % (n = 39) Toxizität von  $\geq$  Grad 2 nach CTC.

Im Vergleich mit Studien, welche sich mit der Radiotherapie-assoziierten Akuttoxizität in der Bestrahlung des Prostatakarzinoms beschäftigen, sind diese Werte als zufriedenstellend einzuordnen. Als beispielhafter Vergleichswert kann eine Studie mit 266 Patienten gelten, bei der bis zu 26 % der Patienten Enddarmtoxizität und bis zu 19 % Harnblasentoxizität  $\geq$  Grad 2 nach CTC (Koper et al. 1999) zeigten. Die Studie aus dem Jahr 1999 untersuchte Einflüsse von Radiatio mit offenen Feldern gegenüber winkelgetreuen Feldern bei jeweils gleicher Dosis von 66 Gy. Peeters et al. konnten bei 669 Patienten bis zu 49 % Enddarmtoxizität von  $\geq$  Grad 2 und bis zur 41% Harnblasentoxizität von  $\geq$  Grad 2 dokumentieren (Peeters et al. 2005). Ziel dieser Studie war eine Evaluation eines möglichen Einfluss von Gesamtdosen von 68 *versus* 78 Gy auf das Auftreten von Toxizität. Signifikante Ergebnisse zeigten sich dabei jedoch lediglich für rektale Blutungen und das Auftreten von Nykturie.

Ab CTC  $\geq$  Grad 2 spricht man von einer Einschränkung der Lebensqualität für die betroffenen Patienten. Insgesamt muss bei Prozentsätzen von 18,7 % (Rektum) sowie 8,8 % (Harnblase) von CTC  $\geq$  Grad 2 der Betroffenen in unserer Untersuchung von relativ günstigen, wenngleich noch immer nicht befriedigenden Ergebnissen gesprochen werden. Ursächlich für die relativ niedrigen Toxizitätsraten der Patienten unseren Kollektivs im Vergleich mit vorheriger Forschung sind unter anderem die stete Weiterentwicklung in Planung und Durchführung der Strahlentherapie (Forsythe et al. 2012).

### 5.1.2 Spättoxizität

Ab dem 90. Tag nach Beginn der Radiatio aufgetretene Toxizität ist als Spättoxizität definiert. Diese wird nach LENT/SOMA-Kriterien eingeteilt. Die Dokumentation der Spättoxizität erfolgte im Rahmen der klinischen Nachsorgen der Patienten in unserer Abteilung, welche sich in Abständen von einem Jahr insgesamt fünfmal nach Abschluss der Radiatio vorstellen. Spättoxizität konnte bei 86,2 % der Patienten (n = 439) dokumentiert werden, fehlende Daten sind vordergründig auf zum Zeitpunkt der Auswertung noch in der Zukunft liegende Nachsorgetermine zurückzuführen.

Im Bereich des Enddarms wurde im untersuchten Kollektiv bei 26,0 % (n = 126) der Patienten Spättoxizität diagnostiziert, insgesamt 10,3 % (n = 50)  $\geq$  Grad 2. Im Bereich der Harnblase zeigte sich bei 25,1 % (n = 122) Spättoxizität, insgesamt 5,5 % (n = 27) erlitten mindestens Grad 2.

2008 wurden Daten einer Langzeitstudie veröffentlicht, welche 1571 Prostatakarzinompatienten über einen mittleren Zeitraum von zehn Jahren beobachtet hatte. Hier wurde bei 9 % der Patienten rektale Beschwerden  $\geq$  Grad 2 dokumentiert sowie 15 % für den Bereich der Harnblase (Zelevsky et al. 2008). Ursprung der Studie war ein Vergleich verschiedener Behandlungsmodalitäten, sodass ein direkter Vergleich mit der vorliegenden Arbeit nicht möglich ist. Eine Studie an 229 Patienten aus dem Jahr 2002 berichtet von einer Inzidenz von 10,7 % Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 am Enddarm (Fiorino et al. 2002). Eine weitere modalitätsvergleichende Studie mit 669 Probanden fand bis zu 26,5 % Symptome im Enddarm sowie bis zu 30,2 % Symptome im Bereich der Harnblase von  $\geq$  Grad 2 (Peeters et al. 2005).

Bezüglich der Dokumentation der Spättoxizität muss bedacht werden, dass sich diese über den gesamten, auf die Strahlentherapie folgenden Zeitraum bis zu Lebensende bezieht. Üblich ist ein Nachbeobachtungszeitraum von fünf Jahren. Der Nachbeobachtungszeitraum der vorliegenden Studie erstreckt sich über den Zeitraum von minimal drei bis maximal 61 Monaten, wobei nicht bei allen Patienten Daten des gesamten Nachbeobachtungszeitraums dokumentiert werden konnten, wie es wünschenswert gewesen wäre (s. Kap. 4.4). Es ist daher denkbar, dass die Zahl der unter Spättoxizität leidenden Patienten höher ist als der von uns erfasste Wert, was auch eine Veränderung der Ergebnisse in der Beziehung zwischen den SNPs sowie der Spättoxizität mit sich bringen könnte. Weiterführende Untersuchungen sollten diesbezüglich erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ansatz gewählt, Kandidatengene für Biomarker anhand einer großen Fallzahl zu testen. Dafür wurde der Kompromiss der nicht immer vollständigen Nachbeobachtungszeit bewusst eingegangen.

## 5.2 Auswertungen der SNP-Analysen

Primäre Zielgröße der vorliegenden Arbeit war die Prüfung eines möglichen Einflusses der Variabilität des *TGFBI*-Gens auf akute sowie späte Radiotherapie-bedingte Toxizität. Hierzu erfolgte die genetische Analyse von 10 *TGFBI*-SNPs (s. Kap. 4.2, Tab. 14), welche nach Literaturrecherche sowie Ergebnissen aus dem eigenen Labor ausgewählt wurden.

Aus dem Gesamtkollektiv ( $n = 509$  Patienten) stand bei 93,5 % ( $n = 476$ ) der Patienten ausreichend genetisches Material zur Analyse bereit. Kann aus der Blutprobe nur unzureichend DNA extrahiert werden, so lässt sich diese im folgenden Arbeitsschritt nicht in befriedigendem Maße amplifizieren (siehe Kap. 4.2). Dementsprechend wurden 33 Proben

aus der weiterführenden Analyse ausgeschlossen. Die Bestimmungsquote über alle zehn SNPs belief sich auf 97,5 % und lag damit im angestrebten Bestimmungsbereich von  $\geq 95$  %.

Die korrekte Bestimmung der 5236 Allele konnte durch die erneute Analyse von 506 Allelen (n = 46 Probanden) überprüft sowie durch Kontrolle der bereits für eine andere Studie analysierten Allele (n = 420) bestätigt werden. Daher kann hier mit hoher Sicherheit von exakten Ergebnissen ausgegangen werden.

### 5.2.1 *TGFB1*-Keimbahngenetik und Radiotherapie-bedingte Toxizität

Zur Prüfung eines möglichen Einflusses der Variabilität des *TGFB1*-Gens auf akute sowie späte Radiotherapie-bedingte Toxizität wurde das Gesamtkollektiv der Patienten in Subgruppen nach Bestrahlungsmodalität unterteilt. Subgruppe 2 (Radiatio primär dosisreduziert perkutan und HDR, Gesamtdosis 64 – 66 Gy), Subgruppe 3 (primär perkutan und HDR, 66 Gy), Subgruppe 4 (primär perkutan ohne LAG, 72 Gy), Subgruppe 6 (primär perkutan und HDR mit LAG, 68,4 – 68,6 Gy) und Subgruppe 7 (primär perkutan mit LAG, 71 Gy) wurden in die Überprüfung einbezogen (s. Flussdiagramm Abb. 4; n = 247 Patienten). Aufgrund fehlender genetischer bzw. klinischer Daten beziehen sich die Auswertungen der Akuttoxizität in diesem Abschnitt auf n = 241, die der Spättoxizität auf n = 217 Patienten (s. Kap. 4.4).

#### 5.2.1.1 Die Variante Arg25Pro

Die Untersuchung von Arg25Pro war in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse. Eine Publikation (Schirmer et al. 2012) aus unserem Labor hatte einen positiven Prädiktionswert von 100 % der Mutationsträger mit erhöhten akuten Nebenwirkungen in der Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms erbracht. In der nun von uns untersuchten Stichprobe von Prostatakarzinompatienten zeigte sich jedoch keine signifikante Assoziation mit dem Ausprägungsgrad der Akuttoxizität.

Im Jahr 2010 wurde eine Metaanalyse von insgesamt 66 Studien zum Einfluss von SNPs auf die Normalgewebsreaktion der Strahlentherapie veröffentlicht (Andreassen 2010). Die in diese Metaanalyse einbezogenen Studien aus dem Zeitraum von Jahr 2002 bis Jahr 2010 schließen Untersuchungen an verschiedenen Tumorlokalisationen ein, darunter Kopf und Hals, (weibliche) Brust und Prostata. Bei zahlreichen dieser Studien wird das *TGFB1*-Gen nicht untersucht. Studien, welche sich mit dem *TGFB1*-Gen auseinandersetzen, konzentrieren sich insbesondere auf rs1800469 („codon -509 T“) und rs1800470 („Leu10Pro“, „codon 10“, im Großteil der zitierten Veröffentlichungen wird die ursprüngliche Bezeichnung rs1982073

verwendet). Nur zwei dieser Studien (Damaraju et al. 2006; Peeters et al. 2005) untersuchten auch Arg25Pro, konnten den SNP aber nicht mit Akuttoxizität nach Radiotherapie assoziieren. In der Untersuchung von Schirmer et al. 2012 handelte es sich daher um die erste Publikation, welche den möglichen Effekt von Arg25Pro auf die Akuttoxizität der Radiotherapie beschrieb. An der Studie nahmen Patienten mit Rektumkarzinom Stadium II/III nach UICC des mittleren und unteren Rektumdrittels teil. Diese wurden nach Diagnosestellung in zwei unabhängige Kohorten ( $n = 88$  und  $n = 75$ ) randomisiert, welche dasselbe Therapieregime erhielten (neoadjuvante Strahlentherapie kombiniert mit den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil sowie z.T. Oxaliplatin). Gleich der vorliegenden Dissertation wurde die therapieassoziierte Akuttoxizität wöchentlich dokumentiert. Zur Auswertung wurden Toxizitätsreaktionen an den Organen Haut, Darm, Enddarm sowie Harnblase einbezogen, als Abgrenzung für schwere, also die Lebensqualität beeinflussende Toxizität ein Wert von  $\geq$  Grad 2 an mindestens einem der Organe definiert. Alle Patienten, welche mindestens ein Arg25Pro-Allel besaßen, waren von Akuttoxizität  $\geq$  Grad 2 betroffen. Auch bei der Untersuchung der Akutreaktion einzelner Organe ergab sich eine Überrepräsentation der Pro25-Träger.

Eine mögliche Ursache dafür, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine signifikante Assoziation zwischen Trägern des Allels und akuten Nebenwirkungen der Therapie ( $p = 0,3$ ) replizieren konnten, liegt in der Verabreichung der systemisch schädigenden Chemotherapeutika im Design der Rektumstudie. Durch die Kombination von DNA-Schädigungen durch sowohl Radiatio als auch Chemotherapeutika erreicht man in der Therapie hohe Kontrollraten, jedoch auch erhöhte unerwünschte Wirkungen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ausschließlich eine Strahlentherapie durchgeführt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zellschädigung durch (auch alleinige) Chemotherapie bei Trägern des Arg25Pro-Allels höher ist als bei Patienten ohne diese Punktmutation, möglicherweise vervielfacht durch eine Kombination der Behandlungsmodalitäten. Diesbezüglich waren zum aktuellen Stand (August 2014) keine veröffentlichten Studien zu finden.

In unserer Patientenkohorte von Prostatakarzinompatienten zeigte sich ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 nach LENT/SOMA. Heterozygote Träger der Pro25-Variante zeigten diesbezüglich ein RR von 2,23 (95 %-CI 1,10 – 4,55). Leider enthielt die von uns untersuchte Kohorte keine homozygoten Träger des Pro25-Allels. Dies lässt sich durch eine MAF von 7,5 % erklären. Mögliche homozygote Träger hätten den gefundenen Effekt stark

beeinflussen können, weshalb deren Fehlen als ein die Bewertung einschränkender Befund bewertet werden muss.

Wird Radiotherapie-bedingte Toxizität diskutiert, so ist dies stets im Kontext der behandelten Region zu betrachten. In Bezug auf die Vergleichbarkeit von Konzepten zur Radiotherapie des Rektumkarzinoms und des Prostatakarzinoms gilt zu beachten, dass sich die Zielvolumina voneinander unterscheiden. Während das Rektum bei einem dort lokalisierten Karzinom gänzlich als Zielvolumen definiert wird, so gilt es in der Bestrahlung von Prostatakarzinomen als Risikoorgan. Dementsprechend wird größtmögliche Sorge getragen, die Strahlenbelastung dort so gering wie möglich zu gestalten.

Eine weitere Differenz der Konzepte sind die unterschiedlichen Therapieabläufe. In der Therapie des Rektumkarzinoms erfolgt auf die neoadjuvante Radiochemotherapie nach sechs Wochen die Resektion des Rektums. Diese führt dazu, dass typische Symptome der Proktitis als Spättoxizität - z.B. erhöhte Stuhlfrequenz, Schleim- und Blutbeimengungen - nicht zum Tragen kommen bzw. kommen können (Fietkau et al. 2007). Bei Veröffentlichung der Daten zum Rektumkarzinom (Schirmer et al. 2012) konnten keine Ergebnisse für Spättoxizität eingeschlossen werden, da der Nachbeobachtungszeitraum zu kurz war. Eine Fortführung der Datenerhebung zur Überprüfung der Assoziation ist daher von höchstem Interesse. Dies gilt auch für den Bereich der Harnblase: Die von uns durchgeführte Subanalyse nach Lokalität der Toxizität führte die erhöhten Toxizitätswerte fast ausschließlich auf diesen Bereich zurück (RR 2,85, 95 %-CI 1,18 – 6,90,  $p = 0,05$ , Abb. 11).

Im Gegensatz dazu fanden Peters et al. 2008 kein vermehrtes Auftreten von Spättoxizität der Blase bei Trägern der Arg25Pro Variante. Nachgewiesen werden konnte aber ein erhöhtes Risiko für erektile Dysfunktion beim gemeinsamen Vorliegen der Minorallele von Arg25Pro, codon -509T und Leu10Pro in der Spätreaktion nach Prostataradiatio (Peters et al. 2008) bei  $n = 141$  untersuchte Patienten. Ebenfalls keine Auswirkung von Arg25Pro und -509T auf Radiotherapie-assoziierten Toxizität auf Blase und Rektum zeigte eine Studie aus dem Jahr 2006 mit  $n = 83$  Prostatakarzinom-Patienten (Damaraju et al. 2006).

Eine Studie zu Zervix- und Endometriumkarzinomen aus dem Jahr 2006 postuliert gar einen leicht protektiven Effekt für homozygote Träger von Arg25Pro (De Ruyck et al. 2006). Der Bewertungsmaßstab für Radiosensitivität wurde auch von dieser Studie bei Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 angelegt, der Nachbeobachtungszeitraum erstreckte sich auf bis zu elf Jahre. Zur Radiotherapie hinzu wurde in unterschiedlichen Anteilen auch Chemo- und Hormontherapie sowie eine Operation durchgeführt. Möglicherweise spielen daher das Geschlecht sowie der

geschlechtsspezifische Hormonhaushalt eine Rolle in der Expression bzw. Wirkweise der Variantenallele.

Es ist bemerkenswert, dass die vorliegende Untersuchung keinen klaren statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Pro25-Allels und höhergradiger akuter Toxizität darstellen kann. Eine mögliche Ursache dafür findet sich in der niedrigen Anzahl an Patienten mit höhergradiger Toxizität unserer Stichprobe. Wir beschreiben für Träger von Pro25 eine Diskriminierung insbesondere zwischen Spättoxizitätsgrad 0 und 1 *versus* 2 und 3 nach Radiotherapie. Diese Einschränkung sollte zunächst jedoch nur im limitierten Kontext der vorliegenden Studie als gegeben betrachtet werden. Es werden in unserer Arbeitsgruppe erweiterte Analysen zu diesem Teilbereich folgen, um diese Ergebnisse zu evaluieren. Zusammenfassend lässt sich trotz dieser Einschränkung festhalten, dass unsere Ergebnisse zum Einfluss von Arg25Pro die Hypothese, dass es sich um eine die Radiotherapie-bedingte Toxizität modulierende Variante handelt, unterstützen.

#### 5.2.1.2 Die Variante rs10417924

Bei Prüfung von möglichen Einflüssen von SNPs im *TGFBI*-Gen wurde u.a. auch die Variante rs10417924 geprüft. In unserer Stichprobe konnte kein Nachweis für die Modulation von akut auftretender Toxizität gezeigt werden. Einen möglicherweise vor Spättoxizität nach Radiotherapie schützender Effekt konnte jedoch für das A-Variantenallel von rs10417924 dargestellt werden. Wir nutzten ein Modell mit angenommenem dominanten Effekt dieses Allels und konnten ein RR von 0,50 (95 %-CI 0,20-0,90,  $p = 0,02$ ) für die Entwicklung von Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 nachweisen. In der Subanalyse nach Toxizitätslokalisierung ließ sich dieser Befund insbesondere der Proktitis zuordnen ( $p = 0,01$ ). Im Gegensatz zu Arg25Pro konnte sich die Assoziation mit vermindert auftretender Spättoxizität bei Variantenträgern kontinuierlich zu den vier Ausprägungsgraden der Spättoxizität darstellen. Träger des A-Allels waren weniger häufig von höheren Toxizitätsgraden betroffen (s. Abb. 14, Kap. 4.4.3). Diese kontinuierliche Assoziation unterstreicht die mögliche Verbindung von rs10417924 und Spättoxizität nach Radiotherapie. Der von uns in dieser Studie beschriebene Effekt wurde in der Veröffentlichung von 2012 (Schirmer et al. 2012) jedoch nicht gefunden. Da sich die Ergebnisse insbesondere auf die Proktitis beziehen, muss hier erneut die beim Rektumkarzinom auf die Radiochemotherapie folgende Operation beachtet werden. Aktuell sind in den Datenbanken lediglich zwei weitere Studien, welche mögliche Effekte dieser Variante beschreiben, verfügbar (Dai et al. 2009; Niu et al. 2012). Keine dieser Untersuchungen bezieht sich jedoch auf Radiotherapie-assoziierte Toxizität. Eine

abschließende Bewertung der von uns dargestellten Ergebnisse ist daher zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich.

### 5.2.1.3 Die Variante Leu10Pro

In der Auswertung der Akuttoxizitätsgrade (dichotomisiert nach  $< \text{Grad } 2$  versus  $\geq \text{Grad } 2$ ) zeigte sich ein schützender Effekt des Pro10-Allels im Vergleich mit dem homozygoten Wildtypallel Leu10 (RR = 0,63). Dieser Effekt konnte sich jedoch nicht bei Homozygotie für Leu10 bestätigen. Dies kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die untersuchte Stichprobe nur 10 Patienten mit diesem Genotyp und Akuttoxizität von  $\geq \text{Grad } 2$  aufwies. In der Subanalyse nach der Lokalisation der Toxizität (s. Kap. 4.4.2) konnte dieser Effekt insbesondere der Proktitis zugeordnet werden ( $p = 0,04$  versus  $p = 0,5$  bezüglich der akuten Zystitis, Abb. 10).

Verschiedene Untersuchungen haben sich (unter anderem) mit Leu10Pro in der Rolle als potentieller Modulator in der Gewebsreaktion auf ionisierende Strahlung beschäftigt. Im Bezug auf einen Effekt von Leu10Pro auf akute Toxizität bei strahlentherapeutischer Therapie des Prostatakarzinoms sind zum aktuellen Stand keine Daten, die einen Bezug darstellen, veröffentlicht. Eine Einordnung der dargestellten Ergebnisse in den Kontext der aktuellen Literatur ist daher nicht durchführbar.

Sämtliche Studien, welche sich mit dem SNP Leu10Pro befassen, zielen auf einen potentiellen Effekt der Variante auf Spättoxizität ab. Dies gilt auch für Studien, die andere Tumorentitäten untersuchten. Die Untersuchung unserer Stichprobe zeigte bezüglich der Spättoxizität keine Modulation durch Leu10Pro.

Eine Studie zeigte einen schützenden Effekt des Pro10-Allels vor der Entwicklung einer Radiotherapie-induzierten Pneumonitits (Yuan et al. 2009). Das Patientenkollektiv bestand aus 164 Patientinnen und Patienten, die bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom eine definitive Radio(chemo)therapie erhalten hatten; der Untersuchungszeitraum betrug 12 Monate nach Beginn der Radio(chemo)therapie. Eine im Jahr 2006 veröffentlichte Studie über Nebenwirkungen der Therapie bei gynäkologischen Karzinomen (Zervix- sowie Endometriumkarzinom) (De Ruyck et al. 2006) zeigte eine Assoziation für homozygote Träger von rs1800469 sowie Leu10Pro zur Entwicklung von Radiotherapie-assoziiertes Spättoxizität. Demgegenüber wird in einer 2009 von der Medizinischen Hochschule Hannover publizierten Studie an 445 Prostatakrebspatienten, welche mit interstitieller Brachytherapie behandelt wurden, nach 18 Monaten Nachbeobachtungszeit keine Assoziation zwischen Leu10Pro und therapieassoziiertes Spättoxizität berichtet. Ebenfalls keine Assoziation zeigte eine spanische Studie an 413 Prostatakrebspatienten (Fachal et al. 2012).

Wiederholt konnte in den jeweiligen Studien eine Verbindung zwischen dem Pro10-Allel mit einem erhöhten Auftreten von subkutaner Fibrose und verändertem kosmetischen Ergebnis im langfristigen Verlauf nach Radiotherapie bei Mammakarzinom dargestellt werden (Alsbeih et al. 2010; Andreassen et al. 2003; Andreassen et al. 2006). Der Effekt konnte jedoch nicht immer reproduziert werden (Barnett et al. 2010), ebenso nicht für Tumoren des Kopf- und Halsbereiches (Andreassen 2010).

Es ist davon auszugehen, dass weitere Studien die Variante Leu10Pro einbeziehen werden, wobei es wünschenswert ist, dass die Analysen auch auf die Akuttoxizität geprüft werden. Nur so wird im weiteren Verlauf eine valide Einschätzung der Modulation von Leu10Pro auf bestrahltes Gewebe möglich sein.

### 5.3 Auftreten des Prostatakarzinoms und *TGFB1*-Genetik

Sekundäre Zielgrößen in der vorliegenden Arbeit waren mögliche Beziehungen zwischen *TGFB1*-Varianten und erkrankungsspezifischen Parametern der Patienten (TNM-Status, PSA-Wert bei Diagnosestellung, *Gleason Score*) sowie dem Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken. Zur Evaluation potentieller Effekte von neun *TGFB1*-SNPs auf das Risiko, an Prostatakarzinom zu erkranken, wurden sowohl die Patienten als auch das gesunde Kontrollkollektiv in jeweils zwei Kohorten unterteilt (Patientenuntergruppen  $n = 248$  bzw.  $261$ , Kontrollkollektiv  $n = 129$  bzw.  $128$ , s. Kap. 4.3) und gegeneinander getestet. In der von uns untersuchten Stichprobe konnte für rs7254679 diesbezüglich näherungsweise ein reproduzierbarer Einfluss nachgewiesen werden: Der heterozygote Genotyp war mit einem höheren Erkrankungsrisiko behaftet ( $RR = 1,63$ ). Dieser Effekt ließ sich in beiden Patientenkohorten darstellen. Es muss jedoch beachtet werden, dass das RR in der ersten Patientenkohorte für Homozygotie deutlich höher war als in der zweiten ( $RR = 2,24$  versus  $0,64$ ). Dieser Befund ist möglicherweise durch die ungleiche Genotypenverteilung zwischen den Patientenkohorten beeinflusst ( $15$  versus  $5$  homozygote Patienten). Durch die geringe Anzahl der Patienten ist der mögliche Effekt insbesondere in Kohorte 2 mit Vorsicht zu betrachten. Ein ausgeglicheneres Verhältnis wäre hier wünschenswert, um validere Aussagen treffen zu können. Über SNP rs7254679 ist bislang keine Untersuchung zur Epidemiologie irgendeiner Erkrankung veröffentlicht worden; die Datenbank dbSNP (s. Kap. 2.7) listet die klinische Signifikanz als unbekannt (Stand August 2014).

Wir prüften im Rahmen einer Subgruppenanalyse von rs7254679 mögliche Einflüsse durch tumorspezifische Parameter (*Gleason Score*, PSA bei ED, T- und N-Status) auf die o.g. Befunde. Diese Testungen blieben allesamt negativ (s. Kap. 4.3).

Im Jahr 2004 konnten zwei Studien ein erhöhtes relatives Risiko für die Erkrankung an Prostatakrebs für die Variante rs1800469 (C-509T) sowohl bei Asiaten (RR = 1,6) (Li et al. 2004) als auch in Kaukasiern (RR = 2,4) (Ewart-Toland et al. 2004) zeigen. Diese Ergebnisse konnten in einer großen Fall-Kontroll-Studie mit über 1300 Probanden sowie einer zahlenmäßig ähnlichen Kontrollgruppe (Kang et al. 2007b), welche an verschiedenen Versorgungszentren der Vereinigten Staaten von Amerika rekrutiert wurden, nicht reproduziert werden. Gleich der vorliegenden Studie konnte kein Effekt der Varianten rs1800468, rs1800469, rs1800471, rs1800472 und rs1982073 (beide letztgenannte Varianten wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht berücksichtigt) auf das Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden.

In der von uns untersuchten Stichprobe (n = 476 Patienten mit ausreichend genetischem Material zur Genanalyse, s. Kap. 5.2) hatten 51 Patienten mindestens einen weiteren malignen Tumor. Hier konnte für rs7254679 eine Verbindung mit dem Vorliegen von Zweitumoren festgestellt werden. Unter der Annahme eines dominanten Effektes des Variantenallels (*TC+CC versus TT*-Wildtyp) betrug das RR hier 1,49 (95 %-CI 1,06 – 2,08), bei Prüfung gegen die Gesamtkohorte der Gesunden stieg es sogar auf 2,16. Dies entspricht einem p-Wert von  $p = 0,001$ .

Auch zu diesen Ergebnissen unserer Studie gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine Veröffentlichungen. Einschränkend muss beachtet werden, dass es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine sehr geringe Fallzahl an Patienten mit Zweitumoren handelt. Darüber hinaus handelt es sich in der Kontrollgruppe der gesunden Probanden vorwiegend um junge Menschen im Studentenalter, eventuell auftretende maligne Erkrankungen können sich daher im weiteren Lebensverlauf einstellen. Dies würde die von uns dargestellten Resultate verändern. Weiterhin enthält die von uns untersuchte Patientenkohorte mit Prostatakarzinompatienten naturgemäß nur Männer, die Kontrollgruppe jedoch besteht aus Personen beider Geschlechter zu etwa gleich großen Teilen. Zur Klärung eines potentiellen Effektes von rs7254679 sollten daher Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven sowie möglichst ausgeglichenen Kontrollgruppen den in unserer Stichprobe beschriebenen Effekt der Variante mit einbeziehen.

### 5.3.1 Berechnung des haploiden Genotyps (Haplotyp)

Für die Berechnung der Haplotypen wurden die Varianten rs1800469, rs1800470, rs1800471, rs6508976 sowie rs2241717 eingeschlossen, da diese über ein hohes Kopplungsungleichgewicht verfügen und daher besonders interessant sind (s. Kap. 4.2.1, Kap. 4.4.4

sowie Abb. 9). Wir prüften die fünf häufigsten Haplotypen H1-H5 mit einer Häufigkeit von mindestens 1% auf Assoziationen mit von uns erhobenen Daten. Bezüglich des Risikos, an Prostatakrebs zu erkranken, konnte jedoch für keinen Haplotyp eine Assoziation nachgewiesen werden. Gleiches wird von einer Studie an 1320 Prostatakrebspatienten (Kang et al. 2007b) berichtet. Es wurden dort ebenfalls die Varianten rs1800469, rs1800470 und rs1800471 untersucht, zusätzlich rs1800468 und rs1800472. Es zeigte sich bei keinem der untersuchten SNPs sowie für keine Haplotypkombination eine Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko.

In der subsequenten Analyse der drei *TGFBI*-Genpolymorphismen, welche mit Akut- bzw. Spättoxizität assoziiert waren, konnte die Minderung des Risikos für das Auftreten von Akuttoxizität durch das Pro10-Allel jedoch auf den Haplotyp H2 zurückgeführt werden. In der Testung der H2-Träger gegen Patienten ohne H2 zeigte sich sowohl in der kombinierten Betrachtung von akuter Proktitis mit Zystitis als auch in der singulären Betrachtung der akuten Proktitis (jeweils  $\geq$  Grad 2) ein statistischer Trend von  $p = 0,07$  nach zweiseitigem Fisher's exaktem Test. Damit scheinen Träger des Haplotyp H2 (Tab. 15) in unserer Studienkohorte ein geringeres Risiko für die Entwicklung von Akuttoxizität zu haben. Dieser möglicherweise protektive Haplotyp trat in unserer Kohorte mit einer Häufigkeit von 28,3 % auf. Sollten sich die von uns dargestellten Ergebnisse bezüglich der Modifikation der Toxizität durch die *TGFBI*-SNPs bestätigen lassen, so würde sich die eingehendere Betrachtung der Haplotypen lohnen.

#### 5.4 Kritische Betrachtung

Die vorliegende Studie hat sich zum Ziel gesetzt, mögliche vorbeschriebene Assoziationen zwischen *TGFBI*-Polymorphismen und der Normalgewebsreaktion unter sowie nach Abschluss einer strahlentherapeutischen Behandlung bei Patienten mit Prostatakarzinom zu überprüfen. Darüber hinaus sollte das Auftreten von Toxizität unabhängig von SNPs dargestellt werden. Ebenso wurde eine mögliche Verbindung zwischen den SNPs und dem Auftreten von Prostatakarzinomen sowie weiterer, therapieassoziiertes und patientenspezifischer Daten getestet. 509 Prostatakarzinompatienten wurden in die Studie eingeschlossen.

Die Dokumentation der Akut- sowie Spättoxizität erfolgte unabhängig von der Analyse der SNPs-Varianten. Daher kann eine Beeinflussung durch die beschriebenen Vorbefunde ausgeschlossen werden. Toxizitätsscores – sowohl akut als auch spät – wurden

abteilungsintern von Fachärztinnen und Fachärzten validiert, sodass von korrekten Bewertungen auszugehen ist.

Die Genotypanalyse erfolgte aus peripher-venösem Vollblut, wobei der Zeitpunkt der Blutabnahme innerhalb der Studienpopulation von vor Beginn der Therapie bis zum Nachbeobachtungszeitraum variierte. Dies ist ein Kritikpunkt an der vorliegenden Arbeit: ein einheitlicher Entnahmekzeitpunkt für alle Patienten wäre wünschenswert. Da es sich jedoch um genetische Analysen, welche DNA-Punktmutationen anhand von Leukozyten untersuchen, handelt, ist von repräsentativen Ergebnissen auszugehen.

Es erfolgte die Einteilung der Patienten anhand der Therapieschemata, um möglichst homogene Gruppen zur Subanalyse der Toxizität zu erhalten. Von den 509 Patienten wurden insgesamt 241 Patienten in die Auswertung der Radiotherapie-assoziierten Toxizität eingeschlossen. Die Einteilung in die jeweiligen Subgruppen ist in Tab. 12, Kap. 4.1.3 dargestellt. Patienten, welche in die Toxizitätsauswertung eingeschlossen wurden, hatten eine relativ homogene Dosis von  $\Sigma$  64 - 72 Gy erhalten und wurden zuvor nicht im Bereich der Prostataloge operiert. Durch diese Selektion sollte sichergestellt werden, dass mögliche *Confounder* die Toxizitätsdaten nicht beeinflussen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass sich die Therapiemodalitäten auch in den Subgruppen, welche in die Auswertung gingen, unterschied: Sowohl die Art der Bestrahlung (teilweise wurde eine interstitielle Brachytherapie ergänzend zur perkutanen Radiatio durchgeführt) als auch das bestrahlte Volumen (Einschluss bzw. Ausschluss des LAG) differierten. Der von uns gewählte Weg ist ein bewusst eingegangener Kompromiss, um eine ausreichend große Studienpopulation zu erhalten, um potentielle Effekte möglichst valide darzustellen.

Die Testung bezüglich potentieller Einflüsse der *TGFBI*-SNPs auf die Entwicklung eines Prostatakarzinoms erfolgte an einem gesunden Kontrollkollektiv ( $n = 257$ ). Die Daten des Kontrollkollektivs lagen bereits vor und schlossen rs2278422 nicht mit ein. Daher kann bezüglich möglicher Effekte dieser Variante keine Aussage getroffen werden. In einer folgenden Untersuchung sollte dieser SNP daher in der Kontrollgruppe nachbestimmt werden. Wir testeten Einflüsse der *TGFBI*-Genetik auf das Risiko, Prostatakrebs zu entwickeln, anhand einer Unterteilung sowohl der Patienten- als auch der Kontrollkohorte, was valide Ergebnisse liefern kann.

Die Charakterisierung der Kontrollgruppe muss als Kritikpunkt an der vorliegenden Studie gewertet werden. Es sind darin auch weibliche Personen enthalten, sodass genderspezifische Einflüsse nicht ausgeschlossen werden können. Da sich *TGFBI* jedoch auf Chromosom 19 befindet, ist dieser Punkt erneut unter Berücksichtigung des Bedarfs einer ausreichend großen

Kontrollgruppe zu akzeptieren. Darüber hinaus besteht das Kontrollkollektiv vor allem aus jungen Menschen im Altersbereich von ca. 20 – 30 Jahren. Der Großteil der malignen Erkrankungen tritt jedoch im höheren Alter auf. Eine (im männlichen Anteil) potentielle Erkrankung an Prostatakrebs ist daher nicht ausgeschlossen. Dieser Kritikpunkt betrifft auch die von uns gefundenen Ergebnisse für rs7254679: Mögliche Krebserkrankungen, auch Zweittumoren, liegen für einen Teil des Kontrollkollektivs mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zukunft. Im optimalen Fall sollte die Kontrollgruppe für eine Studie wie diese demnach aus geschlechts- und altersidentischen Probanden bestehen.

## 6 Zusammenfassung

Prostatakrebs ist die am häufigsten neu diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern weltweit. Die Strahlentherapie stellt für viele Stadien dieser Erkrankung eine wichtige kurative Therapieoption dar. Die Rolle von *TGFBI* als wichtiger Mediator der Strahlenreaktion von Normalgewebe wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben. Die vorliegende Arbeit untersuchte nun mögliche Einflüsse von Varianten des *TGFBI*-Gens auf Epidemiologie und therapieassoziierte Toxizität einer Radiotherapie bei Patienten mit Prostatakarzinom.

509 Prostatakarzinompatienten stellten sich zwischen März 2001 und September 2010 in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen vor. Studienendpunkte waren das Auftreten von therapieassoziiierter Akut- (CTC) sowie Spättoxizität (LENT/SOMA) unter Berücksichtigung von *TGFBI*-Genvarianten und deren Einfluss auf eine Prädisposition zur Erkrankung. Gewertet wurde jeweils der höchste Grad an akuten und späten Nebenwirkungen in Form von Zystitis oder Proktitis. Als starke Nebenwirkung wurde Toxizität  $\geq$  Grad 2 (deutliche Beeinträchtigung der Lebensqualität) definiert.

Es wurden nach Datenbank- und Literaturrecherche und auf Grund von Vorbefunden zehn Polymorphismen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) ausgewählt, welche die genetische Variabilität im Bereich von *TGFBI* repräsentieren. Aus peripher-venösem Vollblut der Patienten wurde DNA extrahiert. Durch Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) erfolgte eine Vervielfältigung der entsprechenden DNA-Abschnitte, dann folgte die Gensequenzierung.

Primäre Zielgröße der Arbeit war es, einen möglichen Einfluss der SNPs auf radiotherapieassoziierte Toxizität zu prüfen. Dies geschah an einer selektierten Kohorte ( $n = 241$ , primäre Radiatio mit  $\Sigma 64 - 72$  Gy). Akuttoxizität konnte für 100 %, Spättoxizität für 91 % ( $n = 217$ ) der selektierten Kohorte evaluiert werden. Akuttoxizität  $\geq$  Grad 2 manifestierte sich bei 24,4 % (19,1 % Proktitis, 8,1 % Zystitis), Spättoxizität  $\geq$  Grad 2 bei 17,0 % (13,0 % Proktitis, 5,4 % Zystitis) der Patienten. Die Genotypisierung war in 97,5 % der geprüften Allele möglich. 10 % der Proben ( $n = 46$ , unselektierte Kohorte) wurden als interne Kontrolle bestätigt.

Bei Trägern des Genotyps Pro25 von rs1800471 („Arg25Pro“) war das Risiko einer Spättoxizität signifikant erhöht: 10,6 % der Pro25-Träger zeigten Akuttoxizität, 23,7 % Spättoxizität ( $p = 0,033$  nach  $\chi^2$ -Test, RR = 2,23, 95 %-CI 1,10 – 4,55). Der SNP rs10417924

zeigte bei Trägern des A-Allels unter Annahme eines dominanten Alleleffekts einen schützenden Effekt bezüglich der Entwicklung von Spättoxizität (RR = 0,50, 0,20 – 0,90,  $p = 0,02$  nach zweiseitigem Fisher's exaktem Test). SNP rs1800470 („Leu10Pro“) zeigte für Träger der Pro10-Variante niedrigere Raten an Akuttoxizität (RR = 0,72, 0,52-1,01,  $p = 0,03$ ). Subanalysen konnten die Effekte von Arg25Pro insbesondere für das Risiko einer späten Zystitis nachweisen ( $p = 0,05$ ), rs10417924 bezog sich auf die späte ( $p = 0,01$ ), Leu10Pro auf die akute Proktitis ( $p = 0,04$ , jeweils zweiseitig getestet).

Sekundäre Zielgröße der Arbeit war die Testung der SNPs auf einen möglichen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, an Prostatakrebs zu erkranken. Dies wurde Mithilfe eines gesunden Kontrollkollektivs ( $n = 257$ ) geprüft. Es zeigte sich ein Trend für eine Assoziation von rs7254679 mit dem Erkrankungsrisiko. Unter erneuter Annahme eines dominanten Alleleffekts zeigte dieser SNP außerdem eine Assoziation mit dem Vorliegen von Zweitkarzinomen (RR = 2,16, 1,45 – 3,21,  $p = 0,001$  im Vergleich mit der Gesamtkohorte der Gesunden).

Wir berichten von einem SNP (Arg25Pro) im *TGFBI*-Gen, dessen Genotyp Pro25 in der von uns untersuchten Patientenkohorte mit einer signifikant höheren Spättoxizität im Bereich der Harnblase nach Radiotherapie des Prostatakarzinoms assoziiert ist. Der SNP Leu10Pro zeigte einen schützenden Effekt bezüglich der Entwicklung von akuter Proktitis sowie der SNP rs10417924 vor später Proktitis. Eine von unserer Abteilung veröffentlichte Studie an 163 Rektumkarzinompatienten, welche radiochemotherapiert wurden, konnte Arg25Pro bereits als potentiellen prädiktiven Marker für strahlentherapieassoziierte Akuttoxizität identifizieren. Diese Ergebnisse werden von der vorliegenden Arbeit unterstützt. Zur Validierung der von uns berichteten Ergebnisse sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die Rolle der *TGFBI*-SNPs in der Normalgewebsreaktion auf Bestrahlung aufzuklären.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ajlouni M (1999): "Radiation-induced proctitis." *Current Treatment Options in Gastroenterology* 2(1), 20-26.
- Alsbeih G, Al-Harbi N, Al-Hadyan K, El-Sebaie M Al-Rajhi N (2010): "Association between normal tissue complications after radiotherapy and polymorphic variations in TGFB1 and XRCC1 genes." *Radiat Res* 173(4), 505-511.
- Andreassen CN (2010): "Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity--are we on the right track?" *Radiother Oncol* 97(1), 1-8.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M Overgaard J (2003): "Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes." *Radiother Oncol* 69(2), 127-135.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sorensen FB Overgaard J (2006): "Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM--a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples." *Int J Radiat Biol* 82(8), 577-586.
- Annes JP, Munger JS Rifkin DB (2003): "Making sense of latent TGFbeta activation." *J Cell Sci* 116(Pt 2), 217-224.
- Ash D, Flynn A, Battermann J, de Reijke T, Lavagnini P Blank L (2000): "ESTRO/EAU/EORTC recommendations on permanent seed implantation for localized prostate cancer." *Radiother Oncol* 57(3), 315-321.
- Bamberg M, Molls M, Sack H. *Radioonkologie. Band 1: Grundlagen.* W. Zuckerschwerdt, München 2003.
- Barcellos-Hoff MH (1993): "Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland." *Cancer Res* 53(17), 3880-3886.
- Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML Weatherbee JA (1994): "Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland." *J Clin Invest* 93(2), 892-899.
- Barnett GC, Coles CE, Burnet NG, Pharoah PD, Wilkinson J, West CM, Elliott RM, Baynes C Dunning AM (2010): "No association between SNPs regulating TGF-beta1

- secretion and late radiotherapy toxicity to the breast: results from the RAPPER study." *Radiother Oncol* 97(1), 9-14.
- Barrack ER (1997): "TGF $\beta$  in prostate cancer: A growth inhibitor that can enhance tumorigenicity." *The Prostate* 31(1), 61-70.
- Bjorkerud S (1991): "Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro." *Arterioscler Thromb* 11(4), 892-902.
- Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF (2000): "Role of transforming growth factor beta in human disease." *N Engl J Med* 342(18), 1350-1358.
- Border WA, Noble NA (1994): "Transforming growth factor beta in tissue fibrosis." *N Engl J Med* 331(19), 1286-1292.
- Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, et al. (2004), "Human prostate cancer risk factors." *Cancer* 101(10 Suppl): 2371-2490.
- Brand TC, Bermejo C, Canby-Hagino E, Troyer DA, Baillargeon J, Thompson IM, Leach RJ, Naylor SL (2008): "Association of Polymorphisms in TGFB1 and Prostate Cancer Prognosis." *The Journal of Urology* 179(2), 754-758.
- Chong KT, Hampson NB, Corman JM (2005): "Early hyperbaric oxygen therapy improves outcome for radiation-induced hemorrhagic cystitis." *Urology* 65(4), 649-653.
- Cozzarini C, Fiorino C, Ceresoli GL, Cattaneo GM, Bolognesi A, Calandrino R, Villa E (2003): "Significant correlation between rectal DVH and late bleeding in patients treated after radical prostatectomy with conformal or conventional radiotherapy (66.6–70.2 Gy)." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 55(3), 688-694.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998): "Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo." *Cell* 93(7), 1159-1170.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, et al. (1998): "Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 280(11), 969-974.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Cote K, Loffredo M, Schultz D, Chen M-H, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Wein A, et al. (2002): "Biochemical outcome after

- radical prostatectomy or external beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate carcinoma in the prostate specific antigen era." *Cancer* 95(2), 281-286.
- Dai L, Gast A, Horska A, Schrappe M, Bartram CR, Hemminki K, Kumar R Bermejo JL (2009): "A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes." *Pediatr Blood Cancer* 52(7), 819-823.
- Damaraju S, Murray D, Dufour J, Carandang D, Myrehaug S, Fallone G, Field C, Greiner R, Hanson J, Cass CE, et al. (2006): "Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer." *Clin Cancer Res* 12(8), 2545-2554.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Bacher K, Vral A, De Neve W Thierens H (2006): "TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65(4), 1240-1248.
- Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR, Meyer L, Nahum A, Tait D, Yarnold J Horwich A (1999): "Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial." *The Lancet* 353(9149), 267-272.
- Dearnaley DP, Sydes MR, Graham JD, Aird EG, Bottomley D, Cowan RA, Huddart RA, Jose CC, Matthews JHL, Millar J, et al. (2007): "Escalated-dose versus standard-dose conformal radiotherapy in prostate cancer: first results from the MRC RT01 randomised controlled trial." *The Lancet Oncology* 8(6), 475-487.
- Denham JW, O'Brien PC, Dunstan RH, Johansen J, See A, Hamilton CS, Bydder S Wright S (1999): "Is there more than one late radiation proctitis syndrome?" *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 51(1), 43-53.
- Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S Schmidt-Ullrich R (2003): "Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways." *Radiat Res* 159(3), 283-300.
- (DGU): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Version 1.03 – März 2011. Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V. (Hrsg.). Deutsche Gesellschaft für Urologie, Düsseldorf 2011

- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R (1995): "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase." *J Biol Chem* 270(18), 10618-10624.
- Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, Walsh PC (1996): "Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up." *Am J Surg Pathol* 20(3), 286-292.
- Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL (2005): "The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma." *Am J Surg Pathol* 29(9), 1228-1242.
- Eton DT, Lepore SJ (2002): "Prostate cancer and health-related quality of life: a review of the literature." *Psycho-Oncology* 11(4), 307-326.
- Ewart-Toland A, Chan JM, Yuan J, Balmain A, Ma J (2004): "A Gain of Function TGFB1 Polymorphism May Be Associated With Late Stage Prostate Cancer." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13(5), 759-764.
- Fachal L, Gomez-Caamano A, Sanchez-Garcia M, Carballo A, Peleteiro P, Lobato-Busto R, Carracedo A, Vega A (2012): "TGFbeta1 SNPs and radio-induced toxicity in prostate cancer patients." *Radiother Oncol* 103(2), 206-209.
- Fietkau R, Rodel C, Hohenberger W, Raab R, Hess C, Liersch T, Becker H, Wittekind C, Hutter M, Hager E, et al. (2007): "Rectal cancer delivery of radiotherapy in adequate time and with adequate dose is influenced by treatment center, treatment schedule, and gender and is prognostic parameter for local control: results of study CAO/ARO/AIO-94." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67(4), 1008-1019.
- Fiorino C, Cozzarini C, Vavassori V, Sanguineti G, Bianchi C, Mauro Cattaneo G, Foppiano F, Magli A, Piazzolla A (2002): "Relationships between DVHs and late rectal bleeding after radiotherapy for prostate cancer: analysis of a large group of patients pooled from three institutions." *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 64(1), 1-12.
- Forsythe K, Blacksborg S, Stone N, Stock RG (2012): "Intensity-modulated radiotherapy causes fewer side effects than three-dimensional conformal radiotherapy when used in combination with brachytherapy for the treatment of prostate cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83(2), 630-635.
- Gallagher AJ, Neil JR, Schiemann WP (2006): "Role of transforming growth factor-beta in cancer progression." *Future Oncol* 2(6), 743-763.

- Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H (1988): "Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide." *Mol Cell Biol* 8(10), 4162-4168.
- Gleason DF (1996): "Undergrading of prostate cancer biopsies: a paradox inherent in all biologic bivariate distributions." *Urology* 47(3), 289-291.
- Gold LI (1999): "The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer." *Crit Rev Oncog* 10(4), 303-360.
- Gomis RR, Alarcon C, Nadal C, Van Poznak C, Massague J (2006): "C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells." *Cancer Cell* 10(3), 203-214.
- Grainger DJ (2007): "TGF-beta and atherosclerosis in man." *Cardiovasc Res* 74(2), 213-222.
- Grainger DJ, Kemp PR, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC (1994a): "Transforming growth factor beta decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cyclic AMP before entry into M phase." *Biochem J* 299 ( Pt 1), 227-235.
- Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC (1994b): "Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice." *Nature* 370(6489), 460-462.
- Gray AM, Mason AJ (1990): "Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly." *Science* 247(4948), 1328-1330.
- Guo Y, Jacobs SC, Kyprianou N (1997): "Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) type I and type II receptors in human prostate cancer." *International Journal of Cancer* 71(4), 573-579.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1), 57-70.
- Hanson B, MacDonald R, Shaikat A (2012): "Endoscopic and medical therapy for chronic radiation proctopathy: a systematic review." *Dis Colon Rectum* 55(10), 1081-1095.
- Hautmann R: *Urologie*. Springer Verlag, Heidelberg 2010.
- Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F (2008): "EAU guidelines on prostate cancer." *Eur Urol* 53(1), 68-80.
- Hellawell GO, Brewster SF (2002): "Growth factors and their receptors in prostate cancer." *BJU International* 89(3), 230-240.

- Hille A, Schmidberger H, Hermann RM, Christiansen H, Saile B, Pradier O, Hess CF (2005a): "A phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of misoprostol rectal suppositories to prevent acute radiation proctitis in patients with prostate cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63(5), 1488-1493.
- Hille A, Christiansen H, Pradier O, Hermann RM, Siekmeyer B, Weiss E, Hilgers R, Hess CF, Schmidberger H (2005b): "Effect of pentoxifylline and tocopherol on radiation proctitis/enteritis." *Strahlenther Onkol* 181(9), 606-614.
- Ignotz RA, Massagué J (1986): "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix." *Journal of Biological Chemistry* 261(9), 4337-4345.
- Ignotz RA, Massagué J (1987): "Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action." *Cell* 51(2), 189-197.
- Ignotz RA, Endo T, Massagué J (1987): "Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta." *J Biol Chem* 262(14), 6443-6446.
- Ilio KY, Sensibar JA, Lee C (1995): "Effect of TGF-beta 1, TGF-alpha, and EGF on cell proliferation and cell death in rat ventral prostatic epithelial cells in culture." *J Androl* 16(6), 482-490.
- Iuliano AD, Feingold E, Wahed AS, Kleiner DE, Belle SH, Conjeevaram HS, Zmuda J, Liang TJ, Yee LJ (2009): "Host genetics, steatosis and insulin resistance among African Americans and Caucasian Americans with hepatitis C virus genotype-1 infection." *Intervirology* 52(1), 49-56.
- Janke JH: Bedeutung genetischer Variabilität im TGFB-Signalweg für Gentranskription, Proteinbildung und Zellvitalität: Untersuchungen zur Wirkung therapeutischer Strahlendosis und des TGFβ1-Liganden. Med. Diss., Göttingen 2009.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin*.
- Jung H, Beck-Bornholdt HP, Svoboda V, Alberti W, Herrmann T (2001): "Quantification of late complications after radiation therapy." *Radiother Oncol* 61(3), 233-246.
- Kang D, Lee K-M, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang W-Y, Hayes RB (2007a): "Lack of Association of Transforming Growth Factor-β1 Polymorphisms and Haplotypes with Prostate Cancer Risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Trial." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16(6), 1303-1305.

- Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB (2007b): "Lack of association of transforming growth factor-beta1 polymorphisms and haplotypes with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian trial." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(6), 1303-1305.
- Kim IY, Ahn HJ, Zelner DJ, Park L, Sensibar JA, Lee C (1996a): "Expression and localization of transforming growth factor-beta receptors type I and type II in the rat ventral prostate during regression." *Molecular Endocrinology* 10(1), 107-115.
- Kim IY, Ahn HJ, Zelner DJ, Shaw JW, Lang S, Kato M, Oefelein MG, Miyazono K, Nemeth JA, Kozlowski JM, et al. (1996b): "Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues." *Clinical Cancer Research* 2(8), 1255-1261.
- Kim IY, Ahn HJ, Lang S, Oefelein MG, Oyasu R, Kozlowski JM, Lee C (1998): "Loss of expression of transforming growth factor-beta receptors is associated with poor prognosis in prostate cancer patients." *Clinical Cancer Research* 4(7), 1625-1630.
- Klotz L (2005): "Active Surveillance for Prostate Cancer: For Whom?" *Journal of Clinical Oncology* 23(32), 8165-8169.
- Kneebone A, Mameghan H, Bolin T, Berry M, Turner S, Kearsley J, Graham P, Fisher R, Delaney G (2001): "The effect of oral sucralfate on the acute proctitis associated with prostate radiotherapy: a double-blind, randomized trial." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 51(3), 628-635.
- Koper PC, Jansen P, van Putten W, van Os M, Wijnmaalen AJ, Lebesque JV, Levendag PC (2004): "Gastro-intestinal and genito-urinary morbidity after 3D conformal radiotherapy of prostate cancer: observations of a randomized trial." *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 73(1), 1-9.
- Koper PCM, Stroom JC, van Putten WLJ, Korevaar GA, Heijmen BJM, Wijnmaalen A, Jansen PP, Hanssens PEJ, Griep C, Krol ADG, et al. (1999): "Acute morbidity reduction using 3DCRT for prostate carcinoma: a randomized study." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 43(4), 727-734.
- Kuban DA, Tucker SL, Dong L, Starkschall G, Huang EH, Cheung MR, Lee AK, Pollack A (2008): "Long-Term Results of the M. D. Anderson Randomized Dose-Escalation Trial for Prostate Cancer." *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 70(1), 67-74.

- Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP Klein EA (2004): "Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy  $\geq$ 72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1–T2 prostate cancer." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58(1), 25-33.
- Landström M, Eklöv S, Colosetti P, Nilsson S, Damber J-E, Bergh A Funa K (1996): "Estrogen induces apoptosis in a rat prostatic adenocarcinoma: Association with an increased expression of TGF-  $\beta$ 1 and its type-I and type-II receptors." *International Journal of Cancer* 67(4), 573-579.
- Lange PH, Narayan P (1983): "Understaging and undergrading of prostate cancer. Argument for postoperative radiation as adjuvant therapy." *Urology* 21(2), 113-118.
- Leask A, Abraham DJ (2004): "TGF-beta signaling and the fibrotic response." *Faseb J* 18(7), 816-827.
- Li Z, Habuchi T, Tsuchiya N, Mitsumori K, Wang L, Ohyama C, Sato K, Kamoto T, Ogawa O Kato T (2004): "Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism at codon10." *Carcinogenesis* 25(2), 237-240.
- Lilleby W, Fosså SD, Wæhre HR Olsen DR (1999): "Long-term morbidity and quality of life in patients with localized prostate cancer undergoing definitive radiotherapy or radical prostatectomy." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 43(4): 735-743.
- Lohr F, Wenz F. *Strahlentherapie kompakt*. Elsevier Urban & Fischer, München 2007.
- Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, Baba H, Kohnoe S Sugimachi K (1999): "Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma." *J Clin Oncol* 17(2), 607-614.
- Martin M, Lefaix JL, Pinton P, Crechet F Daburon F (1993): "Temporal modulation of TGF-beta 1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation." *Radiat Res* 134(1), 63-70.
- Martin M, Lefaix J Delanian S (2000): "TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?" *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47(2), 277-290.
- Massague J (1990): "The transforming growth factor-beta family." *Annu Rev Cell Biol* 6, 597-641.

- McCammon KA, Kolm P, Main B Schellhammer PF (1999): "Comparative quality-of-life analysis after radical prostatectomy or external beam radiation for localized prostate cancer." *Urology* 54(3), 509-516.
- McNeal JE, Villers AA, Redwine EA, Freiha FS Stamey TA (1990): "Histologic differentiation, cancer volume, and pelvic lymph node metastasis in adenocarcinoma of the prostate." *Cancer* 66(6), 1225-1233.
- Michalski JM, Winter K, Purdy JA, Parliament M, Wong H, Perez CA, Roach M, Bosch W Cox JD (2005): "Toxicity after three-dimensional radiotherapy for prostate cancer on RTOG 9406 dose Level V." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 62(3), 706-713.
- Michel MS, Trojan L, Knoll T, Bross S Alken P (2003): "Bewährte und neue urologische Therapien des Prostatakarzinoms." *Der Radiologe* 43(6), 441-447.
- Michl U, Graefen M, Noldus J, Eggert T Huland H (2003): "Funktionelle Ergebnisse unterschiedlicher Operationstechniken der radikalen Prostatektomie." *Der Urologe A* 42(9), 1196-1202.
- Millet C Zhang YE (2007): "Roles of Smad3 in TGF-beta signaling during carcinogenesis." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 17(4), 281-293.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P Heldin CH (1991): "A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1." *Embo J* 10(5), 1091-1101.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, et al. (1999): "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." *Cell* 96(3), 319-328.
- Neheman A, Nativ O, Moskovitz B, Melamed Y Stein A (2005): "Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced haemorrhagic cystitis." *BJU International* 96(1), 107-109.
- Niu X, Li H, Chen Z, Liu Y, Kan M, Zhou D, Li Z, Ye X, Shen S, Lv C, et al. (2012): "A study of ethnic differences in TGFbeta1 gene polymorphisms and effects on the risk of radiation pneumonitis in non-small-cell lung cancer." *J Thorac Oncol* 7(11), 1668-1675.
- Norgaard P, Hougaard S, Poulsen HS Spang-Thomsen M (1995): "Transforming growth factor  $\beta$  and cancer." *Cancer Treatment Reviews* 21(4), 367-403.

- Ohashi T, Yorozu A, Toya K, Saito S, Momma T, Nagata H, Kosugi M (2007): "Rectal Morbidity Following I-125 Prostate Brachytherapy in Relation to Dosimetry." *Japanese Journal of Clinical Oncology* 37(2), 121-126.
- Oklu R, Hesketh R (2000): "The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family." *Biochem J* 352 Pt 3, 601-610.
- Oliai C, Fisher B, Jani A, Wong M, Poli J, Brady LW, Komarnicky LT (2012): "Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced cystitis and proctitis." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 84(3), 733-740.
- Oliveira IS, Pontes-Junior J, Abe DK, Crippa A, Dall'oglio MF, Nesralah AJ, Leite KR, Reis ST, Srougi M (2010): "Undergrading and understaging in patients with clinically insignificant prostate cancer who underwent radical prostatectomy." *Int Braz J Urol* 36(3), 292-299.
- Peeters STH, Heemsbergen WD, van Putten WLJ, Slot A, Tabak H, Mens JW, Lebesque JV, Koper PCM (2005): "Acute and late complications after radiotherapy for prostate cancer: Results of a multicenter randomized trial comparing 68 Gy to 78 Gy." *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 61(4), 1019-1034.
- Peeters STH, Lebesque JV, Heemsbergen WD, van Putten WLJ, Slot A, Dielwart MFH, Koper PCM (2006): "Localized volume effects for late rectal and anal toxicity after radiotherapy for prostate cancer." *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 64(4), 1151-1161.
- Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P (1988): "Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(4), 1105-1108.
- Perry KT, Anthony CT, Steiner MS (1997): "Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate." *Prostate* 33(2), 133-140.
- Peters CA, Stock RG, Cesaretti JA, Atencio DP, Peters S, Burri RJ, Stone NN, Ostrer H, Rosenstein BS (2008): "TGFB1 single nucleotide polymorphisms are associated with adverse quality of life in prostate cancer patients treated with radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70(3), 752-759.
- Pinto A, Fidalgo P, Cravo M, Midoes J, Chaves P, Rosa J, dos Anjos Brito M, Leitao CN (1999): "Short chain fatty acids are effective in short-term treatment of chronic

- radiation proctitis: randomized, double-blind, controlled trial." *Dis Colon Rectum* 42(6), 788-795; discussion 795-786.
- Pollack A, Zagars GK, Starkschall G, Antolak JA, Lee JJ, Huang E, von Eschenbach AC, Kuban DA, Rosen I (2002), "Prostate cancer radiation dose response: results of the M. D. Anderson phase III randomized trial." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 53(5): 1097-1105.
- Potters L, Klein EA, Kattan MW, Reddy CA, Ciezki JP, Reuther AM, Kupelian PA (2004): "Monotherapy for stage T1–T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation." *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 71(1), 29-33.
- (RKI/GEKID): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.v. (Hrsg.). Robert Koch-Institut, Berlin 2010.
- Roach M, 3rd, Hanks G, Thames H, Jr., Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H (2006): "Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65(4), 965-974.
- Rodriguez C, Freedland SJ, Deka A, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Thun MJ, Calle EE (2007): "Body mass index, weight change, and risk of prostate cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(1), 63-69.
- Röntgen WC (1896): "On a New Kind of Rays." *Science* 3(59), 227-231.
- Rustagi T, Mashimo H (2011): "Endoscopic management of chronic radiation proctitis." *World J Gastroenterol* 17(41), 4554-4562.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839), 487-491.
- Schirmer MA, Brockmoller J, Rave-Frank M, Virsik P, Wilken B, Kuhnle E, Campean R, Hoffmann AO, Muller K, Goetze RG, et al. (2011): "A putatively functional haplotype in the gene encoding transforming growth factor Beta-1 as a potential biomarker for radiosensitivity." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 79(3), 866-874.

- Schirmer MA, Mergler CP, Rave-Frank M, Herrmann MK, Hennies S, Gaedcke J, Conradi LC, Jo P, Beissbarth T, Hess CF, et al. (2012): "Acute toxicity of radiochemotherapy in rectal cancer patients: a risk particularly for carriers of the TGF $\beta$ 1 Pro25 variant." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83(1), 149-157.
- Seegenschmiedt MH, Müller R-P, Höffken K, Junginger T Sauer H (2000): "LENT-SOMA-Kriterien: Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapiefolgen in der Onkologie." *Dtsch Arztebl International* 97(37), 2395-.
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA Massague J (2004): "Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation." *Cell* 117(2), 211-223.
- Shi Y Massague J (2003): "Mechanisms of TGF $\beta$ -signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* 113(6), 685-700.
- Shrader-Bogen CL, Kjellberg JL, McPherson CP Murray CL (1997): "Quality of life and treatment outcomes." *Cancer* 79(10), 1977-1986.
- Smit WGJM, Helle PA, Van Putten WLJ, Wijnmaalen AJ, Seldenrath JJ Van Der Werf-Messing BHP (1990): "Late radiation damage in prostate cancer patients treated by high dose external radiotherapy in relation to rectal dose." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 18(1), 23-29.
- Soulitzis N, Karyotis I, Delakas D Spandidos DA (2006): "Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF $\beta$ 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia." *Int J Oncol* 29(2), 305-314.
- Stanford JL, Feng Z, Hamilton AS, Gilliland FD, Stephenson RA, Eley JW, Albertsen PC, Harlan LC Potosky AL (2000): "Urinary and Sexual Function After Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 283(3), 354-360.
- Stokes SH (2000): "Comparison of biochemical disease-free survival of patients with localized carcinoma of the prostate undergoing radical prostatectomy, transperineal ultrasound-guided radioactive seed implantation, or definitive external beam irradiation." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 47(1), 129-136.
- Storey MR, Pollack A, Zagars G, Smith L, Antolak J Rosen I (2000): "Complications from radiotherapy dose escalation in prostate cancer: preliminary results of a randomized trial." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 48(3), 635-642.

- Taylor JD, Holmes TM Swanson GM (1994): "Descriptive epidemiology of prostate cancer in metropolitan Detroit." *Cancer* 73(6), 1704-1707.
- Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL Rowley DA (1990): "A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4), 1486-1490.
- Trotti A, Byhardt R, Stetz J, Gwede C, Corn B, Fu K, Gunderson L, McCormick B, Morris M, Rich T, et al. (2000): "Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on radiotherapy." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 47(1), 13-47.
- Truong LD, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT Thompson TC (1993): "Association of transforming growth factor- $\beta$ 1 with prostate cancer: An immunohistochemical study." *Human Pathology* 24(1), 4-9.
- Vozenin-Brotans MC, Gault N, Sivan V, Tricaud Y, Dubray B, Clough K, Cosset JM, Lefaix JL Martin M (1999): "Histopathological and cellular studies of a case of cutaneous radiation syndrome after accidental chronic exposure to a cesium source." *Radiat Res* 152(3), 332-337.
- Wachter S, Gerstner N, Goldner G, Pötzi R, Wambersie A Pötter R (2001): "Rectal sequelae after conformal radiotherapy of prostate cancer: dose-volume histograms as predictive factors." *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 59(1), 65-70.
- Wahlgren T, Nilsson S, Lennernäs B Brandberg Y (2007): "Promising Long-Term Health-Related Quality of Life After High-Dose-Rate Brachytherapy Boost for Localized Prostate Cancer." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 69(3), 662-670.
- Whitmore WF, Jr., Hilaris B Grabstald H (1972): "Retropubic implantation to iodine 125 in the treatment of prostatic cancer." *J Urol* 108(6), 918-920.
- Wilson JD, Griffin JE Russell DW (1993): "Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency." *Endocr Rev* 14(5), 577-593.
- Wilson KM, Kasperzyk JL, Rider JR, Kenfield S, van Dam RM, Stampfer MJ, Giovannucci E Mucci LA (2011), "Coffee Consumption and Prostate Cancer Risk and Progression in the Health Professionals Follow-up Study." *Journal of the National Cancer Institute.*

- Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC, Samuni AM, Felici A, Reiss M, Yarkoni S, et al. (2004): "Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone." *J Biol Chem* 279(15), 15167-15176.
- Yoshida T, Kawashima A, Ujike T, Uemura M, Nishimura K Miyoshi S (2008): "Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced hemorrhagic cystitis." *International Journal of Urology* 15(7), 639-641.
- Yuan X, Liao Z, Liu Z, Wang LE, Tucker SL, Mao L, Wang XS, Martel M, Komaki R, Cox JD, et al. (2009): "Single nucleotide polymorphism at rs1982073:T869C of the TGFbeta 1 gene is associated with the risk of radiation pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiotherapy." *J Clin Oncol* 27(20), 3370-3378.
- Zapatero A, García-Vicente F, Modolell I, Alcántara P, Floriano A, Cruz-Conde A, Torres JJ Pérez-Torrubia A (2004): "Impact of mean rectal dose on late rectal bleeding after conformal radiotherapy for prostate cancer: Dose–volume effect." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 59(5), 1343-1351.
- Zeleftsky MJ, Levin EJ, Hunt M, Yamada Y, Shippy AM, Jackson A Amols HI (2008): "Incidence of Late Rectal and Urinary Toxicities After Three-Dimensional Conformal Radiotherapy and Intensity-Modulated Radiotherapy for Localized Prostate Cancer." *International journal of radiation oncology, biology, physics* 70(4), 1124-1129.
- Zincke H, Oesterling JE, Blute ML, Bergstralh EJ, Myers RP Barrett DM (1994): "Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (stage T2c or lower) prostate cancer." *J Urol* 152(5 Pt 2), 1850-1857.

## Danksagung

Aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. A. Hille bedanken. Sie hat es mir ermöglicht, meine Promotion über dieses spannende Thema unter ihrer Leitung zu absolvieren. Ich danke für ihre enge Betreuung, freundliche Anleitung, präzise Zielsetzung und stets zeitnahe Rückmeldung bei immer wieder aufkommenden Fragen im Entstehungsprozess der Promotion.

Mein Dank gilt dem ganzen Team der strahlenbiologischen Forschung, hier insbesondere der Leitung, Frau Dipl. Biol. M. Rave-Fränk. Ihre kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript sowie ihre Begeisterung für strahlentherapeutische Fragestellungen haben mir sehr weitergeholfen. Frau A. Bitter, Frau J. Karsten-Krapp und Frau S. Hoffmann danke ich für Hilfe in der Akquisition der Patienten sowie Laborassistenten.

Aus der Abteilung Klinische Pharmakologie gilt mein tiefer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Schirmer, M.Sc., für die Anleitung in die für diese Promotion erforderlichen Laborarbeiten, die zeitintensive Auswertung der Ergebnisse, die gemeinsame Erstellung der Statistiken sowie die sehr fruchtbare Diskussion der Niederschrift. Sein wissenschaftlich-kritischer Blick hat die Qualität dieser Arbeit immens befruchtet.

Frau C. P. N. Mergler, Ärztin und Doktorandin, danke ich ebenfalls für die intensive und freundschaftliche Betreuung in der Phase des experimentellen Teils der Promotion.