

**Aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie  
(Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C. F. Hess)**

**der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

---

EINFLUSS VON KEIMBAHN-POLYMORPHISMEN IN GENEN DES TGF $\beta$ -SIGNALWEGS  
UND DER DNA-REPARATUR AUF DIE STRAHLENEMPFINDLICHKEIT  
HUMANER LYMPHOBLASTOIDER ZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Karin Maria Brinkmann, geb. Gerdemann

aus

Osnabrück

Göttingen 2016

**Dekan:**

**Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

**I. Berichtstatter:**

**PD Dr. med. H. A. Wolff**

**II. Berichtstatter/in:**

**PD Dr. med. M. Schirmer**

**III. Berichtstatter/in:**

**Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**13.03.2017**

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Bedeutung des TGF<math>\beta</math>-Signalwegs</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Komponenten des TGF $\beta$ -Signalwegs.....	3
1.1.2 Inhibition des TGF $\beta$ -Signalwegs durch den Antikörper .....	5
<b>1.2 DNA-Reparatur</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Reparatur von Einzelstrangbrüchen und Basenschäden .....	6
1.2.1.1 Basen-Exzisionsreparatur (BER).....	6
1.2.1.2 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) .....	7
1.2.1.3 <i>Mismatch</i> -Reparatur .....	7
1.2.2 Reparatur von Doppelstrangbrüchen .....	8
1.2.2.1 Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) .....	8
1.2.2.2 Homologe Rekombinationsreparatur (HRR).....	8
<b>1.3 Das internationale HapMap-Projekt</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Material</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Chemikalien</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Medien</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4 Geräte</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5 Zubehör</b> .....	<b>16</b>
<b>2.6 Software</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Kultur der lymphoblastoiden Zellen</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Zellvitalitätsmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS)</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Bioinformatik</b> .....	<b>22</b>

---

<b>3.4 Statistische Auswertung</b> .....	23
<b>4 Ergebnisse</b> .....	25
<b>4.1 Röntgenstrahlung und TGFβ1-System in Bezug auf Zellvitalität</b> .....	25
<b>4.2 Röntgenstrahlung und TGFβ1-System in Bezug auf ROS-Bildung</b> .....	26
<b>4.3 Beziehung zwischen ROS-Bildung und Zellvitalität</b> .....	26
<b>4.4 Auswahl der Genloci für die Assoziationsanalysen mit den Funktionsmessungen</b> 27	
4.4.1 Kandidatengene .....	27
4.4.2 Charakteristika der Genloci .....	28
<b>4.5 Analyse der Kandidatengene im TGFβ-Signalweg</b> .....	31
4.5.1 TGFBR1 .....	31
4.5.2 Analyse des SMAD2-Gens.....	31
4.5.3 Analyse des SMAD3-Gens.....	32
4.5.4 Analyse des SMAD7-Gens.....	35
<b>4.6 Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen</b> .....	39
4.6.1 Analyse des BRCA2-Gens .....	39
4.6.2 Analyse des MSH2-Gens.....	42
4.6.3 Analyse des MSH6-Gens.....	43
4.6.4 Analyse des XRCC1-Gens .....	45
<b>4.7 Zusammenfassende Betrachtung</b> .....	47
<b>5 Diskussion</b> .....	50
<b>5.1 TGFBR1</b> .....	50
<b>5.2 SMAD2</b> .....	52
<b>5.3 SMAD 3</b> .....	53
<b>5.4 SMAD7</b> .....	55
<b>5.5 BRCA2</b> .....	57
<b>5.6 MSH2</b> .....	58
<b>5.7 MSH6</b> .....	60
<b>5.8 XRCC1</b> .....	61
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	63
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	66

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TGF $\beta$ -induzierte Prozesse.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF $\beta$ -Signalwegs .....	4
Abbildung 3: Effekte unterschiedlicher Behandlungen auf die Vitalität von LCL.....	25
Abbildung 4: ROS-Bildung durch unterschiedliche Behandlungen.....	26
Abbildung 5: Zusammenhang zwischen ROS und Vitalität bei anti-TGF $\beta$ und 3 Gy.....	27
Abbildung 6: Flussdiagramm zur Auswahl der Kandidatengene.....	28
Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung aller analysierter polymorpher Genloci .....	29
Abbildung 8: Effekte von 3 Gy in Abhängigkeit von TGFBR1 rs7031302.....	31
Abbildung 9: Modulation der anti-TGF $\beta$ -Wirkung durch SMAD2 rs1792658.....	32
Abbildung 10: Punktediagramm zur Darstellung von nominalen statistischen Signifikanzniveaus und dazugehöriger LD-Plot .....	33
Abbildung 11: SNP rs7162912 und Zellvitalität nach Bestrahlung und TGF $\beta$ 1.....	34
Abbildung 12: Zytotoxizität von 3 Gy in Abhängigkeit von SMAD3 rs17293408.....	35
Abbildung 13: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im SMAD7-Gen mit LD-Plot.....	36
Abbildung 14: Einfluss von SMAD7 rs6507876 auf Zytotoxizität durch 3 Gy .....	38
Abbildung 15: Modulation des TGF $\beta$ -Systems durch SMAD7 rs1873191 .....	39
Abbildung 16: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im BRCA2-Gen mit LD-Plot.....	40
Abbildung 17: SNP rs206119 des BRCA2-Gens und Zellvitalität nach Bestrahlung und Stimulation mit TGF $\beta$ 1 .....	41
Abbildung 18: Einflüsse auf die Zellvitalität am SNP rs1863332 des MSH2-Gens bei Vorliegen des Wildtyps TT und des Variantenallels TG .....	42
Abbildung 19: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im MSH6-Gen mit LD-Plot.....	43
Abbildung 20: SNP rs1800937 des MSH6-Gens und Zellvitalität nach alleiniger Bestrahlung, additiver vorheriger Hemmung durch anti-TGF $\beta$ , sowie durch vorherige bzw. nachträgliche Stimulation durch TGF $\beta$ .....	45
Abbildung 21: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im XRCC1-Gen mit LD-Plot.....	46
Abbildung 22: SNP rs3213263 in XRCC1 und Zellvitalität nach anti-TGF $\beta$ .....	47
Abbildung 23: Reproduzierbarer Effekt von SMAD3 rs17293408 auf die Zellvitalität nach Bestrahlung .....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	13
Tabelle 2: Puffer und Lösungen .....	14
Tabelle 3: Geräte .....	15
Tabelle 4: Zubehör .....	16
Tabelle 5: Software.....	17
Tabelle 6: Anzahl und Art der analysierten polymorphen Positionen in den untersuchten Genen.....	30
Tabelle 7: Strahleninduzierte Abnahme der Zellvitalität in Abhängigkeit multipler Genpolymorphismen .....	48
Tabelle 8: Einfluss multipler Varianten auf Zellvitalität durch Behandlung mit TGFβ1 vor Bestrahlung mit 3 Gy in Bezug zur Kontrolle.....	48
Tabelle 9: Einfluss multipler Varianten auf Zellvitalität durch Bestrahlung mit 3 Gy und unmittelbar nachfolgender Zugabe von TGFβ1 in Bezug zur Kontrolle .....	49
Tabelle 10: Einfluss multipler Varianten auf Zellvitalität durch anti-TGFβ und 3 Gy in Bezug zur Kontrolle .....	49

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i> , Genname
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i> , Genname
BLZ	binukleäre Zellen
C	Cytosin
CSA/B	<i>Cockayne-syndrome A/B</i> , Genname
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i> , Bindegewebswachstumsfaktor
DCFH	Dichlorofluoreszin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ERCC2	<i>excision repair cross-complementing, complementation group 2</i> , Genname
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälber-Serum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
G	Guanin
G1/G2 Phase	<i>gap 1/ gap 2</i> Phase
Gy	Gray
HRR	Homologe Rekombinationsreparatur
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> , hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
K	Kontrollprobe

---

kb	Kilobase(n)
K-it	Probe: Kontrolle + anti-TGF $\beta$
LCL	<i>lymphoblastoid cell line</i> , lymphoblastoide Zelllinie
LD	<i>linkage disequilibrium</i> , Kopplungsungleichgewicht
LIG1	DNA ligase 1, Genname
MLH1	<i>mutL homolog of E.coli 1</i> , Genname
MSH2/6	<i>mutS homolog of E.coli 2/6</i> , Genname
NBN	<i>nibrin</i> , Genname
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> , nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung
NSCLC	<i>non-small-cell lung carcinoma</i> , nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2</i> , Genname
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , phenylmethylsulfonyl Fluorid
PRKDC	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i> , Genname
RAD 50	<i>RAD50 homolog</i> , Genname
R	bestrahlte Probe
RNA	<i>ribonucleid acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
R-Ta	Probe: TGF $\beta$ 1 16 h vor ( <i>ante</i> ) Bestrahlung + Bestrahlung
R-Tp	Probe: Bestrahlung + TGF $\beta$ 1 16 h nach ( <i>post</i> ) Bestrahlung

---

SARA	<i>SMAD anchor for receptor activation</i>
SMAD2/3/7	<i>mother against decapentaplegic homolog of drosophila 2/3/7, Gennamen</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus</i>
S-Phase	Synthese-Phase
T	Thymin
TB	Trypanblau
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGF $\beta$ 1	<i>transforming growth factor beta 1, Gennamen</i>
TGFBR1/ 2	<i>transforming growth factor beta receptor 1/2, Gennamen</i>
TP53	Tumorprotein 53, Gennamen
v/v	<i>volume per volume (Volumen pro Volumen)</i>
XPA-XPG	Xeroderma Pigmentosum A-G, Gennamen
XRCC1/4/5	<i>x-ray repair cross-complementing in chinese hamster cells 1/4/5, Gennamen</i>

# 1 Einleitung

Die Behandlung von bösartigen Tumorerkrankungen mit ionisierenden Strahlen ist integraler Bestandteil der modernen Onkologie. Seit dem Beginn des 20. Jahrhunderts kennt man den Effekt von ionisierenden Strahlen auf Tumorgewebe und macht ihn sich bei der Behandlung von Tumoren zu Nutze (Scherer 1995). Prinzipiell beeinflussen ionisierende Strahlen alle Körperzellen durch Ionisation und Anregung ihrer Moleküle, wobei die zelluläre DNA als das empfindlichste Molekül angesehen wird. Entstandene Schäden wie Basenschäden, Einzelstrangbrüche oder Doppelstrangbrüche können komplexe Signalwege aktivieren, an denen eine Vielzahl von Proteinen bzw. Genen beteiligt sind. Deren Zusammenspiel und Regulation entscheidet letztendlich darüber, ob eine Zelle den Strahlenschaden reparieren wird oder ob es infolge falsch oder nicht reparierter Schäden zu Mutationen oder zum Zelluntergang kommt (Thompson 2012). Letzterer ist das erwünschte Resultat einer Tumorbestrahlung, kann aber auch zu unerwünschten Nebenwirkungen im gesunden Gewebe führen (Rosen et al. 1999).

Zahlreiche Gene, die für verschiedene Proteine an der Verarbeitung strahleninduzierter Schäden beteiligt sind, konnten bereits identifiziert werden. Dazu gehören Gene der Basen- und der Nukleotid-Exzisionsreparatur, der Doppelstrangbruchreparaturen NHEJ und HRR (Dhillon et al. 2011; Lagerwerf et al. 2011) aber auch Gene verschiedener Signalwege, wie z.B. der TGF $\beta$ -Signalweg (Li H et al. 2009, Wang M et al. 2013; Zhang M et al. 2011).

In Kooperationsprojekten der Abteilungen Klinische Pharmakologie, Strahlentherapie und Radioonkologie wurden in den letzten Jahren Interaktionen zwischen dem TGF $\beta$ -Signalweg und der DNA-Schadensverarbeitung identifiziert und Einflüsse genetischer Variationen im TGF $\beta$ -Signalweg auf die Strahlenantwort analysiert. Mittels einer an Kandidatengen orientierten hypothesengetriebenen Vorgehensweise wurde der Einfluss der genetischen Variabilität auf die Funktion des TGF $\beta$ -Signalwegs eingehend untersucht. Die phänotypische Charakterisierung umfasste dabei Analysen über Genexpression (mRNA und Protein), Zellvitalität und Chromosomen-Aberrationen. Dabei zeigten sich für Marker im TGF $\beta$ RI-Gen Zusammenhänge mit der SMAD3-Expressionsregulation und der Strahlensensibilität (Schirmer et al. 2009). In einer weiteren Studie konnte ein hypofunktioneller TGF $\beta$ 1-Haplotyp identifiziert werden, der mit einer geringeren TGF $\beta$ 1-Plasmakonzentration, weniger TGF $\beta$ 1-Freisetzung bestrahlter Zellen, weniger Chromosomenaberrationen und einer reduzierten Zellapoptose nach Bestrahlung einherging (Schirmer et al. 2011).

## 1.1 Bedeutung des TGF $\beta$ -Signalwegs

Das Zytokin Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) und sein zugehöriger Signalweg sind von zentraler Bedeutung in der Proliferation und Differenzierung von Zellen und Geweben. TGF $\beta$  spielt so z.B. eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, bei der Immunreaktion, bei der Angiogenese, bei Heilungsprozessen, bei Bildung von extrazellulärer Matrix, bei Zellmotilität, Adhäsion und auch bei der Einleitung der Apoptose (Dancea et al. 2009; Dennler et al. 2002; Korpál und Kang 2010; Massagué 2008). So wird ein Zusammenhang des TGF $\beta$ -Signalwegs mit der Pathogenese vieler Erkrankungen gesehen (hier seien nur einige Beispiele genannt): Brustkrebs (Massagué 2008), Pankreaskarzinome und kolorektale Karzinome (Korpál und Kang 2010), erhöhtes Risiko für Hirnmetastasen bei NSCLC (Li Q et al. 2012) sowie Erkrankungen wie Arteriosklerose (Gonzalez-Ramos et al. 2013), Marfan-Syndrom (Sawaki und Suzuki 2013; Yuan et al. 2011), COPD (Celedon et al. 2004).

Der TGF $\beta$ -Signalweg wirkt durch seine regulierende Funktion in frühen Stadien der Tumorentstehung in erster Linie tumorsuppressiv. Jedoch nutzen Tumorzellen die modulierende Wirkung von TGF $\beta$  auf Prozesse wie Zellinvasion oder Zellregulation auch zu ihren Gunsten aus, so dass es im Verlauf zu einer onkogenen Wirkung kommen kann (Dancea et al. 2009; Dennler et al. 2002).

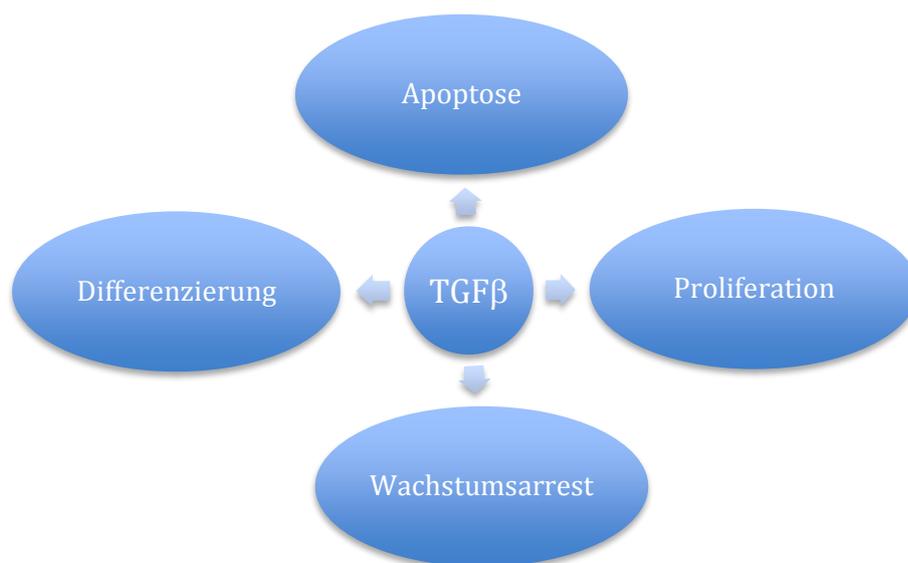


Abbildung 1: TGF $\beta$ -induzierte Prozesse.

### 1.1.1 Komponenten des TGF $\beta$ -Signalwegs

An der Transduktion im TGF $\beta$ -Signalweg sind Liganden, Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle beteiligt, wobei TGF $\beta$  die Funktion des Liganden hat. In der extrazellulären Matrix eingelagert, kann die latente Vorläuferform nach Bedarf durch Proteasen gespalten und dadurch aktiviert werden. Es sind drei Isoformen von TGF $\beta$  bekannt. TGF $\beta$ 1 ist die häufigste ubiquitär exprimierte Isoform. Dieses wird in verschiedenen Geweben exprimiert, vor allem in Endothel, in Bindegewebe und in hämatopoetischen Zellen. Von den verschiedenen Isoformen ist hauptsächlich TGF $\beta$ 1 im zirkulierenden Blut des Menschen von Bedeutung (Cornelini et al. 2003; Dennler et al. 2002; Kubiczkova et al. 2012; Massague 1998; Schmierer und Hill 2007). Daher wurde diese Isoform auch für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Als Rezeptoren dienen zwei Gruppen von Transmembranproteinen: TGF $\beta$ RI (bisher sieben verschiedene Subtypen bekannt) und TGF $\beta$ RII (bisher fünf verschiedene Subtypen bekannt) (Massague und Gomis 2006; Schmierer und Hill 2007). Die Signaltransduktion und Transkriptionsmodulation wird durch SMAD-Proteine gewährleistet. Hier sind die regulatorisch, inhibitorisch sowie co-aktivatorisch wirkenden SMAD-Proteine voneinander zu unterscheiden (Wu et al. 2010).

Hier sei nun im Folgenden die am häufigsten relevante Form des TGF $\beta$ -Signalwegs erläutert, wobei es zu bedenken gilt, dass auch andere Liganden diesen Signalweg aktivieren können bzw. die genannten Liganden auch andere Funktionen haben können.

Zunächst kommt es zur Bindung des Liganden TGF $\beta$ 1 an den hochaffinen Rezeptor TGF $\beta$ RII. Konsekutiv rutscht der TGF $\beta$ RI in topografische Nähe des TGF $\beta$ RII. Es kommt zur Komplexbindung der beiden Rezeptoren mit dem Liganden. TGF $\beta$ RII aktiviert durch Phosphorylierung TGF $\beta$ RI. Durch Phosphorylierung der rezeptorregulierten SMAD (R-SMAD) 2 und 3 werden auch die R-SMAD 1, 5 und 8 aktiviert. Im Grundzustand sind SMAD2 und SMAD3 im Zytoplasma lokalisiert, wo sie durch Bindung an bestimmte Proteine wie z.B. SARA (*SMAD anchor for receptor activation*) blockiert werden. Die TGF $\beta$ RI-vermittelte Phosphorylierung mindert die Affinität der SMAD zu SARA und bewirkt die Interaktion mit dem Kofaktor SMAD4. Es wird ein heterooligomerer Komplex gebildet, der in den Zellkern transloziert und mit Hilfe verschiedener Kofaktoren mit hoher Spezifität und Affinität die Gentranskription reguliert (Korpal und Kang 2010; Tsukazaki et al. 1998).

Durch diese kombinierte Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren kann ein TGF $\beta$ -Stimulus hunderte von Zielgenen aktivieren oder unterdrücken (Massague 2008).

Inhibitorische SMAD-Moleküle können durch kompetitiven Antagonismus bei Phosphorylierung von SMAD2 bzw. SMAD3 eine Signalhemmung hervorrufen. Das System ist also nicht nur in der Lage, die Genexpression zu regulieren, sondern über eine negative Rückkopplung auch sich selbst. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Behandlung mononukleärer Leukozyten mit TGF $\beta$  zu einer verminderten Transkription des SMAD3-Gens führt (Schirmer et al. 2009).

Ein Tumor hat verschiedene Ansatzpunkte, die tumorsuppressive Wirkung des TGF $\beta$ -Signalwegs auszuschalten. Der TGF $\beta$ -Signalweg kann entweder durch rezeptorinaktivierende Mutationen gehemmt werden, was sich z.B. kolorektale Karzinome zu Nutze machen durch Mutation des TGF $\beta$ RII oder durch selektives Ausschalten des tumorsuppressiven Arms des Signalwegs, was bei der Entstehung von Brustkrebs relevant ist (Massague 2008).

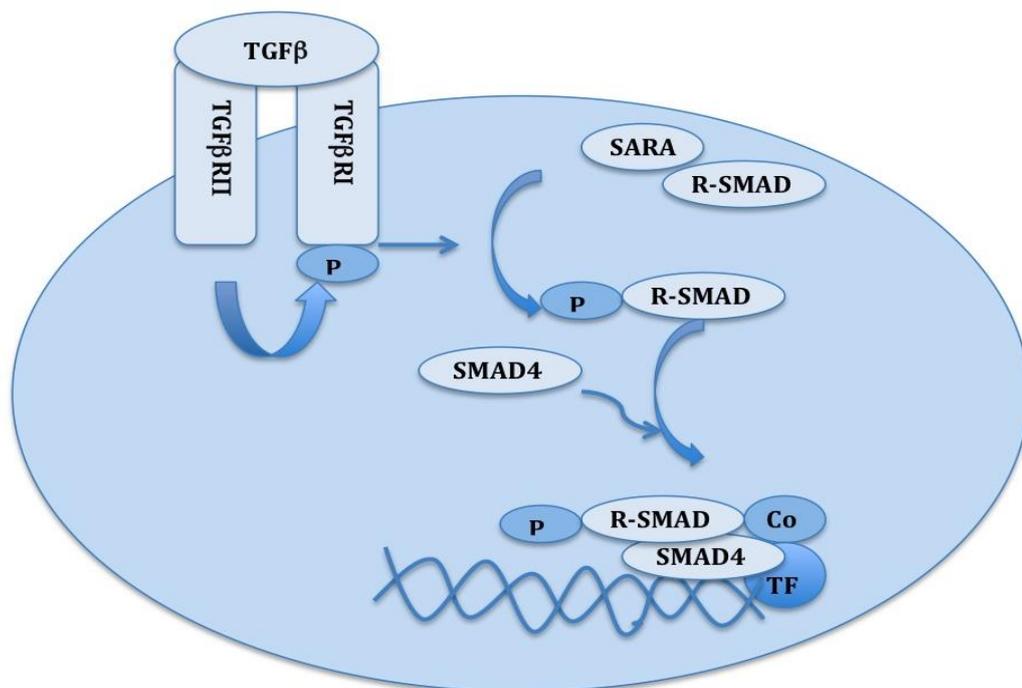


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TGF $\beta$ -Signalwegs. Der TGF $\beta$ -Signalweg (modifiziert nach Siegel und Massague 2003). TGF $\beta$ 1 bindet an TGF $\beta$ RII und bewirkt die Rekrutierung und Phosphorylierung von TGF $\beta$ RI. Der aktivierte TGF $\beta$ RI phosphoryliert die Rezeptor-assoziierten R-SMAD (SMAD2/3), die dadurch von ihrem zytoplasmatischen Anker (SARA) befreit werden und zusammen mit SMAD4 in den Kern translozieren. SMAD-Proteine interagieren mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (TF) und Kofaktoren (Co), um die Genexpression zu regulieren.

### 1.1.2 Inhibition des TGF $\beta$ -Signalwegs durch den Antikörper

Es wurden einige Inhibitoren der verschiedenen Komponenten des TGF $\beta$ -Signalwegs entwickelt und präklinisch getestet. Diese lassen sich in drei Klassen einteilen. Zum einen seien hier die Ligandenfallen genannt, zu denen monoklonale TGF $\beta$ -neutralisierende Antikörper und lösliche T $\beta$ RII und T $\beta$ RIII gehören (z.B. 2G7, 1D11, GC1008). Die zweite Klasse besteht aus dem Antisense-Molekül-vermittelten *Silencing* der TGF $\beta$ -Liganden (z.B. AP12009). Die dritte Möglichkeit, den TGF $\beta$ -Signalweg zu hemmen, ist der Einsatz von *small molecule*-basierten T $\beta$ RI Kinase-Inhibitoren (z.B. SD208, LY2157299) (Korpal und Kang 2010). In dieser Arbeit wurde die Strategie des neutralisierenden Antikörpers 1D11 genutzt. Dieser ist in der Lage, alle drei Isoformen des TGF $\beta$ -Liganden zu binden und auf diese Weise deren biologische Aktivität zu reduzieren.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine intraperitoneale Gabe des Ligandenfängers 2G7 beispielsweise ein intraabdominales Tumorgebilde supprimieren kann (Arteaga et al. 1993; Korpal und Kang 2010). Basierend auf dem Wissen, dass TGF $\beta$  eine starke immunsuppressive Wirkung ausübt, könnte sich eine Inhibition des TGF $\beta$ -Signalwegs positiv auf die Therapie verschiedener Tumorerkrankungen beispielsweise des Glioms, des Melanoms oder des Nierenzellkarzinoms auswirken. Doch sind auch tumorspezifische Vorteile durch die Blockade des TGF $\beta$ -Signalwegs nicht auszuschließen (Massague 2008). Darüber hinaus wäre denkbar, dass eine längere Behandlung mittels TGF $\beta$ -Inhibitoren Defekte des Immunsystems zur Folge hätte. Eine exakte Dosisanpassung ist anzustreben, um Funktionen, die durch überschießende pathologische TGF $\beta$ -Bildung entstehen, zu hemmen bei gleichzeitigem Erhalt der physiologisch notwendigen TGF $\beta$ -Funktionen (Korpal und Kang 2010).

## 1.2 DNA-Reparatur

Die DNA einer Zelle ist als Makromolekül sehr empfindlich gegenüber exogenen und endogenen Einflüssen. So können Veränderungen in ihrer Struktur z.B. durch mutagene Substanzen, thermischen Stress, natürliche und zivilisatorische ionisierende Strahlung oder auch endogen durch spontane Fehler während der DNA-Replikation, durch mangelhafte DNA-Reparatur oder durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen werden. Da im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit besonders die Auswirkungen der Röntgenstrahlung auf die DNA von Bedeutung ist, sei hierauf kurz näher eingegangen. Ionisierende Strahlung induziert verschiedenste Schäden in der DNA. Nach Bestrahlung mit 1 Gy können in der Zelle 4000-5000

DNA-Schäden festgestellt werden. Am häufigsten kommt es zu Basenschäden (1000-3000/Zelle) und Einzelstrangbrüchen (1000/Zelle). Die Anzahl der Doppelstrangbrüche liegt nach dieser Dosis bei etwa 20-40 pro Zelle (Dahm-Daphi et al. 2000; Löbrich et al. 1995; Rogakou et al. 1998; Ward 1988).

Im Rahmen der Zellzykluskontrolle können Kontrollproteine eine Zelle bzw. deren DNA als defekt erkennen und einen Zyklusarrest oder eine Apoptose einleiten.

Während der Evolution hat die Zelle verschiedene Methoden entwickelt, um Schäden in der DNA zu erkennen, nach Möglichkeit zu reparieren und zu verhindern, dass diese an die folgende Generation weitergegeben werden. So soll die genomische Integrität durch Zellteilung und Weitergabe von Merkmalen gewährleistet werden. Eine gewisse Variabilität und Mutationen in Kombination mit sexueller Fortpflanzung bilden gleichzeitig die Voraussetzung für die Evolution. Mutationen und Krebserkrankungen können einerseits durch DNA-Reparatur verhindert, andererseits aber auch durch fehlerhafte Reparatur (Läsionstoleranz) bewirkt werden. Verschiedene Mausmodelle zeigen, dass Fehler während der DNA-Reparatur genomische Instabilität verursachen (Ferguson und Alt 2001).

Ist der Defekt nicht mehr zu beheben, bevor die Zelle in die Mitose geht, gibt es die Möglichkeit, die Apoptose einzuleiten.

## **1.2.1 Reparatur von Einzelstrangbrüchen und Basenschäden**

### **1.2.1.1 Basen-Exzisionsreparatur (BER)**

Die BER stellt den am häufigsten genutzten Reparaturweg der DNA dar. Modifizierte Basen werden in einem mehrstufigen Prozess, der durch substratspezifische DNA-Glykosylasen eingeleitet wird, repariert. Bisher sind 11 unterschiedliche DNA-Glykosylasen in humanen Zellen bekannt (Friedberg et al. 2006; Gros et al. 2002).

Nach Erkennung der fehlerhaften Base wird die n-glykosidische Bindung zwischen Base und Desoxyribose gespalten. An dieser Stelle entsteht eine AP-Stelle. Durch eine AP-Endonuklease wird das Zwischenstück prozessiert, um in weiteren Etappen die DNA-Synthese und die Ligation durchführen zu können, so dass wieder die korrekte Basensequenz vorliegt (Amouroux et al. 2010; Hoeijmakers 2001).

Es gibt zwei Varianten der BER. 80-90% aller Reparaturprozesse erfolgen mittels *short patch repair*. In diesem Fall wird nur ein einzelnes Nukleotid ersetzt. Beim *long patch repair* erfolgt

der Austausch von zwei bis zehn Nukleotiden (Robertson et al. 2009). Beteiligte Proteine sind u.a. XRCC1 und LIG1.

#### 1.2.1.2 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Mittels NER werden verschiedene Läsionen repariert. Hierzu zählen z.B. *crosslinks* innerhalb der DNA-Stränge oder grobe DNA-Läsionen. Das gemeinsame Charakteristikum der Schäden, die von der NER erkannt werden, ist eine Deformierung der DNA-Doppelhelix (Hess et al. 1997). Das Ziel der NER ist die beidseitige Entfernung eines Nukleotidschadens im DNA-Strang. Dabei können herausgeschnittene Anteile bis zu 32 Nukleotide lang sein. Die hierdurch verursachte Lücke wird durch eine DNA-Polymerase geschlossen. Der neu entstandene DNA-Abschnitt wird nachfolgend durch Ligatur eingefügt (Batty und Wood 2000). Man unterscheidet zwei Wege der NER. Zum einen *global genome repair*, welcher Reparaturen an Bereichen der DNA vornimmt, die nicht transkribiert werden. Zum anderen gibt es den *transcription coupled repair*. Dieser übernimmt die Korrektur von Schäden in Bereichen des Genoms, die transkribiert werden (Feng et al. 2003; Mellon et al. 1987).

An diesem Reparaturmechanismus sind u.a. die Gene ERCC1/2, CSA/B und XRCC1 beteiligt. Mutationen, welche die CSA/B Gene betreffen, führen zur Ausbildung des Krankheitsbildes Cockayne-Syndrom. Mutationen betreffend die XPA-XPG-Familie, führen zur Ausbildung des Krankheitsbildes Xeroderma pigmentosum. Bei Xeroderma pigmentosum ist das Hautkrebsrisiko erhöht, was auf die Wichtigkeit einer funktionierenden DNA-Reparatur nach UV-Bestrahlung hinweist. Polymorphismen im XRCC1-Protein sind mit einem erhöhten Vorkommen von Krebserkrankungen assoziiert (Price et al. 1997).

#### 1.2.1.3 Mismatch-Reparatur

DNA-Mismatch-Reparaturproteine sind in der Lage, im DNA-Doppelstrang fehlerhafte Basenpaarungen, die während der DNA-Replikation entstanden sind, zu detektieren und diese zu eliminieren (Surtees et al. 2004). Grundsätzlich sind unter den DNA-Mismatch-Reparaturproteinen "zwei Familien" (Fishel et al. 1994), die MutS-Homologe (MSH) und MutL-Homologe (MLH), voneinander zu unterscheiden (Iyer et al. 2006). Dabei kommt es unter den Proteinen zu typischen Komplexbildungen, um in ihrer Funktion wirksam zu sein. Die Proteinkomplexe MutS $\alpha$  (Drummond et al. 1995), bestehend aus einem Heterodimer aus den Proteinen MSH2 und MSH6 (G-T-Bindungsprotein), und MutL $\alpha$  (Li und Modrich 1995), bestehend aus einem Heterodimer aus den Proteinen MLH1 und PMS2, gelten als die prominentesten Mitwirkenden bei der DNA-Mismatch-Reparatur in menschlichen Zellen (Iyer et al. 2008; Plotz et al. 2006).

In einer aktuellen Metaanalyse wurde herausgestellt, dass somatische Mutationen auf den MLH1- und MSH2/6-Genen mit einer hohen Prävalenz von kolorektalen Karzinomen einhergehen und somit eine vitale Rolle spielen (Zhang et al. 2012; Fishel et al. 1994a). Darüber hinaus werden auch Mutationen derselben Gene mit der Entstehung des sporadischen Nierenzellkarzinoms in Verbindung gebracht (Stoehr et al. 2012).

Zu den in dieser Arbeit analysierten Genen entsprechender DNA-*Mismatch*-Reparaturproteinen gehören die Gene MLH1, MSH2 und MSH6.

## 1.2.2 Reparatur von Doppelstrangbrüchen

### 1.2.2.1 Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ)

NHEJ wird in allen Zellzyklusphasen beobachtet und ist der Reparaturmechanismus der ersten Wahl bei Doppelstrangbrüchen von Zellen, die in der G1-Phase oder in der frühen S-Phase sind. Da diese ihre DNA noch nicht repliziert haben, dient hier zur Reparatur der Doppelstrangbrüche das homologe Chromosom. Es werden nur sehr kurze homologe Bereiche zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen benötigt.

Eine Schwesterchromatide als Matrize liegt nicht vor. Somit werden die freien Enden der DNA direkt miteinander verknüpft und ligiert (Buck et al. 2006; Lieber et al. 2003; Rothkamm und Löbrich 2003; Takata et al. 1998; Weterings und Chen 2008).

Aufgrund der hohen Fehlerquote kann aus dieser Art der Reparatur ein Verlust oder ein Gewinn ganzer Nukleotidsequenzen resultieren (Helleday et al. 2007; Liang et al. 1998; Odersky et al. 2002). Minimale Änderungen in der DNA-Sequenz sind nicht selten. Auch chromosomale Umlagerungen durch fehlerhafte Verknüpfungen von DNA-Enden, die primär nicht zusammengehören, kommen vor. An diesem Reparaturmechanismus sind verschiedene DNA-Reparaturgene beteiligt, u.a. PRKDC, RAD 50 und XRCC4/5 (Hefferin und Tomkinson 2005).

### 1.2.2.2 Homologe Rekombinationsreparatur (HRR)

HRR ist der bevorzugte Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die während und nach der DNA Replikation in der S-Phase des Zellzyklus auftreten. Hier verfügt die Zelle über eine identische DNA-Kopie (Sung und Klein 2006). Fehlende Sequenz-Informationen werden an der Schadensstelle komplementär zur homologen Sequenz, meist diejenige des Schwesterchromatins, neu synthetisiert. Durch die große Sequenzhomologie der Schwesterchromatide wird eine sehr hohe Genauigkeit der Reparatur erzielt (Pierce et al. 2001). An der HRR beteiligte Proteine sind unter anderem RAD 51/52/54, XRCC2/3, BRCA1/2 und MLH1.

Mutationen des BRCA1-Gens und des BRCA2-Gens haben sowohl einen Einfluss auf die Entstehung von Mamma- oder Ovarialtumoren (Chen et al. 1995), als auch einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung anderer Tumorentitäten, insbesondere Lymphome und Leukämien (Friedenson 2007)

### 1.3 Das internationale HapMap-Projekt

Das menschliche Genom spielt eine entscheidende, aber wenig verstandene Rolle bei der Entstehung verschiedener Krankheiten. Man vermutete, dass eine umfassende Analyse der menschlichen Haplotyp-Struktur Einblicke in die Entstehung menschlicher Populationen, auf die Einflussgrößen genetischer Vielfalt und auf populationsbezogene Krankheiten erlaubt (Gabriel et al. 2002).

Das internationale HapMap-Projekt ist im Oktober 2002 durch das internationale HapMap-Konsortium, einer Kooperation von 19 Forschungsgruppen aus insgesamt sechs Staaten (Japan, Großbritannien, Kanada, China, USA und Nigeria) initiiert worden. Ziel des Projektes war, die DNA des menschlichen Genoms auf gemeinsame und interindividuell verschiedene Merkmale zu analysieren, zu beschreiben und der Öffentlichkeit frei zugänglich zu machen. Mit Hilfe der Bestimmung der Genotypen von sehr vielen Varianten an Basensequenzen, außerdem über die Analyse der Häufigkeiten von Basensequenzen und der Grad ihrer Verbindung untereinander, sollte eine Karte (*map*) über die charakteristischen Muster bezüglich des menschlichen Genoms erstellt werden. Die Erstellung dieser Karte sollte aus DNA-Proben aus afrikanischen, asiatischen und europäischen Populationen generiert werden. Man erhoffte sich, charakteristische Varianten an Basensequenzen zu entdecken, die die Entstehung häufiger Erkrankungen beeinflussen. Außerdem versprach man sich Erkenntnisse über genetische Einflüsse, die im Hinblick auf Diagnostik und Therapie von Erkrankungen eine besondere Rolle spielen ("The International HapMap Project," 2003).

Das menschliche Genom verfügt über etwa 10 Millionen Polymorphismen, also genetische Varianten (Goldstein und Cavalleri 2005). Zur Analyse von Unterschieden in der Abfolge von Basen wurden in erster Linie Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) herangezogen, da sie die häufigste Variante darstellen (Hinds et al. 2005). Der Unterschied zwischen zwei DNA-Molekülen besteht in diesem Fall in nur einem Basenpaar, was prinzipiell ein charakteristischer Unterschied zwischen zwei Populationen sein kann.

Bereits im Jahre 2001 wurde eine Karte des menschlichen Genom mit 1,42 Millionen SNP

veröffentlicht (*The International SNP Map Working Group 2001*). Nach Einschätzung des HapMaps-Konsortiums hat das HapMap-Projekt zwar gegenüber dem humanen Genom-Projekt, in dem das menschliche Genom sequenziert wurde, viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich seines Umfangs und der daraus resultierenden Folgen und wird deswegen auch als natürliche Erweiterung dessen gesehen (HapMap 2005). Allerdings unterscheidet es sich maßgeblich darin vom humanen Genom-Projekt, dass nicht die interindividuell gleichen 99,9% des Genoms analysiert wurden, sondern dass "nur" auf die verbleibenden 0,1% des Genoms hinsichtlich interindividueller oder zwischen verschiedenen Populationen befindlicher Unterschiede fokussiert wurde.

Im Jahre 2004 wurden insbesondere ethische Aspekte bezüglich des HapMap-Projektes in den Mittelpunkt gerückt. So wies man darauf hin, dass es zwar zwischen den verschiedenen Populationen genetische Unterschiede gibt, diese allerdings nicht vereinfacht dazu herangezogen werden dürfen, um damit soziale und historische Stereotypen zu bedienen. Im gleichen Zusammenhang wurde deutlich gemacht, dass das HapMap-Projekt unter der jeweiligen nationalen Schirmherrschaft aus Regierung und Ethikkommission durchgeführt wurde unter Berücksichtigung von internationalen und nationalen ethischen Richtlinien (HapMap 2004).

Bereits im Jahre 2005 erkannte man, dass sich der Erfolg des HapMap-Projektes darin bemessen würde, inwieweit genetische Entdeckungen zu einer verbesserten Erkenntnis über die Ätiologie von Krankheiten führen würden. Gleichzeitig sah man technische Innovationen und internationale Zusammenarbeit für das Projekt als maßgeblich, um das Verständnis darüber zu fördern, wie Krankheiten verhindert oder behandelt werden können (HapMap 2005).

Das erste große Ziel des Projekts, der Abschluss der Phase I, wurde mit der Genotypisierung von 1,1 Millionen SNP an vier Populationen im Frühjahr 2005 erreicht. Den Abschluss der Phase II mit der Genotypisierung weiterer 4,6 Millionen SNP plante man ursprünglich für den Herbst 2005 (Thorisson et al. 2005). Allerdings konnte erst im Jahre 2007 die Phase II veröffentlicht werden, in der 3,1 Millionen genotypisierte SNP von 270 Individuen aus insgesamt vier geographisch verschiedenen Populationen charakterisiert wurden, was ca. 25 bis 35 % aller SNP-Variationen in der Beobachtungsgruppe abdeckt (HapMap et al. 2007).

Der Unterschied zwischen der Phase I HapMap und der Phase II HapMap besteht nicht nur in einem unterschiedlichen Abstand der SNP, sondern auch in einer niedrigeren Häufigkeit von Allelen und im Muster des Kopplungsungleichgewichtes (*linkage disequilibrium*, LD) (HapMap et al. 2007). Später erkannte man, dass die meisten erblichen Krankheitsrisiken ungeklärt bleiben, obwohl man bis dahin große Fortschritte hinsichtlich der Identifizierung von genetischen Varianten, die einen Einfluss auf menschliche Krankheiten haben, gemacht hat

(HapMap et al. 2010). Erst ergänzende, genomweite Studien über mehrere Generationen mit Fokussierung auf seltene Allele könnten hier eine zusätzliche Klarheit liefern.

Die Daten der HapMap stehen für die uneingeschränkte, öffentliche Nutzung über die Internetseite <http://www.hapmap.org> zur Verfügung. Neben der Möglichkeit, ganze HapMap-Datensätze herunterzuladen, sind auch Werkzeuge zur Datenanalyse verfügbar (Thorisson et al. 2005).

Ergänzt werden die Ergebnisse des HapMap-Projektes durch die Daten einer US-amerikanischen Arbeitsgruppe, deren Ziel es war, eine Datengrundlage zu erstellen, anhand derer die Struktur genetischer Variation von Menschen und ihre Beziehung zu phänotypischen Unterschieden untersucht werden kann. Dafür hat sie an knapp 1,6 Millionen SNP, die zu 99,54% konkordant mit denen der HapMap waren, Allelfrequenzen und Muster von Kopplungsungleichgewichten untersucht, die sich gleichmäßig verteilt über das menschliche Genom an nicht verwandten Individuen europäischer, afrikanischer und asiatischer Abstammung fanden (Hinds et al. 2005).

Mit der Verfügbarkeit einer detaillierten, genomweiten Karte über einzelne SNP ist die Frage, ob es möglich ist, mit Hilfe der Analyse von Kopplungsungleichgewichten Gene abzubilden, die einen Einfluss auf die Entstehung und möglicherweise auch auf die Behandlung von Krankheiten haben, zum zentralen Thema in der menschlichen Genetik geworden (Reich et al. 2001).

Für diese Doktorarbeit wurden LCL verwendet (*lymphoblastoid cell lines*), die vom Coriell Institute for Medical Research käuflich erworben wurden. Hierbei handelt es sich um B-Lymphozyten, die mittels Epstein-Barr-Virus immortalisiert wurden.

Die Zellen stammen von unverwandten Personen einer Bevölkerung kaukasischen Ursprungs und sind vollständig genotypisiert.

Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns standen 58 Zelllinien zur Verfügung, von denen 54 erfolgreich angezüchtet werden konnten. Diese 54 Zelllinien wurden mittels FACS-Analyse untersucht.

## 1.4. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Auswirkungen ionisierender Strahlen im Rahmen einer Strahlentherapie genauer einschätzen zu können. Hierbei wird insbesondere die Assoziation der Vitalität von LCL mit einer genetisch bedingten Variabilität der Expression von Genen im TGF $\beta$ -Signal- und DNA-Reparaturweg analysiert. Zur Stimulation oder Hemmung der Signalwege werden die LCL mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt und/oder mit TGF $\beta$ 1 oder einem TGF $\beta$ -Inhibitor behandelt. Die Vitalität der LCL wird nachfolgend durch FACS-Analysen bestimmt.

Folgende Fragestellungen werden im Zusammenhang mit dieser Arbeit genauer betrachtet und analysiert:

1. *Welche Eigenschaften hinsichtlich von Kopplungsungleichgewichten zeigen LD-Plots der untersuchten Gene im TGF $\beta$ -Signal- und DNA-Reparaturweg?*
2. *Welche auf den Genen lokalisierten SNP zeigen eine signifikante Assoziation mit der LCL-Vitalität nach Bestrahlung und/oder TGF $\beta$ 1-Inkubation oder TGF $\beta$ 1-Inhibition?*
3. *Welchen Einfluss hat der Variantenallel-Status (heterozygot, homozygot) dieser SNP auf die LCL-Vitalität nach Bestrahlung und/oder TGF $\beta$ 1-Inkubation oder TGF $\beta$ 1-Inhibition?*
4. *Wie wirkt sich die Kombination von Bestrahlung und TGF $\beta$ 1-Inkubation oder TGF $\beta$ 1-Inhibition im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung, TGF $\beta$ 1-Inkubation oder TGF $\beta$ 1-Inhibition aus?*
5. *Wie wirkt sich der zeitliche Ablauf der Kombinationsbehandlung (TGF $\beta$ 1-Inkubation vor oder nach der Bestrahlung) auf die LCL-Vitalität aus?*

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 1: Chemikalien

Anti-TGF- $\beta$	R&D	Wiesbaden, Deutschland
Cytochalasin B von Drechslera Dermatioidea, Katalog-Nr. 130832	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DCFH	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,9% vergällt	DeRaSo	Dassel-Lauenberg, Deutschland
FACS Flow/Rinse/Safe	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Fetales Kälber-Serum, Katalog-Nr. S0115	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Glucose, Katalog-Nr. G7021	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
HEPES, Katalog-Nr. H7523-250G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol, Katalog-Nr.106009	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), Katalog-Nr.106329	Merck	Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
RPMI 1640 Pulvermedium, Katalog-Nr. T125-05	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Streptomycin/Penicillin, Katalog-Nr. A2213	Biochrom AG	Berlin, Deutschland

## 2.2 Medien

Die verwendeten Medien sind nachfolgend aufgeführt. Sie wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt und anschließend durch Sterilfiltrieren sterilisiert.

LM-15%:	RPMI-Medium	84% (v/v)
	FCS	15 % (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
LM-2,5%:	farbloses RPMI-Medium	97,5% (v/v)
	FCS	2,5 % (v/v)

## 2.3 Puffer und Lösungen

Der verwendete Puffer ist nachfolgend aufgeführt und wurde mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt und sterilfiltriert.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

PBS	120 mM NaCl, 17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2)
Cytochalsin-B Mix I	Stock: 600 µg/ml DMSO, Stock: RPMI 1640 = 1:9, 75 µl Mix l/ml RPMI 1640 ⇒ 4,5 µg/ml

## 2.4 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Accu-jet	Brand	Wertheim, Deutschland
Biofuge	Heraeus	Hanau, Deutschland
Brutschrank, (37°C, 5% CO <sub>2</sub> ), Heraeus	Heraeus	Hanau, Deutschland
FACSAria II	Becton Dickinson	Franclin Lakes, USA
FACScan	Becton	Franclin Lakes, USA
Invertiertes Phasenkontrastmikroskop Telaval 31	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Kühlschrank VIP Series -86°C	Sanyo Electric Co. Ltd	Japan
Pipetboy plus Pipettierhilfe	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Pipetten Eppendorf Research mit Spitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Stereomikroskop	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL 2A	Mahl	Trendelburg, Deutschland
Sterile Werkbank, Lamin Air	Heraeus	Hanau, Deutschland
Sterilisator	Memmert	Schwalbach, Deutschland
Trockenschrank	Memmert	Schwalbach, Deutschland
Vortexer (MS2 minishaker)	IKA	Staufen, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	Schütt	Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

## 2.5 Zubehör

Tabelle 4: Zubehör

Eppendorf-Cups	Eppendorf-Nether – Hinz GmbH	Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads 20-200 µl Bestell-Nr. 0030073428	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads, 50-1000 µl Bestell-Nr. 0030073460	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen 5 ml für FACS	Becton Dickinson	Franklin Lakes, USA
Gewebekulturflaschen, Nr. 658175, 75 cm <sup>2</sup> , 250 ml mit Filterkappen	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen, Nr. 152094, 25 cm <sup>2</sup> , 40 ml mit Filterkappen	Nunc	Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen 2 ml, Nr. 9401233	Schütt	Göttingen, Deutschland
Pasteurpipetten 150mm	Wilhelm Ulrich GdbR	Bamberg, Deutschland
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Tissue Culture Plate, 24-Well	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Transferpipetten 3,5 ml, Bestell-Nr. 861172	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
Untersuchungshandschuhe Gentle Skin	Meditrade	Kiefersfelden, Deutschland
Zählkammer 0,0025 mm <sup>2</sup> , (Neubauer improved)	Brand	Wertheim, Deutschland

## 2.6 Software

Tabelle 5: Software

Cell-Quest, Version 1.1.2 <sup>TM</sup>	Becton Dickinson	USA
HaploView-Software	Broad Institute	Cambridge, UK
MS Office, Version 2008 und 2011	Microsoft	Redmond, USA
SPSS, Version 12.0	IBM	USA

## 3 Methoden

### 3.1 Kultur der lymphoblastoiden Zellen

Für diese Arbeit konnten 54 Zelllinien zu Versuchszwecken angezüchtet werden. Die entsprechenden ID-Nummern des Corriell-Instituts sind nachfolgend aufgeführt:

GM06993, GM06994, GM07000, GM07022, GM07034, GM07055, GM07056, GM07345, GM07357, GM11830, GM11831, GM11832, GM11839, GM11840, GM11881, GM11882, GM11992, GM11993, GM11994, GM11995, GM12003, GM12004, GM12005, GM12006, GM12043, GM12044, GM12056, GM12057, GM12144, GM12145, GM12146, GM12154, GM12155; GM12156, GM12234, GM12239, GM12248, GM12249, GM 12264, GM12717, GM12750, GM12751, GM12760, GM12762, GM12763, GM12812, GM12813, GM12814, GM12815, GM12872, GM12873, GM12874, GM12891, GM12892.

Die lymphoblastoiden Zellen wurden in Kryoröhrchen im Stickstofftank bei  $-170^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Entnahme der Kryoröhrchen musste aus Sicherheitsgründen durch eine weitere Person beaufsichtigt werden. Durch Anwärmen der Kryoröhrchen mit der Hand wurde der Inhalt zum Antauen gebracht bis die Entnahme des Eiskerns mit umgebender Flüssigkeit durch Umdrehen des Kryoröhrchens mühelos möglich war. Der Inhalt wurde in ein zuvor mit 20 ml LM-15% befülltes 50 ml-Falcon-Röhrchen entleert. Nach Verschließen des 50 ml-Falcon-Röhrchens wurde dieses in eine Zentrifuge gesetzt. Vor Beginn des Zentrifugierens war darauf zu achten, dass die Zentrifuge gleichmäßig gefüllt war. Bei einer Einstellung von 500 g,  $18^{\circ}\text{C}$ , mittlerer Beschleunigung und mittlerer Bremse wurde für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde mit 5 ml Nährmedium resuspendiert. Anschließend konnten die Zellen in eine kleine Kulturflasche mit  $25\text{ cm}^2$  Oberfläche überführt werden. Die Kulturflaschen wurden zuvor beschriftet mit der entsprechenden Nummer der LCL sowie der Passagenummer (beginnend mit ,1' nach dem Auftauen, ansteigend nach jedem Zellsplitting).

Zur Inkubation wurden die Kulturflaschen stehend in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde die Zelldichte mittels Mikroskop bestimmt. Eine Verfärbung der zuvor rot-violetten Suspension zu einer gelblichen, eher trüben Suspension deutete bereits makroskopisch auf eine hohe Zelldichte hin.

Zunächst wurden 15 ml neues Medium in eine größere Kulturflasche ( $75\text{ cm}^2$ ) vorgelegt.

Nun wurden 5 ml Zellsuspension aus der bestehenden Kultur entnommen, in die größere Kulturflasche passagiert und dort mit dem Medium resuspendiert.

Nach Erreichen einer Zellzahl von mindestens 2.000.000 konnten die jeweiligen Zelllinien für Versuche verwendet werden.

Die unmittelbare Vorbereitung einer Versuchsreihe begann mit dem Aufwärmen des Mediums (RPMI-15%FCS-1%PBS). Dann wurde eine Neubauerkammer bereitgestellt und mit einem leicht angefeuchteten Deckglas abgedeckt. Das korrekte Auflegen des Deckglases bestätigte sich dadurch, dass Newtonsche Ringe sichtbar wurden. In ein E-Cup wurden 15 µl Trypanblau vorgelegt.

Nun wurde die Zellsuspension der zu untersuchenden Zelllinie mit dem Akku-Jet gut durchmischt, bis eine homogene Zellsuspension entstand und in einen 50ml-Tube überführt. 15 µl dieser Zellsuspension wurden nun zu dem Trypanblau in den E-Cup gegeben und gut durchmischt, bevor die Neubauer-Kammer hiermit beschickt wurde.

Beim Auszählen der Zellen wurde die Neubauerkammer in vier Großquadrate unterteilt, die einzeln ausgezählt wurden. Die Gesamtzellzahl errechnete sich aus der Summe der vier Großquadrate, multipliziert mit 5000, multipliziert mit dem Volumen (in ml) innerhalb des Tube. Konnte die Mindestzellzahl erreicht werden, konnten die Versuche mit der jeweiligen Zelllinie begonnen werden.

Zunächst wurde die Zellsuspension in einem 50 ml-Tube für 7 Minuten zentrifugiert (500g, 18°C, mittlere Beschleunigung, mittlere Bremse). Anschließend wurde der Überstand abgegossen und mit LM-15% im doppelten Volumen der Gesamtzellzahl in Mio. resuspendiert (=500.000/ml). Vorbereitet wurden zwei 24-Well-Platten, indem sie mit der Nummer der Zelllinie, dem Datum und den jeweiligen Behandlungsbedingungen beschriftet wurden. Es wurde je 800 µl Zellsuspension in die Wells pipettiert nach folgendem Schema:

Kontrolle, unbehandelt (Abk. K)

Kontrolle + anti-TGFβ (Abk. K-iT)

Bestrahlt (Abk. R)

Bestrahlt + Zugabe von anti-TGFβ 16 h vor Bestrahlung (Abk. R-iT)

Bestrahlt + Zugabe von TGFβ1 16 h vor (ante) Bestrahlung (Abk. R-Ta)

Bestrahlt + Zugabe von TGFβ1 unmittelbar nach (post) Bestrahlung (Abk. R-Tp)

Für den Ansatz R-Ta wurde TGF $\beta$ 1 in einer Zielkonzentration von 5 ng/ml hinzugefügt. Für eine Vorverdünnung von 1:12,5 wurden 64,4  $\mu$ l LM-15% mit 5,6  $\mu$ l des TGF $\beta$ 1 (5  $\mu$ g/ml-Stocklösung) gemischt. Davon wurden je 10  $\mu$ l in die entsprechenden mit 800  $\mu$ l befüllten Wells gegeben. Anti-TGF $\beta$  wurde in einer Zielkonzentration von 250 ng/ml zu den Ansätzen K-iT sowie zu R-it hinzugefügt. Um eine Vorverdünnung von 1:25 zu erhalten wurde zu 67,2  $\mu$ l LM-15% eine Menge von 2,8  $\mu$ l anti-TGF $\beta$  pipettiert. Davon wurden je 10  $\mu$ l in die entsprechenden Wells gegeben. Nach 16-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde die Well-Platte mit den Ansätzen R, R-iT, R-Ta und R-Tp mit einer Strahlendosis von 3 Gy (1 Gy/Min. für 3 Min.) bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgte die Zugabe von TGF $\beta$ 1 in den Ansatz R-Tp. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank bei 37°C.

### 3.2 Zellvitalitätsmessung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) ist ein Messverfahren, welches der Bestimmung von Zelleigenschaften einer hohen Anzahl von Zellen in geringer Zeit dient, z.B. Vitalität, Volumen oder Oberflächenmarker. Dies geschieht durch Detektion optischer Signale, welche die Zelle bei Passage eines Laserstrahls entsendet (Bohm 2004).

Zur Bestimmung der Zellvitalität werden häufig Annexin und Propidiumiodid verwendet.

Annexin ist vor allem ein Marker des frühen programmierten Zelltodes. Es hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen, die im Rahmen der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran nach außen verlagert werden.

Als Nekrosemarker hingegen dient Propidiumiodid. Von vitalen Zellen mit intakter Zellmembran wird dieser Farbstoff nur sehr langsam aufgenommen. Die defekte Zellmembran nekrotischer Zellen weist eine erhöhte Permeabilität auf und wird somit leicht durchlässig für Propidiumiodid, welches sich in die DNA der Zelle einlagert, die Nukleinsäuren anfärbt und so eine Zunahme der Fluoreszenz im roten und braunen Bereich verursacht. Propidiumiodid wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und besitzt ein Emissionsspektrum zwischen 575 und 620 nm. Die nekrotischen Zellen können anhand starker Propidiumiodid-Fluoreszenz detektiert werden.

In dieser Studie sollte die Zellvitalität von LCL bestimmt werden. Bei LCL kann, im Gegensatz zu normalen Leukozyten, kaum zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden. Es findet hier gleichermaßen eine Anfärbung mit beiden Farbstoffen statt. Somit ist eine Doppelfär-

bung in diesem Fall nicht sinnvoll. Man entschied sich in diesem Versuchsaufbau für Propidiumiodid, da dieses deutlich preiswerter ist als Annexin.

Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubation, gerechnet ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung, wurden die 24-Well-Platten mit den behandelten LCL aus dem Brutschrank entnommen.

Auf diesen Platten waren für jede Zelllinie die sechs Behandlungsbedingungen (siehe oben) enthalten. Mit Hilfe einer Pipette wurde der Inhalt der einzelnen Wells gut durchmischt.

Anschließend wurden aus jedem Well 250 µl Zellsuspension pro Well in ein zuvor entsprechend beschriftetes FACS-Röhrchen überführt. Insgesamt wurden so für jede Zelllinie sechs Röhrchen befüllt. Die FACS-Röhrchen wurden dann bis 1 cm unter den Rand mit PBS aufgefüllt und für 5 Minuten bei 500 g (18°C, mittlere Beschleunigung, mittlere Bremse) für fünf Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung der FACS-Mischung, indem 11 ml klares RPMI-Medium (inklusive 5% FKS) mit 2,2 µl DCFH sowie 8,8 µl Propidiumiodid in ein 50-ml-Falcon-Tube überführt wurden. Die Suspension wurde bei 1400 rpm mittels Vortex-Gerät durchmischt.

Nach erfolgter Zentrifugation der befüllten FACS-Röhrchen wurde der Inhalt unter Belassen des letzten Tropfens abgekippt. Die Röhrchen wurden nun mit Hilfe einer Pipette mit gestopfter Spitze mit 800 µl der FACS-Mischung beschickt. Nach kurzem Vortexen (3 s bei 1000 rpm) erfolgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C bevor mit der FACS-Messung im Durchflusszytometer begonnen wurde.

Das Durchflusszytometer verfügt über eine nach außen gerichtete, längliche Kapillare. Die Röhrchen werden nacheinander über die Kapillare gesteckt, so dass die Kapillare soeben in die Suspension eintaucht. Bei der Messung werden die Zellen einzeln durch den Mikrokanal der Kapillare gesaugt und gelangen mit hoher Geschwindigkeit in die Durchflusszelle (>1000 Zellen/s), in der sie durch Laserlicht angeregt werden.

Die erhaltenen Messergebnisse werden anschließend mit der geräteeigenen Software in Form eines Dot Plots graphisch dargestellt. Nach erfolgter Messung wird das Gerät gründlich mit speziell hierfür entwickelten Lösungen gespült.

### 3.3 Bioinformatik

Um den Einfluss genetischer Variabilität auf verschiedene funktionelle oder klinische Konstanten zu analysieren, gibt es grundsätzlich zwei mögliche Wege: den genomweiten und den Kandidatengen-Ansatz.

Bei der genomweiten Assoziationsstudie werden nicht einzelne Gene bestimmt, sondern über das gesamte Genom hinweg verteilte Varianten auf eine Beeinflussung funktioneller oder klinischer Parameter hin untersucht. Mittlerweile enthalten entsprechende Arrays über eine Million genetischer Marker. Beim Kandidatengenansatz fokussiert man sich auf Varianten in Genen mit einer begründeten Hypothese, an der Ausprägung eines Phänotyps beteiligt zu sein. Der Kandidatengenansatz (*candidate gene approach*) ist somit ein hypothesengesteuerter Ansatz. Je größer die Zahl der Genotyp-Phänotyp-Analysen ist, desto schwerer wiegt das Problem des multiplen Testens. Bei einer sehr großen Zahl an Kandidatengen nähert sich eine derartige Analyse einer genomweiten an. Diese beiden prinzipiellen Ansätze spiegeln also grundsätzlich eine statistische Herangehensweise wider, weniger eine technische. So können auch genomweit erhobene Daten für den Kandidatengen-Ansatz verwendet werden, wenn eine Begrenzung der statistischen Analyse auf die definierten Gene erfolgt.

In dieser Studie wurde der Kandidatengenansatz verwendet. Die Konsistenz einer Assoziation in mehreren Studien ist ein starker Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einem Phänotyp einerseits und der analysierten bzw. einer mit dieser im Kopplungsungleichgewicht stehenden genetischen Variante. Fehlt diese Konsistenz, so ist dies nicht zwangsläufig ein Hinweis auf einen mangelnden Zusammenhang. Möglicherweise besteht in so einem Fall die Notwendigkeit, weitere und detailliertere Studien zu gewissen Populationen oder bestimmten Genen durchzuführen (Tabor et al. 2002).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein möglicher Einfluss von 21 bestimmten Genen untersucht werden. Es wurden sieben Gene aus dem TGF $\beta$ -Signalweg betrachtet: SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD7, TGF $\beta$ 1, TGFBR1, TGFBR2. Des Weiteren wurden 14 DNA-Reparaturgene in die Analyse einbezogen: ATM, BRCA1, BRCA2, ERCC2, LIG1, MLH1, MSH2, MSH6, NBM, PRKDC, Rad50, TP53, XRCC1, XRCC5. Dabei wurden die Genotypen für die LCL aus der HapMap-Datenbank (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>, release 28) verwendet und auf Zusammenhänge mit den eigenen funktionellen Messungen überprüft. Je höher dabei das Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium, LD*) zweier Varianten ist, desto ähnlicher verhalten sich die Assoziationen mit den funktionellen Messungen.

### 3.4 Statistische Auswertung

Für alle statistischen Analysen wurde die Software SPSS Version 12.0 verwendet. Grundsätzlich wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zunächst erfolgte die deskriptive Statistik. Diese beschreibende Statistik dient der Veranschaulichung und Darstellung der empirisch gewonnenen Daten. Es gibt mehrere Möglichkeiten der grafischen Darstellung. In dieser Arbeit werden beispielsweise Boxplots und Histogramme verwendet. Anhand dieser Ergebnisdarstellung können Hypothesen aufgestellt werden oder bereits erste Schlüsse gezogen werden. Sie dient auch der Zuordnung, ob es sich um eine parametrische Verteilung, d. h. durch mathematische Parameter beschreibbar (dies entspricht in der Regel einer Normalverteilung), oder um eine nicht-parametrische Verteilung handelt. Die Art der Verteilung entscheidet maßgeblich darüber, welcher statistische Test zur weiteren Auswertung in der Analysephase angewendet wird.

In der Analysephase wird nun versucht, von einer Stichprobe auf eine Grundgesamtheit zu schließen mit einem bestimmten Maß an Sicherheit. Es gilt dabei, die initial gestellten Hypothesen anhand mathematischer Tests zu überprüfen und entweder zu verifizieren oder zu falsifizieren. Zur Prüfung, ob es sich bei den zugrunde liegenden Daten um eine Normalverteilung handelt, wurde in dieser Arbeit der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Sofern eine nicht-signifikante Abweichung von der Normalverteilung vorlag (entsprechend  $p > 0,05$ ), wurden parametrische Testverfahren herangezogen. Bei signifikanter Abweichung kamen nicht-parametrische Tests zum Einsatz. Die Teststärke (*power*), d.h. einen tatsächlich vorliegenden Effekt auch als solchen zu erkennen, ist bei nicht-parametrischen Verfahren jedoch geringer als bei parametrischen Verfahren.

Mittels Korrelationsanalyse wurde auf Vorhandensein und Stärke eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen/Merkmalen untersucht. So wurde bei parametrisch verteilten Daten der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet während bei Abweichung von der Normalverteilung der Rangsummen-Korrelationskoeffizient nach Spearman Verwendung fand. Der Koeffizient, der bei beiden Verfahren errechnet wird, beschreibt die Stärke eines Zusammenhangs. Die errechneten Koeffizienten liegen zwischen -1 und +1. Ein Wert gegen +1 steht für einen stark positiven, ein Wert gegen -1 für einen stark negativen Zusammenhang. Der zugehörige p-Wert ermöglicht eine Aussage über die statistische Signifikanz der Korrelation.

Zum Vergleich zweier verbundener Stichproben wie z.B. Kontrolle *versus* Behandlung mit TGF $\beta$ 1 wurde der gepaarte t-Test (bei parametrischer Verteilung) oder der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet (Verwendung unabhängig vom Verteilungsmuster).

---

Der Einfluss von unabhängigen (z.B. Genpolymorphismen) auf abhängige Variablen (z.B. Zellvitalität) wurde mit dem nicht-parametrischen Jonckheere-Terpstra-Trend-Test bestimmt.

In meiner Arbeit wurden p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant gewertet, wenn für den zu prüfenden Zusammenhang bereits entsprechende Literatur vorlag oder Vorkenntnisse bestanden (z.B. SNP in DNA-Reparaturgenen mit bekannter Bedeutung für zelluläres Schicksal nach zytotoxischen Stimuli). Alle anderen Genotyp-Phänotyp-Beziehungen wurden bei einem p-Wert  $< 0,01$  als signifikant bezeichnet.

Diese explorative Vorgehensweise sollte Hypothesen für spätere Überprüfungen generieren.

Mit der Zahl der angewendeten Tests erhöht sich die Zahl falsch positiver Ergebnisse. Um im Einzelfall von einem statistisch signifikanten Befund sprechen zu können, musste zusätzlich eine Adjustierung des p-Wertes auf die Zahl der durchgeführten Tests erfolgen (hier Bonferroni-Methode).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Röntgenstrahlung und TGFβ1-System in Bezug auf Zellvitalität

Insgesamt war, wie zu erwarten, eine generelle Abnahme der Zellvitalität bei fast allen mit 3 Gy bestrahlten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu verzeichnen, unabhängig von Kombinationen mit TGFβ1 oder anti-TGFβ (Abbildung 3).

Im Vergleich mit einer alleinigen Bestrahlung (3 Gy) zeigte die additive Behandlung mit anti-TGFβ eine zellprotektive Wirkung. Ähnliches galt, etwas weniger stark ausgeprägt, auch für die Kombination mit TGFβ1, sowohl wenn dieses vor als auch nach der Bestrahlung zugesetzt wurde. Die alleinige Behandlung mit anti-TGFβ erhöhte bei der Mehrzahl der Zelllinien die Vitalität gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Für TGFβ1 selbst war ein Effekt auf die Zellvitalität in LCL bereits zuvor untersucht worden (Neumann 2012).

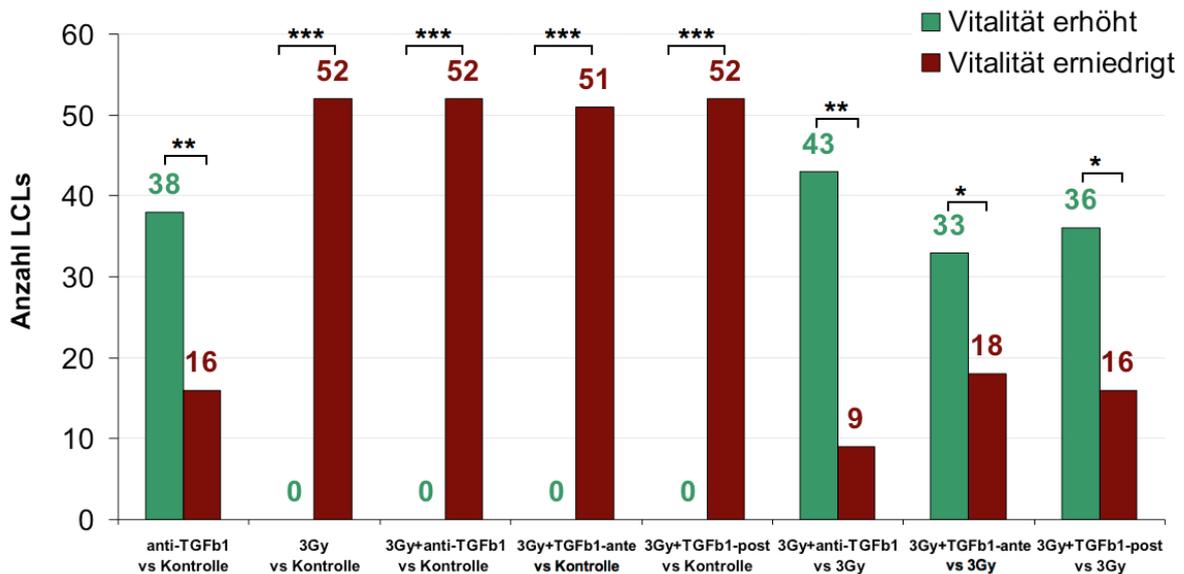


Abbildung 3: Effekte unterschiedlicher Behandlungen auf die Vitalität von LCL. Mit Ausnahme des Vergleichs zwischen anti-TGFβ und Kontrolle waren bei den anderen Bedingungen für einige wenige der 54 erfolgreich angezüchteten Zelllinien die definierten Qualitätskriterien nicht erfüllt (mehr als 10% Abweichung zwischen den Doppelbestimmungen, keine sinnvolle Evaluierung des Bestrahlungseffektes, wenn in Kontrolle <50 vitale Zellen). Dargestellt sind für die einzelnen Behandlungsbedingungen die Anzahl der Zelllinien mit erhöhter (grüne Säule) bzw. erniedrigter Vitalität (rote Säule) im Vergleich zu der jeweils angegebenen Referenzbedingung (Kontrolle mit Medium ohne spezifische Behandlung für die fünf linken Säulengruppen bzw. Bestrahlung mit 3 Gy für die rechten drei Säulengruppen). Die LCL waren 16 h vor Bestrahlung mit anti-TGFβ (ad 250 ng/ml) bzw. TGFβ1 (ad 5 ng/ml) vorbehandelt und nach Bestrahlung mit 3 Gy für weitere 24 h inkubiert worden. Bei der Bedingung „TGFβ1-post“ erfolgte die Zugabe von TGFβ1 (ad 5 ng/ml) unmittelbar nach der Bestrahlung. Eine statistische Analyse erfolgte mit dem gepaarten nicht-parametrischen Wilcoxon-Rangsummentest. Entsprechend des p-Wertes der statistischen Signifikanz wurden vier Kategorien gebildet:  $p \geq 0,05 \sim ns$ ;  $0,05 > p \geq 0,001 \sim *$ ;  $0,001 > p \geq 10^{-6} \sim **$ ;  $p < 10^{-6} \sim ***$ .

## 4.2 Röntgenstrahlung und TGF $\beta$ 1-System in Bezug auf ROS-Bildung

In den Proben nach Bestrahlung mit 3 Gy war gegenüber der unbestrahlten Kontrolle in fast allen LCL eine vermehrte ROS-Produktion zu beobachten. Eine nennenswerte Modulation durch TGF $\beta$ 1 oder anti-TGF $\beta$  war dabei nicht zu verzeichnen (Abbildung 4).

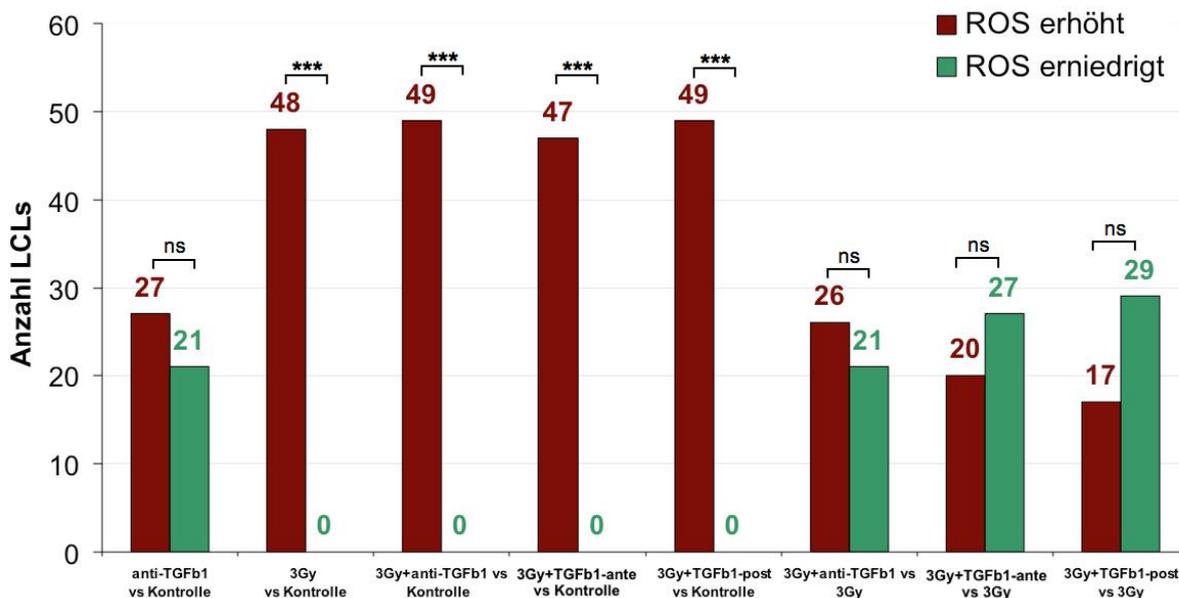


Abbildung 4: ROS-Bildung durch unterschiedliche Behandlungen. Die Darstellungsweise ist analog zu Abbildung 9.

## 4.3 Beziehung zwischen ROS-Bildung und Zellvitalität

Die in den Abbildungen 3 und 4 dargestellten Effekte auf die Vitalität und auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stehen für die durchgeführten Behandlungen mit einer Ausnahme in keiner statistisch signifikanten Korrelation zueinander. Lediglich bei der Kombinationsbehandlung aus anti-TGF $\beta$  und nachfolgender Bestrahlung (3 Gy) war ein moderater Zusammenhang zu erkennen ( $\rho=-0,34$ ,  $p=0,02$ ). Eine höhere ROS-Produktion war dabei mit einem verstärkten Verlust an Zellvitalität verbunden (Abbildung 5). Hier muss berücksichtigt werden, dass das gemessene DCF-Signal als Marker für Wasserstoffperoxid nur als grober Parameter zur Abschätzung der globalen ROS-Bildung betrachtet werden kann.

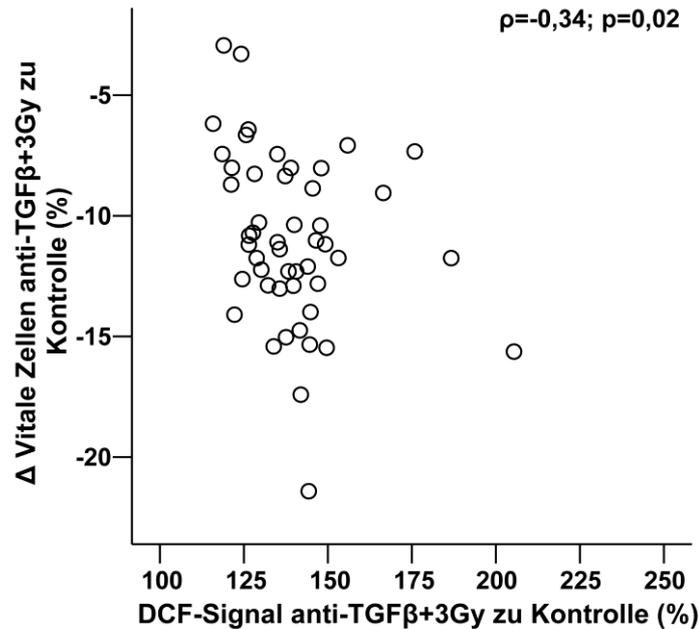


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen ROS und Vitalität bei anti-TGFβ und 3 Gy. Das Streudiagramm zeigt jeweils die prozentualen Veränderungen zur unbehandelten Kontrolle. Die Stärke dieses Zusammenhangs ist als Rangkorrelation nach Spearman ( $\rho$ ) mit der statistischen Signifikanz ( $p$ ) angegeben.

## 4.4 Auswahl der Genloci für die Assoziationsanalysen mit den Funktionsmessungen

### 4.4.1 Kandidatengene

In Anbetracht des spezifischen Fokus der Behandlungsbedingungen auf das TGFβ1-System wurden sieben, in LCL stark exprimierte Gene des klassischen TGFβ1-Signalwegs für die Assoziationsanalysen ausgewählt. Weil als zytotoxische Noxe ionisierende Strahlung verwandt wurde, wurden desweiteren zunächst 24 DNA-Reparaturgene aus funktionellen Überlegungen heraus ins Auge gefasst. Wegen geringer Expressionsstärke und damit mutmaßlich eher geringer Bedeutung in LCL fanden zehn davon für die weiteren Analysen keine Beachtung mehr (Abbildung 6).

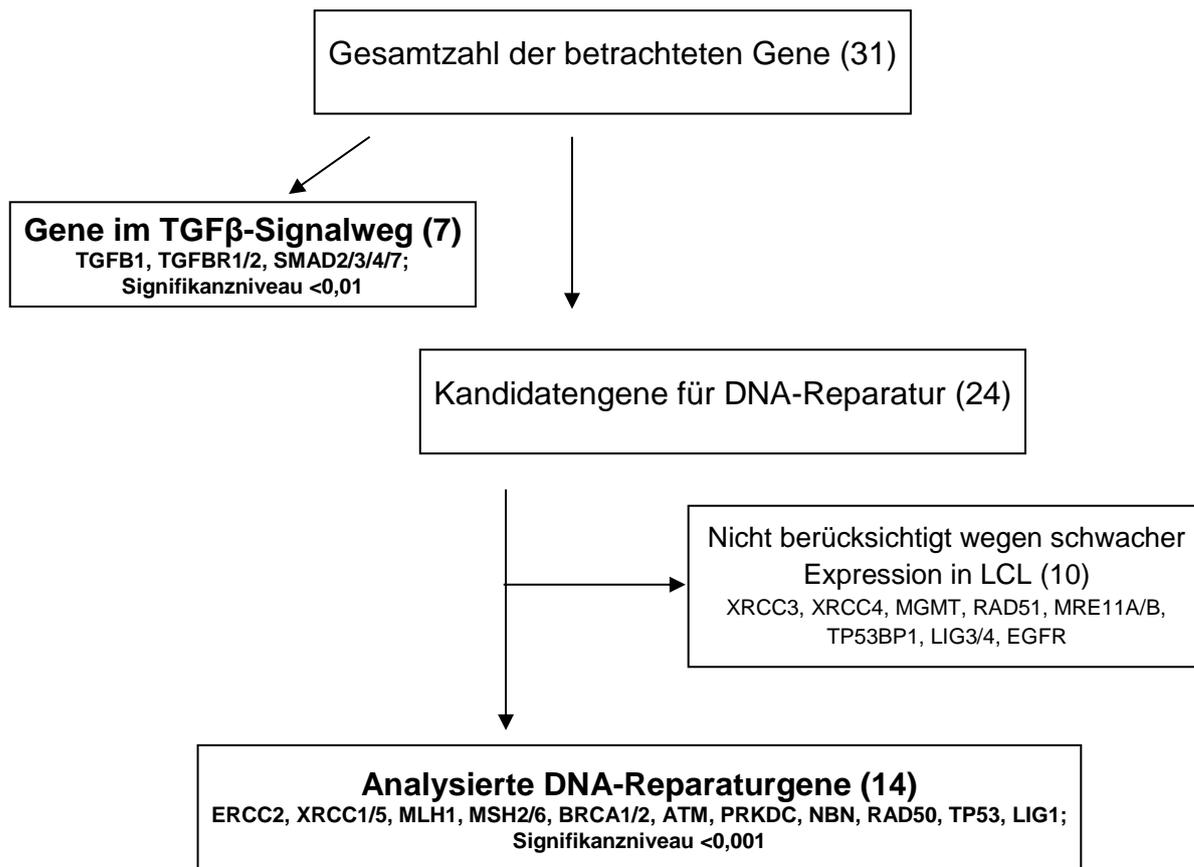


Abbildung 6: Flussdiagramm zur Auswahl der Kandidatengene. Die Anzahl der Gene ist jeweils in Klammern angegeben. Die für die Assoziationsanalyse mit den Funktionsparametern ausgewählten Gene sind mit Namen genannt und auch diejenigen aus dem Bereich der DNA-Reparatur, die wegen schwacher Expression in LCL nicht berücksichtigt wurden.

#### 4.4.2 Charakteristika der Genloci

Im Keimbahn-Genom des Menschen finden sich ca. zehn Millionen genetische Varianten. Bei vielen dieser Varianten handelt es sich um Einzelnukleotidpolymorphismen. Ein Polymorphismus in der Allgemeinbevölkerung muss per definitionem eine Mindestfrequenz des selteneren Allels von  $> 1\%$  in der Normalbevölkerung aufweisen.

Abbildung 7 bietet einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung aller 1656 polymorphen Genloci aus 21 Genen, die im Rahmen dieser Arbeit betrachtet wurden. Dabei fällt auf, dass mit einer Anzahl von knapp über 400 die meisten polymorphen Genloci mit einer Häufigkeit von  $< 5\%$  vorliegen. Der zweite Häufigkeitsgipfel mit ca. 260 polymorphen Genloci liegt um die 50%. Alle anderen polymorphen Positionen verteilen sich relativ gleichmäßig in einem Bereich zwischen 10% und 45%.

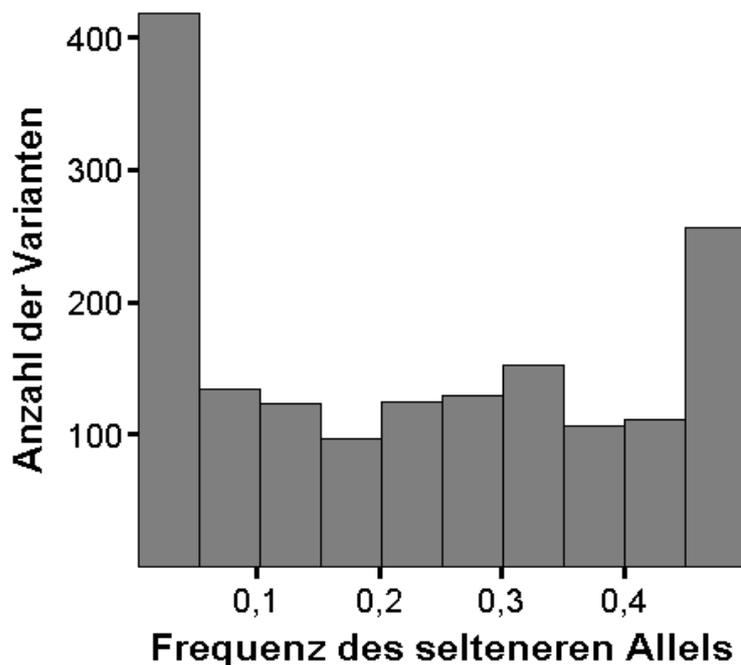


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung aller analysierter polymorpher Genloci. Insgesamt wurden 1656 Genpolymorphismen in 21 Genen betrachtet. Bezogen auf die Frequenz des selteneren Allels, ist in 5%-Intervallen die Verteilung der Genloci in dem kaukasischen HapMap-Kollektiv von 174 Personen dargestellt.

Tabelle 6 beinhaltet nähere Informationen zu den untersuchten Genen. Als Informationsquelle diente hier die HapMap-Datenbank (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) in der Version von August 2010. Für die Auswahl an Genpolymorphismen wurde der entsprechende Genbereich einschließlich flankierender 10 kb der 5'- und 3'- Region ausgewählt. Zu jedem Gen sind Gengröße, Zahl der polymorphen Positionen und Aufteilung dieser in Transitionen, Transversionen und Deletionen angegeben. Die meisten polymorphen Positionen mit einer Anzahl von > 100 wiesen ATM, BRCA2, NBN, SMAD3, TGF $\beta$ R2 und XRCC5 auf. Die häufigste Ursache für eine genetische Variante stellt die Transition dar. Es fanden sich insgesamt nur zwei Deletionen und zwar innerhalb des ATM-Gens.

Tabelle 6: Anzahl und Art der analysierten polymorphen Positionen in den untersuchten Genen. Die Genbezeichnung entspricht der offiziellen Nomenklatur in der NCBI-Gendatenbank (engl. Gene Bank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Für die Auswahl an Genpolymorphismen wurde der jeweilige Genbereich einschließlich flankierender 10 kb der 5'- und 3'-Region betrachtet. Die Genotypdaten wurden von der HapMap-Datenbank (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) in der Version von August 2010 heruntergeladen und beinhalten alle singulären biallelischen Positionen. Darunter fallen alle Variantenallele mit dem Vorhandensein von zwei Allelen an einer Position. Für jedes Gen ist die Gesamtzahl dieser Varianten und die Unterteilung in Transitionen, Transversionen und singuläre Allel-Deletionen aufgeführt.

<b>Genname</b>	<b>Gengröße ±10kb</b>	<b>Zahl der genotypisierten polymorphen Positionen</b>	<b>Transitionen</b>	<b>Trans- versionen</b>	<b>Deletionen</b>
ATM	166,3	113	68	43	2
BRCA1	101,2	82	62	20	0
BRCA2	104,2	139	98	41	0
ERCC2	34,3	39	23	16	0
LIG1	74,9	90	69	21	0
MLH1	77,4	55	35	20	0
MSH2	100,1	61	35	26	0
MSH6	43,8	36	23	13	0
NBN	71,3	118	79	39	0
PRKDC	207,1	56	38	18	0
RAD50	107,0	49	40	9	0
SMAD2	118,1	97	63	34	0
SMAD3	149,3	189	134	55	0
SMAD4	69,5	32	21	11	0
SMAD7	50,9	50	40	10	0
TGFB1	43,2	30	25	5	0
TGFBR1	69,1	65	46	19	0
TGFBR2	107,6	146	96	50	0
TP53	39,2	26	17	9	0
XRCC1	52,3	59	42	17	0
XRCC5	116,9	124	87	37	0

Die Kriterien für das nominale Signifikanzniveau (ohne Berücksichtigung von multiplem Testen) konnten für keinen Polymorphismus in den Genen für den Liganden TGFB1, für den Rezeptor TGFBR2 und das Signaltransduktionsmolekül SMAD4 erfüllt werden. Die Befunde zu diesen Genen werden daher nicht weiter ausgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die übrigen Kandidatengene aus dem TGFβ-System dargestellt, d.h. die Gene für den Rezeptor TGFBR1 sowie die Signaltransduktionsmoleküle SMAD 2, 3, und SMAD 7. Es werden hier Assoziationen mit  $p < 0,01$  zwischen einzelnen Genvarianten und Funktionsparametern (Vitalität bzw. ROS-Bildung) beschrieben. Fanden sich in einem Gen mehrere derartige Assoziationen, wurde auch das genetische Kopplungsmuster betrachtet.

## 4.5 Analyse der Kandidatengene im TGF $\beta$ -Signalweg

### 4.5.1 TGFBR1

Im für TGFBR1 kodierenden Gen war eine Beeinflussung der Funktionsparameter allein für den SNP rs7031302 im Intron 1 erkennbar (Abbildung 8). Das Variantenallel ging dabei mit einer erhöhten Resistenz gegenüber einem strahleninduzierten Verlust an Zellvitalität einher ( $p=0,01$ ), begleitet von weniger ROS-Bildung ( $p=0,03$ ) nach Bestrahlung. Im heterozygoten Zustand belief sich die Minderung der Zytotoxizität absolut auf etwa 5%, was relativ zum Wildtyp etwa 30% entspricht. Bei der ROS-Produktion zeigte sich entsprechend ein relativer Unterschied von nur etwa 7%. Der homozygote Trägerstatus für das Variantenallel war in der Stichprobe zu selten, um eine Bewertung als eigene Gruppe zu ermöglichen, und wurde daher in der statistischen Analyse mit dem heterozygoten Genotyp kombiniert. Die in der Literatur häufig diskutierte Variante TGFBR1\*6A wirkte sich auf keinen der von mir untersuchten funktionellen Parameter aus.

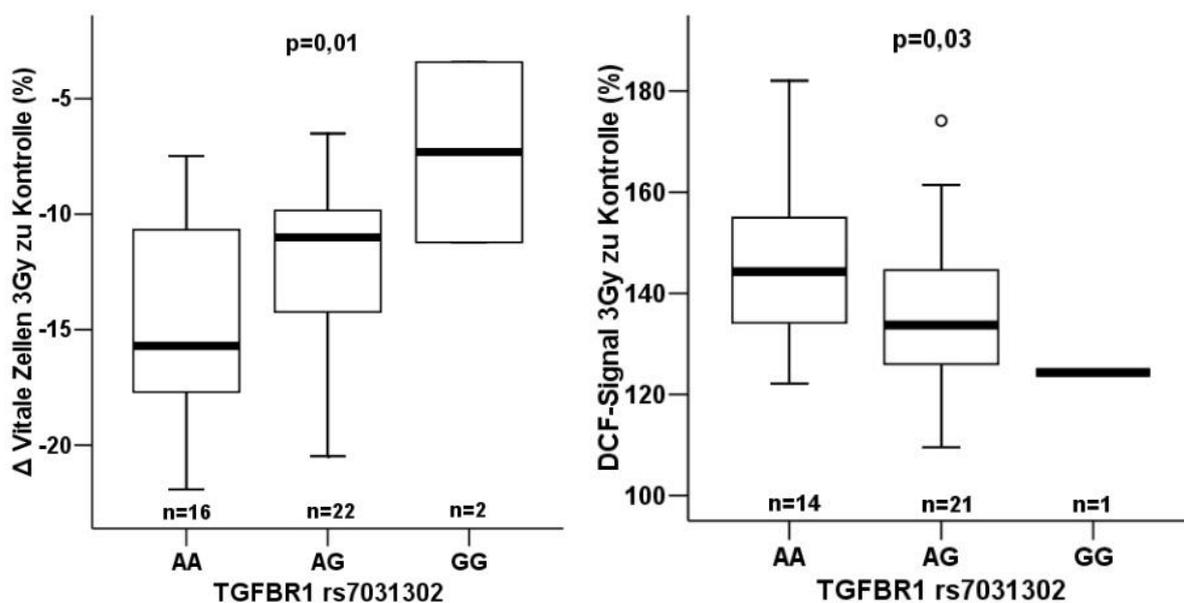


Abbildung 8: Effekte von 3 Gy in Abhängigkeit von TGFBR1 rs7031302. Links sind die Daten für die Zellvitalität, rechts für die ROS-Bildung, jeweils in % zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden jeweils der heterozygote und der homozygote Variantenallel-Status kombiniert und mit dem homozygoten Wildtyp-Allel mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

### 4.5.2 Analyse des SMAD2-Gens

Im SMAD2-Gen zeigte ein Polymorphismus eine Assoziation mit  $p=0,002$ . Dies war rs1792658 in Intron 5, welcher die anti-TGF $\beta$ -Wirkung in Zusammenhang mit Bestrahlung modulierte (Abbildung 9). Bei Vorliegen des C-Variantenallels wirkten sich die zytoprotektiven Effekte

von anti-TGF $\beta$  stärker aus. Gegenüber einer alleinigen Bestrahlung (3 Gy) wird der Anteil vitaler Zellen bei homozygotem Wildtyp-Allel (AA) bei einer Kombinationsbehandlung mit anti-TGF $\beta$  und nachfolgender Bestrahlung (3 Gy) im Median um etwa 1,5% gesteigert, während bei gleicher Behandlung diese Steigerung bei heterozygotem oder homozygotem Vorkommen des C-Variantenallels mit im Median etwa 2,5-3% höher ausfiel. Absolut betrachtet erscheint das durch den Polymorphismus bedingte Effektmaß gering, relativ ist dieses mit nahezu einer Verdopplung der zytoprotektiven Wirkung von anti-TGF $\beta$  aber durchaus beachtlich. Ein weiterer SNP (rs1792689) zeigte einen etwas schwächeren Einfluss auf denselben Funktionsparameter. Im linearen Regressionsmodell mit beiden SNP war jedoch nur ersterer statistisch signifikant bei einem nominalen Niveau von  $p < 0,05$ .

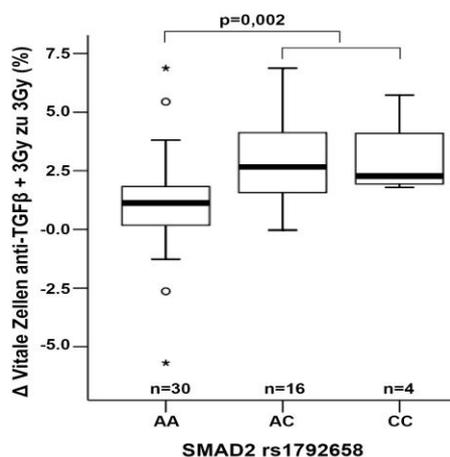


Abbildung 9: Modulation der anti-TGF $\beta$ -Wirkung durch SMAD2 rs1792658. Es ist hier der Einfluss auf die Vitalität der kombinierten Behandlung aus anti-TGF $\beta$  und Bestrahlung (3 Gy) in Bezug auf alleinige Bestrahlung in Prozent (%) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurden die vier Zelllinien mit CC-Genotyp mit dem heterozygoten AC-Genotyp kombiniert und mittels Mann-Whitney-U-Tests dem AA-Genotyp gegenübergestellt; das entsprechende Signifikanzniveau ist als p-Wert angegeben.

#### 4.5.3 Analyse des SMAD3-Gens

Die Kopplungsungleichgewichte der SNP auf dem SMAD3-Gen wurden aus der HapMap-Datenbank mit Hilfe der Software Haploview ermittelt und als LD-Plot dargestellt (Abbildung 10).

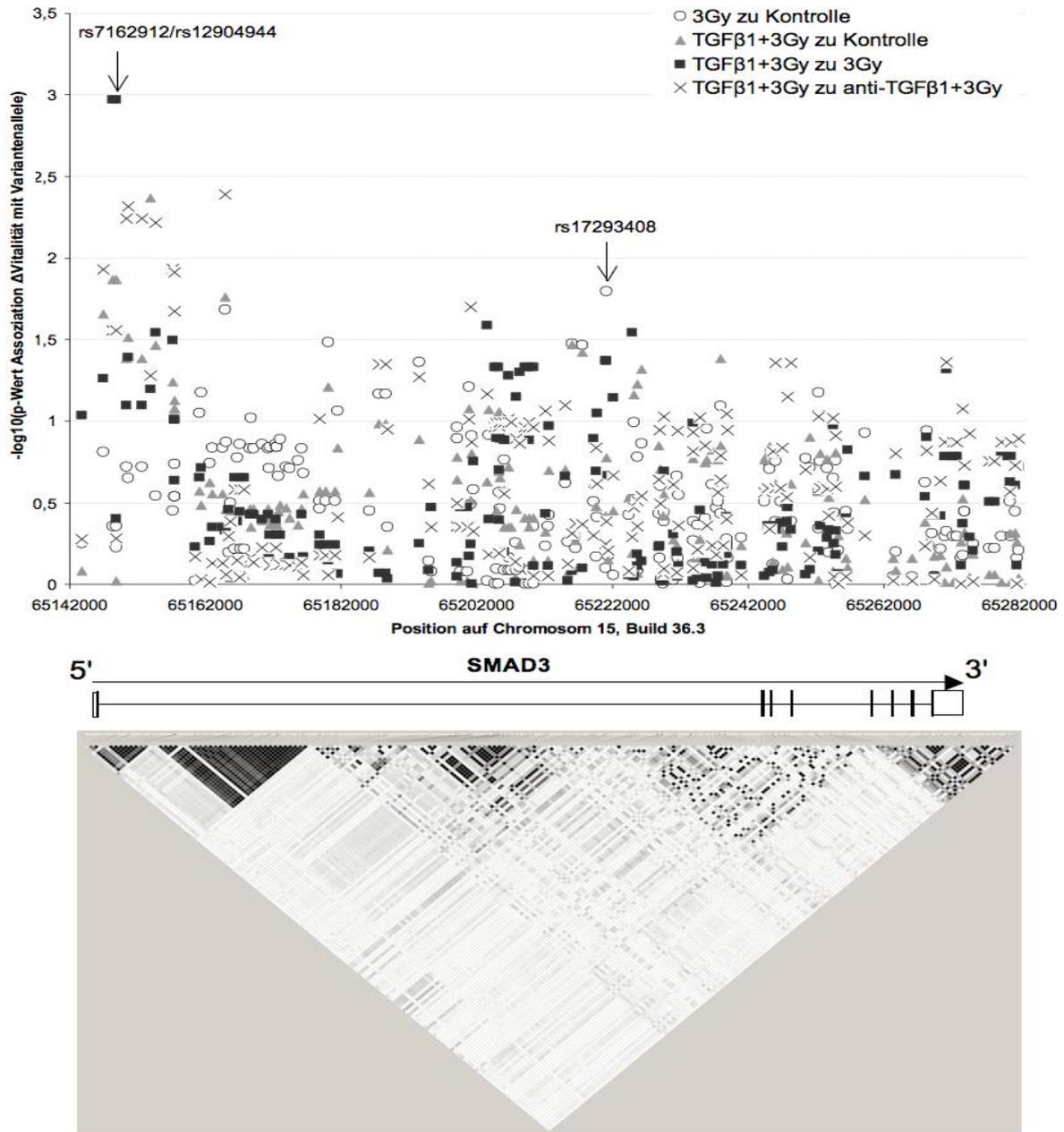


Abbildung 10: Punktediagramm zur Darstellung von nominalen statistischen Signifikanzniveaus und dazugehöriger LD-Plot. Der im unteren Abbildungsteil dargestellte LD-Plot veranschaulicht das Kopplungsungleichgewicht (LD) von SNP-Paaren auf dem SMAD3-Gen einschließlich  $\pm 10$ kb flankierender Sequenzen. Jedes Quadrat repräsentiert einen paarweisen Vergleich des LDs zweier SNP. Je höher der Schwärzungsgrad eines Quadrats ist, umso stärker ausgeprägt ist das Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden dazugehörigen SNP. Der obere Abbildungsteil ist bezüglich der SNP-Positionen auf den unteren Abbildungsteil abgestimmt. Er zeigt die Signifikanzniveaus, aufgetragen als negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes (errechnet mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test), bezüglich der Assoziation eines SNP mit der Veränderung der Vitalität bei den jeweils genannten Bedingungen. Dabei entspricht ein Wert auf der y-Achse von etwa 1,3 einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$  und ein Wert von etwa 2,3 einem Signifikanzniveau von  $p=0,005$ . Damit repräsentieren weit oben im Diagramm liegende Punkte (exemplarisch mit Pfeilen und Benennung des SNP versehen) Assoziationen mit vergleichsweise hoher Signifikanz.

Die beiden in Abbildung 10 mit Pfeilen markierten Assoziationen sind nachfolgend detailliert dargestellt. Die gemäß Beschriftung und Legende genau spezifizierten Punkte mit hoher statistischer Signifikanz im dazugehörigen Punktediagramm sind Grundlage der weiteren Analyse. Diese zeigt sich in den darauf folgenden Boxplot-Darstellungen hinsichtlich der Veränderung der Anzahl an vitalen Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlungsbedingung; einerseits bei Vorliegen des Wildtyps (GG) beziehungsweise der beiden Variantenallele (GT und TT) am SNP rs7162912 sowie andererseits bei Vorliegen des Wildtyps (CC) beziehungsweise des Variantenallels (CT) am SNP rs17293408.

Bei der ersten Assoziation handelt es sich um zwei SNP in perfektem LD, d.h. es liegt eine gemeinsame Vererbung der beiden Allele der SNP rs7162912 und rs12904944 in der untersuchten Stichprobe vor. Somit ist die genetische Information dieser beiden SNP redundant, die nähere Beschreibung beschränkt sich daher auf rs7162912. Dieser ist in Intron 1 des längsten SMAD3-Transkriptes lokalisiert und wirkte sich auf die zytoprotektiven Effekte von TGF $\beta$ 1 aus, wenn dieses 16 h vor Bestrahlung appliziert wurde (Abbildung 11). Gegenüber der alleinigen Bestrahlung wurde die Zellvitalität durch TGF $\beta$ 1 nur beim homozygoten Wildtyp-Allel (GG) von rs7162912 erhöht (Abbildung 11, rechts). Das absolute Effektmaß von im Median etwa 2% muss in Bezug zu den etwa 11% gesehen werden, um welche die Zellvitalität im Median durch Bestrahlung mit 3 Gy unabhängig von Genvarianten verringert wurde.

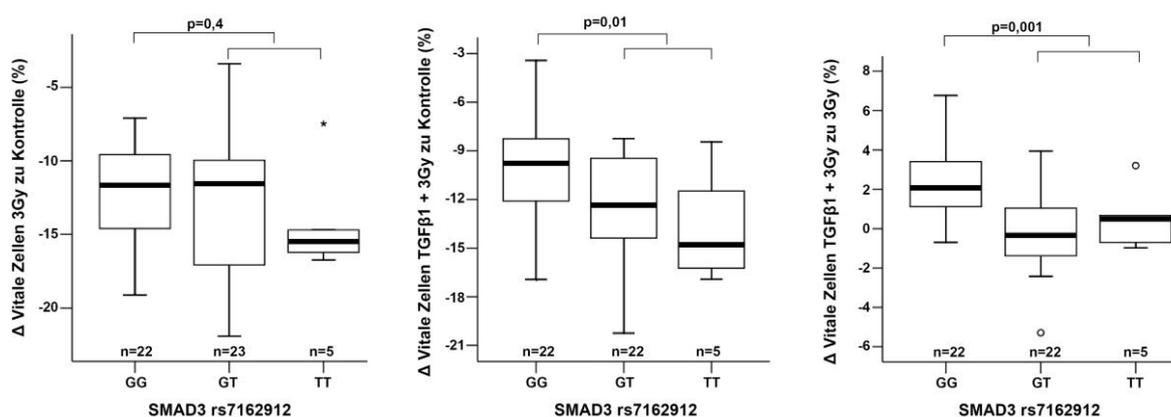


Abbildung 11: SNP rs7162912 und Zellvitalität nach Bestrahlung und TGF $\beta$ 1. Der linke Boxplot zeigt den Einfluss einer Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle. In der Mitte ist der Einfluss einer kombinierten Behandlung mit TGF $\beta$ 1 und Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle dargestellt. Rechts ist der Einfluss einer kombinierten Behandlung mit TGF $\beta$ 1 und Bestrahlung (3 Gy) gegenüber einer alleinigen Bestrahlung (3 Gy) dargestellt. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt, wobei der heterozygote und homozygote Variantenallel-Status zu einer Gruppe zusammengefasst wurden.

Der zweite Assoziations-Lokus in SMAD3 betrifft rs17293408. Hier zeigte sich ein Effekt auf die alleinige Bestrahlung ohne Interaktion mit TGF $\beta$ 1. Während beim homozygoten Wildtyp-Allel (CC) im Median eine Reduktion der vitalen Zellen um etwa 12 % zu beobachten war, waren dies beim heterozygoten Status im Median etwa 10% (Abbildung 12).

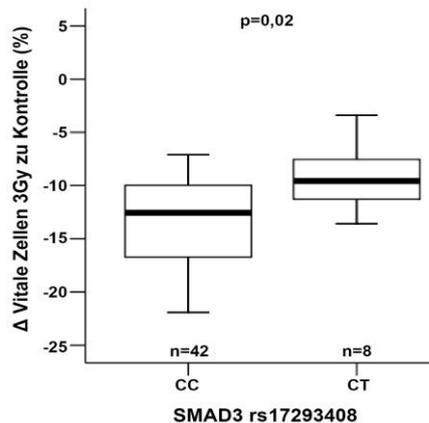


Abbildung 12: Zytotoxizität von 3 Gy in Abhängigkeit von SMAD3 rs17293408.

#### 4.5.4 Analyse des SMAD7-Gens

Die Kopplungsungleichgewichte der SNP auf dem SMAD7-Gen wurden aus der HapMap-Datenbank mit Hilfe der Software Haploview ermittelt und als LD-Plot dargestellt (Abbildung 13).

In Intron 3 konnten zwei miteinander in vollständigem Kopplungsungleichgewicht stehende SNP identifiziert werden (rs 1873190 und rs1873191).

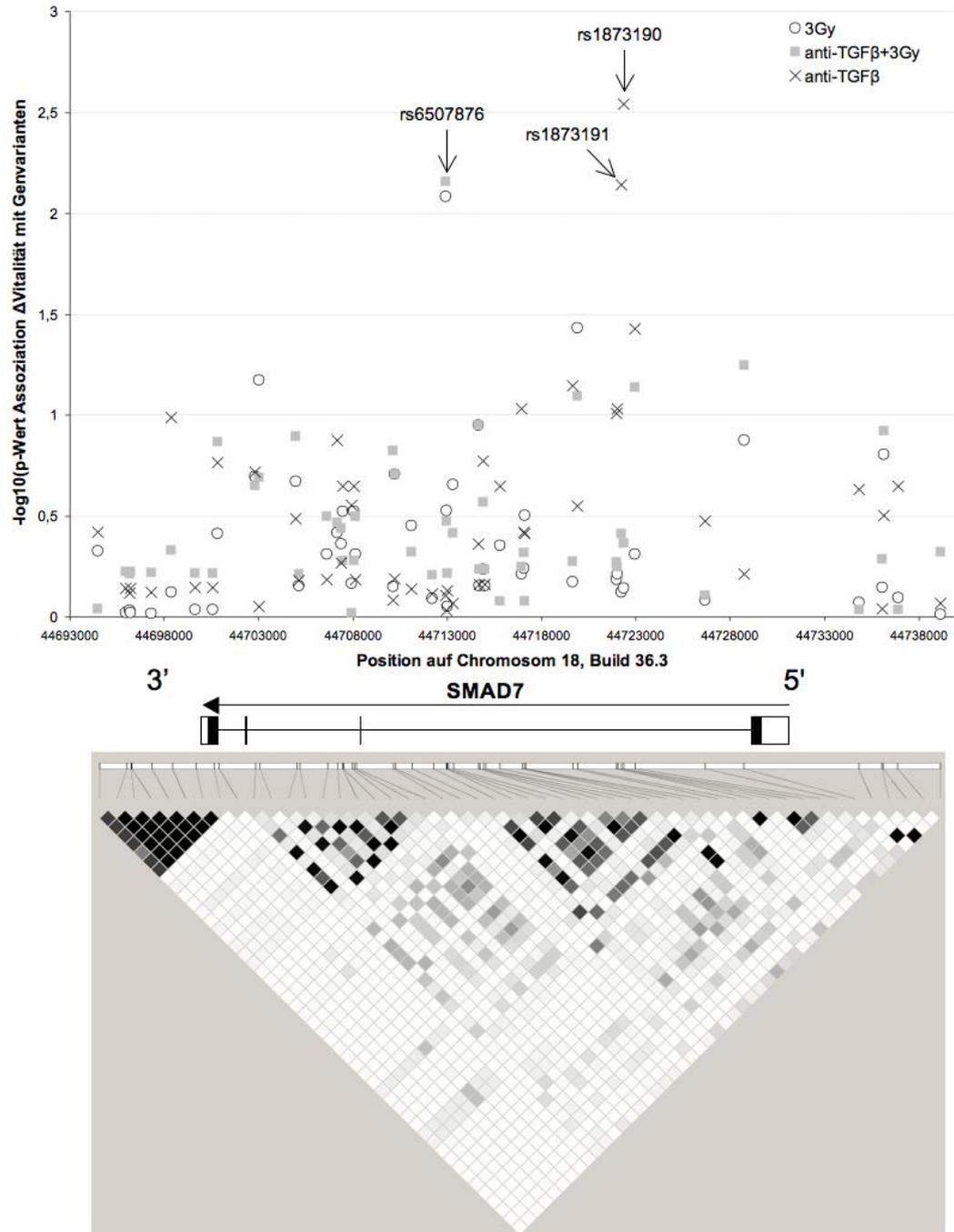


Abbildung 13: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im *SMAD7*-Gen mit LD-Plot. Die Darstellungsweise entspricht Abbildung 14.

Die drei mit Pfeilen markierten Assoziationen im Intron 1 von *SMAD7* wurden genauer betrachtet. Abbildung 14 veranschaulicht die Modulation der Strahlenwirkung durch *SMAD7* rs6507876 und prüft eine Interaktion mit einer Vorbehandlung aus anti-TGFβ bzw TGFβ1.

Beim homozygoten Wildtyp-Allel von rs6507876 hatte eine alleinige Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrollgruppe eine Reduktion der vitalen Zellen im Median um etwa 13% zur Folge, während dies beim heterozygoten Genotyp nur 9% waren (Abbildung 14, links oben;

---

$p=0,008$ ). Dies entspricht einem relativen Unterschied von etwa einem Drittel. Allerdings wiesen nur sieben LCL an dieser Stelle den heterozygoten Status auf. Eine vor der Bestrahlung durchgeführte Hemmung (Abbildung 14, rechts oben) bzw. Stimulation (Abbildung 14, links unten) des TGF $\beta$ -Signalwegs zeigte kaum eine Veränderung gegenüber der alleinigen Bestrahlung.

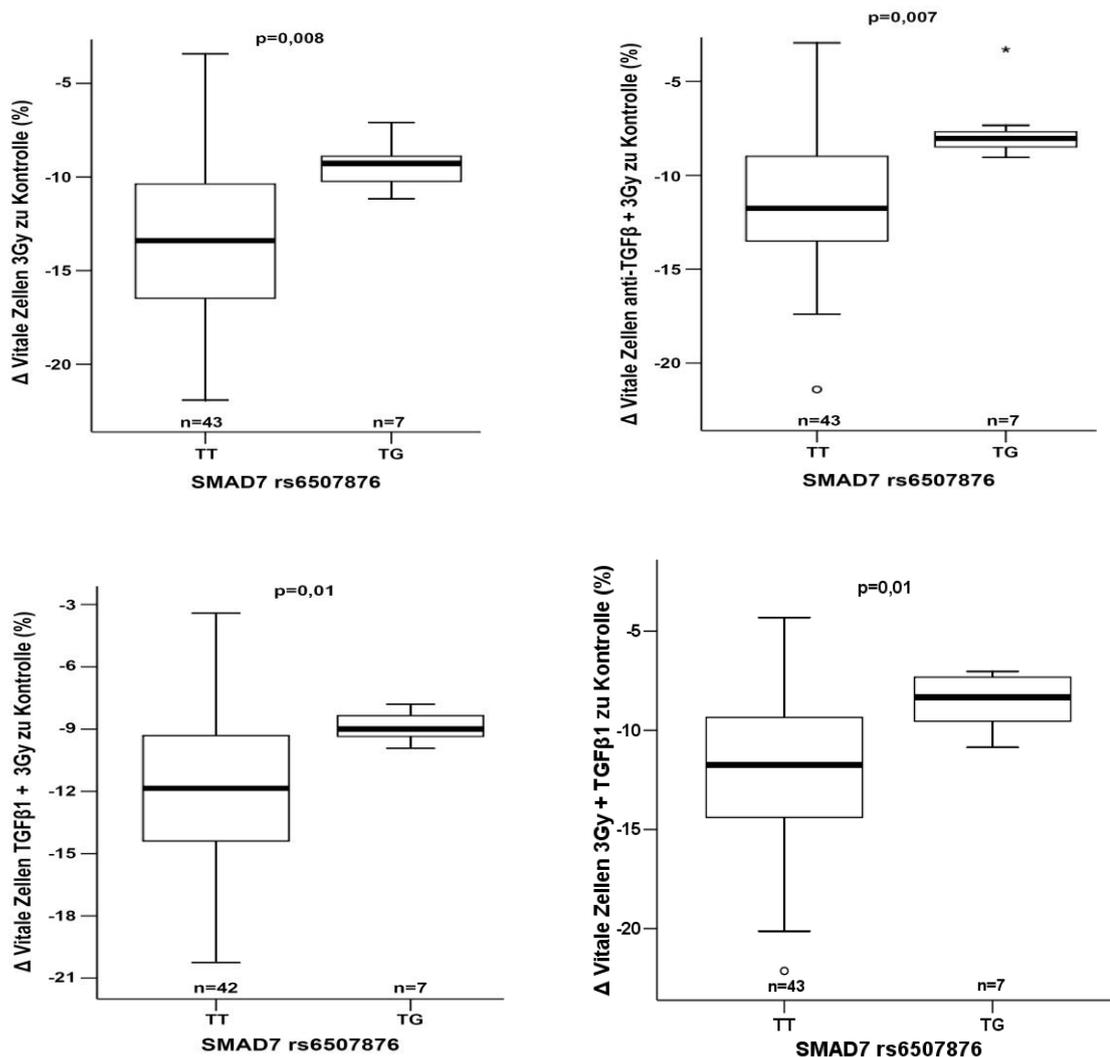


Abbildung 14: Einfluss von SMAD7 rs6507876 auf Zytotoxizität durch 3 Gy. Das Bild links oben zeigt die Effekte des Variantenallels von rs6507876 auf die 3 Gy-Zytotoxizität, das rechts oben auf die kombinierte Behandlung mit anti-TGF $\beta$  und Bestrahlung (3 Gy) gegenüber einer Kontrolle nur mit Zellkultur-Medium. In der unteren Reihe sind die Auswirkungen dieses SNP hinsichtlich der Kombination aus Bestrahlung mit 3 Gy und vorausgegangener (links unten) bzw. nachfolgender TGF $\beta$ 1-Behandlung (rechts unten) gegenüber der Kontrolle dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Da sich der SNP rs1873190 in hohem LD mit rs1873191 befindet, sind nachstehend nur die Effekte für letztgenannten bildlich dargestellt (Abbildung 15). Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich bei einer alleinigen Behandlung mit anti-TGF $\beta$  bei Vorliegen des homozygoten Wildtyp-Allels (GG) eine Zunahme der vitalen Zellen im Median um 1%, wohingegen praktisch keine Veränderung in Gegenwart des Variantenallels auftrat (p=0,007). Auf die Zytotoxizität der Bestrahlung mit 3 Gy wirkte sich diese Genvariante nicht aus.

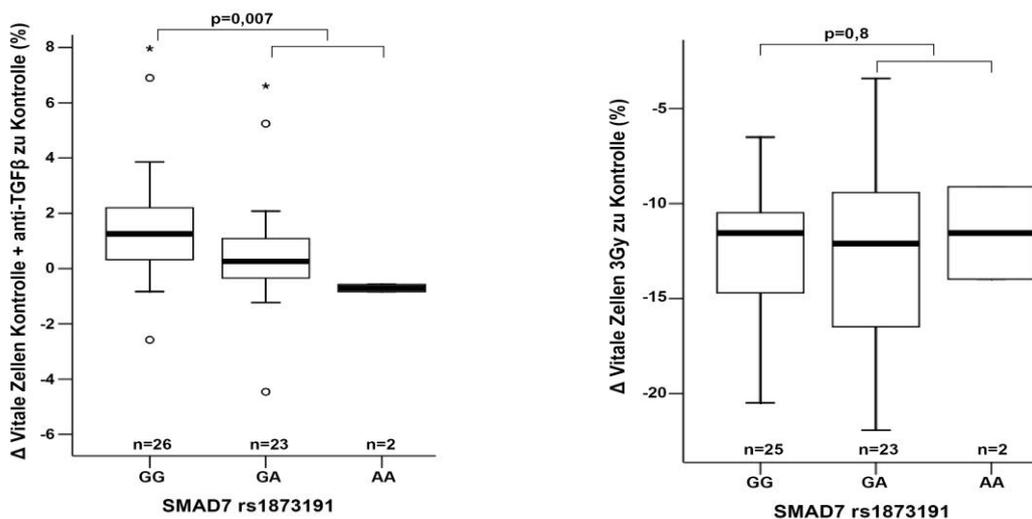


Abbildung 15: Modulation des TGFβ-Systems durch SMAD7 rs1873191. Links wird der Einfluss einer Behandlung mit anti-TGFβ gegenüber der Kontrolle dargestellt. Rechts wird der Einfluss einer Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle dargestellt. Heterozygoter und homozygoter Variantenallel-Status wurden kombiniert und mittels Mann-Whitney-U-Tests mit dem homozygoten Genotyp des Wildtyp-Allels verglichen.

## 4.6 Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen

Die Kriterien für das nominale Signifikanzniveau (ohne Berücksichtigung von multiplem Testen) konnte in den nachfolgend genannten zehn Genen für keinen Polymorphismus erreicht werden: ATM, ERCC2, XRCC5, BRCA1, PRKDC, NBN, RAD50, TP53, LIG1, MLH1. Die Befunde zu diesen Genen werden daher nicht weiter ausgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die übrigen vier Kandidatengene dargestellt.

### 4.6.1 Analyse des BRCA2-Gens

Die Kopplungsungleichgewichte der SNP auf dem BRCA2-Gen wurden aus der HapMap-Datenbank mit Hilfe der Software Haploview ermittelt und als LD-Plot dargestellt (Abbildung 16).

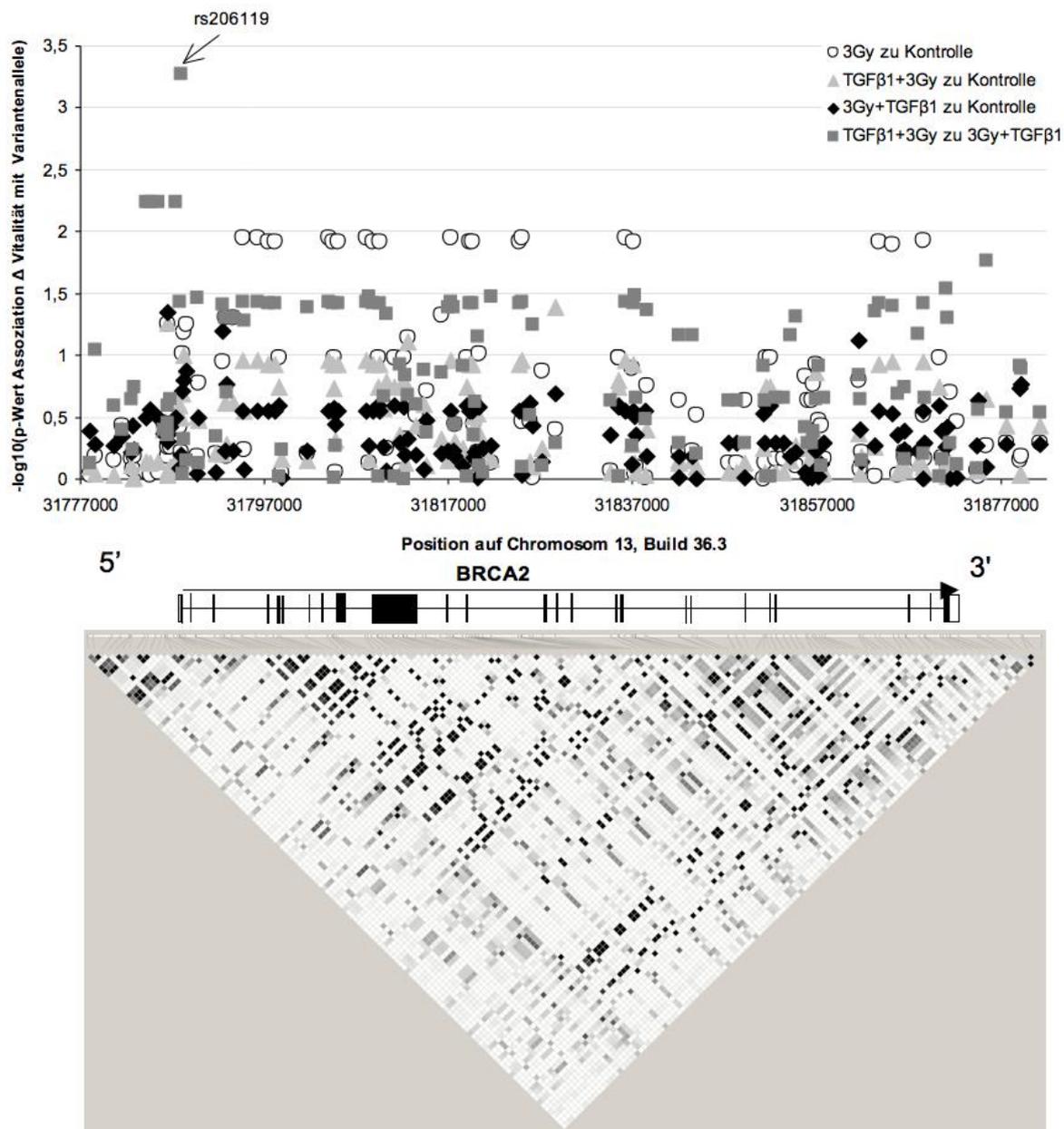


Abbildung 16: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im BRCA2-Gen mit LD-Plot. Die Darstellungsweise entspricht Abbildung 14.

Die mit Pfeil markierte Assoziation im Intron 1 von BRCA2 wurde näher untersucht. Abbildung 16 stellt die Modulation der Strahlenwirkung durch BRCA2 rs206119 dar und prüft eine Interaktion mit einer Vor- bzw. Nachbehandlung mit TGFβ1 bei Vorliegen des Wildtyps AA oder der Variantenallele AG und GG.

Beim homozygoten Wildtyp-Allel und bei beiden Variantenallelen von rs206119 führte eine alleinige Bestrahlung mit 3 Gy gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der vitalen Zellen um 10-12%. Eine Stimulation mit TGFβ1 vor bzw. nach der Bestrahlung (3 Gy) führte generell zu einer Abnahme der Zellvitalität um 9,5-12%. Gegenüber der Stimulation mit TGFβ1

vor Bestrahlung wurde die Zellvitalität durch Stimulation nach der Bestrahlung vor allem beim Wildtyp-Allel von rs206119 erhöht. Das absolute Effektmaß von im Median etwa 1% ist bezüglich der etwa 11% zu sehen, um die die Zellvitalität im Median bei Stimulation vor der Bestrahlung verringert wurde (Abbildung 17).

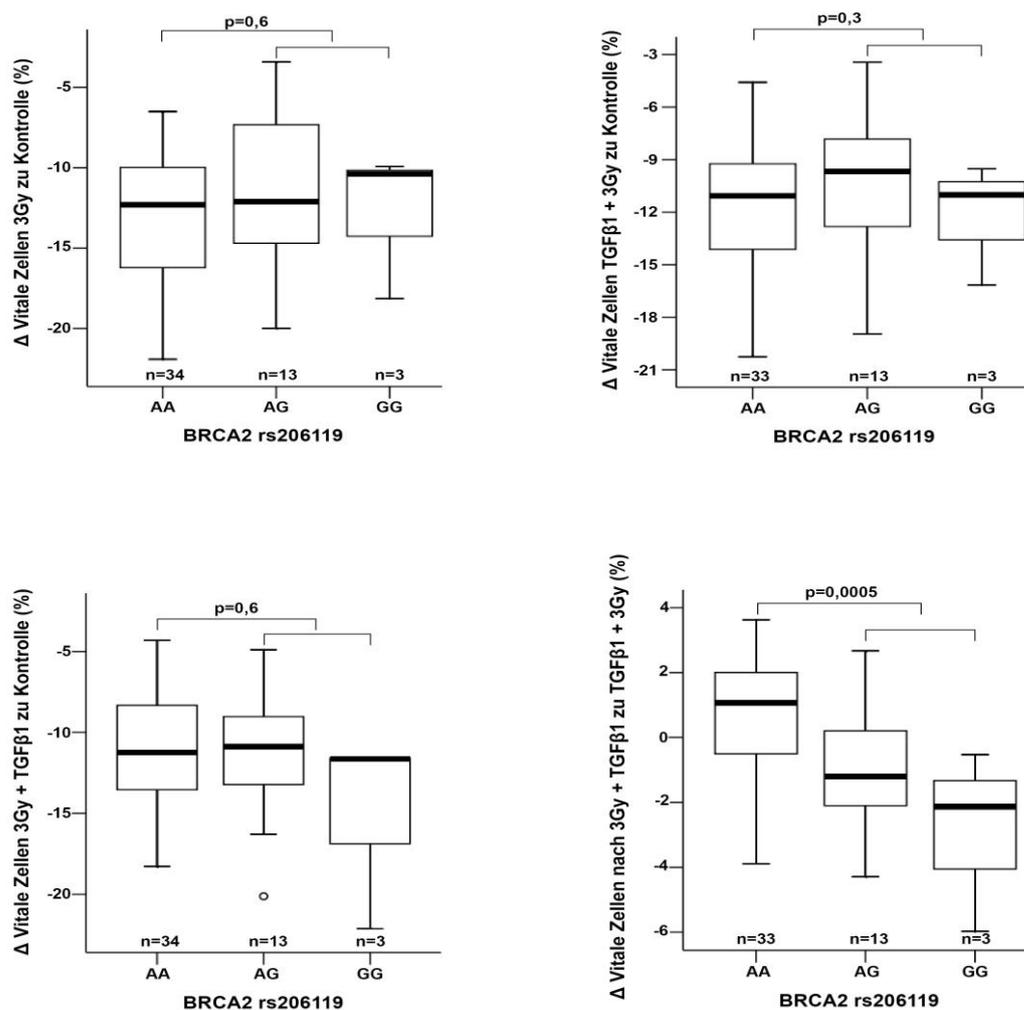


Abbildung 17: SNP rs206119 des BRCA2-Gens und Zellvitalität nach Bestrahlung und Stimulation mit TGF $\beta$ 1. Der Boxplot oben links zeigt den Einfluss einer Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle. Oben rechts wird der Einfluss einer kombinierten Behandlung mit TGF $\beta$ 1 vor der Bestrahlung und Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle dargestellt. Unten links wird der Einfluss einer kombinierten Behandlung aus Bestrahlung (3 Gy) und anschließender Behandlung mit TGF $\beta$ 1 gegenüber der Kontrolle dargestellt. Unten rechts wird der Einfluss einer Behandlung mit TGF $\beta$ 1 nach erfolgter Bestrahlung gegenüber einer Behandlung mit TGF $\beta$ 1 vor der Bestrahlung (3 Gy) dargestellt. Heterozygoter und homozygoter Variantenallel-Status wurden kombiniert und mittels Mann-Whitney-U-Tests mit dem homozygoten Genotyp des Wildtyp-Allels verglichen.

#### 4.6.2 Analyse des MSH2-Gens

Die Boxplot-Analyse (Abbildung 18) zweier Vergleiche von unterschiedlichen Behandlungsbedingungen bezieht sich auf den SNP rs1863332 im 5'-Bereich (Promotorregion) des MSH2-Gens.

Eine alleinige Bestrahlung hatte beim homozygoten Wildtyp-Allel eine Reduktion vitaler Zellen im Median um etwa 12% zur Folge, während dies bei Vorliegen des heterozygoten Genotyps im Median nur etwa 7,5% waren (Abbildung 18 links;  $p=0,03$ ). Relativ gesehen entspricht dies einem Unterschied von fast der Hälfte. Auch hier wiesen nur fünf LCL das Variantenallel TG auf. Dieser Effekt stellt sich ähnlich dar bei additiver Stimulation mit TGF $\beta$  vor der Bestrahlung.

Eine Stimulation mit TGF $\beta$ 1 vor Bestrahlung zeigte bei dem Wildtyp einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt von knapp 1% im Vergleich zur Stimulation nach der Bestrahlung,

bei Vorliegen des Variantenallels TG hingegen liegt ein zytoprotektiver Effekt von etwa 1,5% vor. Verglichen mit einer alleinigen Bestrahlung hat eine der Bestrahlung vorgezogene Stimulation weder beim Wildtyp noch beim Variantenallel einen Einfluss auf die Zellvitalität.

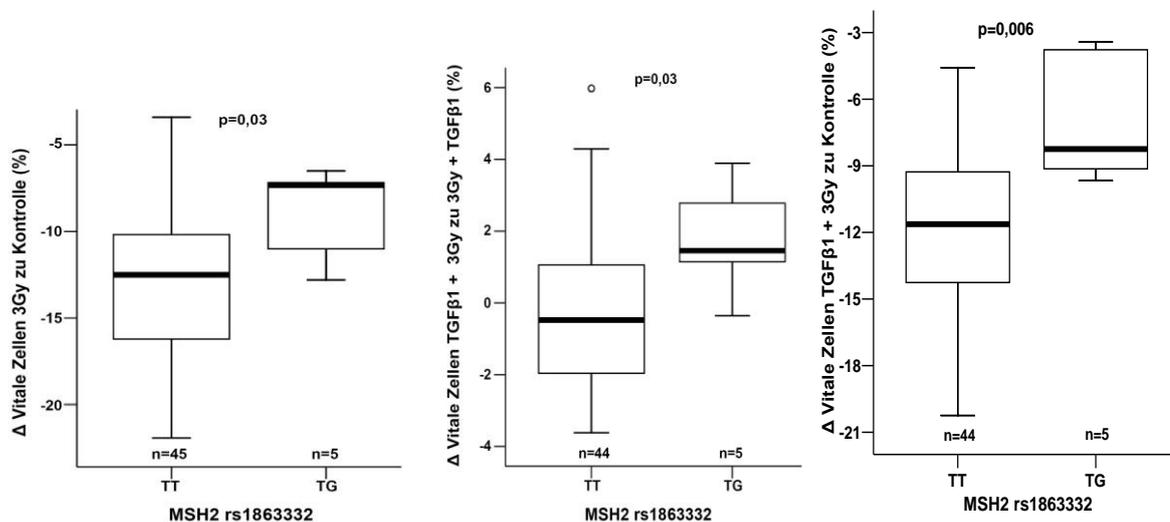


Abbildung 18: Einflüsse auf die Zellvitalität am SNP rs1863332 des MSH2-Gens bei Vorliegen des Wildtyps TT und des Variantenallels TG. Das linke Bild zeigt die Effekte einer alleinigen Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle dargestellt. In der Mitte wird der Einfluss einer Stimulation mit TGF $\beta$ 1 vor der Bestrahlung mit dem Effekt einer Behandlung mit TGF $\beta$ 1 nach der Bestrahlung verglichen. Rechts wird der Einfluss einer Stimulation mit TGF $\beta$ 1 vor Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle dargestellt. Zur statistischen Auswertung diente der Mann-Whitney-U-Test.

### 4.6.3 Analyse des MSH6-Gens

Die Kopplungsungleichgewichte der SNP auf dem MSH6-Gen wurden aus der HapMap-Datenbank mit Hilfe der Software Haploview ermittelt und als LD-Plot dargestellt (Abbildung 19).

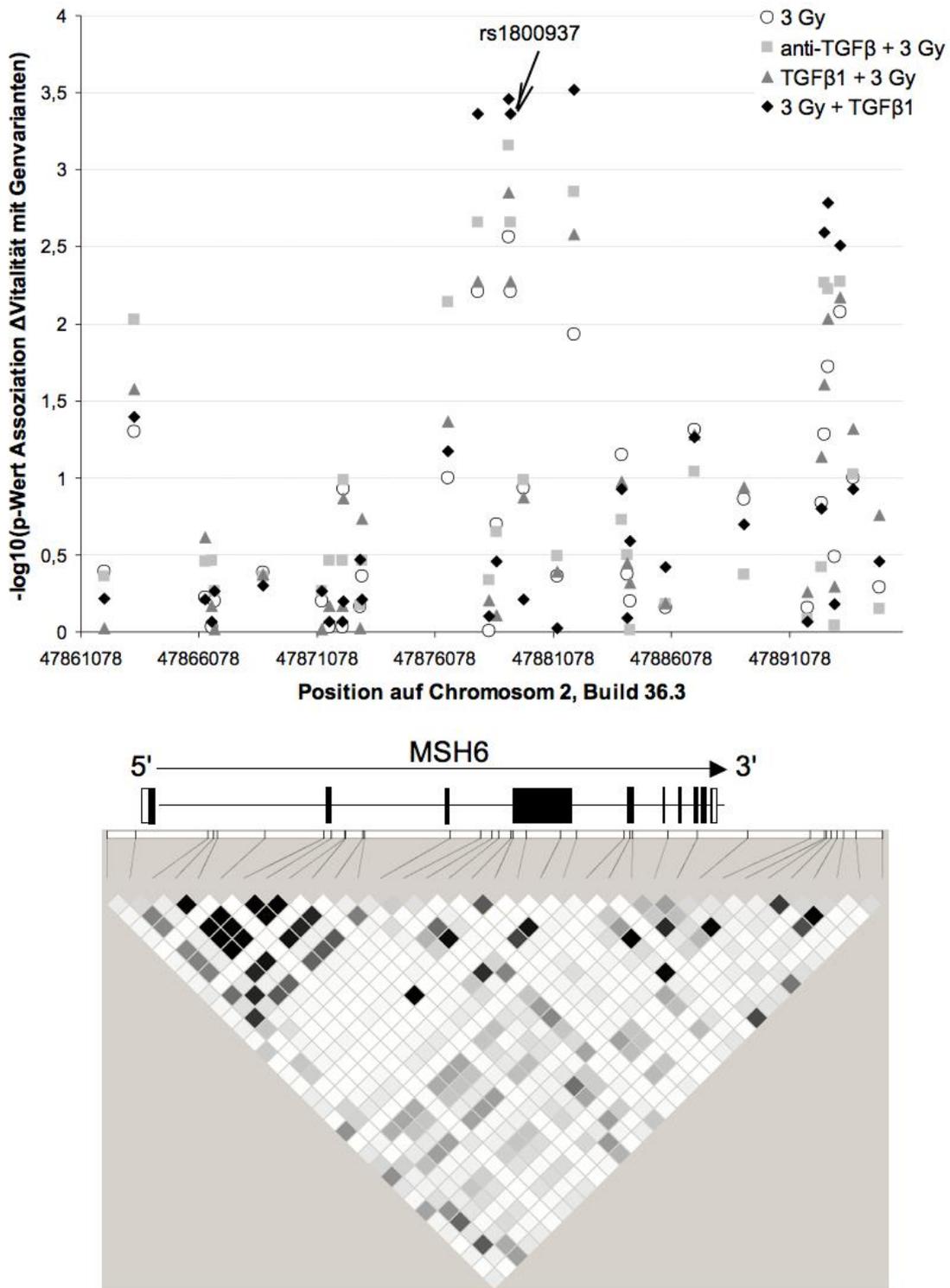


Abbildung 19: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im MSH6-Gen mit LD-Plot. Die Darstellungsweise entspricht Abbildung 14.

Die mit einem Pfeil markierte Assoziation ist Grundlage der weiteren Analyse.

Abbildung 20 zeigt die Veränderung der Zellvitalität in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlungsbedingung und bei Vorliegen des Wildtyps (CC) beziehungsweise der beiden Variantenallele (CT und TT) am SNP rs1800937. An diesem SNP liegt ein Stopcodon vor (Tyr214stop). Beim homozygoten Wildtyp-Allel von rs1800937 reduzierte sich bei alleiniger Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrollgruppe die Anzahl der vitalen Zellen im Median um etwa 13%, während dies bei den Variantenallelen nur etwa 9% waren (Abbildung 20, links oben;  $p=0,005$ ), was einem relativen Unterschied von etwa einem Drittel entspricht.

Im Hinblick auf die Reduktion vitaler Zellen haben bei Vorlage des Variantenallels CT die zuvor durchgeführte Hemmung mit anti-TGF $\beta$  ( $p=0,002$ ) bzw. die nachträgliche Stimulation mit TGF $\beta$ 1 ( $p=0,0003$ ) einen hochsignifikant protektiven Charakter, so dass in Relation etwa um ein Viertel mehr vitale Zellen verbleiben. Auch die Vorlage eines Variantenallels hat gegenüber der Vorlage des Wildtyps einen protektiven Charakter, unabhängig von der additiven Behandlung mit TGF $\beta$ 1 und anti-TGF $\beta$ , da in Relation etwa ein Drittel mehr vitale Zellen verbleiben.

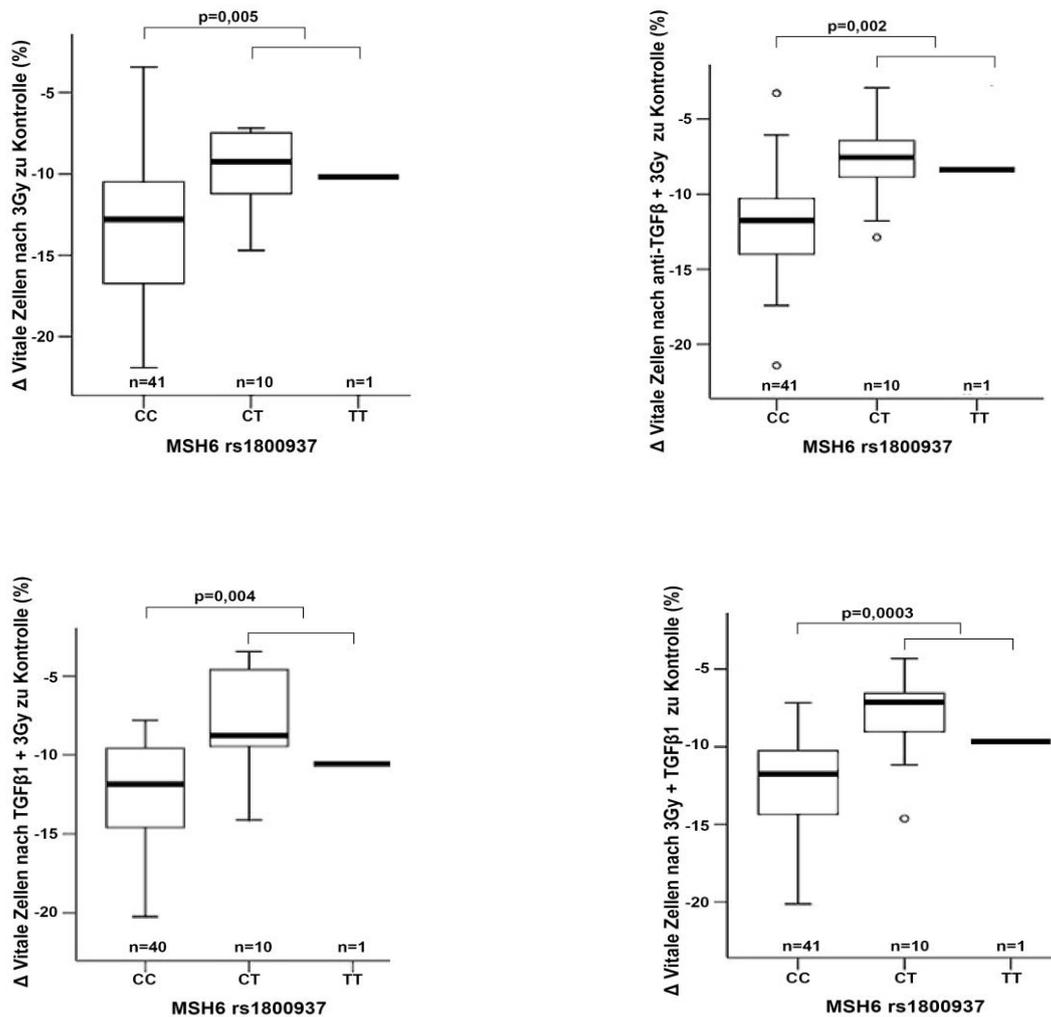


Abbildung 20: SNP rs1800937 des MSH6-Gens und Zellvitalität nach alleiniger Bestrahlung (oben links), additiver vorheriger Hemmung durch anti-TGF $\beta$  (oben rechts), sowie durch vorherige (unten links) bzw. nachträgliche Stimulation durch TGF $\beta$  (unten rechts). Heterozygoter und homozygoter Variantenallel-Status wurden kombiniert und mittels Mann-Whitney-U-Test mit dem homozygoten Genotyp des Wildtyp-Allels verglichen.

#### 4.6.4 Analyse des XRCC1-Gens

Die Kopplungsungleichgewichte der SNP auf dem XRCC1-Gen wurden aus der HapMap-Datenbank mit Hilfe der Software Haploview ermittelt und als LD-Plot dargestellt (Abbildung 21).

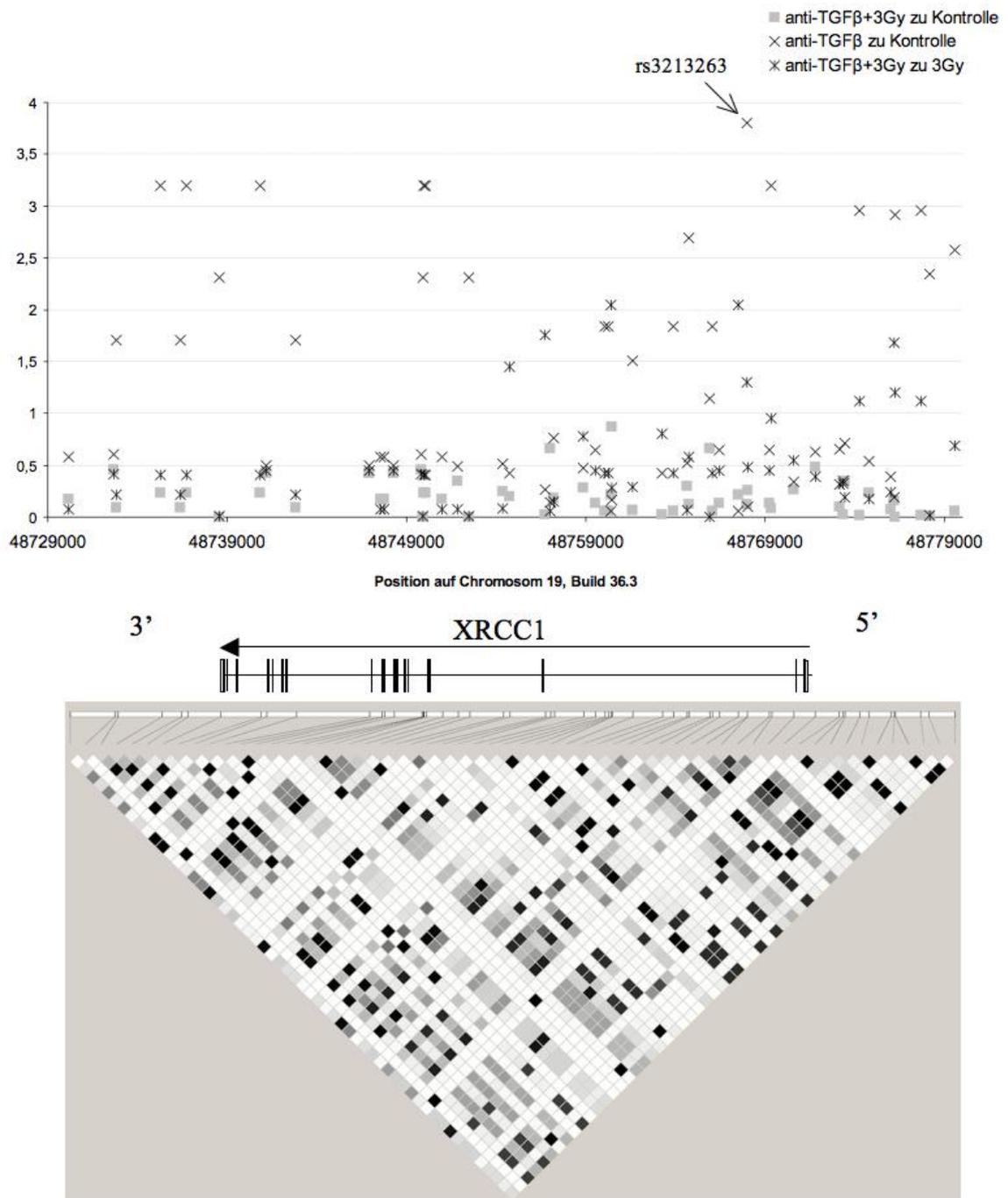


Abbildung 21: Genotyp-Phänotyp-Assoziationen im XRCC1-Gen mit LD-Plot. Die Darstellungsweise entspricht Abbildung 14.

Der mit einem Pfeil markierte Assoziations-Lokus in XRCC1 mit hoher statistischer Signifikanz im dazugehörigen Punktediagramm betrifft rs3213263 und ist Grundlage der weiteren Analyse.

Hier zeigte sich bei einer alleinigen Hemmung mit anti-TGF $\beta$  bei Vorliegen des Variantenallels TT gegenüber dem Wildtyp und dem Variantenallel CT ein vergleichsweise hoher zytoprotektiver Effekt von gut 2% ( $p=0,0002$ ). Nicht nur ohne Bestrahlung, sondern auch bei Bestrahlung mit vorheriger Hemmung durch anti-TGF $\beta$  kommt dieser vergleichsweise hohe zytoprotektive Effekt des Variantenallels TT zum Tragen. Gleichzeitig ist auch der zytotoxische Effekt einer alleinigen Bestrahlung bei Vorliegen des Variantenallels TT gegenüber den anderen Allelen mit etwa 14% vergleichsweise am höchsten ( $p=0,05$ , vergl. Abbildung 22).

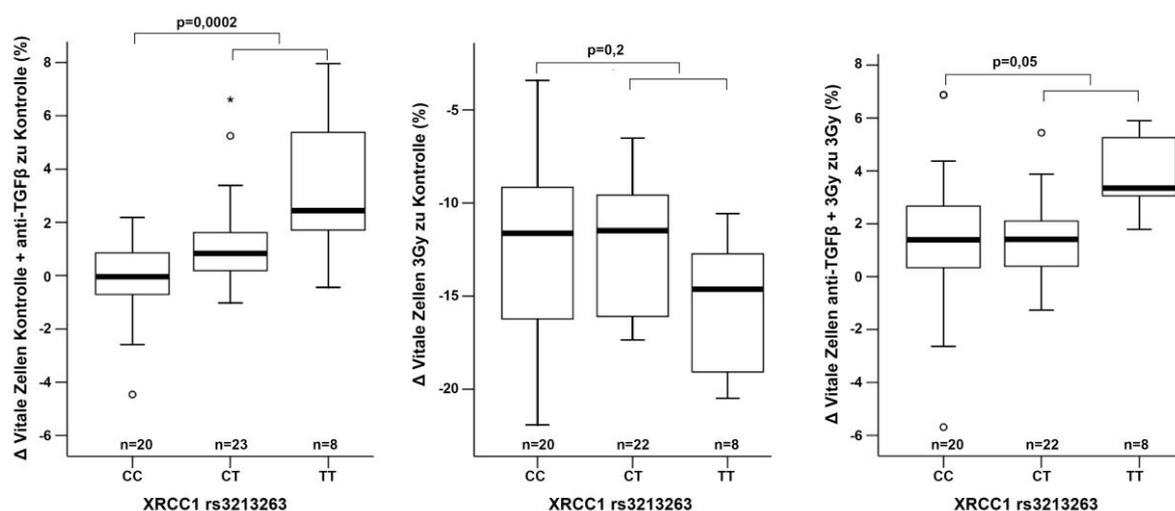


Abbildung 22: SNP rs3213263 in XRCC1 und Zellvitalität nach anti-TGF $\beta$ , Bestrahlung und Kombination aus beiden Behandlungen. Der linke Boxplot zeigt den Effekt des Variantenallels auf alleinige Gabe von anti-TGF $\beta$ 1 gegenüber der Kontrolle, das mittlere zeigt den Effekt auf die 3 Gy-Zytotoxizität, das rechte auf die kombinierte Behandlung mit anti-TGF $\beta$ 1 und Bestrahlung (3 Gy) gegenüber einer alleinigen Bestrahlung (3 Gy). Zur statistischen Auswertung diente der Mann-Whitney-U-Test.

## 4.7 Zusammenfassende Betrachtung

Diejenigen sechs SNP, welche in singulärer Analyse die strahleninduzierte Zytotoxizität beeinflussten, wurden nun kombiniert in einem linearen Regressionsmodell analysiert. Mit den vier SNP rs1800937 (im Genbereich von MSH6), rs17293408 (SMAD3), rs6507876 (SMAD7) und rs1863332 (MSH2) konnten 29,3% der beobachteten Variabilität der radiogenen Zytotoxizität bestimmt werden (siehe Tabelle 7). Der p-Wert von 0,001 für dieses Modell kann jedoch nach Adjustierung auf die Zahl der insgesamt getesteten Genvarianten auf Basis meiner Datenlage nicht als statistisch signifikant betrachtet werden. Die beiden anderen SNP mit  $p < 0,05$  aus der univariaten Analyse, rs7031302 (TGFBR1) und rs7162912 (SMAD3), zeigten im multivariaten Modell keine Assoziation mit  $p < 0,05$ .

Tabelle 7: Strahleninduzierte Abnahme der Zellvitalität in Abhängigkeit multipler Genpolymorphismen. Die durch 3 Gy gegenüber der Kontrolle reduzierte Zellvitalität wurde als abhängige, vier zuvor als signifikant beschriebene Varianten als unabhängige Variablen verwendet. Die zugehörigen Gene sind jeweils direkt nach dem betreffenden SNP in Klammern genannt. Für jedes der vier Modelle ist das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) adjustiert auf die Anzahl der berücksichtigten SNP und der zugehörige p-Wert als Ausdruck der statistischen Signifikanz angegeben. Mit dem Shapiro-Wilk-Test fanden sich für jede Kombination aus funktionellem Messparameter und Genotyp-Ausprägung keine gravierenden Abweichungen von einer Normalverteilung. Die Berechnungen erfolgten mit der Statistik-Software SPSS, Version 12.0. Für die lineare Regressionsanalyse wurde die Option „stepwise“ gewählt mit 0,05 als „entry“ und 0,10 als „removal“.

Modell	SNP in Modell (Gen)	adjustierter $r^2$ -Wert (%)	p-Wert
1	rs1800937 (MSH6)	9,7	0,02
2	rs1800937, rs17293408 (SMAD3)	17,7	0,004
3	rs1800937, rs17293408, rs6507876 (SMAD7)	23,4	0,002
4	rs1800937, rs17293408, rs6507876, rs1863332 (MSH2)	29,3	0,001

Da genetische Prädiktoren in Zusammenhang mit der Aktivität des TGF $\beta$ -Signalwegs von besonderem Interesse waren, wurden entsprechende multivariate SNP-Analysen auch im Hinblick auf die zytotoxischen Effekte von Bestrahlung bei gleichzeitiger Behandlung mit TGF $\beta$ 1- bzw. mit anti- TGF $\beta$ 1 durchgeführt.

Bei Zugabe von TGF $\beta$ 1 16 h vor Bestrahlung konnten 37,3% der Variabilität der resultierenden Zytotoxizität dieser Kombinationsbehandlung durch drei SNP erklärt werden (Tabelle 8). Der zugehörige p-Wert von 0,00001 kann selbst in Anbetracht der Gesamtzahl der 1656 durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Tests als statistisch signifikant angesehen werden. Auffällig ist in diesem Modell im Vergleich zu demjenigen bei alleiniger Bestrahlung (Tabelle 7) das Fehlen des SNP rs17293408 in SMAD3 bei Beibehaltung der anderen drei SNP wenngleich in veränderter Gewichtung.

Tabelle 8: Einfluss multipler Varianten auf Zellvitalität durch Behandlung mit TGF $\beta$ 1 vor Bestrahlung mit 3 Gy in Bezug zur Kontrolle. Der Darstellungsmodus entspricht Tabelle 7.

Modell	SNP in Modell	adjustierter $r^2$ -Wert (%)	p-Wert
1	rs1863332 (MSH2)	15,2	0,003
2	rs1863332, rs6507876 (SMAD7)	26,7	0,0002
3	rs1863332, rs6507876, rs1800937 (MSH6)	37,3	0,00001

Wurde TGF $\beta$ 1 unmittelbar nach Bestrahlung zugegeben, zeigten sich, erneut bei Fehlen eines relevanten Einflusses des SMAD3-SNP rs17293408, ansonsten dieselben SNP als Modellprädiktoren wie bei alleiniger Bestrahlung, und dies auch in derselben Gewichtung (Tabelle 9). Den stärksten Effekt hatte rs1800937 (MSH6), gefolgt von rs6507876 (SMAD7) und

rs1863332 (MSH2). Auch der adjustierte  $r^2$ -Wert des Modells als Maß für den durch die betreffenden Faktoren determinierten Anteil der funktionellen Variabilität war mit 29,9% sehr ähnlich demjenigen bei Bestrahlung ohne zusätzliche Behandlung (29,3%, siehe Tabelle 7). Eine statistische Signifikanz kann hier unter Berücksichtigung multiplen Testens auf Grundlage meines Datensatzes nicht proklamiert werden. Vergleicht man die Stärke der SNP-Effekte in den Regressionsmodellen für eine Behandlung mit TGF $\beta$ 1 vor mit derjenigen nach Bestrahlung, fällt ein stärkerer Einfluss der MSH2- und ein geringerer der MSH6-Variante bei Vorinkubation mit TGF $\beta$ 1 auf.

Tabelle 9: Einfluss multipler Varianten auf Zellvitalität durch Bestrahlung mit 3 Gy und unmittelbar nachfolgender Zugabe von TGF $\beta$ 1 in Bezug zur Kontrolle. Der Darstellungsmodus entspricht Tabelle 7 und 8.

Modell	SNP in Modell	adjustierter $r^2$ -Wert (%)	p-Wert
1	rs1800937 (MSH6)	18,4	0,001
2	rs1800937, rs6507876 (SMAD7)	24,8	0,001
3	rs1800937, rs6507876, rs1863332 (MSH2)	29,9	0,0003

Bei der analogen Vorbehandlung mit anti-TGF $\beta$  16 h vor Bestrahlung zeigte sich noch für zwei der vier SNP aus dem obigen Modell für alleinige Bestrahlung ein Einfluss auf die nach Bestrahlung gemessene Zytotoxizität. Dabei konnten 26,9% dieser funktionellen Variabilität auf die beiden SNP rs1800937 (MSH6) und rs6507876 (SMAD7) zurückgeführt werden (Tabelle 10). Wird der p-Wert dieses Modells auf die Zahl der insgesamt durchgeführten Tests von 1656 adjustiert, ergibt sich ein Wert von 0,3, womit das statistische Signifikanzniveau bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 nicht erreicht wurde.

Tabelle 10: Einfluss multipler Varianten auf Zellvitalität durch anti-TGF $\beta$  und 3 Gy in Bezug zur Kontrolle. Darstellungsmodus entspricht Tabelle 7 und 8.

Modell	SNP in Modell	adjustierter $r^2$ -Wert (%)	p-Wert
1	rs1800937 (MSH6)	15,5	0,002
2	rs1800937, rs6507876 (SMAD7)	26,9	0,0002

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt anhand von Assoziationsanalysen an LCL den Einfluss von Genpolymorphismen auf die Wirkung von Röntgenstrahlen, TGF $\beta$ 1 und das Immunglobulin anti-TGF $\beta$ . Bei einer kombinierten Behandlung wurde auch der Einfluss der Behandlungsreihenfolge auf Zellschäden untersucht.

Die Ergebnisse lassen sich in ihrer Aussagekraft aufgrund der unterschiedlichen Signifikanzniveaus, unter denen sie zur Darstellung kommen, graduieren. Somit zeigen sich einerseits hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) und signifikante ( $p < 0,05$ ), andererseits aber auch nicht signifikante Ergebnisse ( $p > 0,05$ ), wobei Letztere allenfalls einen gewissen Trend zum Ausdruck bringen. Nachfolgend werden signifikante Ergebnisse zu den Assoziationsanalysen der LCL dargestellt und in ihrer Wertigkeit diskutiert. Sofern verfügbar, soll mit Hilfe aktueller Literatur ein klinischer Kontext hergestellt werden sowie eine Einordnung in den aktuellen Stand der Forschung zum Thema TGF $\beta$ 1 erfolgen. Somit soll erörtert werden, inwieweit bestimmte Genpolymorphismen von Kandidatengenen des TGF $\beta$ -Signalwegs und DNA-Reparaturgenen einen Einfluss auf die LCL-Vitalität nach alleiniger Bestrahlung und/oder TGF $\beta$ 1-Inkubation oder Inhibition mit anti-TGF $\beta$  haben. Die Reihenfolge ist analog zum Ergebnisteil.

### 5.1 TGFBR1

Das TGFBR1-Gen (*transforming growth factor beta receptor 1*) ist auf dem langen Arm von Chromosom 9 lokalisiert. Das Gen ist ca. 31 kb lang und enthält neun Exons (Vellucci und Reiss 1997). Es kodiert für ein 503 Aminosäuren langes Transmembranprotein, welches mit zwei Isoformen am TGF $\beta$ -Signalweg beteiligt ist. Der TGF $\beta$ -Rezeptor Typ 1 (TGFBR1) phosphoryliert SMAD2- und SMAD3-Proteine, wenn seine Kinase-Domäne selbst in einem heterotetrameren Komplex durch den TGF $\beta$ -Rezeptor Typ 2 (TGFBR2) aktiviert wird (Eickelberg 2001). Die SMAD2- und SMAD3-Proteine interagieren dann im phosphorylierten Zustand mit SMAD4-Proteinen, translozieren als Proteinkomplex zum Zellkern und regulieren so die Expression der Zielgene (Arthur und Bamforth 2011).

Mutationen der TGFBR1- und TGFBR2-Gene werden mit dem Loeys-Dietz-Syndrom in Verbindung gebracht, einem autosomal dominant vererbten Syndrom, welches durch Aortenaneurysmen und komplexe, systemische Manifestationen gekennzeichnet ist (Loeys et al. 2005;

Loeys et al. 2006). Die Hypothese, dass das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, durch Mutationen des TGFBR1-Gens erhöht wird, ließ sich nicht bestätigen (Carvajal-Carmona et al. 2010). Allerdings scheinen Polymorphismen im TGFBR1-Gen zumindest in Nordchina mit dem Risiko, an einem Adenokarzinom des ösophagogastralen Überganges zu erkranken, assoziiert zu sein (Guo et al. 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen am SNP rs7031302, in Intron 1 von TGFBR1 lokalisiert, bei Vorhandensein des Wildtyps (AA) im Vergleich zu den Variantenallelen eine statistisch signifikante Reduktion vitaler Zellen nach alleiniger Bestrahlung (3 Gy) gegenüber der Kontrolle ( $p=0,01$ ). Ein analoger Effekt dazu stellt sich bei gleichen Bedingungen bezüglich der bestrahlungsinduziert erhöhten Bildung von ROS dar: Gegenüber der Kontrollgruppe werden nach einer alleinigen Bestrahlung mit 3 Gy bei Vorliegen des Wildtyps (AA) am selben SNP relativ viel ROS und vergleichsweise weniger ROS bei Vorliegen der Genvarianten gebildet ( $p=0,03$ ) (vergl. Abbildung 8). Eine additive Behandlung mit TGF $\beta$ 1 oder anti-TGF $\beta$  zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Ausbeuten an ROS.

In der aktuellen Literatur findet sich keine Arbeit, die Bezug auf den SNP rs7031302 auf dem TGFBR1-Gen nimmt. Auch klinische Assoziationen werden nicht beschrieben.

Häufig diskutiert wird die TGF $\beta$ \*6A-Variante, eine Deletionsvariante am SNP rs11466445. Sie ist zwischen Signalpeptid und Rezeptorsequenz lokalisiert und findet sich bei Menschen kaukasischen Ursprungs mit einer Häufigkeit von etwa 10%. Dem Polymorphismus TGF $\beta$ \*6A wird in der Kanzerogenese eine wichtige Rolle zugesprochen (Pasche et al. 2004). Eine frühere Arbeit der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen stellt funktionelle Analysen von Polymorphismen im TGFBR1-Gen dar. Schirmer et al. äußerten in dieser Studie zur Strahlenempfindlichkeit von mononukleären Zellen des peripheren Blutsystems in Abhängigkeit von verschiedenen Polymorphismen die Vermutung, dass die Deletionsvariante \*6A im Signalpeptid von TGFBR1 und der partiell mit ihr gekoppelte SNP rs11568785 die TGF $\beta$ -Signaltransduktion abschwächen. In Abhängigkeit des TGF $\beta$ \*6A-Polymorphismus verursacht Inkubation mit TGF $\beta$ 1 eine verstärkte SMAD7-Expression mit konsekutiver SMAD3-Downregulation über einen negativen *Feedback*-Mechanismus. TGF $\beta$ \*6A bewirkt dabei nach TGF $\beta$ 1-Inkubation eine Abschwächung der SMAD3-Suppression. Dabei zeigte sich bei Vorhandensein der Variantenallele des SNP rs11568785 eine Verstärkung des zytotoxischen Effektes von ionisierenden Strahlen. Dieser Effekt verstärkte sich weiter bei gleichzeitigem Vorliegen des Variantenallels am SNP rs11466445 (Schirmer et al. 2009).

Somit kommt dem Polymorphismus TGFBR1\*6A und dem partiell gekoppelten SNP rs11568785 zum aktuellen Zeitpunkt eine tragende Rolle in der Modulation des TGF $\beta$ -Signalwegs zu. Auch könnte dieser Polymorphismus eine wichtige Bedeutung in der Prognose medikamentöser und strahlentherapeutischer Nebenwirkungen haben (Schirmer et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit blieb bezüglich aller vorgenommenen Behandlungsmodalitäten ein signifikanter Effekt für diesen Polymorphismus aus.

Auch eine signifikante Abhängigkeit von einer Behandlung mit TGF $\beta$  oder anti-TGF $\beta$  konnte bei keinem der untersuchten Polymorphismen beobachtet werden. Es zeigte sich kein Einfluss auf die Zellvitalität.

Im Gegensatz zum oben erwähnten \*6A-Polymorphismus zeigte sich bei Vorhandensein des Wildtyps und nicht der Varianten am SNP rs7031302 eine erhöhte zytotoxische Wirkung ionisierender Strahlung. Da dieser Effekt unabhängig von additiver Gabe von TGF $\beta$ 1 oder anti-TGF $\beta$  zu beobachten war, liegt die Vermutung nahe, dass der Polymorphismus selbst diesem Effekt ursächlich zu Grunde liegt.

## 5.2 SMAD2

Das SMAD2-Gen (*mothers against decapentaplegic homolog of drosophila 2*) ist auf dem Chromosom 18q21.1 lokalisiert und besteht aus zwölf Exons. Es kodiert für das zugehörige Protein, welches aus 467 Aminosäuren besteht. SMAD2 wird zusammen mit SMAD3 eine Schlüsselstellung bei der intrazellulären Signalübertragung im TGF $\beta$ -Signalweg zugesprochen (siehe Kapitel 1.1.2.) (Dai et al. 2009).

Genetische Mutationen im SMAD 2-Gen werden mit kolorektalen Karzinomen und primären Lungentumoren in Verbindung gebracht (Eppert et al. 1996; Heldin et al. 1997; Riggins et al. 1996; Takenoshita et al. 1998). Auch in der Entstehung der kutanen Leishmaniose ist SMAD 2 von Bedeutung (Castellucci et al. 2012).

Bei der vorliegenden Arbeit zeigte der SNP rs1792658 in Intron 5 eine Assoziation mit der Zellvitalität ( $p=0,002$ ) im Hinblick auf die Kombinationsbehandlung mit anti-TGF $\beta$  vor der Bestrahlung gegenüber der alleinigen Bestrahlung. In Gegenwart des Wildtyp-Allels fand sich eine mäßig erhöhte Zellvitalität bei Hemmung mittels anti-TGF $\beta$  vor der Bestrahlung, während sich in Gegenwart der Variantenallele ein deutlich stärkerer zytoprotektiver Effekt zeigte (vergl. Abbildung 9). Die Auswirkung ist relativ gesehen mit nahezu einer Verdopplung der zytoprotektiven Wirkung durch anti-TGF $\beta$  durchaus bemerkenswert.

In der Literatur findet sich eine aktuelle Arbeit, die sich auf den SNP rs1792658 bezieht. Castellucci et al. haben eine Assoziation dieses SNP mit der kutanen Form der Leishmaniose erkannt und damit auf die potenzielle Bedeutung dieses SNP für die Induktion des CTGF (*connective tissue growth factor*) hingewiesen, der für den Wundheilungsprozess bei der kutanen Form der Leishmaniose erforderlich ist (Castellucci et al. 2012).

Abreu et al. konnten zeigen, dass CTGF eine aktivierende Wirkung auf TGF $\beta$ -Signale hat, indem es TGF $\beta$ 1 mit seiner cysteinreichen Domäne direkt bindet (Abreu et al. 2002). Eine Induktion von CTGF durch diesen Polymorphismus könnte somit eine Aktivierung des TGF $\beta$ -Signalwegs zur Folge haben. Eine Hemmung mit anti-TGF $\beta$  würde diese Stimulation möglicherweise wieder aufheben und erscheint im Zusammenhang mit der Behandlung von Patienten mit kutaner Leishmaniose wenig sinnvoll. Eine zusätzliche Stimulation mit TGF $\beta$ 1 wäre hier sinnvoller, erbrachte aber im Rahmen meiner Untersuchungen keine signifikante Veränderung der Zellvitalität. Es gibt keine Erkenntnisse darüber, ob dieser Polymorphismus mit der Entstehung anderer Krankheiten assoziiert ist.

Somit ergibt sich aus dieser Arbeit ein weiterer, statistisch signifikanter Aspekt bezüglich des SNP rs1792658, der möglicherweise in Zusammenhang mit den Erkenntnissen der oben genannten Studien steht.

Je nach Variantenallel an diesem SNP könnte vor einer geplanten Bestrahlung durch zusätzliche Inhibition mit anti-TGF $\beta$  eine relativ gesehen höhere Zytoprotektion des gesunden Gewebes erzielt werden. Beim therapeutischen Einsatz von anti-TGF $\beta$  sollte jedoch immer dessen immunsuppressive Wirkung berücksichtigt werden. Eine genaue Dosisanpassung ist erforderlich. Hierzu sind jedoch weitere Studien notwendig.

### 5.3 SMAD 3

Das SMAD3-Gen befindet sich auf dem Chromosom 15q21-22 und enthält neun Exons. Das zugehörige Protein besteht aus 425 Aminosäuren (Arai et al. 1998; Heldin et al. 1997).

SMAD3 hält eine ähnliche Schlüsselstellung im TGF $\beta$ -Signalweg inne wie SMAD2 (siehe Kapitel 1.1.2) (Dai et al. 2009). Dong et al. entdeckten eine erhöhte Expression von SMAD3 bei Patienten mit Sklerodermie. Sie vermuten, dass Änderungen im TGF $\beta$ -Signalweg in Form einer Hochregulierung des aktivierenden SMAD3 bei gleichzeitiger Defizienz des inhibitorischen SMAD7 für die Hyperresponsivität auf TGF $\beta$ 1, die bei Sklerodermie beobachtet wird, verantwortlich sein könnten (Dong et al. 2002).

Bei den SNP rs7162912 und rs12904944, in Intron 1 des längsten SMAD3-Transkripts gelegen, handelt es sich um zwei SNP in perfektem LD, *linkage disequilibrium*. Die folgende Diskussion bezieht sich daher, wie auch die Ergebnisbeschreibung, auf einen dieser SNP, rs7162912. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich an diesem Polymorphismus bei Homozygotie (GG) eine höhere Strahlenresistenz bei vorausgehender Stimulation mit TGFβ1 (vergl. Abbildung 11, rechts).

Ein weiteres starkes Signal wies der SNP rs17293408 auf. Dieser ist ebenfalls in Intron 1 des längsten SMAD3-Transkripts lokalisiert. Hier ging das seltenere Allel bei alleiniger Bestrahlung ohne Interaktion mit TGFβ1 oder anti-TGFβ mit einer deutlich höheren Strahlenresistenz einher (vergl. Abbildung 12). Anhand der linearen Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass dieser SNP somit, gemeinsam mit Polymorphismen im MSH2-, MSH6- und SMAD7-Gen, immerhin 29,3% der beobachteten Variabilität der bestrahlungsinduzierten Zytotoxizität beeinflusst (vergl. Tabelle 7). Der p-Wert von  $p=0,001$  ist jedoch, wie bereits oben erwähnt, nach Adjustierung auf die Gesamtanzahl der von mir getesteten Genvarianten statistisch als nicht signifikant zu werten. Auf die Auswirkung der anderen Behandlungsmodalitäten zeigte dieser SNP im linearen Regressionsmodell keine signifikante Wirkung. Das ist im Hinblick auf die Ergebnisse einer unten beschriebenen Studie eher erstaunlich.

Auch hier zeigten LCL, die den SNP rs17293408 tragen, bei alleiniger Bestrahlung eine schwächere Strahlenempfindlichkeit, die allerdings auch bei vorheriger additiver Behandlung mit TGFβ1 nachweisbar war (Neumann 2012). Im Rahmen dieser Studie wurden neben LCL auch T-Lymphozyten untersucht. Auch hier hatte der SNP rs17293408 eine zytoprotektive Wirkung unter Bestrahlung (Neumann 2012). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Stimulation mit TGFβ1 die Expression von SMAD3 signifikant reduziert. Nur bei den Trägern der Variante rs17293408 blieb diese konsekutive Reduktion der SMAD3-Expression aus (Neumann 2012). Auch eine weitere Studie aus der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen konnte zeigen, dass dieses Variantenallel (rs17293408) bei Bestrahlung von T-Lymphozyten mit 2 Gy mit einer reduzierten Apoptoserate einherging, wenngleich dies mit  $p=0,097$  zunächst nur als statistischer Trend gewertet wurde (Schirmer et al. 2009). Weitere Literaturangaben zur Funktionalität dieses SNP liegen aktuell nicht vor.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu rs17293408 nach alleiniger Bestrahlung ist in der Bewertung der angewendeten Methodik in dieser Studie als Erfolg zu sehen, da sie für eine gewisse Reliabilität spricht. Die Untersuchung dieser Variante anhand von weiterführenden Studien scheint sinnvoll.

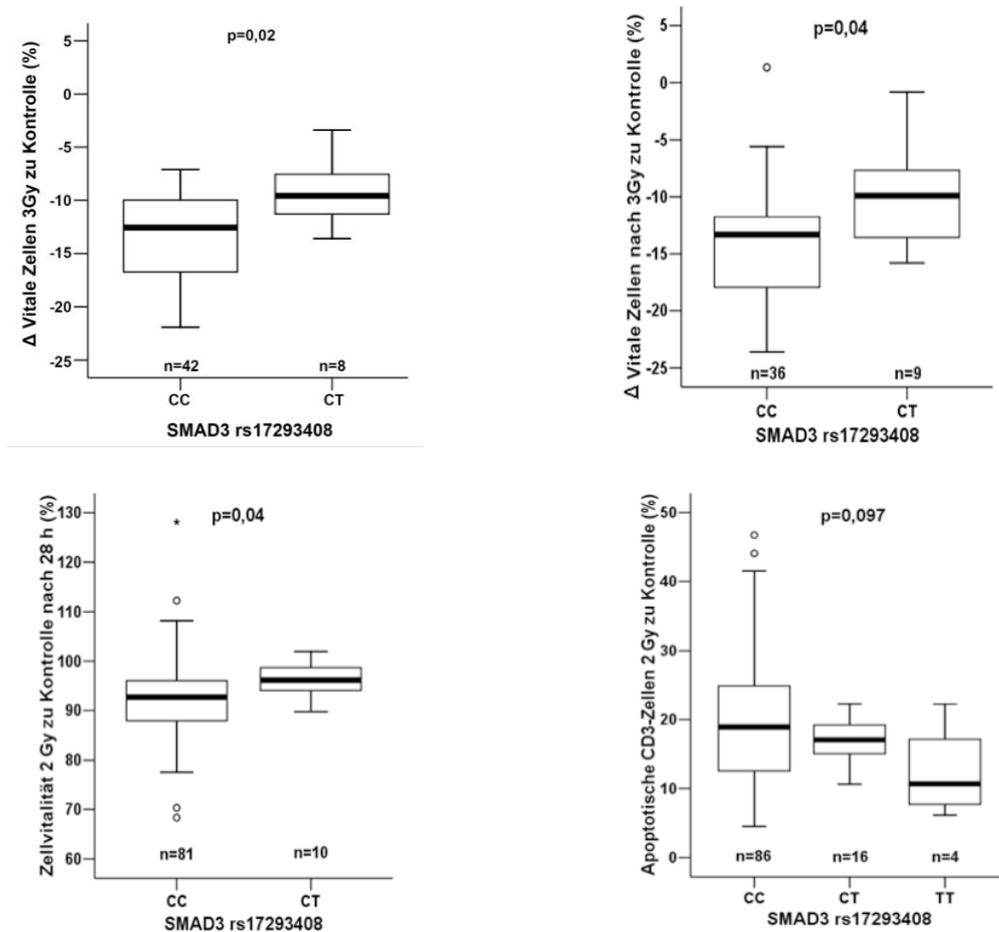


Abbildung 23: Reproduzierbarer Effekt von SMAD3 rs17293408 auf die Zellvitalität nach Bestrahlung. Vergleichende Darstellung: Oben links eigene LCL-Studie, oben rechts LCL-Studie (Neumann, 2012), unten links T-Lymphozyten-Studie (Neumann 2012) Variante mit einer erhöhten Zellvitalität einhergehend und unten rechts frühere Studie (Schirmer et al. 2009) mit einer geringeren Apoptose-rate.

Wie könnte die erhöhte Strahlenresistenz bei Vorhandensein der Variantenallele von rs7162912 und rs17293408 mechanistisch erklärt werden? Einen Ansatzpunkt liefert die Beobachtung einer geringeren Suppression der physiologischen SMAD3-Expression bei (Über)stimulation mit dem TGF $\beta$ 1-Liganden in Gegenwart des Variantenallels von rs17293408, welches Ausdruck einer abgeschwächten Aktivität des TGF $\beta$ -Signalwegs sein könnte (Neumann 2012). Unter der Annahme, dass die Funktionsweise des TGF $\beta$ -Signalwegs bei zytotoxischer Zellschädigung apoptosefördernd ist, würde eine verminderte Aktivität dieses Signalwegs mit entsprechend geringerer Apoptoserate einhergehen. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die erhöhte Strahlenresistenz bei Vorliegen des Variantenallels von rs17293408 sein. Analoge Daten zu rs7162912 in Bezug auf die Responsivität des TGF $\beta$ -Signalwegs liegen mir nicht vor.

## 5.4 SMAD7

SMAD7 ist ein inhibitorisches SMAD, das für ein 426 Aminosäuren langes Protein kodiert. Es ist auf Chromosom 18 lokalisiert (Heldin et al. 1997) und blockiert die Aktivität des TGF $\beta$ -Signalwegs über einen negativen *Feedback*-Mechanismus.

In diesem Zusammenhang wird beschrieben, dass eine erhöhte Expression von SMAD7 eine Strahlenresistenz von Zellen des Pankreaskarzinoms bewirken kann (Dancea et al. 2009). Eine Überexpression von SMAD7 liegt in 50% der Fälle bei Pankreaskarzinomen vor (Boyer und Korc 2005). Aufgrund verschiedener genomweiter Studien konnte gezeigt werden, dass SMAD7-Polymorphismen im Bereich der Risikoregion 18q21 in Verbindung mit der Entstehung kolorektaler Karzinome stehen. Es handelt sich dabei um die drei Varianten rs12953717, rs4939827 und rs4464148 (Broderick et al. 2007). Ein weiterer Zusammenhang wurde später zum SNP rs4939827 (Song et al. 2012) sowie zum SNP rs11874392 hergestellt (Jiang et al. 2013). Diese verdächtigen SNP treten gehäuft in Familien auf, die von kolorektalen Karzinomen betroffen sind. Das Risikoallel zu rs12953717 besitzt eine signifikante Assoziation mit einer verminderten SMAD7-Expression in LCL (Broderick et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte bezogen auf diese SNP kein statistisch signifikantes Ergebnis hinsichtlich veränderter Zellvitalität nach Stimulation mit TGF $\beta$ 1 oder Hemmung mit anti-TGF $\beta$  erzielt werden. Jedoch konnten für zwei andere SNP des SMAD7-Gens signifikante Ergebnisse herausgearbeitet werden. Es zeigte sich, dass eine alleinige Bestrahlung (3 Gy) beim homozygoten Wildtypallel von rs6507876 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion der Zellvitalität zur Folge hatte. Dieser Effekt fand sich auch bei Heterozygotie, jedoch in schwächerer Ausprägung (vergl. Abbildung 14).

Im linearen Regressionsmodell trägt dieser SNP bei allen betrachteten Modalitäten mit einem gewissen Prozentsatz zur Variabilität der resultierenden Zytotoxizität bei. Bei Gabe von TGF $\beta$ 1 vor der Bestrahlung stellt er gemeinsam mit rs1863332 aus MSH2 und rs1800937 aus MSH6 37,3% der Variabilität der aus dieser Behandlung folgenden Zytotoxizität dar. Der p-Wert ist mit 0,00001 statistisch signifikant. Bei TGF $\beta$ 1-Gabe nach der Bestrahlung lag der Anteil der funktionellen Variabilität mit 29,9% bei selbigen SNP. Bei Gabe von anti-TGF $\beta$  vor Bestrahlung bildeten selbige SNP 26,9% der funktionellen Variabilität. Eine statistische Signifikanz kann daraus nicht abgeleitet werden.

Als einziger SNP hatte rs1873191 einen maßgeblichen Einfluss darauf, inwieweit bei einer alleinigen Behandlung mit anti-TGF $\beta$  im Vergleich zur Kontrolle die Anzahl von vitalen Zellen beeinflusst wird. Hier ist in Gegenwart des Variantenallels von rs1873191 eine Zunahme vitaler Zellen bei Behandlung mit anti-TGF $\beta$  zu beobachten ( $p=0,007$ , vergl. Abbildung 14). Dies ist

der einzige Polymorphismus, bei dem im Rahmen dieser Studie eine alleinige Behandlung mit anti-TGF $\beta$  eine Auswirkung auf die Zellvitalität hatte. Ursächlich könnte ein Ausbleiben des negativen *Feedback*-Mechanismus von SMAD7 durch Hemmung mit anti-TGF $\beta$  sein.

In der bereits erwähnten Studie aus der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen konnte bei Vorliegen des Variantenallels von rs6507876 eine stärkere TGF $\beta$ 1-induzierte SMAD7-Expression festgestellt werden als beim Wildtyp (Neumann 2012). Es war eine vergleichbare Auswirkung ( $p=0,1$  bei alleiniger Behandlung mit TGF $\beta$ 1,  $p=0,02$  bei Behandlung mit TGF $\beta$ 1 und nachfolgender Bestrahlung) des gleichen SNP auf die SMAD7-Transkription in LCL zu beobachten (Neumann 2012). Diese Effekte konnten in einer früheren Studie mit PBMC nicht bestätigt werden, wobei eine Maskierung durch das heterogene PBMC-Gemisch als denkbare Erklärung geäußert wurde (Neumann 2012).

In meiner Studie konnte bezogen auf den SNP rs6507876 sowohl bei Stimulation vor der Bestrahlung sowie bei einer Hemmung kaum eine Veränderung der Vitalität im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung gesehen werden. Inwieweit also eine Veränderung der SMAD7-Expression, stimuliert durch TGF $\beta$ 1, einen Einfluss auf die Zellvitalität hat, lässt sich aus der vorliegenden Arbeit nicht näher ableiten.

Zu beiden SNP rs6507876 und rs1873191 gibt es keine weitere Literatur.

## 5.5 BRCA2

Das BRCA2-Gen (*breast cancer 2*) wurde erstmalig vier Jahre nach der Erstbeschreibung des BRCA1-Gens beschrieben. Es ist lokalisiert auf dem Chromosom 13q12.3, beinhaltet 27 Exons (Tavtigian et al. 1996) und kodiert für das zugehörige Protein, welches aus 3418 Aminosäuren besteht. Die Aktivierung von BRCA2 erfolgt durch Phosphorylierung von BRCA1. BRCA2 zählt zu den Tumorsuppressorgenen und hat eine wichtige Funktion in der Zellzykluskontrolle. Es ist außerdem an der homologen Rekombinationsreparatur beteiligt.

Mutationen des BRCA2-Gens haben einen Einfluss auf die Entstehung von Mammakarzinomen (Jonkers et al. 2001), Ovarialkarzinomen (Chen et al. 1995; Welch und King 2001), Lymphomen und Leukämien (Friedenson 2007), Nasopharynxkarzinomen (Qin et al. 2011), Prostata- (Willems et al. 2008) und Pankreaskarzinomen (Murphy et al. 2002). Neben neun weiteren Genen ist auch BRCA2 an der Entstehung der Fanconi-Anämie beteiligt (Meetei et al. 2005).

Der SNP rs206119 ist in Intron 1 des BRCA2-Gens lokalisiert und ging in meiner Untersuchung bei reiner Bestrahlung mit einer Abnahme der Zellvitalität in gleicher Weise einher, unabhängig

davon, ob der Wildtyp oder eine der Varianten vorlag. Wurde mit TGF $\beta$ 1 vor bzw. nach Bestrahlung stimuliert, so konnte sowohl beim Wildtyp wie auch bei den Varianten eine Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden.

Von einer Stimulation mit TGF $\beta$ 1 nach der Bestrahlung profitierte vor allem der Wildtyp im Sinne einer Zytoprotektion mit hochsignifikantem Ergebnis ( $p=0,0005$ , vergl. Abbildung 17).

Der Einfluss intronischer Varianten bzgl. der Proteinfunktionalität ist fraglich, da die Introns beim Spleißvorgang aus der mRNA entfernt und somit nicht translatiert werden. Dennoch kann eine mögliche Auswirkung intronischer Varianten nicht ausgeschlossen werden, v.a. wenn diese am Intron-/Exonübergang lokalisiert sind. So finden sich auch zwei Literaturangaben zu dieser Variante.

Qin et al. konnten anhand einer in der südchinesischen Provinz Kanton durchgeführten Studie belegen, dass dieser SNP signifikant mit der Entstehung von Nasopharynxkarzinomen assoziiert ist. Kantonesen bilden die ethnische Gruppe mit dem höchsten Risiko, an einem Nasopharynxkarzinom zu erkranken (Qin et al. 2011).

Außerdem wurde der SNP rs206119 in eine Studie von Baynes et al. in die Betrachtung mit eingeschlossen. Dabei wurde der Einfluss von Varianten auf fünf verschiedenen Genen auf das Risiko der Entstehung von Brustkrebs untersucht. Zusammen mit 15 anderen SNP auf dem BRCA2-Gen wurde auch der SNP rs206119 in die Analyse eingeschlossen. Schließlich kam man zu dem Ergebnis, dass diese gängigen Varianten das Risiko für Brustkrebs wahrscheinlich nicht erhöhen (Baynes et al. 2007). Somit können die Aussagen der vorliegenden Arbeit bezüglich des SNP rs206119 auf dem BRCA2-Gen als neuer Aspekt gewertet werden, da sie in keinem inhaltlichen Zusammenhang zu der Arbeit von Baynes et al. stehen (Baynes et al. 2007).

Der zytoprotektive Einfluss, den TGF $\beta$ 1 im Rahmen meiner Messungen auf LCL hatte, könnte bei der Behandlung von Nasopharynxkarzinomen von Nutzen sein. Eine lokale Applikation von TGF $\beta$ 1 zum Schutz des topographisch benachbarten Gewebes bei einer Strahlentherapie könnte diskutiert werden. Dabei scheint eine der Bestrahlung nachgeschaltete Verabreichung Erfolg versprechender. Insbesondere Träger des Wildtyps könnten davon profitieren. Diese Überlegungen sind jedoch sehr zurückhaltend zu formulieren und bedürfen weiterer Exploration.

## 5.6 MSH2

MSH2 (*MutS protein homolog 2*) ist auf Chromosom 2p21 lokalisiert und besteht aus 16 Exons (Kolodner et al. 1994). Das Tumorsuppressorgen ist homolog zum E. coli MutS-Gen und an der *Mismatch*-Reparatur beteiligt (Fishel et al. 1994a; Fishel et al. 1993).

Zusammen mit dem Protein MSH3 bildet das Protein MSH2 den heterodimeren MutS $\beta$ -Proteinkomplex (Iyer et al. 2008; Palombo et al. 1996). Es kann ebenfalls einen heterodimeren Komplex mit MSH6 bilden, den MutS $\alpha$  *Mismatch*-Reparatur-Komplex. Dieser ist in der Lage, fehlerhafte Basenpaare zu erkennen und mittels ATPase-Aktivität zu eliminieren (Gradia et al. 1997).

Es wird ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Heterozygotie auf dem MSH2-Gen und einer Prädisposition für die Entstehung eines HNPCC gesehen (Fishel et al. 1993; Jiricny 1994), für die damals bei etwa 50% der betroffenen Patienten eine Mutation des MSH2-Gens verantwortlich gemacht wurde (Fishel et al. 1994a; Fishel et al. 1994b). Auch mit dem Muir-Torre-Syndrom wird MSH2 assoziiert (Barana et al. 2004).

Darüber hinaus haben Mutationen auf dem MSH2-Gen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben von Patienten mit einem Glioblastoma multiforme (Wibom et al. 2012).

In einer aktuellen Arbeit kommen die Autoren zu dem Schluss, dass in einer Umgebung mit oxidativem Stress die induzierbare ektopische Expression von MSH2 wie ein Alarmsignal für die T-Zell-vermittelte Immunüberwachung auf Tumorzellen wirken könnte (Mo et al 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen unter Fokussierung auf den SNP rs1863332, lokalisiert im 5'-Bereich (Promotorregion) des MSH2-Gens, einen additiven Effekt einer der Bestrahlung vorangeschalteten Stimulation mit TGF $\beta$ 1 gegenüber einer alleinigen Bestrahlung bezüglich der Reduktion von vitalen Zellen. Bei Vorliegen des Wildtyps hatte eine Behandlung mit TGF $\beta$ 1 vor der Bestrahlung einen zusätzlich zytotoxischen Effekt ( $p=0,006$ ) im Vergleich zur TGF $\beta$ 1-Gabe nach Bestrahlung, während das Variantenallel zytoprotektiv wirkt ( $p=0,03$ , vergl. Abbildung 18). Dieser SNP wirkt sich im linearen Regressionsmodell ebenfalls auf einige Behandlungsmodalitäten aus. Hinsichtlich der TGF $\beta$ 1-Stimulation 16 h vor Bestrahlung stellt dieser SNP gemeinsam mit den bereits erwähnten SNP aus SMAD7 und MSH6 37,3% der Variabilität der konsekutiven Zytotoxizität dar mit einem signifikanten p-Wert von 0,00001 (vergl. Tabelle 8). Eine besondere Bedeutung kommt diesem SNP bei der vergleichenden Betrachtung von TGF $\beta$ 1 Stimulation vor oder nach Bestrahlung zu. Bezüglich der Stimulation vor der Bestrahlung scheint die MSH2-Variante den stärksten Einfluss zu haben.

In der aktuellen Literatur findet sich keine Arbeit, die einen Bezug auf den SNP rs1863332 auf dem MSH2-Gen nimmt. Somit konnte erstmalig ein mutmaßlich relevanter Aspekt bezüglich dieses SNP herausgearbeitet werden, der bei einer Strahlentherapie oder einer Behandlung mit TGF $\beta$ 1 eine Rolle spielen könnte.

## 5.7 MSH6

MSH6 (*MutS homolog of E.coli 6*) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 und besteht aus zehn Exons. Das zugehörige Protein enthält 1360 Aminosäuren. Wie schon im Zusammenhang mit MSH2 erwähnt, kann MSH6 ein Heterodimer mit MSH2 bilden.

Eine Mutation des MSH6-Gens wird u.a. mit der Entstehung des HNPCC (Miyaki et al. 1997; Berends et al. 2002) und des familiären Endometriumkarzinoms assoziiert (Risinger et al. 1996; Wijnen et al. 1999). Kastrinos et al. halten einen Zusammenhang zwischen Auftreten von HNPCC und einem Pankreaskarzinom bei Patienten, die eine Mutation im MSH6-Gen tragen, für möglich (Kastrinos et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit zeigte der Polymorphismus rs18000937, bei dem es sich um ein Stopcodon (Tyr214stop) handelt, signifikante Einflüsse.

Bei alleiniger Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle war bei Vorhandensein des Wildtyps eine stärkere Zytotoxizität zu beobachten ( $p=0,005$ , vergl. Abbildung 20). Bei Vorliegen des Variantenallels (CT) haben alle drei Behandlungsbedingungen, also eine Hemmung mit anti-TGF $\beta$  ( $p=0,002$ ), eine vorausgehende Stimulation mit TGF $\beta$ 1 ( $p=0,004$ ) bzw. eine nachträgliche Stimulation mit TGF $\beta$ 1 ( $p=0,0003$ ), eine signifikant bis hochsignifikante zytoprotektive Wirkung (vergl. Abbildung 20).

In der linearen Regressionsanalyse trägt dieser SNP als einziger von den untersuchten SNP bei allen Behandlungsmodalitäten anteilig mit mehr oder weniger hohem Prozentsatz zur Variabilität der konsekutiven Zytotoxizität bei. Besonders hervorzuheben ist hier das Ergebnis der Regressionsanalyse zur Gabe von TGF $\beta$ 1 vor Bestrahlung. Gemeinsam mit je einem Polymorphismus aus SMAD7 und aus MSH2 stellt rs1800937 37,3% der Variabilität der resultierenden Zytotoxizität dieser Stimulation dar. Dies entspricht einem p-Wert von 0,00001, was auch unter Berücksichtigung einer Gesamtzahl von 1656 durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Tests als signifikant erachtet werden kann (vergl. Tabelle 8).

Da MSH6 mit der Entstehung des HNPCC assoziiert ist und es sich bei dem untersuchten SNP um ein Stopcodon handelt, liegt die Vermutung nahe, dass hier ein Zusammenhang bestehen

könnte. Die Proteinfunktionalität könnte durch Defekte oder Varianten an diesem SNP erheblich beeinflusst werden. Hierfür gibt es jedoch in der Literatur bisher keinen Hinweis. In der aktuellen Literatur spielt der SNP rs1800937 keine Rolle. So gesehen ergibt sich aus dieser Arbeit ein erster, klinisch möglicherweise relevanter Aspekt.

Die gegenüber dem Wildtyp erhöhte Strahlenresistenz insbesondere von Trägern des Variantenallels CT konnte schon bei anderen Polymorphismen dieses Proteins belegt werden. In einer thematisch ähnlichen Arbeit aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie der Georg-August-Universität Göttingen wurden LCL, die zuvor bestrahlt und mit TGF $\beta$ 1 vorinkubiert wurden, mittels Mikrokerntest auf Zellschäden untersucht. Auch dabei wurden die Ergebnisse mit Genpolymorphismen der Datenbank des HapMap-Projektes korreliert. Es wurde die Vermutung geäußert, dass eine gesteigerte DNA-Reparatur kausal für die erhöhte Strahlenresistenz der Varianten verantwortlich sein könnte (Springer 2015). Diese Überlegung liegt auch bei der vorliegenden Arbeit nahe.

Tumorpatienten, die Träger des Wildtyps sind, könnten möglicherweise von einer Strahlentherapie stärker profitieren, sofern sich der verstärkt zytotoxische Effekt ebenso auf das Tumorgewebe auswirkt und nicht nur auf das gesunde Gewebe. Kombinierte Behandlungen mit TGF $\beta$ 1 oder anti-TGF $\beta$  könnten möglicherweise zum Schutz des gesunden Gewebes lokal appliziert werden. Eine möglicherweise forcierte DNA-Reparatur könnte somit noch zusätzlich gefördert werden. Von dieser Behandlung würden dann eher Träger der Varianten profitieren. Diese Spekulationen bedürfen jedoch weiterer Untersuchung. Warum die ‚Gegenspieler‘ TGF $\beta$ 1 und anti-TGF $\beta$  hier beide einen zytoprotektiven Effekt auf die Varianten haben, bleibt unklar.

## 5.8 XRCC1

Das XRCC1-Gen (*X-ray cross-complementing defective repair in chinese hamster cells 1*) ist auf dem Chromosom 19q13.31 lokalisiert und enthält 17 Exons. Das zugehörige Protein besteht aus 633 Aminosäuren. XRCC1 ist maßgeblich an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt in Form von BER (Cuneo und London 2010; Nash et al 1997) und NER (Moser et al. 2007). Anhand einer Studie zum Einfluss verschiedener Genotypvarianten an DNA-Reparaturgenen auf die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung konnte die Vermutung nahegelegt werden, dass gewisse Varianten zu Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung beitragen (Hu et al. 2001).

Eine erhöhte Assoziation von Polymorphismen im XRCC1-Gen mit Krebserkrankungen wird berichtet (Price et al. 1997). Vor allem die Entstehung von Magentumoren (S. Wang et al. 2012), Zervixkarzinomen (Mei et al. 2014), Lungen-, Kolon-, Prostata- und Mammakarzinomen (Karahalil et al 2012) wird mit XRCC1 assoziiert.

In meiner Analyse hatte der SNP rs3213263, welcher sich in Intron 2 des XRCC1-Gen befindet, einen Einfluss auf die Vitalität der LCL. Die Gabe von anti-TGF $\beta$  hatte bei Vorliegen des Variantenallels TT einen deutlichen zytoprotektiven Effekt ( $p=0,0002$ , vergl. Abbildung 22). Dieser Effekt ließ sich auch bei Hemmung mit anti-TGF $\beta$  und anschließender Bestrahlung beobachten. Auch auf alleinige Bestrahlung zeigten LCL mit der Variante TT die stärkste Reaktion in Form von erhöhter Zytotoxizität.

In der aktuellen Literatur gibt es keine Arbeit, die diesem SNP auf dem XRCC1-Gen eine besondere Bedeutung beimisst. Somit ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit ein neuer und damit erster, möglicherweise klinisch relevanter Aspekt bezüglich des SNP rs3213263 auf dem XRCC1-Gen. Tumorpatienten, die gleichzeitig Träger der Variante TT sind, könnten ein besseres Ansprechen auf eine Strahlentherapie im Sinne von stärkerer zytotoxischer Wirkung auf das Tumorgewebe zeigen. Eine lokale Applikation von anti-TGF $\beta$  könnte gesundes Gewebe vor Strahlenschäden schützen. Somit könnte eine bessere Verträglichkeit einer Strahlentherapie erzielt werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Strahlentherapie ist gemeinsam mit chemotherapeutischen und chirurgischen Maßnahmen integraler Bestandteil multimodaler Therapiekonzepte bei malignen Tumorerkrankungen. Eine maßgebliche Rolle spielt hierbei ein vor allem in den letzten Jahren entwickeltes, zunehmendes Verständnis von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen auf molekularer Ebene innerhalb von Zellen und insbesondere in menschlichen Geweben. So werden mittlerweile auch sehr komplexe Regelkreise mit den mitunter unterschiedlichen Funktionen ihrer einzelnen aus Proteinen bestehenden Komponenten mehr und mehr verstanden. Durch die Kenntnis dieser Regelkreise entstehen allerdings auch neue Fragen zum Verständnis, derer sich die medizinische Forschung annimmt. Einen bedeutenden intrazellulären Regelkreis stellt der TGF $\beta$ -Signalweg dar, der neben anderen vielfältigen Funktionen auch auf die Entstehung von bestimmten Tumorerkrankungen einen Einfluss hat. Aber nicht nur Proteine innerhalb dieses Signalwegs und die für sie kodierenden Gene, sondern auch in anderem Kontext agierende Proteine bzw. die für sie kodierenden Gene regulieren die Entstehung von malignen Tumoren. Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass die jeweils für sie kodierenden Gene hinsichtlich ihrer molekularen Struktur vollständig bekannt sind. Sogar eine Vielzahl an Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) ist bekannt und auch die Kenntnis darüber, dass das Vorliegen von verschiedenen Variantenallelen eines SNP unter bestimmten Behandlungsbedingungen einen Einfluss auf die Vitalität von Zellen hat.

Die vorliegende Arbeit sollte anhand einer prospektiven Studie einen Beitrag dazu leisten, die Auswirkung ionisierender Strahlung, wie sie im Rahmen einer Strahlentherapie eingesetzt wird, besser vorhersagen zu können. Anhand von lymphoblastoiden Zellen (LCL) sollte geprüft werden, inwieweit ionisierende Strahlung die Zellvitalität beeinflusst in Abhängigkeit von genetisch bedingter Variabilität der Expression von Genen des TGF $\beta$ -Signalwegs und DNA-Reparaturgenen. Hierzu wurden 54 käuflich erworbene LCL erfolgreich angezüchtet. Danach wurden die Zellen insgesamt sechs Behandlungsbedingungen unterworfen. Neben der unbehandelten Kontrolle wurden Zellen einer alleinigen Bestrahlung mit 3 Gy ausgesetzt, 16 Stunden vor der Bestrahlung mit TGF $\beta$ 1 oder anti-TGF $\beta$  vorinkubiert oder unmittelbar nach der Bestrahlung mit TGF $\beta$ 1 behandelt. Nach Ablauf einer 24-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Zellvitalitätsmessung mittels FACS-Analyse. Die Ergebnisse wurden mit Daten von insgesamt 1656 polymorphen Positionen aus 21 Kandidatengenen korreliert. Auf diese Weise sollte der Einfluss dieser Polymorphismen auf die Zellvitalität ermittelt werden. Die Daten wurden dabei

der HapMap-Datenbank entnommen. Zusammenfassend soll noch einmal kurz auf die unter 1.2 formulierten Fragestellungen eingegangen werden.

Ad 1: Bei zwei der untersuchten Gene konnten anhand der LD-Plots Kopplungsungleichgewichte dargestellt werden. Hervorzuheben ist hier SMAD3. Hier waren die SNP rs7162912 und rs12904944 in perfektem LD. SMAD7 besitzt zwei Polymorphismen, rs1873191 und rs1873190, die sich im hohen LD befinden.

Ad 2: Insgesamt waren zwölf Polymorphismen aus acht Genen (TGFB1, SMAD2, SMAD3, SMAD7, BRCA2, MSH2, MSH6 und XRCC1) mit signifikanten Veränderungen der Zellviabilität assoziiert.

Ad 3: Das Variantenallel scheint häufiger und bei allen Behandlungsbedingungen einen zytoprotektiven Effekt zu haben. Ausnahmen sind rs206119 des BRCA2-Gens, rs7162912 des SMAD3-Gens und rs1873191 des SMAD7-Gens, bei denen der Wildtyp mit höherer Zellviabilität einhergeht. Dabei gilt es jedoch zu bedenken, dass die Fallzahlen der Variantenallele häufig sehr klein sind. Einen Sonderfall stellt rs3213263 des XRCC1-Gens dar. Hier zeigte das homozygote Variantenallel einerseits bei alleiniger Gabe von anti-TGF $\beta$  und bei Vorinkubation mit anti-TGF $\beta$  mit anschließender Bestrahlung ebenfalls einen vergleichsweise hohen zytoprotektiven Effekt, im Gegensatz dazu jedoch bei alleiniger Bestrahlung den stärksten zytotoxischen Effekt.

Ad 4: Die alleinige Bestrahlung mit 3 Gy führte erwartungsgemäß bei den untersuchten LCL zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität. Die SNP aus SMAD3, SMAD7, MSH2 und MSH6 wirkten sich bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy modulierend auf die Zytotoxizität aus (vergl. Tabelle 7), jedoch lediglich mit einem p-Wert von  $p=0,001$ , was im Kontext dieser Arbeit statistisch als nicht signifikant zu werten ist. Betrachtet man die Wirkung einer alleinigen Inhibition mit anti-TGF $\beta$ , so zeigte sich lediglich am SNP rs3213263 aus XRCC1 ein signifikanter Effekt ( $p=0,0002$ ) im Sinne einer Zytoprotektion bei Trägern des Variantenallels TT. Interessanterweise zeigten sich bei Betrachtung der Auswirkung einer Stimulation mit TGF $\beta$ 1 vor und nach Bestrahlung mit 3 Gy dieselben SNP als statistisch signifikante Modellprädiktoren ( $p=0,0001$ ) wie auch bei alleiniger Bestrahlung (SNP aus SMAD7, MSH2, MSH6) mit Ausnahme des SMAD3-SNP rs17293408.

Ad 5: Bei Vorinkubation mit TGF $\beta$ 1 wirkte sich die MSH2-Variante stärker aus. Hier entstand beim Wildtyp ein zusätzlich zytotoxischer Einfluss im Vergleich zur Stimulation nach Bestrah-

lung. Die MSH6-Variante zeigte bei dieser Betrachtung einen schwächeren Einfluss. Bei Inhibition durch anti-TGF $\beta$  16 h vor der Bestrahlung zeigten noch zwei der vier SNP aus den oben genannten Genen einen relevanten Einfluss. Bei rs1800937 aus MSH6 und bei Trägern des Wildtypallels am SNP rs1873191 aus SMAD7 hatte die Hemmung des TGF $\beta$ -Signalwegs vor der Bestrahlung eine zytoprotektive Wirkung.

Die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit werden durch größere klinische Studien schließlich bestätigt oder verworfen werden müssen, bevor man aus ihnen eine weitere Spezifizierung von Strategien zur Behandlung einer malignen Tumorerkrankung wird ableiten können. Vor allem die Resultate mit sehr hoher bis hoher statistischer Signifikanz scheinen diesbezüglich vielversprechend zu sein; aber auch die Ergebnisse, die allenfalls einen gewissen Trend erkennen lassen, sollten je nach Relevanz im Rahmen der spezifischen Tumorthherapie einer genaueren wissenschaftlichen Prüfung unterzogen werden. In Zukunft wird das Verständnis von Möglichkeiten einer Therapie von malignen Erkrankungen auf genetischer Ebene weiter zunehmen. Die Komplexität von Regelkreisen in menschlichen Zellen und schließlich auch die genombedingte, sehr hohe genetische Variabilität bieten künftig ein sehr großes wissenschaftliches Betätigungsfeld.

## Literaturverzeichnis

- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM (2002). Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat cell biol* 4(8), 599-604
- Amouroux R, Campalans A, Epe B, Radicella JP (2010). Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res* 38(9), 2878-2890
- Arai T, Akiyama Y, Okabe S, Ando M, Endo M, Yuasa Y (1998). Genomic structure of the human Smad3 gene and its infrequent alterations in colorectal cancers. *Cancer Lett* 122(1-2), 157-163
- Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT (1993). Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* 92(6), 2569-2576
- Arthur HM, Bamforth SD (2011). TGF $\beta$  signaling and congenital heart disease: Insights from mouse studies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91(6), 423-434
- Barana D, van der Klift H, Wijnen J, Longa ED, Radice P, Cetto GL, Fodde R, Oliani C (2004). Spectrum of genetic alterations in Muir-Torre syndrome is the same as in HNPCC. *Am J Med Genet A* 125A(3), 318-319
- Batty DP, Wood RD (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241(2), 193-204
- Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, Thompson DJ, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM et al. (2007). Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 9(2), R27
- Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CH et al. (2002). Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 70(1), 26-37
- Bohm I (2004). Flow cytometric analysis of the LE cell phenomenon. *Autoimmunity* 37(1), 37-44
- Boyer Arnold N, Korc M (2005). Smad7 abrogates transforming growth factor-beta1-mediated growth inhibition in COLO-357 cells through functional inactivation of the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 280(23), 21858-21866
- Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, Webb E, Howarth K, Rowan A, Lubbe S, Spain S, Sullivan K, Fielding S et al. (2007). A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 39(11), 1315-1317
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanéche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan JL, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, De Villartay JP, Revy P (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124(2), 287-299

- Carvajal-Carmona LG, Churchman M, Bonilla C, Walther A, Lefevre JH, Kerr D, Dunlop M, Houlston R, Bodmer WF, Tomlinson I (2010). Comprehensive assessment of variation at the transforming growth factor beta type 1 receptor locus and colorectal cancer predisposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17), 7858-7862
- Castellucci L, Jamieson SE, Almeida L, Oliveira J, Guimaraes LH, Lessa M, Fakiola M, Jesus AR, Nancy Miller E, Carvalho EM et al. (2012). Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* 12(5), 1102-1110
- Celedon JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, Reilly JJ, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Laird N et al. (2004). The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 13(15), 1649-1656.
- Chen Y, Chen CF, Riley DJ, Allred DC, Chen PL, Von Hoff D, Osborne C, Lee WH (1995). Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. *Science* 270(5237), 789-791
- Cornelini R, Rubini C, Fioroni M, Favero GA, Strocchi R, Piattelli A (2003). Transforming growth factor-beta 1 expression in the peri-implant soft tissues of healthy and failing dental implants. *J Periodontol* 74(4), 446-450.
- Cuneo MJ, London RE (2010). Oxidation state of the XRCC1 N-terminal domain regulates DNA polymerase beta binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(15), 6805-6810
- Dahm-Daphi J, Sass C, Alberti W (2000). Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int J Radiat Biol* 76(1), 67-75
- Dai F, Lin X, Chang C, Feng XH (2009). Nuclear export of Smad2 and Smad3 by RanBP3 facilitates termination of TGF-beta signaling. *Dev Cell* 16(3), 345-357
- Dancea HC, Shareef MM, Ahmed MM (2009). Role of Radiation-induced TGF-beta Signaling in Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol* 1(1), 44-56
- Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 71(5), 731-740.
- Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M (2011). Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26(1), 33-42.
- Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ (2002). Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6), 3908-3913
- Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P (1995). Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 268(5219), 1909-1912
- Eickelberg O (2001). Endless healing: TGF-beta, SMAD, and fibrosis. *FEBS Lett* 506(1), 11-14
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL et al. (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86(4), 543-552.

- Feng Z, Hu W, Chasin LA, Tang MS (2003). Effects of genomic context and chromatin structure on transcription-coupled and global genomic repair in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31(20), 5897-5906
- Ferguson DO, Alt FW (2001). DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene* 20(40), 5572-5579
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75(5), 1027-1038
- Fishel R, Ewel A, Lee S, Lescoe MK, Griffith J (1994a). Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science* 266(5189), 1403-1405
- Fishel R, Ewel A, Lescoe MK (1994b). Purified human MSH2 protein binds to DNA containing mismatched nucleotides. *Cancer Res* 54(21), 5539-5542
- Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindal T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD (2006). DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* 5(8), 986-996
- Friedenson B (2007). The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 7, 152
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296(5576), 2225-2229
- Goldstein DB, Cavalleri GL (2005). Genomics: understanding human diversity. *Nature* 437(7063), 1241-1242
- Gonzalez-Ramos M, Calleros L, Lopez-Ongil S, Raoch V, Griera M, Rodriguez-Puyol M, de Frutos S, Rodriguez-Puyol D (2013). HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- $\beta$ 1 up-regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 45(2), 232-242
- Gradia S, Acharya S, Fishel R (1997). The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 91(7), 995-1005
- Gros L, Saparbaev MK, Laval J (2002). Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21(58), 8905-8925
- Guo W, Dong Z, Guo Y, Chen Z, Yang Z, Kuang G (2012). Association of polymorphisms in transforming growth factor- $\beta$  receptors with susceptibility to gastric cardia adenocarcinoma. *Mol Biol Rep* 39(4), 4301-4309
- HapMap: The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426(6968), 789-796
- HapMap: International HapMap Consortium (2004). Integrating ethics and science in the International HapMap Project. (2004). *Nat Rev Genet* 5(6), 467-475
- HapMap: International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063), 1299-1320
- HapMap: International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau H, Hardenbol P et al. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNP. *Nature* 449(7164), 851-861

- HapMap: International HapMap3 Consortium, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, Yu F, Peltonen L, Dermitzakis E, Bonnen PE (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467(7311), 52-58
- Hefferin ML, Tomkinson AE (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* 4(6), 639-648
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390(6659), 465-471
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6(7), 923-935
- Hess MT, Gunz D, Luneva N, Geacintov NE, Naegeli H (1997). Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes. *Mol Cell Biol*; 17(12), 7069-7076
- Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR (2005). Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science* 307(5712), 1072-1079
- Hoeijmakers JH (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835), 366-374
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22(6), 917-922
- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106(2), 302-323
- Iyer RR, Pohlhaus TJ, Chen S, Hura GL, Dzantiev L, Beese LS, Modrich P (2008). The MutS $\alpha$ -proliferating cell nuclear antigen interaction in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 283(19), 13310-13319
- Jiang X, Castela JE, Vandenberg D, Carracedo A, Redondo CM, Conti DV, Paredes Cotore J, Potter JD, Newcomb PA Passarelli MN et al. (2013). Genetic variations in SMAD7 are associated with colorectal cancer risk in the colon cancer family registry. *PLoS One* 8(4), e60464
- Jiricny J (1994). Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match? *Trends Genet* 10(5), 164-168
- Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 29(4), 418-425.
- Karahalil B, Bohr VA, Wilson DM 3rd. (2012). Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol* 31(10), 981-1005
- Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S (2009). Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 302(16), 1790-1795
- Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Rao MR, Morrison P, Wirth L, Finan PJ, Burn J, Chapman P (1994). Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations. *Genomics* 24(3), 516-526

- Korpál M, Kang Y (2010). Targeting the transforming growth factor-beta signalling pathway in metastatic cancer. *Eur J Cancer* 46(7), 1232-1240
- Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S (2012). TGF- $\beta$  - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 10, 183
- Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI, Mullenders LH (2011). DNA damage response and transcription. *DNA Repair* 10(7), 743-750
- Li GM, Modrich P (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6), 1950-1954
- Li H, Sekine M, Seng S, Avraham S, Avraham HK (2009). BRCA1 interacts with Smad3 and regulates Smad3-mediated TGF- $\beta$  signaling during oxidative stress responses. *PLoS One* 4(9), e7091
- Li Q, Wu H, Chen B, Hu G, Huang L, Qin K, Chen Y, Yuan X, Liao Z (2012). SNP in the TGF- $\beta$  signaling pathway are associated with increased risk of brain metastasis in patients with non-small-cell lung cancer. *PloS one* 7(12), e51713
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9), 5172-5177
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(9), 712-720
- Löbrich M, Rydberg B, Cooper PK (1995). Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(26), 12050-12054
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N et al. (2005). A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat genet* 37(3), 275-281
- Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S et al. (2006). Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med* 355(8), 788-798
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791
- Massague J (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134(2), 215-230
- Massague J, Gomis RR (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580(12), 2811-2820
- Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, Xue Y, Singh TR, Bier P, Steltenpool J, Stone S, Dokal I, Mathew CG et al. (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 37(9), 958-963
- Mei J, Duan HX, Wang LL, Yang S, Lu JQ, Shi TY, Zhao Y (2014). XRCC1 polymorphisms and cervical cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumour Biol* 35(2), 1221-1231
- Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51(2), 241-249
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997). Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 17(3), 271-2

- Mo C, Dai Y, Kang N, Cui L, He W (2012). Ectopic expression of human MutS homologue 2 on renal carcinoma cells is induced by oxidative stress with interleukin-18 promotion via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways. *J Biol Chem* 287(23), 19242-19254
- Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LH, Fousteri MI (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* 27(2), 311-323
- Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE (2002). Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res* 62(13), 3789-3793
- Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE, Lindahl T (1997). XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36(17), 5207-5211
- Neumann M. Genetisch bedingte Variabilität der Expression von Genen des TGFβ-Signalwegs und deren Bedeutung für die Zellvitalität: Untersuchungen in T-Lymphozyten, immortalisierten B-Lymphozyten und Fibroblasten. *Med. Diss. Göttingen* 2012
- Odersky A, Panyutin IV, Panyutin IG, Schunck C, Feldmann E, Goedecke W, Neumann RD, Obe G, Pfeiffer P (2002). Repair of sequence-specific 125I-induced double-strand breaks by nonhomologous DNA end joining in mammalian cell-free extracts. *J Biol Chem*, 277(14), 11756-11764
- Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J (1996). hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* 6(9) 1181-1184
- Pasche B, Kaklamani V, Hou N, Young T, Rademaker A, Peterlongo P, Ellis N, Offit K, Caldes T, Reiss M et al. (2004). TGFBR1\*6A and cancer: a meta-analysis of 12 case-control studies. *J Clin Oncol* 22(4), 756-758
- Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M (2001). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 11(11), S52-59
- Plotz G, Piiper A, Wormek M, Zeuzem S, Raedle J (2006). Analysis of the human MutLalpha.MutSalpha complex. *Biochem Biophys Res Commun* 340(3), 852-859
- Price EA, Bourne SL, Radbourne R, Lawton PA, Lamerdin J, Thompson LH, Arrand JE (1997). Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. *Somat Cell Mol Genet* 23(4), 237-247
- Qin HD, Shugart YY, Bei JX, Pan QH, Chen L, Feng QS, Chen LZ, Huang W, Liu JJ, Jorgensen TJ et al. (2011). Comprehensive pathway-based association study of DNA repair gene variants and the risk of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 71(8), 3000-3008
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T., Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411(6834), 199-204
- Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Mad-related genes in the human. *Nat genet* 13(3), 347-349

- Risinger JI, Umar A, Boyd J, Berchuck A, Kunkel TA, Barrett JC (1996). Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nat Genet* 14(1), 102-105
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 66(6), 981-993
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10), 5858-5868
- Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID (1999). The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer invest* 17(1), 56-72
- Rothkamm K, Löbrich M (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9), 5057-5062
- Sawaki D, Suzuki T (2013). Targeting Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Aortopathies in Marfan Syndrome. *Circ J* 77(4): 898-9
- Scherer, E. (1995). [Centennial of X-ray. Comments on its history, presence and future of its therapeutic application]. [Historical Article]. *Strahlenther Onkol* 171(12), 709-714
- Schirmer MA, Hoffmann AO, Campean R, Janke JH, Zidek LM, Hoffmann M, Kruse M, Sehrt D, Tzvetkov MV, Rave-Fränk M et al. (2009). Bioinformatic and functional analysis of TGFBR1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 19(4), 249-259
- Schirmer MA, Brockmoller J, Rave-Fränk M, Virsik P, Wilken B, Kühnle E, Campean R, Hoffmann RO, Goetze RG, Neumann M 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
- Schmierer B, Hill CS (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12), 970-982
- Siegel PM, Massague J (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3(11), 807-21
- Song Q, Zhu B, Hu W, Cheng L, Gong H, Xu B, Zheng X, Zou L, Zhong R, Duan S et al. (2012). A common SMAD7 variant is associated with risk of colorectal cancer: evidence from a case-control study and a meta-analysis. *PLoS One* 7(3), e33318
- Springer K. (2015) Einflussnahme von TGF $\beta$  auf die Strahlensensibilität lymphoblastoider Zellen. *Med. Diss. Göttingen*
- Stoehr C, Burger M, Stoehr R, Bertz S, Ruummele P, Hofstaedter F, Denziger S, Wieland WF, Hartmann A, Walter B (2012). Mismatch repair proteins hMLH1 and hMSH2 are differently expressed in the three main subtypes of sporadic renal cell carcinoma. *Pathobiology* 79(3), 162-168
- Sung P, Klein H (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(10), 739-750
- Surtees JA, Argueso JL, Alani E (2004). Mismatch repair proteins: key regulators of genetic recombination. *Cytogenet Genome Res* 107(3-4), 146-159
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3(5), 391-397

- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17(18), 5497-5508
- Takenoshita S, Tani M, Mogi A, Nagashima M, Nagamachi Y, Bennett WP, Hagiwara K, Harris CC, Yokota L (1998). Mutation analysis of the Smad2 gene in human colon cancers using genomic DNA and intron primers. *Carcinogenesis* 19(5), 803-807
- Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D et al. (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 12(3), 333-337
- Thompson LH (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat Res* 751(2), 158-246.
- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005). The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15(11), 1592-1593
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95(6), 779-791
- Vellucci VF, Reiss M (1997). Cloning and genomic organization of the human transforming growth factor-beta type I receptor gene. *Genomics* 46(2), 278-283
- Wang M, Saha J, Hada M, Anderson JA, Pluth JM, O'Neill P, Cucinotta FA (2013). Novel Smad proteins localize to IR-induced double-strand breaks: interplay between TGFβ and ATM pathways. *Nucleic Acids Res* 41(2), 933-942
- Wang S, Wu X, Chen Y, Zhang J, Ding J, Zhou Y, He S, Tan Y, Qiang F, Bai J et al. (2012). Prognostic and predictive role of JWA and XRCC1 expressions in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 18(10), 2987-2996
- Ward JF (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35, 95-125
- Welsh PL, King MC. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10(7), 705-713
- Weterings E, Chen DJ (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18(1), 114-124
- Wibom C, Sjöström S, Henriksson R, Brännström T, Broholm H, Rydén P, Johansen C, Collatz-Laier H, Hepworth S, McKinney PA et al. (2012). DNA-repair gene variants are associated with glioblastoma survival. *Acta Oncol* 51(3), 325-332
- Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S et al. (1999). Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 23(2), 142-144
- Willems AJ, Dawson SJ, Samaratunga H, De Luca A, Antill YC, Hopper JL, Thorne HJ, kConFab Investigators (2008). Loss of heterozygosity at the BRCA2 locus detected by multiplex ligation-dependent probe amplification is common in prostate cancers from men with a germline BRCA2 mutation. *Clin Cancer Res* 14(10), 2953-2961
- Wu DM, Zhu HX, Zhao QH, Zhang ZZ, Wang SZ, Wang ML, Gong WD, Tan M, Zhang ZD (2010). Genetic variations in the SMAD4 gene and gastric cancer susceptibility. *World J Gastroenterol* 16(44), 5635-5641

- 
- Yuan SM, Ma HH, Zhang RS, Jing H (2011). Transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in Marfan's syndrome: a preliminary histopathological study. *VASA* 40(5), 369-374
- Zhang M, Kleber S, Rohrich M, Timke C, Han N, Tuettenberg J, Martin-Villalba A, Debus J, Peschke P, Wirkner U et al.(2011). Blockade of TGF- $\beta$  signaling by the TGF $\beta$ R-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res* 71(23), 7155-7167
- Zhang R, Qin W, Xu GL, Zeng FF, Li CX (2012). A meta-analysis of the prevalence of somatic mutations in the hMLH1 and hMSH2 genes in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 14(3), e80-89

## **Danksagung**

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. F. Hess für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. J. Brockmöller danke ich ebenfalls für die Möglichkeit, Teile der experimentellen Arbeiten in seiner Abteilung durchführen zu können.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Hendrik A. Wolff, der die Durchführung der vorliegenden Studie ermöglicht und unterstützt hat und mir voller Enthusiasmus mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dipl. Biol. M. Rave-Fränk und Herrn PD Dr. med. M. Schirmer bedanken, die mir die Thematik der Arbeit nahegebracht haben und durch unermüdete Mitarbeit, durch konstruktive Kritik und hilfreiche Ratschläge maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Alexandra Bitter und Frau Juliane Kasten-Krapp danke ich für die stets freundliche und engagierte Hilfe im Labor.

Besonders möchte ich meiner Mitdotorandin und Freundin Katarina Springer für wertvollen Austausch zur Thematik und konstruktive ‚humorvolle‘ Stunden im Labor danken.