

Aus der Abteilung Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
im Zentrum Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Genetisch bedingte Variabilität der Expression von Genen des
TGF β -Signalwegs und deren Bedeutung für die Zellvitalität:
Untersuchungen in T-Lymphozyten, immortalisierten
B-Lymphozyten und Fibroblasten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Michael Neumann

aus Gifhorn

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. Michael P. Schön

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Brockmöller

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Hille

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2013

I Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	viii
1 EINLEITUNG	1
1.1 TGFβ-Signalweg-assoziierte Krankheitsbilder	1
1.1.1 TGF β -Signalweg und Fibrose	1
1.1.2 TGF β -Signalweg und Karzinogenese.....	2
1.1.3 TGF β -Signalweg und Atherosklerose	3
1.1.4 TGF β und neurologische Erkrankungen.....	4
1.2 Komponenten des TGFβ-Signalwegs	4
1.2.1 TGF β -Liganden	6
1.2.2 TGF β -Rezeptoren.....	7
1.2.3 SMAD-Moleküle.....	7
1.3 Signalübermittlung im TGFβ-System	8
1.4 Regulation des TGFβ-Signalwegs: Expressionsänderungen	9
1.5 TGFβ-Signalweg und Zellvitalität	10
1.6 Funktionelle Genpolymorphismen im TGFβ-Signalweg	11
1.7 Zielsetzung	13
2 MATERIAL	16
2.1 Geräte	16
2.2 Verbrauchsmaterial	17
2.3 Chemikalien	18
2.4 Kits und Assays	20
2.5 Lösungen und Puffer	20
2.6 Medien	21
2.7 Zellen	21
2.7.1 LCLs.....	21
2.7.2 Primäre humane T-Lymphozyten.....	22
2.7.3 Fibroblasten.....	22
2.8 Software	22
2.9 Datenbanken	23
2.10 Primersequenzen	23
2.10.1 Primer für qRT-PCR.....	23
2.10.2 Primer für Multiplex-PCR	25

3	METHODEN.....	26
3.1	Zellgewinnung und Zellkultur	26
3.1.1	T-Lymphozyten.....	26
3.1.2	Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs).....	28
3.1.3	Fibroblasten.....	28
3.2	Behandlung der Zellen.....	30
3.2.1	T-Lymphozyten.....	30
3.2.2	Lymphoblastoide Zelllinien.....	30
3.2.3	Fibroblasten.....	31
3.3	Zellvitalitäts-Messungen	32
3.3.1	Durchflusszytometrie.....	32
3.3.2	AlamarBlue®.....	32
3.4	RNA-Methoden.....	33
3.4.1	Asservierung von RNA.....	33
3.4.2	Isolierung und Quantifizierung von RNA.....	34
3.4.3	cDNA-Synthese.....	34
3.4.4	Referenzgene.....	35
3.4.5	Quantitative <i>Real time</i> -PCR (qRT-PCR).....	36
3.5	DNA-Analytik	38
3.5.1	Isolierung und Quantifizierung von genomischer DNA.....	38
3.5.2	PCR.....	39
3.5.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	41
3.5.4	Genotypisierung mittels Primerextension (SNaPshot™).....	42
3.5.5	Fragmentlängen-Analyse.....	43
3.6	Bioinformatik.....	44
3.7	Statistik.....	45
4	ERGEBNISSE.....	48
4.1	Genexpression im TGFβ-Signalweg in Fibroblasten	48
4.1.1	Basalexpression.....	48
4.1.2	Expressionsänderungen nach Bestrahlung.....	49
4.2	LCLs.....	53
4.2.1	Effekte von TGFβ1 und Bestrahlung auf Genexpression.....	53
4.2.2	Reproduzierbarkeit von Genexpressionsänderungen in LCLs.....	57
4.2.3	Zellvitalität.....	59
4.2.4	Assoziation mit Genvarianten.....	62
4.2.4.1	<i>CDKN1A</i>	63
4.2.4.2	<i>TGFBR1</i>	63
4.2.4.3	<i>SMAD3</i>	65
4.2.4.4	<i>SMAD7</i>	67
4.2.4.5	<i>TGFBR2, SMAD2 und SMAD4</i>	69
4.3	T-Lymphozyten	69
4.3.1	Genexpression in T-Lymphozyten.....	69
4.3.2	Zellvitalität in T-Lymphozyten.....	71
4.3.3	Assoziationen mit Genvarianten.....	72
4.3.3.1	<i>Assoziationen im TGFBR2-Gen</i>	74
4.3.3.2	<i>Assoziationen im TGFBR1-Gen</i>	74
4.3.3.3	<i>Assoziationen im SMAD3-Gen</i>	76
4.3.3.4	<i>Assoziationen im SMAD4-Gen</i>	77
4.3.3.5	<i>Assoziationen im SMAD7-Gen</i>	78

5	DISKUSSION	80
5.1	Genexpressionsänderungen und Regulation.....	80
5.2	Effekte von TGF β auf die Zellvitalität.....	81
5.3	Identifizierung und Validierung funktioneller Genvarianten.....	82
5.3.1	TGFBR2.....	82
5.3.2	TGFBR1.....	82
5.3.3	SMAD3.....	84
5.3.4	SMAD4.....	86
5.3.5	SMAD7.....	87
5.4	Überlegungen zur Vergleichbarkeit der durchgeführten Studien.....	87
5.5	Kritische Auseinandersetzung.....	88
5.6	Ausblick.....	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	91
7	LITERATURVERZEICHNIS	93
8	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	104

II Abkürzungsverzeichnis

°	Grad (als Winkelmaß)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTB	Aktin-β
AS	Aminosäure
B2MG	Beta-2-Mikroglobulin
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre oder <i>copy</i> DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
dbSNP	database SNP, innerhalb NCBI-Datenbank
ddH ₂ O	(doppelt destilliertes) Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylen Diamin Tetraacetic Acid</i>
et al.	<i>et alii</i> , und andere
exp	<i>expected</i> , erwartete Anzahl
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray

h	Stunde
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-1
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
JT-Test	Jonckheere-Terpstra-Trend-Test
K	Kalium
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LCLs	Lymphoblastoid Cell Lines
m	Meter
M	mol/l
MeV	Mega-Elektronenvolt
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
µl/µg	Mikroliter / Mikrogramm
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
ng / nm	Nanogramm / Nanometer
obs	<i>observed</i> , beobachtete Anzahl
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	<i>Phosphat-Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PMCA4	<i>plasma membrane calcium ATPase 4</i>
Primer-F	Vorwärts-Primer
Primer-R	Rückwärts-Primer
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
r / r ²	Korrelationskoeffizient / Bestimmtheitsmaß
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>SMAD2 / 3 / 4 / 7</i>	<i>Mother Against Decapentaplegic Homolog 2 / 3 / 4 / 7</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
<i>TGFB1 / TGFβ1</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i> (Gen- bzw. Proteinname)
<i>TGFBR1 / TGFβR1</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 1</i> (Gen- bzw. Proteinname)
<i>TGFBR2 / TGFβR2</i>	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 2</i> (Gen- bzw. Proteinname)
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung/Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIC	6-Carboxyrhodamin
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)

Es sei darauf hingewiesen, dass – allgemeinen Konventionen entsprechend – Gennamen und Allele in kursiver und Proteinnamen in Standard-Schrift dargestellt sind. In Abbildungen wurde generell Standard-Schrift verwendet.

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Reaktions-Mastermix für cDNA-Synthese	35
Tab. 2 Bedingungen für die qRT-PCR.....	37
Tab. 3 Zusammensetzung der Einzel- und Multiplex-PCR.	40
Tab. 4 Bedingungen für Einzel- und Multiplex-PCR	41
Tab. 5 Verwendete Testverfahren	47
Tab. 6 Korrelation der Genexpression auf Basalniveau in 21 Fibroblastenlinien.	49
Tab. 7 Korrelation der Expressionsänderungen durch 2 Gy in 21 Fibroblastenlinien.....	50
Tab. 8 Korrelation der Expressionsänderungen durch 8 Gy in 21 Fibroblastenlinien.....	50
Tab. 9 Transkriptänderungen in Fibroblasten nach 2 und 8 Gy.....	52
Tab. 10 Korrelation der Genexpression auf Basalniveau in LCLs	55
Tab. 11 Korrelation der Genexpression für die durch TGFβ1 induzierten Effekte in LCLs ...	56
Tab. 12 Korrelation der Genexpression für die durch 3 Gy induzierten Effekte in LCLs.....	56
Tab. 13 Korrelation der Genexpression für die durch TGFβ1 und 3 Gy induzierten Effekte .	57
Tab. 14 Inter-Tag-Korrelation der Expressionsparameter für 11 LCLs.....	58
Tab. 15 Charakteristik der 21 genotypisierten Varianten	73

IV Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Komponenten und Funktionsweise des TGF β -Signalwegs.....	5
Abb. 2 Schmelzpunktkurve nach <i>Real time</i> -PCR von SMAD2.....	38
Abb. 3 Variabilität der Basalexpression in 21 Fibroblastenlinien	48
Abb. 4 Strahlenwirkung als Transkriptänderungen in 21 Fibroblastenlinien.	51
Abb. 5 Transkriptänderungen in Fibroblasten nach 2 und 8 Gy.	52
Abb. 6 Effekte von TGF β 1 und 3 Gy auf Genexpression im TGF β -Signalweg in 48 LCLs...	54
Abb. 7 Einfluss von TGF β 1 und 3 Gy-Bestrahlung auf die Vitalität von LCLs.....	59
Abb. 8 Inter-Tag-Korrelationen der Zellvitalität bei den LCLs.....	60
Abb. 9 <i>CDKN1A</i> -Expression und Zellvitalität nach TGF β 1-Behandlung	61
Abb. 10 <i>TGFBR1</i> -SNPs und Genexpression von <i>TGFBR1</i> und <i>SMAD7</i> nach 3 Gy in LCLs. 64	
Abb. 11 <i>TGFBR1-rs10819635</i> und Genexpression von <i>TGFBR1</i> und <i>SMAD7</i>	65
Abb. 12 <i>SMAD3</i> -SNPs und Strahlen-induzierte Zytotoxizität durch 3 Gy in LCLs.....	66
Abb. 13 <i>SMAD3-rs17293408</i> und Zytotoxizitätsinduktion durch 3 Gy in LCLs	67
Abb. 14 Effekte von <i>SMAD7</i> -SNPs auf die Zellvitalität unter TGF β 1	68
Abb. 15 Stärkste mit TGF β 1-Effekten assoziierende <i>SMAD7</i> -SNPs.....	69
Abb. 16 Expression von <i>SMAD3</i> , <i>SMAD7</i> und <i>TGFBR1</i> auf Basalniveau in T-Zellen.....	70
Abb. 17 Effekte von 2 Gy, TGF β 1 und anti-TGF β 1 auf die Genexpression von <i>SMAD3</i> , <i>SMAD7</i> und <i>TGFBR1</i> in T-Zellen.....	71
Abb. 18 Effekte von 2 Gy, TGF β 1 und anti-TGF β 1 auf die Zellvitalität von T-Zellen	72
Abb. 19 Funktionelle Assoziationen der Variante <i>TGFBR1</i> *6A	75
Abb. 20 SNPs <i>rs6478974</i> auf Strahlen-induzierte <i>SMAD3</i> -Transkription und Zellvitalität....	75
Abb. 21 Genotyp-Phänotyp-Assoziationen für die untersuchten sieben <i>SMAD3</i> -SNPs.....	77
Abb. 22 Modulation der Zellvitalität unter TGF β 1 durch den SNP <i>rs17663887</i> in <i>SMAD4</i> ...	78
Abb. 23 <i>SMAD7 rs6507876</i> -Effekte auf <i>SMAD7</i> - und <i>TGFBR1</i> -Induktion durch TGF β 1	79
Abb. 24 <i>SMAD3 rs17293408</i> -Effekte auf die Zellvitalität nach Bestrahlung.....	85
Abb. 25 <i>SMAD3 rs11856909</i> und erhöhte zelluläre Strahlenresistenz	86

1 Einleitung

1.1 TGF β -Signalweg-assoziierte Krankheitsbilder

Der TGF β -Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie z.B. Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Massague et al. 2000). Folglich wird dieser Signalweg mit einer Reihe von Körperfunktionen (z.B. Immunantwort, Regeneration, Defektreparatur, Wundheilung) bzw. Fehlfunktionen (z.B. überschießende Entzündungsreaktionen, Karzinogenese) in Zusammenhang gebracht. Auch die Bildung extrazellulärer Komponenten wie Kollagen wird über das TGF β -System reguliert. Somit besteht auch eine Beziehung zu vielen Erkrankungen, bei denen es zu einer Dysfunktion der Bildung extrazellulärer Matrix kommt.

1.1.1 TGF β -Signalweg und Fibrose

TGF β spielt bei der Bildung der extrazellulären Matrix und damit bei der Wundheilung eine wichtige Rolle. Dort kann ein Überschuss an TGF β -Protein zu Fibrose und Narbenbildung führen (Border und Noble 1994). Die gesteigerte Produktion von Kollagen wird über eine erhöhte Ausschüttung von CTGF (*connective tissue growth factor*) reguliert, welches wiederum von TGF β stimuliert wird (Chujo et al. 2005). Diese Prozesse können im Gefolge chronischer Entzündungen eintreten, wie sie z.B. auch nach einer Strahlentherapie beobachtet werden. In bestrahlten Geweben fanden sich erhöhte Spiegel unterschiedlicher Zytokine, unter anderem auch von TGF β (Dent et al. 2003). TGF β wird durch eine Reihe von Stimulatoren wie Bestrahlung, pH-Verminderung oder enzymatisch aktiviert. Die auf diese Weise modulierten zellulären Prozesse begünstigen die Entwicklung einer radiogenen Fibrose (Martin et al. 2000). Nach Bestrahlung kommt es, induziert durch TGF β , zu einer Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ins bestrahlte Gewebe. Über die Ausschüttung weiterer Zytokine, welche Fibroblasten zur Sekretion von Matrix-Proteinen anregen, werden pro-fibrotische Prozesse gefördert (Xavier et al. 2004). Insgesamt ist der Zusammenhang zwischen dem TGF β -Signalweg und der radiogenen Fibrose mittlerweile gut etabliert (Leask und Abraham 2004).

Auch für andere auf chronischen Entzündungsprozessen basierende Organfibrosen wird dem TGF β -System eine größere Bedeutung beigemessen. Fibrotische Veränderungen in den Nieren werden durch TGF β mitbeeinflusst. Die erhöhten TGF β -Spiegel führen zu einer Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Produktion von extrazellulären Matrixproteinen und damit im Verlauf zu einem fibrotischen

Remodelling (Qi et al. 2006; Zeisberg et al. 2000). Auch bei chronischen Entzündungsprozessen in der Leber, aus denen sich Leberfibrosen und hepatozelluläre Karzinome entwickeln können, spielt TGF β eine wichtige Rolle. Eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters von Signaltransduktionsmolekülen im TGF β -Signalweg führt offenbar dazu, dass dieser Signalweg nicht mehr tumorsuppressiv, sondern fibrogen und onkogen wirkt (Matsuzaki 2009).

1.1.2 TGF β -Signalweg und Karzinogenese

Die kontextabhängigen tumorhemmenden bzw. -fördernden Effekte machen den TGF β -Signalweg zu einem attraktiven Objekt der Krebsforschung und möglicher zukünftiger therapeutischer Interventionen. Dabei sind vielfältige und komplexe Wirkungen auf Zellwachstum, -differenzierung und -teilung zu berücksichtigen. Sechs essenzielle Veränderungen der physiologischen Zellfunktion werden für eine maligne Transformation als nötig erachtet (Hanahan und Weinberg 2000): 1. Eigene Wachstumssignale, 2. Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, 3. Umgehung der Apoptose-Mechanismen, 4. unbegrenztes Replikationspotenzial, 5. hinreichende und nachhaltige Angiogenese sowie 6. Gewebeeinfiltration und -metastasierung. Zumindest bei vier dieser Mechanismen (2., 3., 5. und 6.) ist TGF β maßgeblich involviert (Millet und Zhang 2007). Diese Erkenntnisse basieren unter anderem darauf, dass in einem breiten Spektrum von hyperproliferativen Erkrankungen und Tumorarten eine Vielzahl genetischer und epigenetischer Veränderungen in Genen des TGF β -Signalwegs gefunden wurden (Derynck et al. 2001; Massague et al. 2000).

Primär wird davon ausgegangen, dass TGF β als Tumorsuppressor fungiert. In epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen hat TGF β einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation durch Förderung eines Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase (Ellenrieder 2008; Ravitz und Wenner 1997). Obwohl also gemäß Zellkulturexperimenten eine starke Wachstumshemmung durch TGF β gut dokumentiert ist, zeigen die meisten Tumore des Menschen eine starke Expression von TGF β , deren Ausmaß oft mit einer schlechten Prognose korreliert ist (Gold 1999; Watanabe et al. 2001). Man geht heute davon aus, dass sich die Eigenschaften von TGF β initial tumorunterdrückend auswirken, im weiteren Verlauf aber die Tumorausbreitung begünstigen (Pardali und ten Dijke 2009). Einerseits gehen häufig im Verlauf der Tumorgenese die eigentlich zytostatischen Effekte von TGF β auf die Tumorzellen verloren (Gomis et al. 2006; Seoane et al. 2004). Andererseits kommen verstärkt pro-metastatische und neoangiogenetische Prozesse zum Tragen (Blobe et al. 2000; Galliher

et al. 2006; Galliher und Schiemann 2006). Ein Aspekt dabei ist, dass TGF β die Adhäsion von Tumorzellen an Matrixproteine und damit deren Metastasierung unterstützt (Maehara et al. 1999). Außerdem hilft TGF β dem Tumor, sich den Angriffen des Immunsystems zu entziehen (Inge et al. 1992; Torre-Amione et al. 1990). Dabei kommt offenbar der Ansammlung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) eine besondere Bedeutung zu, deren Generierung durch TGF β gefördert wird (Curiel et al. 2004). Diese unterdrücken die anti-tumoröse Aktivität zytotoxischer Lymphozyten.

1.1.3 TGF β -Signalweg und Atherosklerose

In Bezug auf Atherosklerose wird TGF β primär als anti-inflammatorisch angesehen (Tedgui und Mallat 2006). Dabei übt TGF β vielfältige Effekte auf unterschiedliche Zelltypen der Gefäßwand aus (Grainger und Metcalfe 1995; Hansson und Robertson 2004; Mallat und Tedgui 2002; Singh und Ramji 2006). Dabei sind insbesondere die Wirkungen auf glatte Muskelzellen von denen auf Endothelzellen zu unterscheiden. In der Kultur glatter Muskelzellen stimulierte TGF β 1, welches im zirkulierenden Blut die vorherrschende TGF β -Isoform darstellt, massiv die Bildung von extrazellulärer Matrix (Ignotz et al. 1987; Ignotz und Massague 1987; Penttinen et al. 1988). Weiterhin wurde unter den meisten untersuchten experimentellen Bedingungen eine Hemmung der Proliferation der Muskelzellen und eine vermehrte Expression kontraktiler Proteine beschrieben (Bjorkerud 1991; Grainger et al. 1994b; Owens et al. 1988). Bezüglich Endothelzellen hemmt TGF β 1 die Proliferation und Migration sowie die Expression von Adhäsionsproteinen, welche für die Anhaftung von Leukozyten und damit einhergehende Entzündungsreaktionen wichtig sind (Gamble et al. 1993). Insgesamt unterdrückt TGF β 1 die Endothelzell-Aktivierung. Außerdem wurde in Zellkultur durch TGF β 1 eine Hemmung der Schaumzellbildung aus Makrophagen, welche bei der Genese der arteriosklerotischen Plaques von zentraler Bedeutung sind, beobachtet (Argmann et al. 2001). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF β zur Aufrechterhaltung der physiologischen Architektur der Blutgefäße beiträgt (Grainger 2007; Raines und Ferri 2005). Diese Ansicht wird dadurch gestützt, dass ein genetisches Ausschalten der Funktion des TGF β -Signalwegs in Mäusen zu einer dramatischen Zunahme der Arteriosklerose führte (Robertson et al. 2003). In welchem Umfang der TGF β -Signalweg bzw. dessen Dysfunktion zu den klinischen Manifestationen der Arteriosklerose beiträgt, bleibt noch zu klären.

Da Frauen im Durchschnitt eine Dekade später an kardiovaskulären Ereignissen erkranken als Männer (Georgiadou und Sbarouni 2009), stellt sich die Frage, ob dies auch mit TGF β zusammenhängen könnte. Hinweise dafür gibt es aus Studien an Mäusen, bei welchen

vermehrt atherosklerotische Läsionen bei höherer Expression von Apolipoprotein A und damit verbundener geringerer Aktivierung von TGF β gefunden wurden (Grainger et al. 1994a). Wurden Mäuse mit Tamoxifen behandelt, stiegen die TGF β -Serumspiegel an und die Lipidplaques verringerten sich (Grainger et al. 1995). An einer Studie an über 1000 Frauen fand sich ein nahezu halbiertes Risiko für Herzinfarkte bei Einnahme des Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen (McDonald et al. 1995). Allerdings traten dann häufiger Thromboembolien auf, ein Indiz dafür, dass auch bei kardiovaskulären Ereignissen differenzierte kontextspezifische TGF β -Effekte vorliegen könnten. Interessanterweise zeigte der Aromatasehemmer Letrozol, der im Unterschied zu Tamoxifen keine partiell Östrogenrezeptor-agonistische Wirkung besitzt, entgegengesetzte kardiovaskuläre Effekte: mehr koronare und weniger thromboembolische Ereignisse (Thurlimann et al. 2005). Funktionell-molekulare Untersuchungen dazu, die einen Zusammenhang zwischen Aromatase-Hemmern und dem TGF β -Signalweg belegen würden, gibt es noch nicht.

1.1.4 TGF β und neurologische Erkrankungen

Eine sehr interessante und viel beachtete Studie konnte eine wichtige Funktion des TGF β -Signalwegs im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung aufzeigen. In einem Tiermodell wurden Mäuse mit einem Alzheimer-ähnlichen Phänotyp mit solchen Tieren gekreuzt, bei denen mehrere TGF β -Signalweg-Gene genetisch ausgeschaltet waren. Dadurch besserte sich die Symptomatik der Versuchstiere und histologisch wurde in den Hirnschnitten eine vermehrte Infiltration von Makrophagen mit inkorporiertem Amyloid- β gefunden (Town et al. 2008). Auch für die Entwicklung, die Erhaltung und den Schutz dopaminerger Neurone scheint TGF β wichtig zu sein. Damit ist auch dessen potenzielle Implikation bei der Parkinson-Erkrankung gegeben (Roussa et al. 2009).

1.2 Komponenten des TGF β -Signalwegs

Die einzelnen Komponenten des TGF β -Signalwegs setzen sich aus Liganden, Rezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen zusammen, über deren Funktion es in den letzten Jahren zunehmend Aufschluss gab.

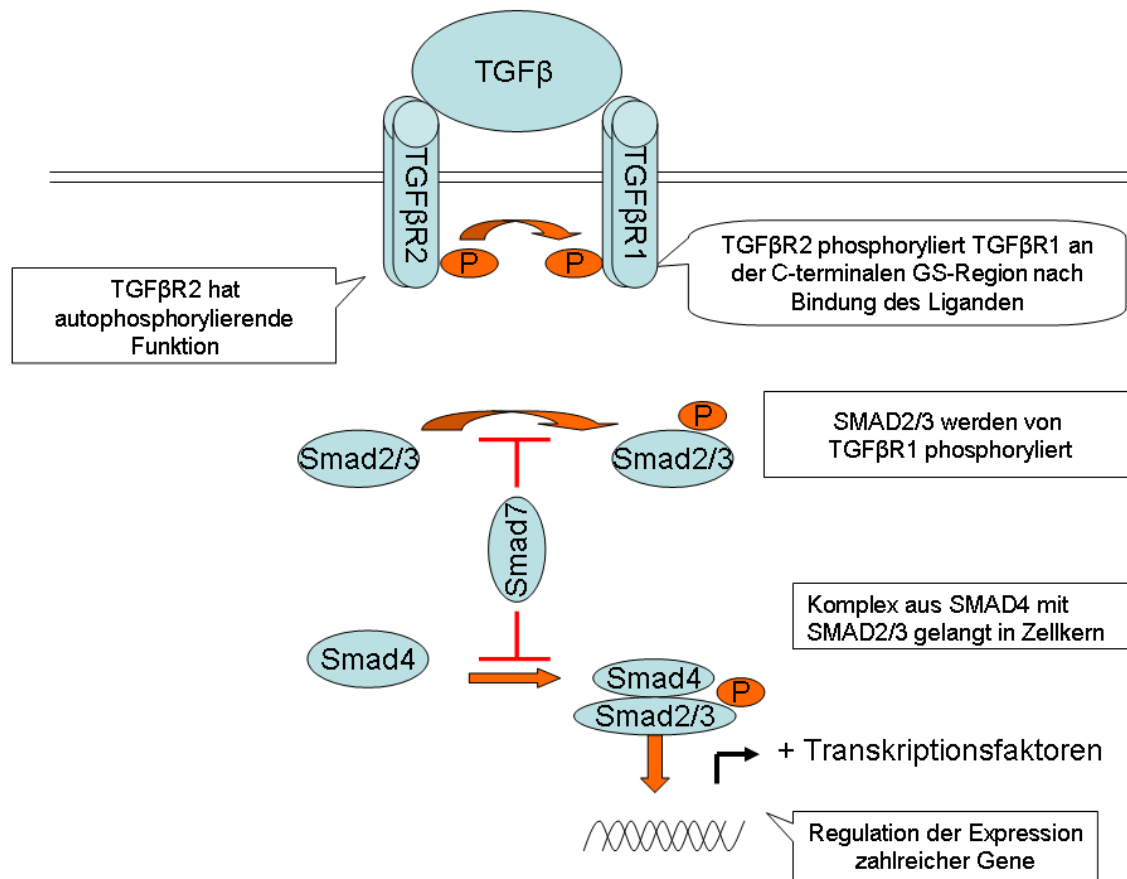


Abb. 1 Komponenten und Funktionsweise des TGFβ-Signalwegs.

Der Signalweg von TGFβ (*transforming growth factor beta*) gehört zu einer großen Familie von sequenzhomologen Proteinen (Superfamilie). Bisher sind mehr als 30 Proteine bei Säugetieren bekannt. Dazu gehören BMPs (*bone morphogenetic proteins*) und die Aktivine. Das gängigste Modell vom TGFβ-Signalweg zeigt einen Ablauf der Bindung des TGFβ-Liganden an den TGFβ-Rezeptor und darauffolgenden Signaltransduktion über intrazelluläre Faktoren (Itoh et al. 2000; Massague 1998; Moustakas et al. 2001). Allerdings gibt es viele Kombinationen von Liganden und Rezeptoren, das heißt, die Ligand-Rezeptor-Interaktion ist unspezifisch (Oh et al. 2000): Aktivine und TGFβ-Liganden können an die gleichen Rezeptoren binden und nutzen dabei dieselben intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle (Derynck und Zhang 2003). Auch sind die Signalwege untereinander verknüpft, so dass Aktivine und TGFβ-Proteine auch hemmenden Einfluss aufeinander haben können. Schon in den frühen Phasen der embryonalen Entwicklung, sowie im Erwachsenenalter haben TGFβ-Proteine, Aktivine und BMP Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen (Schmierer und Hill 2007). Die Anlage und Ausreifung wichtiger Organe wird über die TGFβ-Superfamilie reguliert (Mummery und van den Eijnden-van Raaij 1993; Roelen et al. 1997).

1.2.1 TGF β -Liganden

Von TGF β sind drei Isoformen mit einer hohen Sequenzhomologie von etwa 70% in der biologisch aktiven C-terminalen Region bekannt (Massague 1990). Als eine vierte Isoform wird mitunter auch das LEFTY2-Protein bezeichnet. Dieses ist an der regulären Links-Rechts-Zuordnung der Organe in der Embryonalphase (Kosaki et al. 1999) und am regelhaften Ablauf der Menstruationsblutung beteiligt (Kothapalli et al. 1997). Zu den anderen TGF β -Isoformen weist „TGF β 4“ nur eine Aminosäuresequenz-Homologie von 30% auf.

Im zirkulierenden Blut ist praktisch nur die TGF β 1-Isoform quantitativ bedeutsam; daher sollen sich die weiteren Betrachtungen auf dieses konzentrieren. Seine Expression findet in vielen Geweben statt, besonders hoch ist sie in Endothel, Bindegewebe und in hämatopoetischen Zellen (Blobe et al. 2000). Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 19q.13.1 und hat eine Länge von 26,2 kbp. TGF β wird zunächst als dimeres Polypeptid transkribiert und translatiert, zusammen mit dem LAP (*latency-activated protein*, Gray und Mason 1990), welches im selben Leserahmen liegt und dem TGF β 1 vorgelagert ist. Die einzelne Kette dieses Dimers umfasst 390 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt 44,3 kDa. Bevor TGF β aus der Zelle sezerniert wird, wird LAP abgespalten, die Polypeptidketten werden aber über eine nicht-kovalente Bindung weiter zusammengehalten (Dubois et al. 1995; Gentry et al. 1988). Binnen 15 min nach proteolytischer Spaltung von LAP und TGF β 1 erfolgt intrazellulär eine kovalente Bindung eines weiteren Proteins, welches LTBP (*latent TGF β binding protein*) genannt wird. Dieses Protein scheint für die Sekretion und Aktivierung von TGF β 1, sowie dessen Steuerung zu bestimmten Zielstrukturen von Bedeutung zu sein (Oklu und Hesketh 2000). Innerhalb weiterer 15 min wird dann der TGF β 1-LAP-LTBP-Komplex sezerniert (Miyazono et al. 1991). Man kann sich diesen Komplex als funktionelle Einheit mit dem LAP als Detektor, dem LTBP als Lokalisator und schließlich dem TGF β 1 selbst als Effektor vorstellen (Annes et al. 2003; Munger et al. 1999).

Um TGF β 1 aus diesem inaktiven Komplex freizusetzen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen wird das Matrix-Glykoprotein Thrombospondin-1 als ein wichtiger Faktor für die Aktivierung von TGF β 1 und dessen Freisetzung aus dem inaktiven Komplex angesehen (Crawford et al. 1998). Aber auch ionisierende Strahlung, ein saurer pH-Wert (kleiner als 3,5) oder Spaltung durch Plasmin können TGF β freisetzen (Barcellos-Hoff 1993; Barcellos-Hoff et al. 1994). Das eigentliche TGF β 1-Protein hat als Einzelpeptid ein Molekulargewicht von

13 kDa. Es liegt jedoch als Homodimer vor, wobei die beiden Monomere über einen Cystein-Rest miteinander verbunden sind (Shi und Massague 2003).

1.2.2 TGF β -Rezeptoren

Nach den Liganden stellen Rezeptoren die nächste Ebene im TGF β -Signalweg dar. Hierbei werden zwei Haupttypen unterschieden: TGF β RI- und TGF β RII-Rezeptoren (Schmierer und Hill 2007), wobei bei Säugetieren bislang sieben RI- und fünf RII-Rezeptoren bekannt sind. Beide Typen sind Transmembranproteine und haben extrazellulär eine cysteinreiche Ligandenbindungsdomäne und intrazellulär eine Serin-/Threonin-Kinase-Domäne. In der Zellmembran liegen TGF β RI und TGF β RII als Homodimere vor. Für den Liganden TGF β 1 sind TGF β RI (ein RI-Typ) und TGF β R2 (ein RII-Typ) quantitativ am wichtigsten (Karlsson et al. 2005). Das *TGF β R2*-Gen liegt auf Chromosom 3p22 und hat eine Größe von 87,6 kbp, das *TGF β RI*-Gen liegt auf Chromosom 9q22 und ist 49,1 kbp groß.

1.2.3 SMAD-Moleküle

Bisher sind in Säugetieren acht verschiedene SMAD-Proteine beschrieben worden. Ihr Name leitet sich von „mothers against decapentaplegic homolog“ ab. Ihre Aufgabe besteht in der Signaltransduktion und Transkriptmodulation. Die SMAD-Proteine werden unterteilt in regulatorische („rSMADs“ wie SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 und SMAD8), inhibitorische („iSMADs“ wie SMAD6 und SMAD7) und co-aktivatorische („co-SMADs“ wie SMAD4).

In den Blutzellen sind vorwiegend SMAD2, SMAD3, SMAD4 und SMAD7 exprimiert. SMAD2 hat eine Größe von 467 Aminosäuren (AS) und ein Gewicht von 52,3 kDa. SMAD3 von 425 AS und 48,1kDa, SMAD4 von 552 AS und 60,4 kDa und SMAD7 hat 426 AS und wiegt 46,4 kDa. Die Genloci befinden sich für SMAD2 auf Chromosom 18q21.1, SMAD3 auf Chromsom 15q22.33, SMAD4 auf Chromosom 18q21.1 und SMAD7 auf Chromosom 18q21.1.

Die besondere Bedeutung von *SMAD*-Genen für die Karzinogenese wird dadurch belegt, dass sich bei Pankreas- und kolorektalen Karzinomen häufig Mutationen in *SMAD2* und *SMAD4* fanden (Eppert et al. 1996; Hahn et al. 1996; Miyaki et al. 1999; Uchida et al. 1996). Bei einer umfassenden Analyse für Proteine kodierender Sequenzen bei 11 kolorektalen Karzinomen gehörten *SMAD2* und *SMAD4* zu den Genen, in welchen am häufigsten Mutationen beobachtet wurden (Sjoblom et al. 2006).

Studien an Mäusen mit Fibroblasten mit einem Knock-out von *SMAD3* zeigten, dass der Verlust dieses Proteins mit einer verminderten Produktion von extrazellulärer Matrix und damit mit weniger Fibrose einherging. Damit könnten SMAD3-Inhibitoren klinisch relevant werden, zum einen im Bereich der Wundheilung, zum anderen in der Reduktion von Fibrose (Roberts et al. 2001). Solche Mäuse erwiesen sich auch als resistent gegen strahleninduzierte Fibrose der Haut (Flanders 2004).

1.3 Signalübermittlung im TGF β -System

Hier soll kurz die Funktionsweise des klassischen TGF β -Signalwegs beschrieben werden, wie er unter anderem in Blutlymphozyten von Bedeutung ist (wie oben bereits erwähnt, können auch andere Liganden diesen Signalweg aktivieren oder dieselben Liganden können auch auf andere Signalkaskaden wirken). Der erste Schritt besteht in der Bindung des TGF β 1-Liganden an den hochaffinen TGF β R2. Durch diese Bindung gelangt der TGF β R1 in räumliche Nähe zum TGF β R2. Es bildet sich also ein Komplex aus dem Liganden TGF β 1 und den beiden Rezeptoren TGF β R2 und TGF β R1 zusammengehalten durch den Liganden. In dieser Konstellation kann dann die konstitutiv aktive Kinasedomäne des TGF β R2 den TGF β R1 phosphorylieren und damit aktivieren (Wrana et al. 1994). Nun wird das Signal durch Phosphorylierung von SMAD2- und SMAD3-Molekülen weitergeleitet (Massague 1998). Interessanterweise gibt es hier eine recht klare Trennung: drei der TGF β -Typ-I-Rezeptoren (darunter der TGF β R1) aktivieren SMAD2 und SMAD3 (so genannte „TGF β - oder Aktivin-Signale“), während die anderen vier Typ-I-Rezeptoren für die Signalweiterleitung SMAD1, SMAD5 und SMAD8 verwenden (typisch für die „BMP-Signale“, *bone morphogenic proteins*) (Attisano und Wrana 2002). Diese SMAD-Moleküle sind im nicht-aktivierten Zustand mit einem so genannten SARA-Protein (*SMAD anchor for receptor activation*) komplexiert. Dieses begünstigt die Position der SMAD-Proteine an der Zellmembran, damit diese leichter phosphoryliert werden können (Tsukazaki et al. 1998). Nach Phosphorylierung werden SMAD2 bzw. SMAD3 freigesetzt (Moustakas 2002). Weitere Signaltransduktionsmoleküle wie zum Beispiel SMAD4 lagern sich an phosphoryliertes SMAD2/SMAD3 an. Dieser hetero-oligomere Komplex wandert dann in den Kern und reguliert dort – zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren – die Expression einer Vielzahl von Genen (Abb. 1). Dabei werden Enzyme rekrutiert, die Histone acetylieren bzw. deacetylieren (Wrzesinski et al. 2007). In diese Signalkaskade können noch inhibitorische SMAD-Proteine (in Lymphozyten vor allem SMAD7) eingreifen. Diese Signalhemmung kann sowohl durch einen kompetitiven Antagonismus bei der Phosphorylierung von SMAD2

bzw. SMAD3 erfolgen als auch deren Aggregation mit SMAD4 unterbinden (Abb. 1 Hayashi et al. 1997; Nakao et al. 1997). Zudem kann SMAD7 zur Degradierung von TGF β R1 über die Rekrutierung von Smurf-enthaltenden E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexen beitragen (Wrzesinski et al. 2007).

1.4 Regulation des TGF β -Signalwegs: Expressionsänderungen

Über den TGF β -Signalweg wird nicht nur die Expression einer Vielzahl abhängiger Gene reguliert, sondern dieses System kann sich über Expressionsänderungen auch selbst regulieren. Bekannt ist die Induktion des Autoinhibitors SMAD7 durch TGF β 1 in T-Zellen (Kunzmann et al. 2003). Vor kurzem wurde auch eine Suppression der Transkription des *SMAD3*-Gens nach TGF β 1-Behandlung in mononukleären Leukozyten beobachtet (Schirmer et al. 2009). Dieses System vermag sich offenbar nach Stimulation sowohl durch eine vermehrte Transkriptionsrate von iSMADs als auch durch eine verminderte von rSMADs in einem gewissen Rahmen selbst regulieren zu können. Interessant ist, dass die Funktion des inhibierenden SMAD7 durch CTGF, welches über den TGF β -Signalweg reguliert wird, unterbunden und somit die negative Rückkopplung unterbrochen werden kann (Phanish et al. 2005). Andererseits kann der Ligand TGF β 1 seine eigene Expression induzieren. Eine Behandlung mit neutralisierendem TGF β 1-Antikörper reduzierte dessen Transkription in Fibroblasten (Schultze-Mosgau et al. 2006). In die Regulation der Expression von Genen des TGF β -Signalwegs greifen auch viele andere Signalwege ein. Beispielsweise fand sich eine vermehrte Transkription von iSMADs durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, Afrakhte et al. 1998), durch IFN γ (Ulloa et al. 1999), oder die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL1 β (Bitzer et al. 2000). Weiterhin besteht eine Verbindung zu MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Kaskaden, die sich in ERK1/2 oder die beiden stressaktivierten Signalwege JNK und p38 aufzweigen. Die häufig bei kolorektalen Karzinomen gefundenen *RAS*-Mutationen führen zu einer Retention von SMAD2/SMAD3 im Zytoplasma und verhindern deren Translokation in den Zellkern (Calonge und Massague 1999; Kretzschmar et al. 1999). Auf diese Weise ist die TGF β -SMAD-Signalkaskade gehemmt.

Da ein enger Zusammenhang zwischen dem TGF β -Signalweg und Fibrose nach Strahlentherapie gut belegt ist (siehe oben, Leask und Abraham 2004; Xavier et al. 2004), stellt sich die Frage, ob Röntgenstrahlung die Genexpression von Komponenten dieses Signalwegs verändert. Schon länger bekannt ist, dass in bestrahltem Gewebe unter anderem mehr TGF β gebildet wird (Dent et al. 2003). In bestrahltem Nierengewebe von Mäusen wurde

kürzlich eine mehrere Wochen anhaltende mRNA-Expressionssteigerung unter anderem der Gene *TGFBR1* und *SMAD7* beschrieben (Kruse et al. 2009).

1.5 TGF β -Signalweg und Zellvitalität

Die Wirkungen von TGF β 1 auf die Zellvitalität sind vielfältig, kontextabhängig und komplex. Eine zentrale Funktion von TGF β in Bezug auf das Immunsystem besteht darin, die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen aufrecht zu erhalten, indem es die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Lymphozyten reguliert (Wrzesinski et al. 2007). Zudem ist TGF β an der Initiierung und Beendigung entzündlicher Reaktionen beteiligt. Schon vor etwa zwei Jahrzehnten hatte man festgestellt, dass selbst winzige Mengen an TGF β die Proliferation von T-Zellen unterdrücken und es diesbezüglich antagonistische Effekte gegenüber IL2 aufweist (Kehrl et al. 1986; Ruegamer et al. 1990). Weitere Details dieser Wirkung konnten später aufgeklärt werden. So entscheidet offenbar der Aktivierungsgrad der Zellen, welche Wirkung TGF β entfaltet. Auf ruhende Lymphozyten des peripheren Blutes wirkt TGF β 1 aktivierungshemmend und apoptoseunterdrückend (Bommireddy et al. 2003). Umgekehrt steigert TGF β die Apoptose in T-Zellen, die bereits aktiviert sind (Chung et al. 2000). Auf diese Weise wirkt TGF β einer Überstimulation des Immunsystems entgegen. Bei der Bewertung der Funktionsweise des TGF β -Signalwegs werden zunehmend auch die einzelnen Komponenten dieses Systems näher beleuchtet. So scheint SMAD3 essenziell für die Suppression der IL2-Produktion und die T-Zell-Rezeptor-vermittelte, jedoch nicht die IL2-induzierte Proliferation von Lymphozyten zu sein (McKarns et al. 2004). Es sei angemerkt, dass TGF β die Zellproliferation auch IL2-unabhängig hemmen kann. Beispielsweise mindert TGF β die Expression von Zellzyklus-Promotoren, während es die von -Blockern erhöht (Datto et al. 1995; Hannon und Beach 1994; Polyak et al. 1994). Zu letzteren gehören CDKN1A (auch als p21 bezeichnet), CDKN2B (p15) oder CDKN1B (p27). Diese durch TGF β induzierten Hemmfaktoren der Proliferation wirken dabei auch synergistisch (Wolfrain et al. 2004).

Zusätzlich zur Unterdrückung der Proliferation werden auch Effektorfunktionen von T-Zellen durch TGF β unterdrückt (Ahmadzadeh und Rosenberg 2005; Smyth et al. 1991). Nicht nur die Entwicklung zytotoxischer CD8⁺-Zellen (Ranges et al. 1987), sondern auch deren zytolytische Aktivität wird durch TGF β gehemmt (Mempel et al. 2006), wobei zumindest letztere Funktion über T-regulatorische Zellen (Tregs) vermittelt wird. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Proliferation und Aktivierung konventioneller T-Lymphozyten (CD4⁺-Helfer- und zytotoxischer CD8⁺-Zellen) durch TGF β supprimiert wird.

Dies unterstreicht die Bedeutung von TGF β für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase und der Selbsttoleranz. In einem Mausmodell konnte umgekehrt gezeigt werden, dass bei Ausschaltung des TGF β -Systems (durch eine dominant-negative *TGF β R2*-Mutante) die CD8⁺-Zellen eine wesentlich bessere antitumoröse zytolytische Aktivität aufweisen (Gorelik und Flavell 2001; Zhang et al. 2006). Entscheidend dafür war die Blockade des TGF β -Signalwegs in den CD8⁺-Zellen in Zusammenhang mit der Helferfunktion von CD4⁺-Zellen, wobei in letzteren die Funktionstüchtigkeit des TGF β -Systems hierfür unerheblich war.

Es gibt aber auch neuere Berichte, dass TGF β unter bestimmten Bedingungen das Überleben und die Aktivierung von CD8⁺-Zellen verstärken kann. In einem Modell für Typ-I-Diabetes wurde beobachtet, dass TGF β auf naive, unstimulierte CD8⁺-Zellen – wie oben beschrieben – inhibierend wirkte, während es in den Zellen, welche schon durch Antigen-Kontakt stimuliert waren, deren Überleben und die Produktion bestimmter aktivierender Zytokine förderte (Filippi et al. 2008). Damit gilt für CD8⁺-Zellen offenbar in Analogie zu den CD4⁺-Zellen (siehe oben, Bommireddy et al. 2003), dass TGF β in Abhängigkeit des Aktivierungszustands dieser Zellen entweder eine proliferations- und funktionsfördernde bzw. -hemmende Wirkung ausübt.

1.6 Funktionelle Genpolymorphismen im TGF β -Signalweg

In der Medizin wird bei künftigen Therapieentscheidungen der Blickwinkel immer mehr hin zu optimierten Therapien gerichtet sein, welche maßgeschneidert auf jeden einzelnen Patienten optimiert werden. Ein wichtiges Element dabei ist die Berücksichtigung genetischer Faktoren. Diese lassen sich in somatische, d.h. während des Lebens erworbene Mutationen (typischerweise in Tumoren), und in die geerbte genetische Komposition unterteilen (Varianten in der Keimbahn). Bei letzteren werden entsprechend der Häufigkeit so genannte Polymorphismen (>1% Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung) von seltenen, familiären oder durch Spontanmutation in der Keimbahn entstandenen Varianten unterschieden. Die ganz überwiegende Zahl an genetischen Polymorphismen machen so genannte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) aus. Es existieren im gesamten Genom etwa 12 Millionen solcher Stellen. Daneben gibt es noch Deletionen oder Insertionen (diese betreffen 1-1000 Basenpaare, etwa 1 Million im menschlichen Genom), VNTRs (*variable number of tandem repeats*, das sind sich wiederholende Elemente von 2-1000 Basenpaaren) und CNVs (*copy number variations*, das sind Deletionen, Insertionen oder Multiplikationen von mehr als 1000 Basenpaaren), die zusammen etwa 12% des menschlichen Genoms betreffen.

Hinsichtlich des TGF β -Systems konzentrieren sich die meisten Literaturberichte auf SNPs im Gen für den *TGF β 1*-Liganden, genauer gesagt, auf dessen 5'-Region. Zum einen wurde eine Beeinflussung der TGF β -Produktion durch die SNPs an Position -509 und 869 beschrieben (Awad et al. 1998; Grainger et al. 1999). Diese beiden SNPs sind genetisch eng miteinander gekoppelt. Die *TGF β 1*-Variante 915G>C (=Arg25Pro) ging ebenfalls mit höheren TGF β 1-Konzentrationen im Serum einher. Weiterhin zeigte sich nach Bestrahlung von Brustkrebspatienten ein erhöhtes Risiko für eine radiogene Fibrose, wenn die *TGF β 1*-Genotypen 509TT bzw. 869CC (=10Pro) vorlagen (Andreassen et al. 2005; De Ruyck et al. 2006; Giotopoulos et al. 2007; Quarmby et al. 2003). Allerdings gibt es hier auch Studien, welche solch einen Zusammenhang verneinen (Andreassen et al. 2006) bzw. diesen bei Bestrahlung von anderen Organen, wie zum Beispiel der Prostata, nicht nachweisen konnten (Damaraju et al. 2006). Das Variantenallel 869C in *TGF β 1* ging bei japanischen Frauen nach der Menopause mit höheren TGF β 1-Plasmaspiegeln, einer höheren Knochendichte und weniger osteoporotischen Frakturen einher (Yamada et al. 1998). Bei kaukasischen Frauen fand sich für das -509T-Allel eine höhere Knochenmasse (Tzakas et al. 2005). Obwohl im Hinblick auf ein Krebsrisiko kontrovers diskutiert, wurde vor kurzem in einer sehr großen Studie ein sehr gering, aber statistisch signifikant höheres Brustkrebsrisiko für das 869C-Allel beobachtet (Cox et al. 2007). Diese *TGF β 1*-Polymorphismen wurde für eine Vielzahl weiterer klinisch relevanter Fragestellungen auf Assoziationen untersucht (z.B. Leberfibrose, kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen). Die Ergebnisse dazu sind jedoch zumeist uneinheitlich, so dass definitive Schlussfolgerungen noch nicht gezogen werden können.

Zum Einfluss von genetischen Polymorphismen in den TGF β -Rezeptoren gibt es noch wenige Daten. Für Varianten im Gen für *TGF β 2* sind bislang kaum Assoziationen mit klinischen oder funktionellen Daten bekannt, z.B. war eine entsprechende Studie zur Entstehung von Keloiden negativ (Bayat et al. 2004). Beim Gen für *TGF β 1* konzentrierten sich die Untersuchungen bislang auf eine 9 Basenpaare umfassende Deletionsvariante. Daraus resultiert ein Verlust von drei konsekutiven Alaninen am Übergang vom Signalpeptid zur Rezeptorsequenz von *TGF β 1*. Diese Variante wird auch als *6A bezeichnet, weil beim Wildtyp insgesamt neun aufeinander folgende Alanine vorliegen und bei der Deletionsvariante nur 6. Die Allelhäufigkeit der Deletion beträgt bei Kaukasiern etwa 10%. Zunächst wurde vermutet, dass diese Variante mit einer niedrigeren Aktivität des Rezeptors einhergehen könnte (Chen et al. 1999). Weiterhin gibt es Daten, in denen diese Deletion mit einem höheren Risiko für kolorektale Karzinome in Verbindung gebracht wird (Pasche et al. 1999; Xu und Pasche 2007), allerdings mit einer niedrigen Penetranz (Kaklamani et al. 2003).

Ob *TGFBR1*6A* tatsächlich ein Krebsrisikoallel darstellt, ist insgesamt strittig und könnte zumindest tumorspezifisch sein (Daley et al. 2007; Skoglund et al. 2007; Zhang HT et al. 2005). Interessant scheint aber, dass in Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms bei 30% der Patienten diese Deletion neu auftrat (Pasche et al. 2005). Auch ein somatischer Erwerb im Bereich von Karzinomen des Kopf-Halsbereichs ist beschrieben worden (Bian et al. 2007). Untersuchungen zum Einfluss von **6A* auf Strahlen-induzierte Zytotoxizität legen die Hypothese einer verminderten Funktionalität dieser Variante nahe (Schirmer et al. 2009).

Zu klinisch oder funktionell bedeutsamen *SMAD*-Polymorphismen liegen bislang erst wenige Daten vor. Eine genomweite Assoziationsstudie ergab einen Zusammenhang des Darmkrebsrisikos mit drei Varianten in intronischen Bereichen von *SMAD7* (Broderick et al. 2007). Einen zell- oder molekularbiologischen Nachweis der Funktionalität dieser Varianten gibt es bislang noch nicht.

1.7 Zielsetzung

Grundlage meiner Arbeit bildeten zwei frühere, in der Abteilung Klinische Pharmakologie Göttingen durchgeführte Pilotstudien zur Evaluierung des Einflusses von Genpolymorphismen sowohl auf Expressionsparameter im TGF β -Signalweg als auch auf Zellvitalität nach TGF β 1-Stimulation und Bestrahlung (Campean 2007; Janke 2009). Darin konnten autoregulatorische Mechanismen im Sinne einer transkriptionellen Induktion von *SMAD7* und einer Suppression von *SMAD3* nach TGF β 1-Stimulation in Leukozyten nachgewiesen werden. Weiterhin legten diese Daten eine Hypofunktionalität der *TGFBR1*6A*-Deletionsvariante nahe. Ziel war es nun, die Ergebnisse dieser vorangegangenen Arbeiten weiter zu präzisieren und zu erweitern. Dazu sollte zum einen eine weitere Bestätigung der zuvor als potenziell funktionell identifizierten Genvarianten erfolgen. Darüber hinaus waren diese früheren Studien auch mit Nachteilen behaftet, die in meiner Arbeit zu lösen waren. Damals wurden als Studienmaterial PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) verwendet, die jedoch eine heterogene Zellmischung darstellen. Außerdem sollte die genetische Variabilität umfassender dargestellt werden. Zur Differenzierung allgemeiner von zellspezifischen Mechanismen sollten meine Untersuchungen mit drei unterschiedlichen Zellarten durchgeführt werden: Fibroblasten, LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) und T-Lymphozyten. Um zumindest die häufigen Genvarianten mit guter Power auf funktionelle Effekte testen zu können, bedurfte es einer ausreichend großen Stichprobe. Beispielsweise braucht man einen Stichprobenumfang von etwa 100 genetisch unterschiedlichen Zellen, um bei einer Allelfrequenz von 30% für einen bi-allelischen

Polymorphismus einen signifikanten Unterschied zwischen den Trägern der beiden homozygoten Zustände detektieren zu können (wenn ein Effektunterschied und eine Standardabweichung von je 30% angenommen wird). Diese große Probenzahl war jedoch nur für die Studie mit den T-Lymphozyten zu bewerkstelligen. Mit den Fibroblasten und LCLs sollten daher Genotyp-unabhängige Effekte dargestellt werden. Für die vorhandenen 48 LCLs sollten die bereits vorhandenen TGF β -Signalweg-Genotypen explorativ auf eine Assoziation mit den zu messenden Expressions- und Zellvitalitätsparametern getestet werden. Im einzelnen ergaben sich für meine Arbeit folgende zu untersuchende Hypothesen:

1. In der Literatur sind für bestrahltes Gewebe nennenswerte Änderungen der Expression von Genen des TGF β -Signalwegs beschrieben (auch in Relation zu unspezifischen Veränderungen von Referenzgenen). Dies sollte nun von mir in bestrahlten Zellkulturen (Fibroblasten mit 2 und 8 Gy, LCLs mit 3 Gy, T-Lymphozyten mit 2 Gy) überprüft werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der mRNA der Gene *TGFBRI*, *SMAD3* und *SMAD7*.
2. TGF β 1-Behandlung führt in einem negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer Induktion der mRNA von *SMAD7* und zu einer Suppression von *SMAD3*. Ausgehend von diesem Prinzip sollten für die T-Lymphozyten die Effekte von anti-TGF β 1 (einem neutralisierenden TGF β 1-Antikörper) eruiert werden, um einen weiteren Beweis der Selbstregulation des TGF β -Systems zu liefern.
3. Die 48 zur Verfügung stehenden LCLs stellen gegenwärtig das weltweit am dichtesten genotypisierte Kollektiv dar. Dies beinhaltet auch umfassende Genotyp-Daten für die einzelnen Komponenten des TGF β -Signalwegs. Daher sollten diese Genpolymorphismen (etwa 950 in *TGFBRI*, *TGFBRI2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD7* und dem besonders Strahlen-responsiven *CDKN1A*) mit den vorzunehmenden mRNA-Expressionsmessungen dieser Gene (Kontrollniveau, Bestrahlungs- und TGF β 1-Effekte) in Beziehung gesetzt werden. Eine entsprechende Analyse sollte auch für die durch FACS-Analysen zu ermittelnden Zellvitalitätsparameter durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang war auch zu prüfen, inwiefern die Funktionsmessungen innerhalb einer Subgruppe von 11 LCLs zwischen unterschiedlichen Tagen korrelierten, eine wichtige Voraussetzung für die sinnvolle Testung eines Einflusses genetischer Varianten.
4. Um Genpolymorphismen als funktionell bedeutsam einzustufen zu können, müssen diese reproduzierbar mit vergleichbaren Funktionsmessungen (Expression,

Zellvitalität) assoziiert sein. Die Studie mit den T-Lymphozyten diene dabei als Validierung sowohl für die Ergebnisse früherer durchgeführter Dissertationen (siehe oben) als auch für die eigenen, anhand der LCL-Studie als potenziell identifizierten Genvarianten.

2 Material

2.1 Geräte

Accu-jet [®]	Brand, Wertheim
Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
BioRobot [®] EZ1	Qiagen, Hilden
Elektrophorese-Kammer (ComPhor L Mini-Gelkammer)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophorese-Netzteil (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
FACSAria II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Feinwaage BL 610	Sartorius, Göttingen
Fluor-S [™] MultiImager (für Gelfotografie)	BioRad, Hercules USA
Hämatocytometer (Neubauer-Zählkammer Improved)	Brand, Wertheim
Inkubator Function line	Heraeus, Hanau
Kühlschrank VIP Series –86°C	Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA, Staufen
Mikroliter-Küvette für Photometer (LabelGuard [™])	Implen, München
Mikroplatten-Reader (96-Well, Tecan ULTRA)	Tecan, Crailsheim
Mikroskop Telaval31	Zeiss, Jena
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Netzteil für Elektrophoresekammer Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well), Typ Master-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (96-Well), PTC-200 Peltier	MJ Research/BioRad, Hercules, USA

PH-Meter CG822	Schott Geräte
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) Typen <i>Research</i> und <i>Referense</i>	Eppendorf, Hamburg
PTC-200 Peltier Thermal Gradient Cycler	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierer 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Stauschlauch zur Blutentnahme	Prämeta, Troisdorf
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL 2A	Mahl, Trendelburg
TaqMan 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vertikal-Autoklav, KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Vortexer (MS 2 <i>minishaker</i>)	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Xstrahl RS225	GulmayMedical Limited, UK
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterial

Alkoholisches Haut-Desinfektionsspray (Kodan [®])	Schülke & Mayr, Norderstedt
Blutentnahme-Besteck (Butterfly, Micro-Flo [™])	LDKS Oversan, Gemonio, Italien
Einweg-Pasteurpipetten, Glas, 230 mm	Brand, Wertheim
Einweg-Pasteurpipetten, Kunststoff, 3 ml	Roth, Karlsruhe
Filter: 50 µm Cup Filcons	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Flat 8 Cap Strips, RNase Cleanroom Produced	Thermo Scientific, UK
Mehrkanal Pipette (8er) 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Monovetten Kalium-EDTA, 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten Lithium-Heparin, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg

PCR Softtubes Flachdeckel, RNase- und DNase-frei (0,2 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom
Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen RNase-, DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Kisker, Steinfurt
Platten, 6-Well steril für Zellkultur	Nunc, Roskilde, Dänemark
Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
RNase-freie 96 Multiply PCR Platte natur	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 5 ml für FACS	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell, Technocut, Edelstahl Klinge	HMD Healthcare Ltd., Hereford HR4 9DQ UK
Spitzen für Multipipette plus (Combitip plus 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spitzen für Multipipette plus, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Streifen (8er) für PCR-Platten	Abgene, Epsom
TaqMan Adhesive Optical Covers	Applied Biosystems, Darmstadt
Tupfer (aus Zellstoff)	Hartmann, Heidenheim

2.3 Chemikalien

100 bp-Leiter	Rapidozym, Berlin
6β-Mercaptoethanol	Sigma, St.Louis, USA
Agarose <i>Ultra Pure</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Annexin, FITC-markiert	Roche, Mannheim
Anodenpuffer (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Anti-TGF-beta 1	R&D Systems, Inc.
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe

CD3-Antikörper (UCHT1-Klon), Phycoerythrin-markiert	BioSource, Nivelles, Belgien
di-Natriumhydrogen-phosphat	Merck, Darmstadt
dNTP-Set	ABgene, Epsom
Ethanol	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid (1% in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Exonuklease I	USB, Staufen
FACS Flow / Rinse / Safe	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
GENESCAN [®] 400 HD[ROX] Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneScan [™] LIZ [®] 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
Glycerol 85%	Zentralapotheke Klinikum Göttingen
Hepes	Applied Biosystems, Darmstadt
HiDi-Lösung (mit Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Kaliumchlorid	Riedel-DeHaën AG, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Milasan, Malliß
Natriumchlorid	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Natriumchlorid	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PicoGreen [®]	Applied Biosystems, Darmstadt
Polymer POP7 (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer (Design nach gewünschter Sequenz, siehe Anhang)	MWG-Biotech, Ebersberg
Propidiumiodid	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Random Primer dN6	Roche, Mannheim
rHu TGF-beta 1	PromoCell GmbH, Heidelberg
Ribonuklease-Inhibitor (RNA guard)	Amersham, Freiburg
Rnase-Zap	Sigma, St.Louis, USA

RPMI Medium 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	USB, Staufen
SuperScript™-II-Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Türcksche Lösung	Merck, Darmstadt

2.4 Kits und Assays

Antikörper CD3 anti-human APC-markiert	eBioscience, Frankfurt am Main
EZ1 DNA Blood Kit zur DNA-Isolierung aus Gesamtblut, vollautomatisch	Qiagen, Hilden
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
Puffer-Lösungen für ELISA (Kit)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Real time</i> -PCR-Mastermix mit SYBR® green	USB, Staufen
RNA-Isolierungskit (<i>basicrna</i>), manuell	OLS, Hamburg
SNaPshot™-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
TaqMan® Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt

2.5 Lösungen und Puffer

Annexin-Puffer, pH 7,4, eingestellt mit NaOH	HEPES	10 mM
	NaCl	140 mM
	CaCl ₂	5 mM
PBS-Puffer, pH 7,4 hergestellt als 10x-Konzentrat, 1x-Verdünnen mit NaOH eingestellt	NaCl	128,5 mM
	KCl	2,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
Probenpuffer für Gelelektrophorese	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Ficoll Puffer Typ 400 gelöst in 1x TBE- Puffer	15% (w/v)
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer), als 10x konzentriert hergestellt,	Tris	1 M

mit HCl auf pH 8,3 eingestellt	Borsäure	1 M
	EDTA	30 mM
TE-Puffer, pH 7,5, eingestellt mit HCl	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM

2.6 Medien

FM	DMEM-Medium	90% (v/v)
	FCS	10% (v/v)
FM-primär	DMEM-Medium	89% (v/v)
	FCS	10% (v/v)
	Penicillin / Streptomycin / Amphotericin B	1% (v/v)
	HBSS-2%	
HBSS-2%	HBSS (<i>Hank's buffered salt solution</i>)	98% (v/v)
	FCS	2% (v/v)
LM-10%	RPMI-Medium	89% (v/v)
	FCS	10% (v/v)
	Penicillin-/ Streptomycin-Lösung	1% (v/v)
LM-15%	RPMI-Medium	84% (v/v)
	FCS	15% (v/v)
	Penicillin/Streptomycin	1% (v/v)
LM-2%	LM-10%	20% (v/v)
	RPMI-Medium	80% (v/v)

2.7 Zellen

2.7.1 LCLs

LCLs (*lymphoblastoid cell lines*) sind durch Transfektion mit Epstein-Barr-Virus immortalisierte B-Lymphozyten. Die für diese Arbeit verwendeten LCLs waren unverwandte Spender kaukasischen Ursprungs und wurden vom Coriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, USA, bezogen. Von ursprünglich in Frage kommenden 59 Zelllinien; die den Probanden des HapMap-Projektes entsprechen, konnten 48 angezüchtet werden. Die zugehörigen ID-Nummern des Coriell Instituts sind:

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

2.7.2 Primäre humane T-Lymphozyten

Diese stammten von freiwilligen Spendern europäischer Abstammung. Deren Gewinnung ist im Methodenteil näher beschrieben.

2.7.3 Fibroblasten

Diese stammten von humanen Hautstücken, die im Rahmen von Operationen der Abteilungen Dermatologie und Allgemein Chirurgie der Universität Göttingen gewonnen wurden.

2.8 Software

Adobe Photoshop

Bildbearbeitung

Cell-Quest Version 1.1.2™

Software zur Durchführung und Visualisierung der durchflusszytometrischen Messungen für das FACS-Scan Gerät von BD

3100 Data Collection Software Version 1.0 (Applied Biosystems)

Erhebung von Daten mit dem 3100 Genetic Analyser Sequenzierer

GeneScan Analysis Version 3.5.1 (Applied Biosystems)

Auswertung von DNA-Fragment-Analysen im Sequenzierer

HaploView-Software (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>): Software zur grafischen Aufbereitung von Daten aus den Genotyp-Datenbanken.

MS Office

Programme für Textverarbeitung, Präsentationen und Tabellenkalkulation

Phase-Software (Version 2.1): Software zum Berechnen der Haplotypen

Quantity One S Version 4.2.1 (BioRad)

Grafische Darstellung und Auswertung von Gelbildern.

SDS 2.1 (Applied Biosystems)

Auswertung von Expressionsmessungen, die mit dem TaqMan 9100 HT gemacht wurden.

SPSS Version 12.0

Grafische Darstellung von Messdaten und Testung auf mögliche Assoziationen.

SWEEP Version 1.0

Analyse von genetischen Selektionssignaturen

XFluor4 (Tecan)

Programm zur Auswertung von Daten, die mit dem Tecan-Mikroplattengerät gemessen wurden.

2.9 Datenbanken

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

Informationen zu Genen, mRNA und Proteinen wurden aus dieser Datenbank gewonnen, ebenfalls Informationen zu dokumentierten Polymorphismen und Microarray-Expressions-Daten.

dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>): umfassendste Datenbank zur genetischen Keimbahn-Variabilität beim Menschen

HapMap-Projekt (<http://www.hapmap.org/index.html.en>)

IIPGA-Datenbank (http://innateimmunity.net/IIPGA2/index_html)

Für die vorliegende Arbeit wurden aus dem HapMap-Projekt Genotypdaten verwendet, für welche in der Abteilung Klinische Pharmakologie zugehörige lymphoblastoide Zelllinien vorhanden waren. Insgesamt umfasst die Genotypisierung des HapMap-Projekts über 4 Millionen genetischer Polymorphismen der menschlichen Keimbahn. Zusätzlich existieren Datenbanken mit Genpolymorphismen für spezielle Fragestellungen, wie z.B. IIPGA, welcher wichtige Gene über den TGFβ-Signalweg enthält.

2.10 Primersequenzen

2.10.1 Primer für qRT-PCR

Fragment	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
----------	-----------------	------------------

<i>TGFBR1</i>	ACCCTTCATTAGATCGCCCTTT	CGCAATTGTTCTCTGAACAAGC
<i>SMAD2</i>	GCCATCACCCTCAAACTGT	GCCTGTTGTATCCCCTGATCTA
<i>SMAD3</i>	GAACGTCAACACCAAGTGCAT	ACGCAGACCTCGTCCTTCT
<i>SMAD4</i>	ACGAACGAGTTGTATCACCTGG	ATGGCTGTCCCTCAAAGTCAT
<i>SMAD7</i>	ACTCCAGATACCCGATGGATTT	CCTCCCAGTATGCCACCAC
<i>CDKN1A</i>	GGAAGACCATGTGGACCTGT	ACTGCAGGCTTCCTGTGG
<i>GADPH</i>	CCCTTCATTGACCTCAACTACAT	ACGATACCAAAGTTGTCATGGAT
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>SDHA</i>	CCCAGGTTTTTCACTTCACTGT	CCAGTTGTCCTCCTCCATGTTC
<i>UBC</i>	CGGTGAACGCCGATGATTAT	ATCTGCATTGTCAAGTGACGA
<i>YWHAZ</i>	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT

2.10.2 Primer für Multiplex-PCR

Gen	Polymorphismus	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	SNaPshot-Primer
<i>TGFBR2</i>	rs11466531	GGGGTTCCTGTGTGCCCTTATTTTC	GGCTGGGAGCAGAGAATAGTAACATAAGTG	TGGGGTAGAGTTTCTAAACTAGGTTGAG
<i>TGFBR1</i>	rs10819635	GTCTGGGATTCTACAGTGAATTTTGTGTC	TTCACCACTTGAAGTCAGTCTTGATTG	TGATCTGCTTTCCCAAAGAAAA
<i>TGFBR1</i>	rs11466445	CCACAGGCGGTGGCGGCGGGACCAT	FAM-CCCGCGCCATGTTTGGAGAAAGAGCA	
<i>TGFBR1</i>	rs6478974	CTTGGCTGGAGAGGATGGCATGTG	TCCCTCTGCGGCACAATTAGACATTC	(CTGA) ₇ CTTATGGGCCTTGAAAATCAGG
<i>TGFBR1</i>	rs10988716	CGGAAGGAGGTGTCTTCGTTTACG	TTCACCACTTGAAGTCAGTCTTGATTG	(ACTG) ₉ ACTTAAAAGGTTGGGGGGGGC
<i>TGFBR1</i>	rs11568785	TGTGGGATTTAGATGCCAGTATATCTC	GGAGCAGTTGTTGCCTAGGGCTAAG	(TGAC) ₆ TAGTTGTCCACTTGCAACCCA
<i>SMAD3</i>	rs11632964	GAGGAGAACCCATGAGAGGTGGAAAAC	CCAAGTCACTAGCTGTTTCACTGCCAGTTAC	TACCAAAAAGTTCCCAACATCATACT
<i>SMAD3</i>	rs6494629	GCATCAGAAGGTCTCAGGAGCCTTAC	AGGCTTCTGAGGGTCCATTATTTCTGTC	CTGACTGACTACAAGATACCAGGAGGCTCCC
<i>SMAD3</i>	rs11856909	GGCCCCTGGCTTCCCTCTTCTATAAAC	GCCACATACCGGAATCACCTAGGAAAAG	(CTGA) ₆ CTCCCCTGGAGACCAGTGAATTTTC
<i>SMAD3</i>	rs2118613	ATCTCTGGGTCACTGGTTTTCTCAACATC	TGGAGTTGGCTAAGGCCTCTAACTTAGTTTC	(ACTG) ₅ ACTCCCCTTTGTACTGTGAGTTTCTGA
<i>SMAD3</i>	rs17293408	CAGCAGTAGTCCCCAGGATGAGACAG	GGGTGGACTCAAGGTATCGGACTTTC	(TGAC) ₆ TATCGGACTTTCCAGGTAATGAAAA
<i>SMAD3</i>	rs4776344	AGGCTCAGACAAGGCATTTGCTGAC	CCATCCCTCGAACCTCAGAGTACTTC	(GACT) ₅ GGGACCACAGACATAGCCATC
<i>SMAD3</i>	rs3743343	GGCAACTTTTCAAAAACACAGCTATCA	ACTACACCCTCCACCAACATTCAGAAC	(ACTG) ₄ CAACTTTTCAAAAACACAGCTATCA
<i>SMAD7</i>	rs4939827	GAACCCTGTTTTAGGGATGAGCTGAAC	GAGACGCGTAAAACCTTGCTGAGATATCTG	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA
<i>SMAD7</i>	rs12953717	GAACCCTGTTTTAGGGATGAGCTGAAC	CAGCCTCATCCAAAAGAGGAAA	ACACCAACCTCGCATGCAG
<i>SMAD7</i>	rs6507876	GCAGTTACCAGGGTGTTCCTTTTTCAC	AAGTCCCGACTTTGCAAGATGAAAATTG	(TGAC) ₇ TGAAGCCCCACCAGGAAGA
<i>SMAD7</i>	rs4464148	GCAGTTACCAGGGTGTTCCTTTTTCAC	AAGTCCCGACTTTGCAAGATGAAAATTG	(GACT) ₃ GGGAACAGACAGAGAAGGATGAA
<i>SMAD7</i>	rs1873191	GCACTGCCAACAGTAGGAGCTGTAATTG	CTTTTCGCATCCTCAGGAACAACAATG	AGCGGGCAGGTTTTCTCCTC
<i>SMAD4</i>	rs10502913	CCTATCCCTTCTCCTGCCATTTAAGGAC	TGAGGGAGCATGGAAAGTTCATAGGTAAC	(GACT) ₄ AGACTAGCCAATCCTGACTGATAC
<i>SMAD4</i>	rs3764465	GCATGGGGTTTATGAGTTGAGACAGACA	GCCACTGTTGTAGTTTTGAGCCTCTTCAG	GCATGGGGTTTATGAGTTGAGACAGACA
<i>SMAD4</i>	rs17663887	GCCACCAAAACATTGGGTAATTGTTGTC	GGTGAAACCGCTCTCTACGAAAAATAG	(TGAC) ₃ TAACCAGTGTACCTATCAGTTGTTTGC

3 Methoden

3.1 Zellgewinnung und Zellkultur

3.1.1 T-Lymphozyten

Um den Einfluss von genetischen Varianten auf funktionelle Parameter zu testen, ist eine ausreichende Fallzahl nötig. Diese hängt sowohl von der Effektstärke als auch von der Häufigkeit einer Genvariante ab. Um einen Effektunterschied von ca. 30% bei einer Variante mit mindestens 25% Allelfrequenz statistisch nachweisen zu können, mussten für die Probandenstudie mindestens 100 Personen rekrutiert werden. Die Kriterien hierfür waren klar vorgegeben. Es sollten Nichtraucher im Alter von 18-55 Jahren sein und einen kaukasischen Ursprung haben. Die Probanden sollen zum Zeitpunkt der Blutspende körperlich gesund sein. Zusätzlich wurde ein Differentialblutbild angefertigt. Bei krankhaften Befunden wurden die entsprechenden Proben von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Außerdem durften keine Medikamente mit Ausnahme von Antiallergika und Kontrazeptiva eingenommen werden.

Die Blutentnahme erfolgte in der klinischen Pharmakologie der Universität Göttingen. Den Probanden wurde nach gründlicher Desinfektion 6x9 ml Blut in Heparin-Röhrchen abgenommen, sowie 3x2,7 ml in EDTA-Röhrchen. Ein Röhrchen des EDTA-Bluts wurde zum Differentialblutbild in die klinische Chemie gegeben und die restlichen 2 EDTA-Röhrchen wurden bei -20°C für eine spätere DNA-Isolierung eingefroren. Das heparinisierte Blut wurde, nachdem es auf Raumtemperatur abgekühlt war, nach 15-30 min weiterverarbeitet.

Die benötigten T-Lymphozyten wurden über ein mehrschrittiges Verfahren aus heparinisiertem Vollblut isoliert. Zunächst wurden PBMCs mittels des Dichtegradientenmediums Ficoll-Paque Plus nach Angaben des Herstellers gewonnen. Dazu wurden in zwei 50-ml-Falcon-Röhrchen je 22,5 ml RPMI mit 22,5 ml Blut vermischt. Nun wurde von diesen Mischungen jeweils 15 ml in ein schon vorher mit 15 ml Ficoll befülltes 50-ml-Falcon gegeben. Die Überschichtung musste langsam und vorsichtig erfolgen, damit keine Vermischung der beiden Lösungen stattfand. Pro Proband ergaben sich sechs solcher Ansätze. Diese wurden nun 30 min (18°C, ohne Bremse, ohne Beschleunigung) zentrifugiert. Die Dichte von Ficoll beträgt 1,077 g/cm³ und ist somit höher als die von Lymphozyten und Monozyten, aber niedriger als die von Erythrozyten und Granulozyten. Nach der Zentrifugation war in den Falcons folgende Auftrennung zu erkennen: Ficoll mit Erythrozyten und Granulozyten als Pellet, danach zwischen Ficoll und Plasma die PBMCs und oben

Plasma und Thrombozyten. Der Ring zwischen Plasma und Ficoll wurde nun mit einer 5-ml-Spitze per Accu-Jet abgesaugt und in zwei beschriftete 50-ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Diese wurden danach mit PBS aufgefüllt und 10 min zentrifugiert (18°C, bei mittlerer Bremse und Beschleunigung). Nach Zentrifugation erkannte man unten ein Pellet. Die beiden 50-ml-Falcons wurden bis zur Verjüngung mit einer Glaspipette abgesaugt. Nun wurden die Inhalte der beiden Falcons vereinigt, indem das eine Pellet mit einer 25-ml-Spitze eines Accu-Jets mit HBSS (enthielt 2% FCS) resuspendiert und in das andere Falcon überführt wurde. Nun war nur noch ein 50-ml-Falcon übrig, welches noch mit HBSS (2% FCS) aufgefüllt wurde. Jetzt folgte wieder eine Zentrifugation für 10 min (18°C, bei mittlerer Bremse und Beschleunigung). Danach wurde der Überstand mit einer Glaspipette bis etwa 0,5 cm vom Boden entfernt abgesaugt und mit 1 ml LM-10% resuspendiert, sodass sich nun eine Zellsuspension von 1,5 ml ergab. Darin wurden nun die T-Lymphozyten mit dem humanen Antikörper gegen CD3 mit APC-Markierung gefärbt und für 20 min auf Eis im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden noch 2 ml LM-2% dazugegeben. Diese Zellsuspension wurde über einen 50-µm-Filter in ein 5 ml-Röhrchen (Firma Sarstedt) überführt. Danach wurde der Filter noch mit 1 ml LM-2% nachgespült, um eventuell hängengebliebene Zellen nicht zu verlieren. In dem 5-ml-Röhrchen befanden sich nun etwa 4,5 ml Zellsuspension. Diese wurde dann 5 min (18°C, mittlere Bremse und Beschleunigung) zentrifugiert und mit einer 1000-µl-Pipette 3,5 ml des Überstands abgenommen. In den verbliebenen 1,5 ml wurde das Pellet nun resuspendiert. Nun wurden die Zellen auf Eis zum Sortieren in die Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Uniklinikums Göttingen gegeben.

Mit einem FACSAria II wurde die Sortierung der im vorigen Abschnitt genannten Zelltypen durchgeführt. Für diese Arbeit waren nur die T-Lymphozyten relevant. Wegen der großen Zahl der benötigten Zellen wurden die Parameter so eingestellt, dass eine möglichst hohe Sortiergeschwindigkeit erzielt wurde (etwa 15.000 Zellen/s). Ziel waren mindestens 13,2 Millionen T-Lymphozyten, welche in zuvor mit 300 µl FCS benetzte 5-ml-Röhrchen sortiert wurden. Dies dauerte etwa 1,5-2 h. Dabei mussten die 5-ml-Auffangröhrchen häufig gewechselt werden. Für die CD3-positiven Zellen wurden pro Sortierung etwa 20 dieser 5-ml-Röhrchen benötigt, welche auf Eis gelagert wurden. Nach Ende der Sortierung wurden diese in 50-ml-Röhrchen vereinigt und 10 min bei 500 g (bei mittlerer Geschwindigkeit und Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die CD3-positiven Zellen mit LM-10% auf 1 Million/ml eingestellt.

3.1.2 Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs)

Die immortalisierten LCL-Zellen lagerten bei -170°C im Stickstofftank. Bei der Arbeit am Stickstofftank musste eine zweite Person zur Sicherheit anwesend sein. Nach Entnahme der Zelllinien wurden diese in einem Wärmebad bei 37°C kurz angetaut. Sobald der Eiskern in den Kryo-Röhrchen durch das Antauen mobil war, wurde dieser sofort in ein zuvor mit 30 ml LM-15% befülltes 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurden die Falcon Röhrchen für 10 min bei 500 g (18°C , mittlere Beschleunigung, mittlere Bremse) abzentrifugiert. Währenddessen wurden kleine Kulturflaschen mit 25cm^2 Oberfläche vorbereitet. Diese wurden mit der Nummer der Zelllinie, der Passagenummer (nach Auftauen mit „1“ bezeichnet) und dem Auftaudatum beschriftet.

Die LCL-Zellen wurden nun bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und im Abstand von 3-4 Tagen mikroskopiert, um Zelldichte und Qualität des Mediums zu überprüfen. Bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte bzw. bei einer beginnenden Gelbfärbung des im Medium enthaltenen Phenolrots wurden die Zellen passagiert und das Medium ersetzt. Nach dem ersten Passagieren wurden die Zellen in 75-cm^2 -Flaschen kultiviert. War eine Zellzahl von mindestens 22,8 Millionen erreicht, konnten sie für die Versuche verwendet werden.

Eine genaue Bestimmung der Zellzahl erfolgte kurz bevor eine Zelllinie für die Versuchsreihe eingesetzt wurde. Um eine homogene Zellsuspension zu erreichen, wurden die 75-cm^2 -Kulturflaschen mehrere Male geklopft und dann mit einer 10-ml-Pipette mit dem AccuJet resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Jetzt wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß $20\ \mu\text{l}$ Trypanblau gegeben und $20\ \mu\text{l}$ der Zellen aus dem Falcon-Röhrchen dazugegeben. Dieser Ansatz wurde gut durchmischt und mit einer auf $15\ \mu\text{l}$ eingestellten Pipette eine Neubauer-Zählkammer vorsichtig befüllt. Dabei war darauf zu achten, dass bei der Vorbereitung der Zählkammer und dem Auflegen des Deckglases Newtonsche Ringe zu sehen waren. Nun mussten vier Großquadrate ausgezählt werden, aus denen der Mittelwert berechnet wurde. Der Mittelwert pro Großquadrat wurde nun mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Zellzahl in einem μL zu berechnen. Eine Multiplikation mit dem Faktor 1000 ergibt die entsprechende Zahl in einem mL. Um die Gesamtzahl der Zellen zu erhalten, musste noch mit Faktor 2 (wegen der Verdünnung in Trypanblau) sowie mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension (in ml) multipliziert werden.

3.1.3 Fibroblasten

Fibroblasten wurden aus gesunder Haut durch Auswuchstechnik angezüchtet. Die Hautstücke stammten von den Abteilungen für Dermatologie bzw. Allgemeinchirurgie der Universität

Göttingen. Die Spender, welche ihr schriftliches Einverständnis erklärt hatten, sollten nicht älter als 18-60 Jahre sein und durften keine chronisch infektiösen bzw. autoimmunologischen Erkrankungen haben. Das für die Fibroblasten-Anzucht verwendete Hautstückchen, für welches eine Größe von wenigen Quadratmillimetern genügte, durfte keine pathologischen Veränderungen aufweisen und musste insbesondere auch Tumor-frei sein. Die nach Entnahme in physiologische Kochsalzlösung eingelegten Hautstücke wurden nun unter sterilen Bedingungen zur weiteren Kultivierung vorbereitet. Dazu wurde zuerst das subdermale Fettgewebe in sterilen Petrischalen entfernt. Dann wurde das Hautpräparat mit Einmal-Skalpellen in kleine Stückchen mit wenigen Millimetern Kantenlänge geschnitten und mit der Epidermis nach oben auf den Boden einer 115-cm²-Zellkulturflasche mit herausnehmbarem Deckel gesetzt. Dort ließ man sie 3-5 min antrocknen, um sie dann mit 15 ml FM-primär vorsichtig zu umspülen. Das Antrocknen der Hautstückchen war von Bedeutung, weil sie nicht im Medium schwimmen durften. Nun wurden die Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dabei war es wichtig, jede Woche das Medium zu wechseln. Hier konnte auch gleich unter dem Mikroskop kontrolliert werden, ob Fibroblasten ausgewachsen waren. War dies der Fall, wurden die Hautstückchen entfernt, indem um diese mit einem sterilen Skalpell herum geschnitten wurde, um die vorhandenen Fibroblastenaussprossungen nicht mit zu entfernen. Dann wurde das Medium abgesaugt und durch 30 ml neues FM-primär ersetzt und weiter im Brutschrank inkubiert. Bei einem dichten Bewuchs der Zellkulturflaschen konnten die Zellen passagiert werden. Dabei wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturflasche dann mit 10 ml PBS gewaschen und dieses ebenfalls mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt. Dann wurden 3 ml Trypsin-Lösung (Tryple-Express) dazugegeben und die Flasche für 3 min in den Brutschrank gestellt. Danach wurde die Flasche aus dem Brutschrank genommen und die Fibroblasten durch Klopfen gelöst. Nach dem Klopfen war eine Kontrolle unter dem Mikroskop notwendig, damit sichergestellt war, dass sich auch alle Zellen gelöst hatten. Nun wurde die Zellsuspension zügig in ein 50-ml-Röhrchen überführt, in welches zuvor das doppelte Volumen FM des zuvor verwendeten Trypsins vorgelegt worden war, um das Trypsin zu inaktivieren. Das 50-ml-Röhrchen wurde nun zentrifugiert (10 min, 500 g, Raumtemperatur) und der Inhalt abgekippt. Die Zellen wurden in 1 ml FM resuspendiert und ausgezählt. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. War das Ergebnis kleiner als 200.000 Zellen pro Milliliter, so wurden die Fibroblasten in eine 25-cm²-Zellkulturflasche überführt. Waren es mehr als 200.000 Zellen, so wurden sie in 75-cm²-Flaschen weiter kultiviert, je nach Größe der Kulturflasche in 5 bzw. 20 ml. Nun wurden die Flaschen zurück in den Brutschrank gelegt

und bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert. Alle 5-10 Tage wurden die Flaschen unter dem Mikroskop kontrolliert, das Medium gewechselt und bei entsprechender Zellzahl gesplittet. Dabei wurde je nach Zellzahl in verschiedenen Verhältnissen gesplittet, zwischen 1:1 und 1:8.

3.2 Behandlung der Zellen

3.2.1 T-Lymphozyten

Diese auf eine Million/ml in LM-10% eingestellten T-Lymphozyten wurden auf eine 12-Well-Platte überführt, wobei zunächst nur die beiden zu bestrahlenden Wells mit jeweils 900 µl befüllt wurden. Die Platten wurden dann mit insgesamt 2 Gy und einer Dosisleistung von 1 Gy/min bestrahlt (Bestrahlungsgerät Stabilipan der Firma Siemens, Erlangen). Diese Strahlendosis wurde auf Basis früherer Ergebnisse der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität Göttingen gewählt und entspricht in etwa derjenigen, welche die Patienten pro Behandlungstag erhalten. Dann wurden die übrigen Wells ebenfalls mit 900 µl Zellsuspension befüllt und mit Zytokinen behandelt, wobei jeder Ansatz in Duplikaten angelegt wurde. Die humanen rekombinanten Zytokine TGFβ1 und anti-TGFβ1 wurden dabei in einer Endkonzentration von 5 ng/ml von TGFβ1 und 250 ng/ml anti-TGFβ1 eingesetzt. Aus kleinen Aliquots einer Stocklösung mit jeweils 10 µg/ml wurden nach einmaligem Auftauen Vorverdünnungen mit 200 ng/ml in LM-10% hergestellt und daraus dann jeweils 22,5 µl zu den 900 µl Zellsuspension gegeben. Eine Ansatz (ebenfalls doppelt) wurde als unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

Die Ansätze inkubierten nun für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Primärer funktioneller Endpunkt waren Änderungen der Expression von Genen des TGFβ-Signalwegs unter den durchgeführten Behandlungen. Dazu wurde nach 24 h RNA gewonnen, wobei die Doppeltansätze hierfür vereinigt wurden. Bis zur Isolierung der RNA-Proben wurden diese bei -80°C gelagert. Als sekundärer funktioneller Parameter interessierten noch mögliche Auswirkungen auf die Zellvitalität, wenngleich nennenswerte Effekte hier nur bei der Bestrahlung erwartet wurden. Für diese Messungen wurde jeder der Doppeltansätze der 12-Well-Platte in Duplikaten (d.h. insgesamt vier Replikate pro Bedingung) gemessen. Dies geschah mittels fluorometrischer Messung des Substratumsatzes von AlamarBlue[®], mit welchem die Proben für weitere 4 bzw. 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden.

3.2.2 Lymphoblastoide Zelllinien

Nach ausreichender Vermehrung einer LCL-Kultur wurden die Zellen in einem 50-ml-Röhrchen für 7 min bei 500g (18°C, mittlere Beschleunigung, mittlere Bremse) zentrifugiert.

Dann wurde das Medium abgekippt und die LCLs in LM-15% resuspendiert und dabei auf 1 Million/ml eingestellt. Davon wurden je 3,9 ml auf eine beschriftete 6-Well-Platte zu einer Vorinkubation über 16 h gegeben. In eins der sechs Wells wurde humanes rekombinantes, aktives TGF β 1-Protein in einer Zielkonzentration von 5 ng/ml gegeben. Dazu wurde aus Aliquots der 10 μ g/ml-Stocklösung zunächst eine Vorverdünnung mit 500 ng/ml in LM-15% hergestellt und aus dieser dann 39 μ l auf die 6-Well-Platte pipettiert. Nach 16 h wurden am nächsten Tag vier unbehandelte Ansätze aus der 6-Well-Platte in Duplikate auf eine 12-Well-Platte mit je 1500 μ l verteilt. Die restlichen 2 Wells der 6-Well-Platte, also ein unbehandeltes Well und eines mit TGF β 1 vorbehandelt, wurden dann mit 3 Gy bestrahlt (Xstrahl RS225). Auf Grund von Voruntersuchungen in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität Göttingen wurden die LCLs mit 3 Gy und nicht wie die T-Lymphozyten mit 2 Gy bestrahlt. Davon wurden dann je 1500 μ l der bestrahlten Kontrolle und der bestrahlten TGF β 1-Probe auf die 12-Well-Platte überführt. Somit befanden sich nun je 1500 μ l Zellsuspension in zwei Parallelansätzen für die unterschiedlichen Behandlungen auf der 12-Well-Platte, die unbehandelte Kontrolle sogar vierfach. Dann wurde die Platte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 4h inkubiert.

Wegen der potenziellen Gefährdung von Zytokinen durch wiederholtes Auftauen wurden aus den Stocklösungen (je 10 μ g/ml Zytokin in LM-10%) kleine Aliquots (20-40 μ l) angefertigt und bei -20°C gelagert. Jedes dieser Aliquots wurde nur einmal aufgetaut und dann für bis zu 2 Wochen bei Kühlschrank-Lagerung (4°C) verwendet. Die daraus hergestellten Verdünnungen mit 500 ng/ml in LM-15% wurden nur bis zu einer Woche verwendet und ebenfalls bei 4°C aufbewahrt.

3.2.3 Fibroblasten

Für die Versuchsreihe wurden die Fibroblasten in 6-Well-Platten zu je 100.000/ml ausgebracht. Dann wurden sie für eine Woche im Brutschrank kultiviert, um eine gleichmäßige Bewachung der Wells sicher zu stellen. Dies wurde am Ende der Woche mit dem Mikroskop kontrolliert. Dann wurde das alte Medium durch frisches ersetzt und die Zellen mit 2 bzw. 8 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universität Göttingen (Bestrahlungsgerät Stabilipan der Firma Siemens, Erlangen). Die so behandelten Fibroblasten wurden dann für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert und dann aus diesen Proben RNA asserviert und bei -80°C eingefroren.

3.3 Zellvitalitäts-Messungen

3.3.1 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) zur Bestimmung des Anteils noch intakter Zellen wurden mit den behandelten LCLs durchgeführt. Diese erfolgten nach 30-stündiger Inkubation, gerechnet vom Zeitpunkt der Bestrahlung an. Dazu wurden – nach gründlichem Mischen – von der 12-Well-Platte je 100 µl der Zellsuspension in ein vorher beschriftetes FACS-Röhrchen überführt. Das FACS-Röhrchen wurde nun mit PBS bis 1 cm unter den Rand befüllt und bei 500g für 5 min (18°C, mittlere Beschleunigung, mittlere Bremse) zentrifugiert. Währenddessen wurde die FACS-Mischung vorbereitet. Dazu wurden in ein 50-ml-Röhrchen 9,1 ml PBS vorgelegt. Dazu kamen 3,9 ml klares RPMI-Medium mit 15% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Weiterhin wurde 2,6 µl DCFH und 5,2 µl Propidiumjodid dazugegeben und die Mischung bei 1400 rpm für 3 s gevortext. Nach Zentrifugation der mit PBS befüllten FACS-Röhrchen wurden diese abgekippt und der letzte Tropfen in den FACS-Röhrchen belassen. Jetzt wurde jede FACS-Probe mit 1000 µl der FACS-Mischung beschickt und kurz bei 1000 rpm für 3 s gevortext. Danach kamen die FACS-Röhrchen für die Dauer von einer Stunde zur Inkubation in den Brutschrank bei 37°C. Dann erfolgte die FACS-Messung (FACScan).

Mit der Fluoreszenz-aktivierten Zellanalyse (FACS-Analyse) können bestimmte Eigenschaften von Zellen über Fluoreszenz-Detektion gemessen werden. Von Interesse in dieser Arbeit war die Zellvitalität, die sich z.B. mit Annexin (als Apoptose-Marker) oder mit Propidiumiodid (als Nekrose-Marker) bestimmen lässt. Bei normalen Leukozyten lässt sich typischerweise eine Sequenz von Apoptose in Nekrose beobachten. Die LCLs hingegen färben sich unabhängig von der zeitlichen Sequenz in gleicher Weise mit Annexin und Propidiumiodid an, so dass die Messung eines der beiden Parameter hier genügte. Dessen Anregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 488 nm, das Emissionsspektrum erstreckt sich über eine relativ weite Spanne zwischen 575 und 620 nm. Dies stellte aber für die hier durchgeführten Messungen kein Problem dar, da in diesem Bereich keine andere, interferierende Substanz gemessen wurde.

3.3.2 AlamarBlue®

Die Vitalitätsmessung der sortierten T-Lymphozyten in der Probandenstudie erfolgte mit dem AlamarBlue®-Assay in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten. Das Prinzip beruht auf einer Reduktion von Resazurin zu dem fluoreszierenden Resofurin, die umso höher ist, je vitaler die

Zellen sind. Das reduzierte Resofurin hat ein Maximum der Exzitation bei 485 nm und der Emission bei 612 nm.

Zur Messung wurde die 12-Well-Platte, welche 24 h zuvor mit Zytokinen behandelt wurde, 5 s bei 1000 rpm gevortext und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Auf einer sterilen schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte mit klarem Boden wurde in 4 Reihen 60 μ l LM-10% mit einer Multipipette in jedes Well vorgelegt. Nun wurden in Doppelbestimmung jeweils 40 μ l von der 12-Well-Platte auf die schwarze Platte überführt, d.h. pro Behandlung wurde eine 4-fach-Bestimmung durchgeführt (da auf der 12-Well-Platte jede Bedingung zweimal vorhanden war). Dazu kamen dann 10 μ l der gebrauchsfertigen AlamarBlue[®]-Lösung. Anschließend wurde die schwarze Platte kurz bei 600 rpm gevortext und bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz-Messung wurde nach einer Inkubationszeit von 4 und 24 h durchgeführt. Zur Auswertung wurde aus den vier Messwerten jeder Behandlung zuerst der Median berechnet. Davon wurde dann der Messhintergrund, welcher nur aus Medium und AlamarBlue[®] bestand, subtrahiert. Danach wurden die Werte für die fünf unterschiedlichen Behandlungen (2 Gy, IL10, IL1 β , TGF β 1, anti-TGF β 1) auf die Kontrolle bezogen und so die prozentuale Veränderung ermittelt.

3.4 RNA-Methoden

3.4.1 Asservierung von RNA

Die Entnahme der RNA erfolgte bei den LCLs nach einer Inkubation von 4 und 24 h, bei den T-Lymphozyten aus der Probandenstudie nach 24 h. Dabei wurden die jeweiligen Doppeltansätze aus den 12-Well-Platten in 5 ml-Röhrchen vereinigt. Bei den LCLs waren dies entsprechend den Behandlungen vier unterschiedliche Ansätze mit je 800.000 Zellen (Kontrolle, 5 ng/ml TGF β 1, 3 Gy und 5 ng/ml TGF β 1+3 Gy), bei den T-Lymphozyten pro Ansatz etwa 1.400.000 Zellen: Kontrolle, 2 Gy, 5 ng/ml TGF β 1, 250 ng/ml eines TGF β 1 neutralisierenden Antikörpers (kurz „anti-TGF β 1“ genannt). Die 5 ml-Röhrchen mit den Zellsuspensionen wurden bis 1 cm unter den Rand mit PBS befüllt und bei 500g für 5 min (18°C, mittlere Beschleunigung, mittlere Bremse) zentrifugiert. Dann wurden die Röhrchen abgekippt und der letzte Tropfen mit einer 1000- μ l-Pipette abgenommen und verworfen. Den Zellen wurde dann 350 μ l Mercaptoethanol hinzugefügt. Dann erfolgte eine kurze Inkubation von 2 min. Dann wurde mit einer 1000- μ l-Pipette die Zellsuspension solange resuspendiert, bis keine Schleimfäden mehr sichtbar waren. Dann wurde das Lysat in schon vorher

beschriftete 2 ml-Reaktionsgefäße gefüllt und für weitere 10-15 min inkubiert. Jetzt wurden die gewonnenen Proben bei -80°C bis zur RNA-Isolierung eingefroren.

3.4.2 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Die oben genannten RNA-Proben, welche bei -80°C lagerten, wurden nun auf Eis langsam aufgetaut. RNA ist sehr empfindlich gegenüber diese abbauenden RNasen. Deshalb müssen beim Arbeiten mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Zuerst wurden mit Anti-RNase-Spray (RNase-Zap) die Arbeitsflächen und –geräte eingesprüht. Zur Isolierung wurde das RNase mini-Plus-Kit von Qiagen benutzt. Die Isolierung erfolgte mit einem Roboter (BioRobot[®] EZ1) nach Protokoll des Herstellers. Nach Ende der Prozedur wurden die Proben sofort wieder auf Eis gelagert.

Die gewonnene RNA wurde mit Hilfe des Biophotometers 6313 quantifiziert. Das Gerät wurde mit einer für den Mikroliter-Bereich geeigneten Messzelle aufgerüstet (LabelGuard[™], wobei hier der das Messsignal um den Faktor 10 verstärkende Deckel und ein Probenvolumen von je $3\ \mu\text{l}$ verwendet wurde). Als Messhintergrund wurde die Absorption von ddH_2O bestimmt. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, worüber die Konzentration der RNA-Proben ermittelt wurde (noch korrigiert mit derjenigen bei 320 nm). Zusätzlich wurde bei 280 nm die Konzentration von Proteinen bestimmt. Der Quotient der optischen Dichte bei 260 nm/280 nm gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der RNA. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,3 liegen, was grundsätzlich der Fall war. Nach jeder Messung wurde die Küvetten-Oberfläche mit einem Fussel-freien Papiertuch gereinigt. Die Effizienz des Reinigens wurde photometrisch kontrolliert, bevor eine erneute Messung stattfinden konnte.

3.4.3 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription der isolierten RNA erfolgte mittels SuperScript[™]-II-Reverse-Transkriptase. Dieses stellt aus der vorhandenen RNA komplementäre cDNA her. Die Vorgehensweise war im Einzelnen wie folgt: Zunächst wurden 0,1 unit dN6 Random Primer in eine RNase-freie 96-Well-Platte vorgelegt. Diese bestehen aus sechs Nukleotiden aller möglichen Kombinationen der vier Basen, um möglichst alle RNA-Moleküle zu erfassen und umzuschreiben. Dann wurde isolierte RNA dazugegeben. Bei den Proben der LCL-Studie wurde hierfür jeweils $1\ \mu\text{g}$ Gesamt-RNA eingesetzt, bei den Proben der T-Lymphozyten aus der Probandenstudie wegen der geringen Ausbeute an RNA die gesamte Menge ohne vorherige Quantifizierung. Die Platten wurden spaltenweise mit Streifen (Flat 8 Cap Strips)

verschlossen. Die Gesamtvolumina dieser Ansätze betragen 18,5 μl bei den Proben der LCL-Studie (1 μl dN6, RNA und ddH₂O zusammen 17,5 μl) und 37 μl bei den Proben der T-Lymphozyten (35 μl RNA und 2 μl dN6). Nach kurzer Zentrifugation wurde die Mischung in einem Thermocycler bei einer Temperatur von 72°C für 10 min inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Sofort danach wurde die Platte auf Eis gebracht, um eine Renaturierung zu verhindern. An dieser Stelle findet auch die Anlagerung der Primer statt. Währenddessen wurde der Mastermix für die reverse Transkription entsprechend Tab. 1 vorbereitet. Die mittlerweile abgekühlten Proben wurden nun kurz abzentrifugiert und mit 11,5 μl (bei den LCL-Proben) bzw. 13,5 μl (bei den Lymphozyten-Proben) versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden diese Ansätze nun für 10 min bei 25°C und dann für die eigentliche Enzymreaktion eine Stunde lang bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Daran schloss sich noch eine Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase bei 75°C für 15 min an.

Die LCL-Proben wurden nun zunächst mit ddH₂O auf 10 ng/ μl cDNA (geschätzt aus der Menge der initial eingesetzten RNA) eingestellt und dann auf 96-Well-PCR-Platten zu 2 ng/ μl in TE-Puffer gebracht. Aus diesen Mutterplatten erfolgten dann die späteren *Real time*-Expressionsmessungen. Die Proben der T-Lymphozyten wurden nach der reversen Transkription direkt mit 200 μl TE-Puffer auf 96-Well-PCR-Platten versetzt, so dass eine cDNA-Konzentration von etwa 2 ng/ μl vorlag.

Mastermix für cDNA-Synthese	Menge bei LCLs	Menge bei T-Lymphozyten
5x RT Puffer	6,00 μl	9,00 μl
0,1 M DTT	2,50 μl	2,50 μl
10 mM dNTPs	1,00 μl	1,50 μl
RNase-Inhibitor (40 U/ μl)	0,50 μl	0,50 μl
Reverse Transkriptase (200 U/ μl)	0,25 μl	0,30 μl
Gesamt	11,75 μl	13,80 μl

Tab. 1 Reaktions-Mastermix für cDNA-Synthese

3.4.4 Referenzgene

Die Effizienz der reversen Transkription kann sehr variabel sein. Um dies zu kontrollieren, ist die Messung des Expressionszustands von Referenzgenen erforderlich. Wegen der geringen RNA-Ausbeute bei den T-Lymphozyten wurde das gesamte RNA-Isolat zur reversen Transkription eingesetzt und auf eine Quantifizierung verzichtet. Die Normierung erfolgte hier zum einen durch eine konstante Zellzahl für die RNA-Gewinnung, insbesondere aber

durch die Referenzgene bei der Expressionsmessung. Als Referenzgene wurden im Rahmen dieser Arbeit *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *UBC* und *YWHAZ* verwendet, welche als solche auch in der Literatur gefunden werden. Für die vorliegende Arbeit wurde darauf geachtet, dass sie das gesamte Spektrum der Expressionsstärke der Zielgene abbilden. Für die Auswertung wurde aus diesen fünf Referenzgenen ein gewichtetes Mittel errechnet, auf welches dann jedes der Zielgene bezogen wurde.

Idealerweise sollten die Referenzgene unter den durchgeführten Behandlungen keine Veränderung ihrer Expressionsstärke zeigen (daher auch *Housekeeping*-Gene genannt). Bei massiv zytotoxischen Behandlungen wie z.B. Bestrahlung gibt es aber keine derartigen Gene. Dennoch ist auch hier der Bezug auf Referenzgene sinnvoll, um beurteilen zu können, wie stark die Veränderung eines Zielgens (zumeist Herunterregulation in Folge des Zelluntergangs) in Relation zu den Referenzgenen ist.

3.4.5 Quantitative *Real time*-PCR (qRT-PCR)

Bei der *Real time*-PCR wird zeitgleich zur ablaufenden PCR die quantitative Zunahme der Amplifikate gemessen. Bei der in dieser Arbeit ausschließlich durchgeführten zweischrittigen Reaktion, d.h. der zeitlichen Trennung von reverser Transkription und qRT-PCR, wurde als Matrize immer der gesamte cDNA-Pool eingesetzt. Die jeweilige Spezifität für ein bestimmtes Gen wird durch ein spezifisches Primerpaar erreicht. Diese Messungen wurden grundsätzlich in Doppelbestimmung auf einer 384er-Thermo-Fast-Platte in einem Gesamtvolumen von 10 μl – bestehend aus 7 μl Reaktionsmix und 3 μl cDNA – durchgeführt. Um eine eventuelle Kontamination auszuschließen, wurde der Reaktionsmix in einem DNA-freien Arbeitsbereich hergestellt. Dieser setzte sich aus 5 μl HotStart-IT[®] SYBR[®] Green-Mastermix, 0,2 μl einer 10 μM Mischung aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer für das zu messende Gentranskript sowie 1,8 μl DNase-freiem H₂O zusammen. Nach Wechsel des Arbeitsplatzes kamen pro Reaktion 3 μl cDNA aus den Mutterplatten (Konzentration etwa 2 ng/ μl) hinzu. Die Platte wurde mit einer optisch klaren Folie verschlossen. Hierbei war auf einen festen Verschluss der Folie zu achten, da es sonst zu einem Abheben der Folie während der Erhitzung der Platte und nachfolgend zu einem Verdampfen der Probe kommen kann. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Platte dann in einem TaqMan 7900 HT-Gerät gemessen. Die Standardbedingungen für die Geräteeinstellung sind Tab. 2 zu entnehmen.

Gen	Initiale Aktivierung	PCR-Programm				Schmelzpunktkurve mit eindeutigem Peak?
		Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklenzahl	
Zielgene						
<i>CDKN1A</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	64°C, 20 s	72°C, 40 s	40	ja
<i>SMAD2</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	ja
<i>SMAD3</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	ja
<i>SMAD4</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	ja
<i>SMAD7</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	ja
<i>TGFBR1</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	65°C, 30 s	72°C, 1 min	40	ja
Referenzgene						
<i>GAPDH</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 30 s	72°C, 1 min	40	ja
<i>HPRT1</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 40 s	40	ja
<i>SDHA</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 30 s	72°C, 1 min	40	ja
<i>UBC</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	60°C, 20 s	72°C, 40 s	45	ja
<i>YWHAZ</i>	95°C, 2 min	95°C, 15 s	65°C, 20 s	72°C, 30 s	40	ja

Tab. 2 Bedingungen für die qRT-PCR.

Das Prinzip der für diese Arbeit verwendeten Messung mit SYBR[®] Green beruht darauf, dass dieses nach Laser-Anregung praktisch nur dann Licht emittiert, wenn es in DNA-Doppelstränge eingelagert ist. Dieses Fluoreszenzsignal wird in der Elongationsphase der PCR gemessen. Im optimalen Fall wird der zu amplifizierende cDNA-Abschnitt pro Zyklus verdoppelt. Über eine Eichgerade wurde die Effizienz einer qRT-PCR-Reaktion ermittelt, diese sollte mindestens 90% betragen. Die Auswertung erfolgt in einem Bereich, in dem die Signalintensität proportional zur Menge der gebildeten DNA-Moleküle ist. Dabei wird ein Grenzwert für dieses Signal festgelegt und für jede Probe wird ermittelt, bei welcher Zyklenzahl dieses erreicht wurde (der so genannte *cycle threshold* oder kurz Ct-Wert). Über diesen Ct-Wert lassen sich alle auf einer Platte gemessenen Proben hinsichtlich der mRNA-Expression eines bestimmten Gens vergleichen. Die Auswertung erfolgte mit der gerätespezifischen Software SDS 2.1.

Da sich SYBR[®] Green universal und damit unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert, besteht grundsätzlich das Risiko, dass die gemessene Signalintensität nicht nur durch das erwünschte Fragment, sondern auch noch durch unspezifische Nebenprodukte der PCR-Reaktion bedingt sein könnte. Daher wurde am Ende einer jeden qRT-PCR der Schmelzpunkt T_m für das gebildete Produkt bestimmt. T_m ist die Temperatur, bei der DNA-Doppelstränge bei langsam ansteigender Temperatur von 60 auf 95°C zur Hälfte „geschmolzen“ sind, d.h. 50% der Moleküle als Einzelstrang vorliegen und entsprechend viel SYBR[®] Green wieder freigesetzt und damit nicht fluoreszierend ist. Ergab die 1. Ableitung der Schmelzpunktkurve einen eindeutigen Peak, war dies ein deutlicher Hinweis, dass nur ein spezifisches Fragment vorlag wie in Abb. 2 zu sehen. Eine weitere Kontrolle erfolgte exemplarisch an einem cDNA-Pool aus unterschiedlichen Proben über Agarose-Gelelektrophorese. Auch hier war das Vorliegen einer einzigen Bande gefordert.

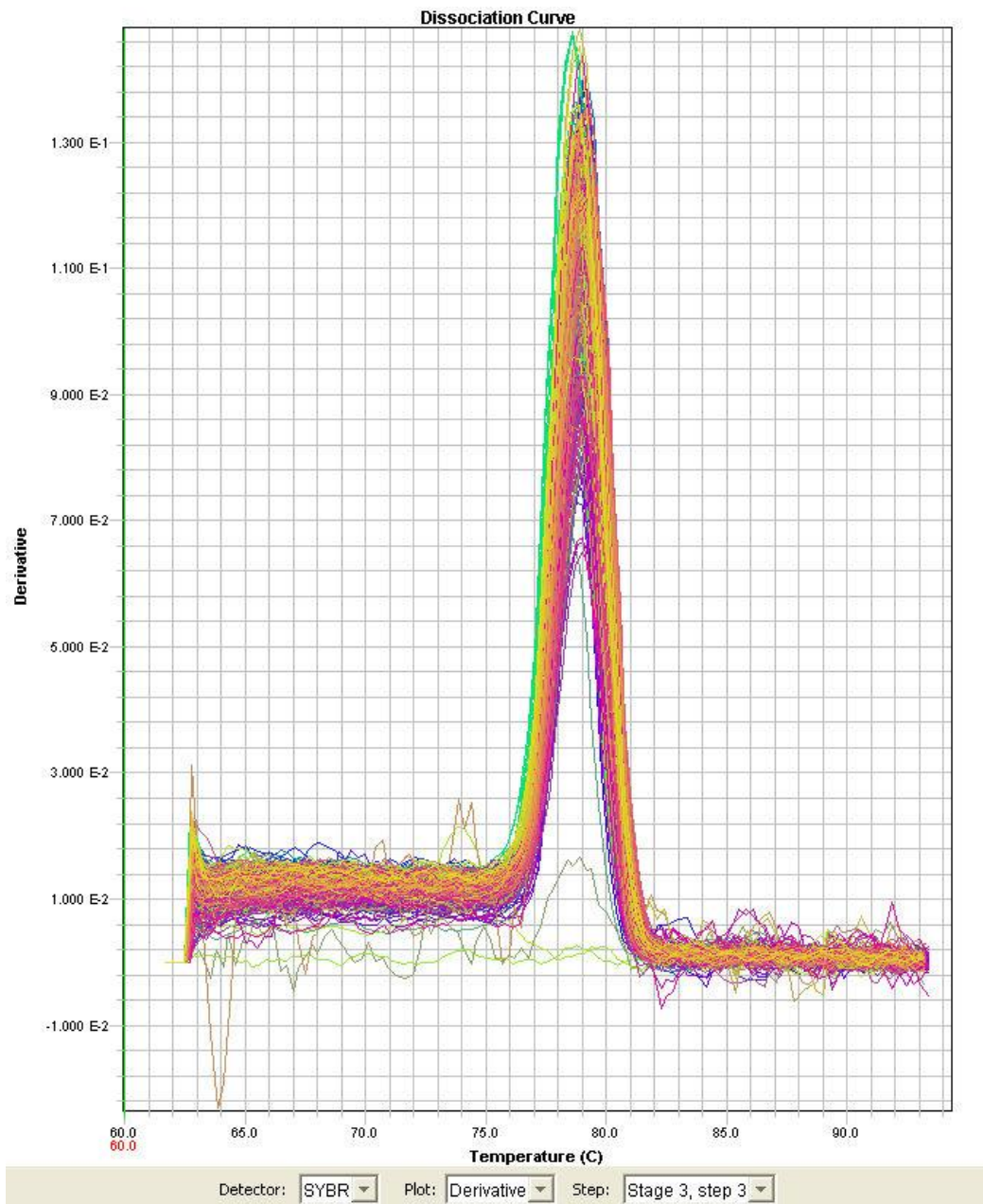


Abb. 2 Schmelzpunktkurve nach *Real time-PCR* von SMAD2. Es ist die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Für die Schmelzpunktkurve wurden die PCR-Produkte zunächst kurz für 15 s bei 95° denaturiert und dann auf 60°C für 15 s abgekühlt. Dann wurde ganz langsam die Temperatur erhöht (mit der minimalen *Ramp rate* des TaqMan-7900HT von 2%). Ein einziger Peak weist auf das Vorliegen von – wie gewünscht – nur einem spezifischen Produkt hin.

3.5 DNA-Analytik

3.5.1 Isolierung und Quantifizierung von genomischer DNA

Jedem Probanden wurden zur Gewinnung von genomischer DNA 2,7 ml EDTA-Gesamtblut abgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung bei -20°C. Unter Verwendung des BioRobot EZ1 und dem Qiagen-Kit für DNA-Blut erfolgte die Aufreinigung der genomischen DNA. Dabei wurden aus 350 µl Vollblut mittels magnetischer Separation

ungefähr 200 μl DNA-Eluat gewonnen. Ähnlich wie bei der RNA erfolgte die Quantifizierung mit dem Biophotometer 6313 (mit den Einstellungen für doppelsträngige DNA) und der Verwendung der oben beschriebenen LabelGuard™-Messküvette. Die Konzentrationen lagen dabei zwischen 40 und 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Auf 96-Well-PCR-Platten wurden dann Verdünnungen von 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ angefertigt.

3.5.2 PCR

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist ein etabliertes Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäure-Fragmenten. Es ist auch möglich, mehrere PCR-Reaktionen zusammen ablaufen zu lassen, man spricht dann von Multiplex-PCR. Bei menschlicher DNA können mit Standard-PCR-Kits Fragmente bis zu 2000 bp gut amplifiziert werden, bei einer Multiplex-PCR sollten die größten Stücke nicht länger als 800 bp sein. In dieser Arbeit wurde eine Einzel-PCR (für Fragmentlängen-Analyse, siehe unten) und eine Multiplex-PCR (für Primerextensions-Analyse, siehe unten) durchgeführt.

Die Zusammensetzung einer PCR besteht aus folgenden Einzelkomponenten: Puffer, dNTPs, einem Primerpaar, einer hitzestabilen DNA-Polymerase (klassischerweise Taq-Polymerase), sowie dem DNA-Template, von welchem die interessierenden Sequenzbereiche vervielfältigt werden sollen. Sind in den zu amplifizierenden DNA-Templates GC-reiche Regionen vorhanden, können optional noch Zusätze wie die Q-Solution der Firma Qiagen hilfreich sein, welche einen positiven Einfluss auf die Schmelzeigenschaften der DNA hat. In unseren Reaktionsmischungen wurden daher während der Etablierung parallele Ansätze mit und ohne Q-Solution pipettiert. Später konnten wir dann anhand einer Gelelektrophorese entscheiden, ob ein Zusatz der Q-Solution sinnvoll ist. Bei dem verwendeten Multiplex-PCR-Kit sind im Mastermix außer den spezifischen Primern, dem DNA-Template und der optionalen Q-Solution bereits alle Komponenten enthalten (siehe Tab. 3). Bei einer Multiplex-PCR können mehrere PCR-Reaktionen simultan ablaufen, was zu einer erheblichen Steigerung der Arbeitseffizienz führt. Besondere Sorgfalt muss dabei auf das Primerdesign verwendet werden. Dabei sollten die Annealing-Temperaturen aller Primer in einem ähnlichen Bereich liegen, oberhalb von 65°C spielen Unterschiede laut Herstellerangaben keine große Rolle mehr. Weiterhin sollten – wenn möglich – extreme Unterschiede im GC-Gehalt der zu amplifizierenden Fragmente vermieden werden. Um schließlich die gebildeten Produkte auf einer Gelelektrophorese unterscheiden zu können, ist beim Design der Multiplex-PCR auf hinreichend große Fragmentlängendifferenzen zu achten.

	Einzel-PCR (pro Reaktion)	Multiplex-PCR (pro Reaktion)
Puffer bzw. Mastermix	1,2 µl PCR-Puffer	6 µl Mastermix
dNTPs (10 mM)	0,24 µl	(in Mastermix)
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	0,06 µl	(in Mastermix)
Q-Solution	2,4 µl	1,2 µl
Primer	0,12 µl (1 µM) vorwärts; 0,24 µl (2 µM) rückwärts mit 5'-FAM-Markierung	1,2 µl aus 10x Primermix
ddH ₂ O (DNAse-frei)	5,74 µl (ergänzend zu 10 µl)	1,6 µl (ergänzend zu 10 µl)
DNA-Template (aus 10 ng/µl)	2 µl	2 µl

Tab. 3 Zusammensetzung der Einzel- und Multiplex-PCR.

Zu Beginn einer PCR-Reaktion im Thermocycler wird die Matrize (z.B. genomische DNA) durch Erhitzen auf 94-96°C denaturiert. In diesem Temperaturbereich werden die Wasserstoffbrückenbindungen, welche den DNA-Doppelstrang zusammenhalten, aufgebrochen und die Stränge lösen sich voneinander. Dann folgen 35 bis 40 repetitive PCR-Zyklen, welche sich aus Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing) und Kettenverlängerung (Elongation) zusammensetzen. Der variabelste Parameter ist dabei die optimale Annealing-Temperatur, welche in der Etablierungsphase des Assays über eine Gradienten-PCR mit fünf unterschiedlichen Temperaturen (58°C, 62,6°C, 64,8°C, 66°C, 69°C) ermittelt wurde. Diese hängt von der Länge und Sequenz der Primer ab. Ziel ist ein kräftiges PCR-Produkt ohne Nebenprodukte. In der Elongationsphase wird das 3'-Ende der Primer durch die verwendete hitzestabile Polymerase entsprechend der Sequenz der DNA-Matrize verlängert. Dabei entsteht ein PCR-Produkt von der Sequenzlänge, welche durch ein Primerpaar begrenzt wird. In jedem Zyklus der PCR wird der gewünschte DNA-Sequenzabschnitt verdoppelt. Am Ende der PCR schließt sich noch eine finale Elongation an, um etwaige unvollständige Produkt zu komplementieren. Das PCR-Ergebnis wurde anschließend über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Nachdem die optimalen Bedingungen, welche Tab. 4 zu entnehmen sind, gefunden wurden, konnte nun die Multiplex-PCR für die gesamte Probenserie gestartet werden.

	Einzel-PCR	Multiplex-PCR
Initiales Erhitzen	10 min bei 95°C	15 min bei 95°C
PCR-Zyklen		
Anzahl	35	40
Denaturierung	95°C, 75 s	94°C, 30 s
Annealing	65°C, 60 s	65°C, 90 s
Elongation	72°C, 60 s	72°C, 90 s
Finale Elongation	72°C, 10 min	72°C, 10 min

Tab. 4 Bedingungen für Einzel- und Multiplex-PCR.

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von RNA- oder DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch ein elektrisches Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode durch das Agarose-Gel, welches als Molekularsieb wirkt. Kleinere Fragmente laufen dabei schneller als größere. Die Auftrennung der Fragmente hängt vom Widerstand der Gelmatrix ab, welche durch die Konzentration der Agarose bedingt wird. In dieser Arbeit lagen die PCR-Fragmentlängen zwischen 80 und 800 bp, für deren Auftrennung sich eine Agarose-Konzentration von 2% eignet. Dazu wurde für die Herstellung eines zweireihigen Gels mit 2x10 Taschen 1 g Agarose in 50 ml TE-Puffer aufgekocht, bis sich keine Schlieren mehr zeigten. Nun wurde das Gel auf 60°C herunter gekühlt und mit 1 µl Ethidiumbromid unter dem Abzug versetzt (5 µl/100ml). Nun wurde die Flüssigkeit bei einer Temperatur von 40-50°C in einen Gelträger gegossen, welches zuvor mit zwei Kämmen (entsprechend den beiden Taschenreihen) bestückt wurde. Nachdem das Gel ausgehärtet war, konnte der Kamm entfernt werden und das Gel in den TBE-Laufpuffer gelegt werden. Nach vollständiger Aushärtung des Gels (dauert etwa 30 min) wurden die 12 µl-Ansätze aus der Multiplex-Gradienten-PCR, versetzt mit 6-fach konzentriertem Ladepuffer, in die Taschen des Gels gegeben. In eine äußere Tasche jeder Reihe wurde ein DNA-Längenstandard von 100 bp pipettiert.

Nun wurde die Elektrophorese gestartet. Die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 100-120 V (je nach Länge der Kammer) aufgetrennt. In Zeitabständen von etwa 15 min (wegen der erheblich variierenden Fragmentlängen der Multiplex-PCR-Produkte) wurde das Gel unter UV-Licht mit dem Fluor-STM MultiImager fotografiert. Die Fluoreszenz von Ethidiumbromid erhöht sich stark nach Interkalation in doppelsträngige DNA. Diese wird

nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht detektiert. Hierbei ist die Intensität proportional zur Länge und Konzentration der DNA.

3.5.4 Genotypisierung mittels Primerextension (SNaPshot™)

Für die Genotypisierung wurden nur Polymorphismen ausgewählt, für welche durch bereits vorliegende Ergebnisse Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung vorlagen. Dies basierte auf den Daten einer vorangegangenen Studie mit humanen Leukozyten (Janke 2009) bzw. der eigenen Studie mit lymphoblastoiden Zellen.

Mit der Primerextensionsmethode lassen sich pro Lauf etwa zehn Polymorphismen simultan bestimmen. Zunächst wird die flankierende Region des interessierenden Polymorphismus durch PCR amplifiziert (hier mit Multiplex-PCR, siehe oben). Mit Restriktionsenzymen wurden dann überschüssige Primer (mit Exo I) und dNTPs (mit SAP) verdaut. Dazu wurde pro 10 µl zu verdauende PCR-Produkte eine Mischung aus 7,5 units Exo I und 3,1 units SAP in RX-Puffer (in SAP-Kit enthalten) hergestellt und auf einer 384-Well-Platte verteilt. Dann wurden mittels 8-Kanal-Pipette die PCR-Produkte hinzugefügt. Anschließend fand eine 3-stündige Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C statt. Nun mussten die Exo I und die SAP in einem Thermocycler bei 80°C für 15 min inaktiviert werden, damit sie in der SNaPshot™-Reaktion keinen Schaden an den ddNTPs und Primern anrichten.

Im nächsten Schritt erfolgte nun die eigentliche SNaPshot™-Reaktion zum Nachweis der polymorphen Stelle. Das Prinzip beruht darauf, dass ein spezifischer Primers direkt vor der zu bestimmenden polymorphen Stelle bindet. Am 3'-Ende des Primers wird nun ein Fluoreszenzfarbstoff-markiertes ddNTP eingebaut. Diesen markierten ddNTPs fehlt am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe, so dass infolge dessen nur ein Nukleotid eingebaut werden kann. Dabei tragen die ddNTPs für die vier Basen eine unterschiedliche Farbmarkierung: Grün für Adenin, schwarz für Cytosin, blau für Guanin und rot für Thymin. Um in einem Reaktionsansatz mehrere SNPs zu bestimmen, müssen die zu extendierenden Primer unterschiedlich lang sein, um sie bei der Sequenzierreaktion separieren zu können. Dies erreicht man durch unspezifische Verlängerungen der Primer an deren 5'-Ende (durch *Non sense*-Basenabfolgen).

Die SNaPshot™-Reaktion erfolgte im 5 µl-Maßstab. Dazu wurde zunächst ein Reaktionsmix mit 3 µl je Probe angefertigt. In 2 µl DNase-freies Wasser wurden dazu 0,5 µl SNaPshot™-Mastermix und 0,5 µl eines Pools aus den zu extendierenden Primern (10-fach konzentriert zwischen 0,2-1,2 µM) gegeben und diese Mischung auf eine 384-Well-Platte vorgelegt. Dann wurden 2 µl der aufgereinigten PCR-Produkte dazu pipettiert. Nach der Reaktion mussten

verbliebene ddNTPs mittels SAP (1 unit/ μ l) dephosphoryliert werden. Dabei wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert im Wärmeschrank. Dieser Schritt ist notwendig, um eventuelle Nebenreaktionen zu verhindern, welche im Elektropherogramm des Sequenzierers stören könnten.

Zur Analyse im Sequenzierer wurden 10 μ l Formamid-Lösung (versetzt mit Längenstandard Genescan LIZ 120) auf eine 96-Well-Sequenzierplatte gebracht und dann 1,1 μ l aus der SNaPshot™-Reaktion dazu gegeben. Anschließend wurden die extendierten Primer bei 95°C für 5 min in einem 96-Well-Thermocycler denaturiert. Durch ein schnelles Überführen auf Eis sollte eine Renaturierung verhindert werden. Nach kurzer Zentrifugation wurde die 96-Well-Sequenzierplatte auf einen gerätespezifischen Träger aufgesteckt, mit einer Gummimatte und einem Rahmen versehen und die Analyse im Sequenzierer gestartet. Die Auswertung des Elektropherogramms erfolgte mit der Genescan™-Analysis-Software, Version 3.5.1.

3.5.5 Fragmentlängen-Analyse

Das als *6A bekannte Allel im Signalpeptid des Rezeptors *TGFBR1*, bei welchem die neun Basen GCGGCGGCG deletiert sind (entspricht in der Aminosäuresequenz drei konsekutiven Alanin-Resten), wurde über Fragmentlängen-Analyse bestimmt. Der flankierende Bereich wurde zuerst über Einzel-PCR amplifiziert (siehe oben Tab. 3 und Tab. 4). Die Analyse des deletierten Allels erfolgte dann mittels Kapillarelektrophorese im Sequenzierer. Um die beiden Allele differenzieren zu können, war einer der beiden PCR-Primer am 5'-Ende mit einer Fluoreszenz-Markierung (FAM) versehen worden. Das Fragment mit dem Wildtyp-Allel hatte eine Länge von 221 bp, das mit der Deletion 212 bp. Als Größenstandard diente Genescan ROX-400HD.

Auf einer Sequenzierplatte wurden 10 μ l einer 1:200-Verdünnung des ROX-400HD-Größenstandards in Formamid-Lösung vorgelegt. Dazu wurde dann 1 μ l des PCR-Produkts gegeben. Nun erfolgte eine Denaturierung im Thermocycler bei 95°C für 5 min. Anschließend wurde die Platte sofort auf Eis gebracht werden und dort für 10 min heruntergekühlt. Damit sollte verhindert werden, dass sich die DNA renaturiert. Nun konnte die Platte mit den entsprechenden Halterungen in das Sequenziergerät gebracht werden. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software GeneScan Analysis Version 3.5.1 ausgewertet.

3.6 Bioinformatik

Die Gesamtzahl der im humanen Keimbahn-Genom enthaltenen genetischen Varianten wird auf 10 Millionen geschätzt. Dazu zählen neben den SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), welche mit Abstand die häufigsten sind, Deletionen, Insertionen, VTNRs (*variable tandem nucleotide repeats*), Mikrosatelliten und CNVs (*copy number variations*). Von einem Polymorphismus spricht man, wenn das seltenere Allel mit einer Frequenz von mindestens 1% in der Bevölkerung vorkommt. Zur explorativen Untersuchung des Einflusses genetischer Variabilität auf funktionelle oder klinische Parameter kommen prinzipiell zwei Vorgehensweisen in Betracht: ein Genom-weiter oder ein Kandidatengen-Ansatz.

Genom-weit bedeutet, dass eine große Zahl gleichmäßig über das Genom verteilter Varianten bestimmt wird. Dieses wird gegenwärtig mit SNP-Chips durchgeführt. Dem Vorteil einer umfassenden Analyse stehen als Nachteile hohe Kosten, die Erfordernis einer großen Fallzahl und häufig das Fehlen von Nicht-SNP-Varianten gegenüber. Eine große Fallzahl ist nötig, um bei einer sehr streng zu wählenden Signifikanzgrenze (wegen ansonsten vieler falsch positiver Resultate) einen statistisch signifikanten Befund zu erhalten. Andere genetische Varianten wie z.B. Deletionen sind typischerweise nicht auf den Chips enthalten und können somit auf diese Weise nicht analysiert werden.

Eine neue Entwicklung ist Sequenzieren der 3. Generation, womit innerhalb von nur zwei Monaten ein gesamtes menschliches Genom analysiert werden kann. Dadurch werden die technischen Limitierungen der SNP-Chips aufgehoben, die Einschränkungen bezüglich Fallzahl und statistischer Signifikanz gelten aber entsprechend. Zudem ist dieses Verfahren im Moment noch sehr teuer.

Der Kandidatengen-Ansatz bedeutet, dass nur Varianten in ganz bestimmten Genen untersucht werden, für die ein Zusammenhang mit gewonnenen Daten (z.B. funktionelle) plausibel ist. Von Vorteil ist hierbei, dass weit weniger Tests durchgeführt werden, wodurch das Signifikanzniveau weniger streng ist als beim Genom-weiten Testen. Als Nachteil liegt auf der Hand, dass mögliche Einflüsse anderer Gene dabei nicht berücksichtigt werden.

Obwohl für den LCL-Teil dieser Arbeit auch eine Genom-weite Auswertung möglich ist, wurde jedoch der Kandidatengen-Ansatz gewählt. Zum einen war die Zahl mit 48 lymphoblastoiden Zelllinien relativ klein, zum anderen sollte spezifisch die Hypothese möglicher Effekte in Genen des TGF β -Signalwegs geprüft werden. Hierbei handelte es sich um *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD7*, *TGF β 1*, *TGF β R1*. Für diese Gene befinden sich in der Datenbank dbSNP inzwischen weit über hundert Varianten-Einträge pro Gen. Diese Einträge

stammen von unterschiedlichen Laboratorien mit Genotypen von unterschiedlichen Personen. Etliche dieser Daten sind nicht validiert. Die aktuell umfassendste Analyse, welche an denselben Personen durchgeführt wurde und somit auch eine Aussage über die genetische Kopplung von Varianten erlaubt, stellt die HapMap-Datenbank mit derzeit etwa 4 Millionen analysierter genetischer Positionen dar. Für die in dieser Arbeit verwendeten LCLs kaukasischer Spender wurden die entsprechenden Genotypen für die oben genannten Gene aus HapMap heruntergeladen und auf Assoziationen mit den funktionellen Messungen analysiert. Für die Probandenstudie, welche den Charakter einer Validierungsstudie hatte, wurden nur einzelne Varianten bestimmt, für die es bereits Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung gibt (Janke 2009).

3.7 Statistik

Es lassen sich deskriptive von analytischen Verfahren abgrenzen. Die deskriptive, d.h. „beschreibende“ Statistik umfasst die Darstellung von Messdaten hinsichtlich Lage und Verteilung. Zur besseren Veranschaulichung werden dazu oft Grafiken verwendet. Die Messwerte können dabei sowohl einzeln als auch zusammenfassend betrachtet werden. Besonders bei einer größeren Zahl von Messwerten wird meist letzters bevorzugt. Folgende grafische Darstellungsformen wurden in meiner Arbeit verwendet: Histogramme für die Darstellung von Häufigkeitsverteilungen, Scatterplots zur Darstellung paarweiser Korrelationen von Messgrößen und Boxplots für die nicht-parametrische Darstellung zur Zusammenfassung von Lage- und Streuungsmaß eines Messparameters.

Zur analytischen Statistik gehören alle diejenigen Verfahren, die über die bloße Betrachtung der beobachteten Messwerte hinausgehen. Es können dabei aus den gemessenen Werten durch mathematische Verfahren Parameter geschätzt werden (z.B. die Konzentration eines Medikaments, bei welcher ein halbmaximaler Effekt auftritt). Oder es werden mittels statistischer Tests Hypothesen geprüft (z.B. ob der Unterschied zwischen zwei Gruppen statistisch signifikant ist oder nicht).

Typischerweise geht man bei der Bewertung von Daten so vor, dass man zunächst deskriptiv die Daten veranschaulicht und dann die zu prüfenden Hypothesen durch analytische Tests untersucht. Wichtig ist dabei zu klären, ob die Verteilung der Daten parametrisch oder nicht-parametrisch ist. Das typische Beispiel für eine parametrischen Verteilung, d.h. eine Beschreibung ist durch mathematische Parameter möglich, stellt die Normalverteilung dar, welche auch als Gaußsche Glockenkurve bezeichnet wird. Ob eine solche vorliegt, kann einerseits durch deskriptive Histogramme und Q-Q-Plots eingeschätzt werden. Dies sollte

aber zusätzlich durch einen analytischen Test objektiviert werden. In dieser Arbeit wurde zur Prüfung einer Normalverteilung der Shapiro-Wilk-Test angewandt, der bei den hier betrachteten Fallzahlen eine höhere Power als der Kolmogorov-Smirnov-Test aufweist.

Bei nicht-signifikanter Abweichung von einer Normalverteilung (d.h. $p > 0,05$, bei mehrfachem Testen Grenze entsprechend niedriger) konnten zur Untersuchung von Unterschieden zwischen Behandlungsgruppen oder Genotypen parametrische Testverfahren verwendet werden. War diese Voraussetzung nicht gegeben, wurden nicht-parametrische Methoden eingesetzt (siehe Tab. 5).

Um die Beziehung zweier Variablen zueinander zu vergleichen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, z.B. wie sich das Ausmaß Behandlungs-induzierter Expressionsänderungen eines Gens mit denen eines anderen Gens verhält. Bei parametrischer Verteilung der Messwerte wurde dazu der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Für Variablen, die keine Normalverteilung aufwiesen, wurde stattdessen der Spearman-Rangsummen-Korrelationskoeffizient verwendet. Bei beiden Verfahren erhält man einen Koeffizienten als Maß für die Stärke der Korrelation sowie einen p-Wert für deren statistische Signifikanz. Je näher der Korrelationskoeffizient gegen den Wert null geht, desto schwächer ist der Zusammenhang zwischen zwei Variablen.

Um Veränderungen von verbundenen Stichproben (z.B. Behandlung *versus* Kontrolle) zu analysieren, wurde entweder der gepaarte t-Test (parametrisch) oder der Wilcoxon-Rangsummentest benutzt. Der Wilcoxon-Test ist unabhängig von der Verteilung und kann sowohl Stärke als auch Differenzen von gepaarten Stichproben vergleichen.

Der Einfluss von unabhängigen (z.B. Genotypen) auf abhängige Variablen (z.B. Expressions- oder Zellvitalitätsmessungen) wurde mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test (nicht-parametrisch) ermittelt. Dieser Test berücksichtigt einen so genannten Alleldosis-Effekt, d.h. die Auswirkung einer Genvariante auf einen funktionellen Messparameter sollte bei Heterozygotie zwischen den Beobachtungen für die beiden homozygoten Zustände liegen.

Alle diese genannten Tests geben einen p-Wert an, welcher die nominale statistische Signifikanz der geprüften Hypothese widerspiegelt. Dabei sagt der p-Wert aus, wie groß die Irrtumswahrscheinlichkeit ist, mit der die beobachteten Unterschiede zufällig sind.

	parametrische Verteilung	nicht-parametrische Verteilung
Korrelationsanalyse zwischen zwei Größen	Pearson-Korrelations-Koeffizient	Spearman-Rangsummen-Korrelations-Koeffizient
Prüfung, ob Behandlungseffekte gegenüber Kontrolle statistisch signifikant (verbundene Stichproben)	Gepaarter t-Test	Wilcoxon-Rangsummen-Test
Prüfung von Effekten diskreter unabhängiger Variablen (z.B. Genotypen)	(lineare Regression, in meiner Arbeit nicht verwendet)	Jonckheere-Terpstra-Trend-Test

Tab. 5 Statistische Testverfahren

Alle Berechnungen wurden mit der SPSS-Software (Version 12.0) ausgeführt. Eine nominale statistische Signifikanz lag bei einem p-Wert kleiner 0,05 vor. Dies ist jedoch nur dann korrekt, wenn nur ein einziger, auf einer vorher definierten Hypothese basierender Test durchgeführt wird. Typischerweise ist das der Fall, wenn bereits umfangreiche Vorkenntnisse vorhanden sind und eine Validierung einer Hypothese angestrebt wird.

Ist noch nicht viel über eine zu untersuchende Thematik bekannt (wie z.B. über Effekte von Genvarianten im TGF β -Signalweg), wird zunächst ein exploratives Vorgehen gewählt. Dabei wird dann eine Vielzahl von statistischen Tests durchgeführt (z.B. Prüfung jeder einzelnen Genvariante auf Assoziation mit mehreren funktionellen Messgrößen). Dadurch erhöht sich mit der Zahl der Tests die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse („multiples Testen“). Im einfachsten Fall ist diese Beziehung proportional, d.h. der p-Wert für die Signifikanzschwelle von 0,05 müsste durch die Anzahl der Tests dividiert werden (so genannte Bonferroni-Adjustierung). Dies ist ein besonders konservativer Ansatz, welcher davon ausgeht, dass alle durchgeführten Tests voneinander unabhängig sind. Sind z.B. genetische Polymorphismen miteinander gekoppelt, so liegt diese Voraussetzung nicht mehr vor. Je nach Kopplungsgrad könnte dann die „strenge“ Bonferroni-Korrektur etwas abgemildert werden. Das Problem des multiplen Testens bleibt aber bestehen. Wenn überhaupt ein Effekt einer Genvariante besteht, so ist dieser typischerweise gering. Es wären dann bei explorativem Vorgehen sehr hohe Fallzahlen erforderlich, um auch unter Berücksichtigung des multiplen Testens eine statistische Signifikanz aufzeigen zu können. Dieser Problematik wurde in meiner Arbeit dadurch begegnet, dass die LCL-Studie bezüglich der Prüfung eines Einflusses von Genvarianten als explorativer Ansatz diente. Für die darin signifikantesten Befunde wurden die T-Lymphozyten dann als Validierungsstudie betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Genexpression im TGF β -Signalweg in Fibroblasten

In Fibroblasten sollte die Wirkung von Bestrahlung (mit 2 und 8 Gy) auf die Expression von Genen des TGF β -Signalwegs untersucht werden. Zusätzlich sollte mit *CTGF* ein typisches Gen, welches in Fibroblasten über diesen Signalweg reguliert wird, ebenfalls analysiert werden. Sowie auch *CDKN1A*, welches als eines der am stärksten strahlenresponsiven Gene gilt. Dazu waren 21 Fibroblastenlinien zu je 100,000 pro Ansatz auf eine 6-Well-Platte ausgebracht worden. Diese ließ man 7 d bis zur Konfluenz wachsen. Dann erfolgte die Bestrahlung mit 2 bzw. 8 Gy und parallel dazu wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach 24 h Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C wurde die RNA der Zellen gewonnen.

4.1.1 Basalexpression

Zunächst war von Interesse, in welchem Ausmaß die basale Expression der Zielgene variierte. Dies ist in Abb. 3 aufgetragen. Man erkennt, dass das inhibitorische (*SMAD7*) und die aktivatorischen (*SMAD2*, *SMAD3*) Signaltransduktionsmoleküle eine sehr geringe Streubreite aufweisen. Demgegenüber zeigte *CTGF*, welches die Bildung von Bindegewebsfasern induziert, die größte Variabilität der betrachteten Gene.

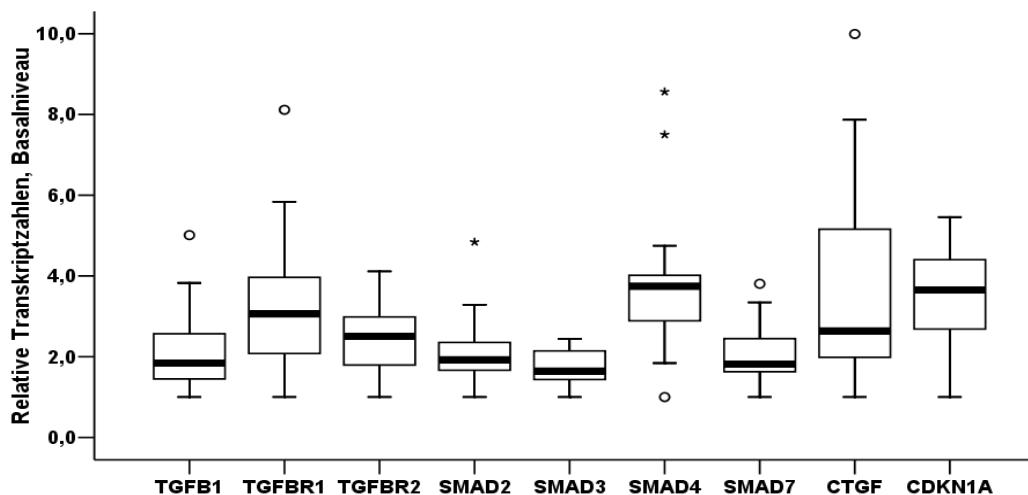


Abb. 3 Variabilität der Basalexpression in 21 Fibroblastenlinien. Die Messwerte für jedes Gen wurden auf das gewichtete Mittel aus vier Referenzgenen (*GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *UBC*) bezogen. Die so normierten Daten sind, umgerechnet in Transkriptzahlen, relativ bezüglich des niedrigsten Wertes (= Einheit von 1,0) für jedes Gen dargestellt. Damit lässt sich der Faktor der Gesamtstreuung direkt ablesen. Die Darstellungsweise erfolgte als Boxplots: Die dicke schwarze Linie ist der Median (Q2) der Verteilung, die untere Linie des Kastens gibt das 25%-Quartil (Q1), die obere das 75%-Quartil (Q3) an. Das heißt, in dem durch einen Kasten markierten Bereich liegen 50% der Messwerte. Der Abstand zwischen Q3 und Q1 wird auch als Interquartilabstand (IQA) bezeichnet. Die kurzen horizontalen Striche (orthogonal zu den vertikalen) zeigen das Minimum (unten) bzw. Maximum (oben) der Verteilung an, abgesehen von Ausreißern (Kreise) bzw. Extremwerten (Sterne), welche sich in einem Abstand von 1,5-3,0 x IQA bzw. mehr als 3,0 x IQA unterhalb von Q1 bzw. oberhalb von Q3 befinden.

Weiterhin sollte geklärt werden, inwiefern die Expressionen dieser Gene miteinander korreliert sind. Auf Basalniveau wurde dabei die stärkste positive Korrelation zwischen *TGFB1* und *CTGF* sowie zwischen den beiden Rezeptoren *TGFB1* und *TGFBR2* festgestellt. Weitere substantielle Zusammenhänge bestanden zwischen *TGFB1* und dem Autoinhibitor *SMAD7*, den beiden Rezeptoren und dem aktivatorischen *SMAD2*, *SMAD7* und *CTGF* sowie *SMAD3* und *CDKN1A* (Tab. 6).

	<i>TGFB1</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CTGF</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFB1</i>	0,16	0,28	0,21	0,19	0,22	0,45*	0,64**	-0,11
<i>TGFB1</i>		0,63**	0,50*	0,36	-0,09	-0,26	-0,06	0,07
<i>TGFBR2</i>			0,54*	0,18	-0,06	-0,31	-0,09	0,24
<i>SMAD2</i>				-0,26	0,02	0,12	-0,08	-0,20
<i>SMAD3</i>					-0,21	-0,27	-0,01	0,56*
<i>SMAD4</i>						0,19	0,06	-0,22
<i>SMAD7</i>							0,55*	-0,13
<i>CTGF</i>								-0,07

Tab. 6 Korrelation der Genexpression auf Basalniveau in 21 Fibroblastenlinien. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für diese Analyse wurden jeweils die Referenzgen-normierten Ct-Werte der *Real time*-Messung ($= -\log_2[\text{Transkripte}]$, alle normalverteilt gemäß Shapiro-Wilk-Test) zueinander in Beziehung gesetzt. Die eingetragenen Zahlenwerte geben den Korrelationskoeffizienten r nach Pearson an. Sterne zeigen statistische Signifikanz p an, wobei * $0,001 < p < 0,05$ und ** $p \leq 0,001$.

4.1.2 Expressionsänderungen nach Bestrahlung

Nachdem in Tab. 6 die Korrelation der Gene auf Basalniveau betrachtet wurde, zeigt Tab. 7 die Korrelation der Expressionsänderungen durch Bestrahlung mit 2 Gy. Die stärksten Korrelationen zeigten hierbei *TGFB1* mit *TGFB1* und *TGFBR2*, sowie *TGFB1* mit *TGFBR2*. Weitere Zusammenhänge zeigten sich bei *TGFBR2* und *SMAD2*. *CDKN1A*, welches eines der stärksten responsiven Strahlengene ist, zeigte bei Bestrahlung mit 2 Gy keine Korrelation mit den Genen des TGF β -Signalwegs, auch nicht mit *SMAD3*, welches auf Basalniveau mit *CDKN1A* korreliert war (Tab. 6).

Bei der Betrachtung der Korrelation der Expressionsänderungen durch 8 Gy (Tab. 8) zeigten sich sehr ähnliche Effekte wie durch 2 Gy (Tab. 7). Die stärksten Korrelationen wiesen hierbei *TGFB1* mit *TGFBR2*, gefolgt von *TGFBR2* mit *TGFB1*, *TGFB1* mit *TGFB1* und *CTGF* mit *TGFB1*. Schwächere Korrelationen waren zwischen *SMAD2* und *TGFBR2*, *CTGF* und *TGFBR2*, sowie *CDKN1A* und *CTGF* zu beobachten. Im Unterschied zu der

Bestrahlung mit 2 Gy war bei 8 Gy eine positive Korrelation von *CTGF* mit *TGFBR1* und *TGFBR2* erkennbar.

	<i>TGFBR1</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CTGF</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFBR1</i>	0,78**	0,76**	0,32	0,47*	0,12	0,15	0,28	0,16
<i>TGFBR2</i>		0,88**	0,34	0,23	0,41	0,01	0,10	0,00
<i>SMAD2</i>			0,60*	0,10	0,29	0,21	0,09	-0,01
<i>SMAD3</i>				-0,07	-0,10	0,33	0,08	-0,16
<i>SMAD4</i>					-0,02	0,40	0,31	0,14
<i>SMAD7</i>						-0,26	-0,06	-0,05
<i>CTGF</i>							-0,32	-0,18
<i>CDKN1A</i>								0,29

Tab. 7 Korrelation der Expressionsänderungen durch 2 Gy in 21 Fibroblastenlinien nach 24 h. Darstellungsweise wie in Tab. 6. Auch hier waren alle Parameter normalverteilt.

	<i>TGFBR1</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CTGF</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFBR1</i>	0,76**	0,83**	0,44	0,22	-0,28	0,01	(0,25)	0,18
<i>TGFBR2</i>		0,81**	0,30	0,30	-0,12	0,04	(0,66)**	0,25
<i>SMAD2</i>			0,48*	0,11	-0,19	0,23	(0,50)*	0,20
<i>SMAD3</i>				0,21	-0,28	0,24	(-0,11)	-0,03
<i>SMAD4</i>					-0,34	0,01	(0,08)	0,33
<i>SMAD7</i>						0,40	(-0,06)	-0,03
<i>CTGF</i>							(0,07)	0,08
<i>CDKN1A</i>								(0,64)*

Tab. 8 Korrelation der Expressionsänderungen durch 8 Gy in 21 Fibroblastenlinien nach 24 h. Darstellungsweise wie in Tab. 6. Auch hier waren die meisten Parameter normalverteilt außer *CTGF*, für welches daher statt dem Pearson- der nicht-parametrische Spearman-Korrelationskoeffizient rho angegeben ist (Werte in Klammern).

In den Fibroblasten sollten als Modell für bestrahltes Normalgewebe die durch Bestrahlung (2 und 8 Gy) gegenüber der Kontrolle hervorgerufenen Veränderungen der Expression von Genen des TGF β -Signalwegs (einschließlich des darüber regulierten *CTGF*) analysiert werden. Dazu wurden die referenzgenormierten Expressionswerte in Relation zur Kontrolle gesetzt. Die Streubreite dieser Strahleneffekte ist in Abb. 4 dargestellt.

Wurden die log₂-Werte dieser Transkriptänderungen betrachtet, waren alle Parameter bis auf *CTGF* mit 8 Gy mit einer Normalverteilung vereinbar. Dementsprechend konnte eine parametrische Analyse durchgeführt werden, welche in Abb. 5 zu sehen ist. Die zugehörigen Zahlenwerte und das Signifikanzniveau sind in Tab. 9 aufgelistet. Allgemein ist festzustellen,

dass die Effekte durch 2 Gy und durch 8 Gy sehr ähnlich waren. Dies gilt für die statistisch signifikante Reduktion von *TGFBRI*, *SMAD3* und *SMAD4* wie auch für die Induktion von *SMAD2*. Die supprimierende Wirkung von Bestrahlung auf *CTGF* war bei 8 Gy noch deutlich ausgeprägter als bei 2 Gy. Ein stärkerer Effekt durch 8 Gy war auch für die Steigerung der Transkription des strahlenresponsiven *CDKN1A* zu beobachten. Die Expression von *TGFB1*, *TGFB2* und *SMAD7* unterschied sich nach Bestrahlung nicht signifikant von der Kontrolle.

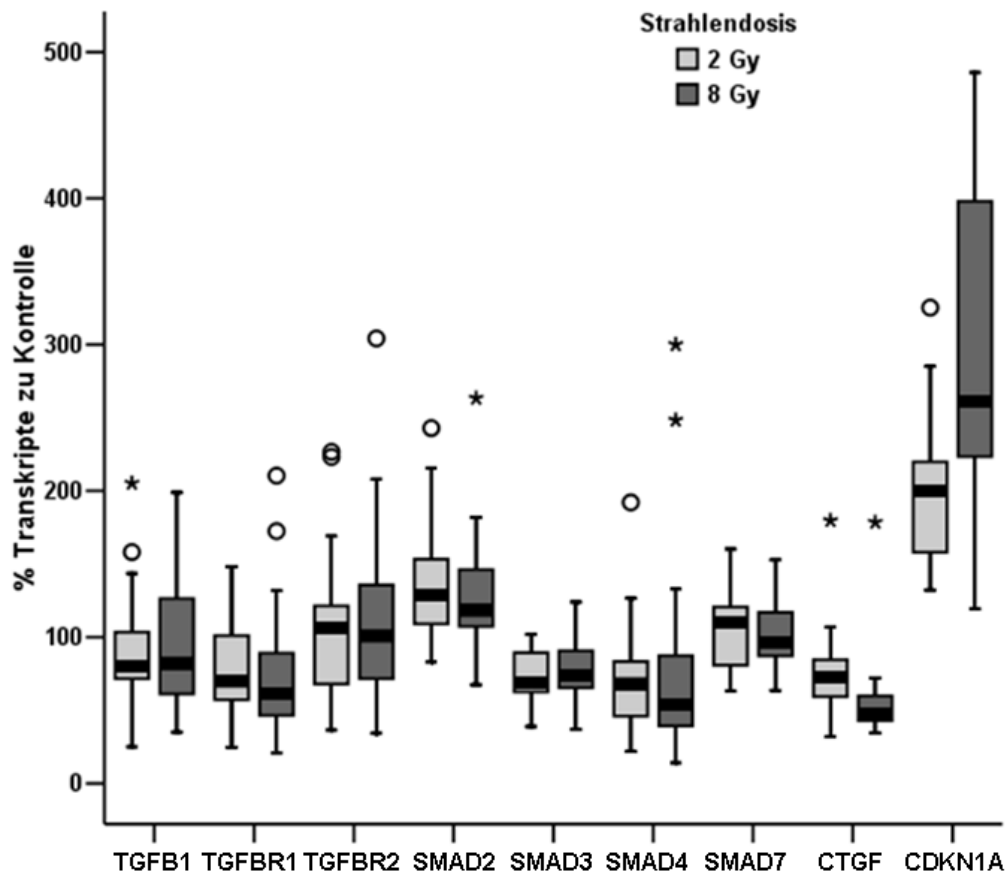


Abb. 4 Strahlenwirkung als Transkriptänderungen in 21 Fibroblastenlinien. Die Rohdaten wurden zunächst auf das gewichtete Mittel aus *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA* und *UBC* normiert und dann für jede Zelllinie als relative Transkriptänderung zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Zur Beschreibung von Boxplots siehe Abb. 3.

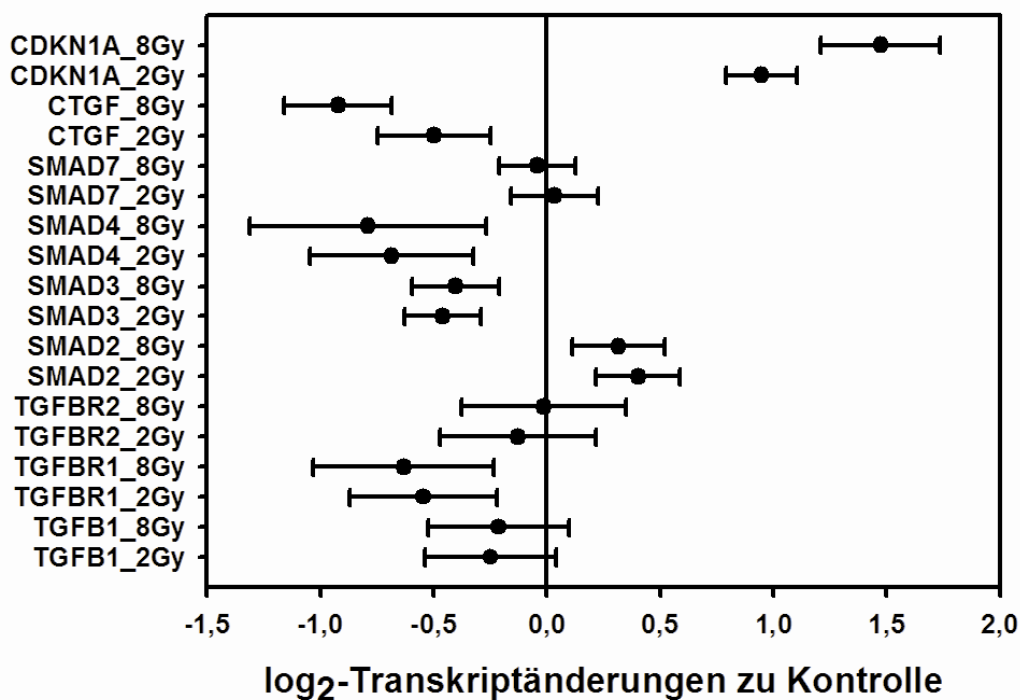


Abb. 5 Transkriptänderungen in Fibroblasten nach 2 und 8 Gy. Die Effekte der Bestrahlung auf die Genexpression sind mit 95%-Konfidenzintervall dargestellt. Hierfür wurden von den Transkriptzahlen (normiert auf *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *UBC*) der Logarithmus zur Basis 2 gebildet, womit – außer bei *CTGF* mit 8 Gy – eine Normalverteilung gegeben war. Für die Mittelwerte (ausgefüllte Kreise) ist das jeweilige 95%-Konfidenzintervall durch Striche markiert. Schneiden diese Striche auf der einen oder anderen Seite die vertikale Linie bei 0, so ist die Veränderung gegenüber der Kontrolle statistisch nicht signifikant.

Gen	24 h nach 2 Gy		24 h nach 8 Gy	
	log ₂ relativ zu Kontrolle [95% CI]	p-Wert	log ₂ relativ zu Kontrolle [95% CI]	p-Wert
<i>TGFB-Signalweg-Gene</i>				
<i>TGFB1</i>	-0,25 [-0,54;+0,04]	0,09	-0,21 [-0,52;+0,10]	0,2
<i>TGFB1</i>	-0,54 [-0,87;-0,22]	0,002	-0,63 [-1,03;-0,23]	0,004
<i>TGFB2</i>	-0,13 [-0,47;+0,22]	0,5	-0,01 [-0,37;+0,35]	0,9
<i>SMAD2</i>	+0,40 [+0,22;+0,59]	0,0002	+0,32 [+0,11;+0,52]	0,004
<i>SMAD3</i>	-0,46 [-0,63;-0,29]	2*10 ⁻⁵	-0,40 [-0,59;-0,21]	0,0003
<i>SMAD4</i>	-0,68 [-1,04;-0,33]	0,0007	-0,79 [-1,31;-0,27]	0,005
<i>SMAD7</i>	+0,03 [-0,16;+0,23]	0,7	-0,04 [-0,21;+0,13]	0,6
<i>vom TGFB-Signalweg beeinflusste Gene</i>				
<i>CTGF</i>	-0,50 [-0,75;-0,25]	0,0004	-0,92 [-1,16;-0,68]	1*10 ⁻⁷
<i>Positiv-Kontrolle für Wirkung von Röntgenstrahlung</i>				
<i>CDKN1A</i>	+0,95 [+0,79;+1,11]	6*10 ⁻¹¹	+1,47 [+1,21;+1,74]	4*10 ⁻¹⁰

Tab. 9 Transkriptänderungen in Fibroblasten nach 2 und 8 Gy. Zahlenwerte und Signifikanzniveau zu Abb. 5.

4.2 LCLs

In LCLs, welche aus dem kaukasischen Kollektiv der HapMap-Genotypisierung stammten, sollten die Effekte von TGF β 1 und Röntgenstrahlung (diese auch nach TGF β 1-Vorbehandlung) auf die Expression von Genen des TGF β -Signalwegs dargestellt werden. Ein zweiter funktioneller Parameter bildete eine Zellvitalitätsmessung. Die aus der HapMap-Datenbank verfügbaren Genotypen in den untersuchten Zielgenen sollten auf etwaige Beeinflussungen der funktionellen Parameter geprüft werden.

Insgesamt konnten von den verfügbaren unverwandten 59 LCL-Linien 48 erfolgreich angezüchtet werden. Neben den drei Behandlungsbedingungen (5 ng/ml TGF β 1, 3 Gy Röntgenstrahlung sowie 5 ng/ml TGF β 1 16 h vor 3 Gy) wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Diese Ansätze wurden auf 12-Well-Platten nach Behandlung in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 4 h wurde RNA gewonnen, nach 30 h die Zellvitalität mittels Durchflusszytometrie erfasst.

4.2.1 Effekte von TGF β 1 und Bestrahlung auf Genexpression

Die mRNA-Expression wurde für die TGF β -Signalweg-Gene *TGFBRI*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* und *SMAD7* sowie für das besonders strahlenresponsive *CDKN1A* ermittelt. Auf die Messung von *TGFB1* und *TGFB2* wurde hier verzichtet, da frühere Arbeiten in der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität Göttingen wiederholt keine Effekte von Bestrahlung auf diese beiden Gene in Leukozyten gezeigt hatten (Campean 2007; Janke 2009) und auch in den Fibroblasten für diese beiden Gene keine signifikanten Veränderungen nachweisbar waren (Abb. 5). Die Induktion von *SMAD7* durch TGF β 1 in lymphozytären Zellen ist gut belegt (Kunzmann et al. 2003). CTGF fand bei den LCLs keine Beachtung, weil dieses dort nicht relevant exprimiert ist.

Ziel war es, die Effekte nach 4 h Behandlung mit TGF β 1, 3 Gy-Bestrahlung sowie der kombinierten Behandlung (3 Gy nach 16 h Vorinkubation mit TGF β 1) auf die Transkription der oben genannten Gene in 48 LCLs zu untersuchen (Abb. 6).

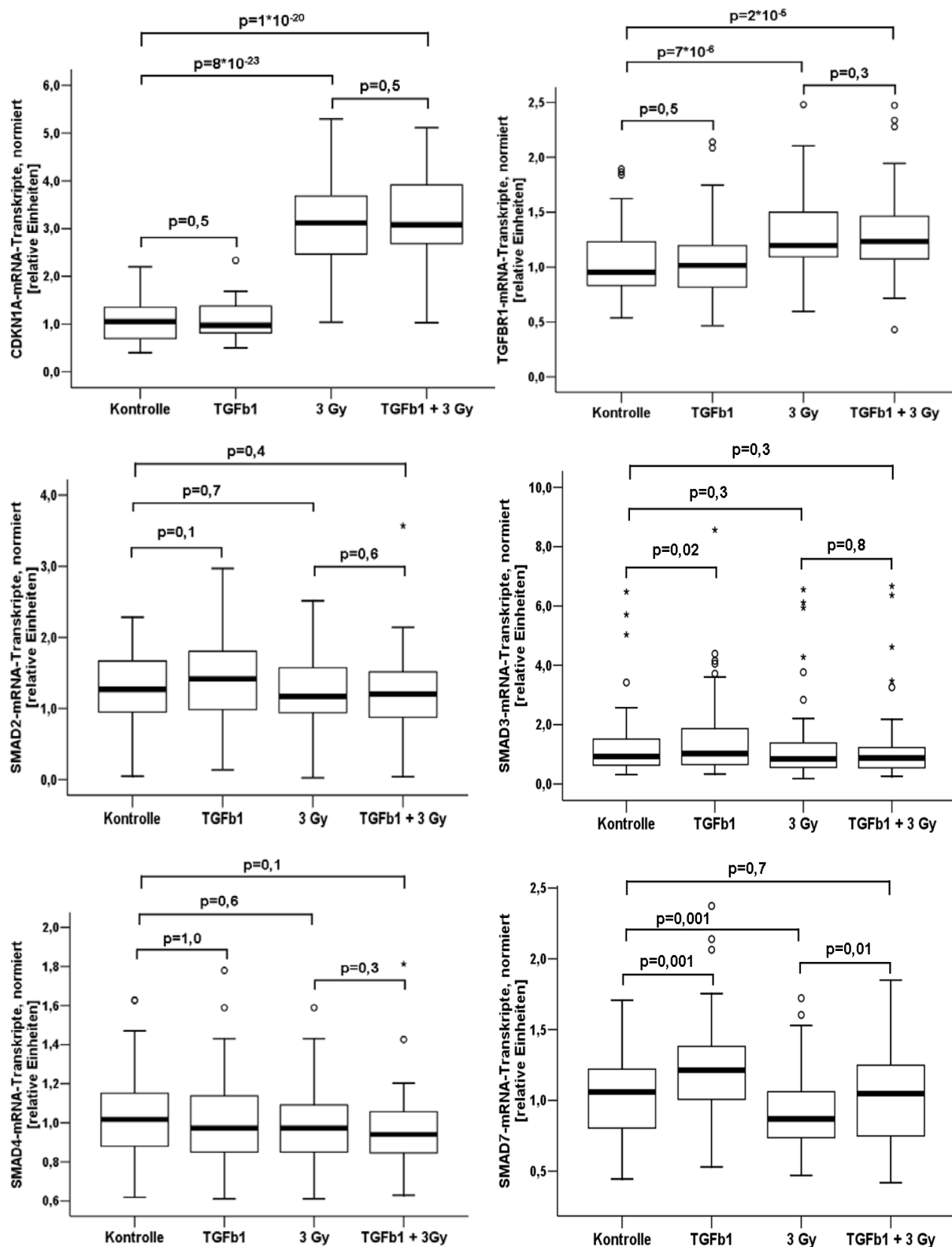


Abb. 6 Effekte von TGFβ1 und 3 Gy auf Genexpression im TGFβ-Signalweg in 48 LCLs. Für jedes Gen wurden die Rohwerte der Expression zunächst auf das gewichtete Mittel aus den fünf Referenzgenen *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *UBC* und *YWHAZ* normiert und diese Werte dann auf das jeweilige Mittel der Kontrollen bezogen. Die Signifikanztestung erfolgte auf Ebene der Ct-Werte (= $-\log_2[\text{Transkripte}]$, wo außer bei *SMAD2* eine Normalverteilung angenommen werden konnte). Dementsprechend wurden Unterschiede für die interessierende Behandlungspaare (Kontrolle-TGFβ1, Kontrolle-3 Gy, Kontrolle-TGFβ1+3 Gy, 3 Gy-TGFβ1+3 Gy) mit dem gepaarten t-Test bewertet, bei *SMAD2* mit dem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest. Die zugehörigen p-Werte für die statistische Signifikanz sind an den entsprechenden Stellen in den Boxplots eingetragen. Für die Darstellungsweise der Boxplots siehe Beschreibung in Abb. 3.

Wie in Abb. 6 zu sehen, nahm die Expression von *CDKN1A* unter Bestrahlung deutlich zu, im Median etwa um den Faktor 3. TGFβ1 hatte hier keinen Einfluss. Sehr ähnlich verhielt es sich mit *TGFBR1*, nur waren hier die Effekte der Bestrahlung schwächer ausgeprägt. Die Bestrahlungswirkung auf diese beiden Gene war hoch signifikant korreliert (siehe unten, Tab. 12 und Tab. 13). *SMAD2*, *SMAD3* und *SMAD4* zeigten in den Behandlungen keine nennenswerten Veränderungen der Expressionsstärke gegenüber den Kontrollen. Wie erwartet, stieg *SMAD7* unter TGFβ1-Inkubation an, da dieses einen über Genexpression regulierten Autoinhibitor dieses Signalwegs darstellt. Auffällig war jedoch dessen Herunterregulation durch 3 Gy. Offensichtlich wirken sich diese beiden Behandlungen gegenläufig auf die *SMAD7*-Expression aus und bei der Kombination war dementsprechend kein Unterschied zur Kontrolle zu verzeichnen.

Weiter sollte untersucht werden, ob die einzelnen Gene in ihrer Expression korreliert waren und zwar sowohl auf Kontrollniveau als auch für die Behandlungs-induzierten Effekte. Dies könnte Hinweise auf gemeinsam regulierte Gene geben. Dazu wurde auf Ebene der Ct-Werte der *Real time*-Messungen die Expression von *TGFBR1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD7* und *CDKN1A* paarweise miteinander verglichen. Diese Analyse beruht auf den Messungen an 48 genetisch unterschiedlichen LCLs, wovon 11 ein zweites Mal kultiviert und gemessen wurden, so dass diese Korrelationen insgesamt auf einer Fallzahl von 59 basieren.

Auf Kontrollniveau waren dabei mehrere Gene paarweise stark positiv korreliert, insbesondere *TGFBR1* mit *CDKN1A*, *SMAD2* mit *SMAD4*, *SMAD3* mit *SMAD4*, *SMAD4* mit *CDKN1A* und *SMAD7* mit *CDKN1A* (Tab. 10).

	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFBR1</i>	(0,09)	0,12	(0,32)*	0,16	0,47**
<i>SMAD2</i>		(0,30)*	(0,38)**	(0,19)	(0,22)
<i>SMAD3</i>			(0,55)**	0,01	0,29*
<i>SMAD4</i>				(0,16)	(0,41)**
<i>SMAD7</i>					0,44**

Tab. 10 Korrelation der Genexpression auf Basalniveau in LCLs. Die Rohdaten der Messung wurden zuerst durch ein gewichtetes Mittel aus *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA*, *UBC* und *YWHAZ* als *Housekeeping*-Gene normiert. Die so erhaltenen Werte (= $-\log_2$ [normierte Transkripte]) wurden für die Korrelationsanalyse verwendet. Waren diese gemäß Shapiro-Wilk-Test mit einer Normalverteilung vereinbar, wurde der Koeffizient nach Pearson, ansonsten der nach Spearman (Werte dann in Klammern gesetzt) verwendet. Die statistische Signifikanz ist durch Sterne angezeigt, wobei * $0,001 < p < 0,05$ und ** $p \leq 0,001$.

Tab. 11 zeigt die Korrelation der durch TGF β 1 induzierten Effekte in LCLs. Deutliche paarweise Korrelationen lassen sich zwischen *TGFBRI* und *SMAD7*, zwischen *TGFBRI* und *CDKN1A* und zwischen *TGFBRI* und *SMAD4* erkennen.

	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFBRI</i>	(0,29)*	(0,24)	0,41**	0,57**	0,51**
<i>SMAD2</i>		(0,17)	(0,20)	(0,09)	(-0,01)
<i>SMAD3</i>			(0,38)*	(0,12)	(0,16)
<i>SMAD4</i>				0,29*	0,32*
<i>SMAD7</i>					0,34*

Tab. 11 Korrelation der Genexpression für die durch TGF β 1 induzierten Effekte in LCLs. Darstellungsweise wie in Tab. 10.

In Tab. 12 sind die paarweisen Korrelationen der durch 3 Gy induzierten Genexpressionsänderungen aufgezeigt. Die stärksten Zusammenhänge bestanden in absteigender Reihenfolge bei *TGFBRI* mit *CDKN1A*, bei *TGFBRI* mit *SMAD3*, *TGFBRI* mit *SMAD2* und bei *SMAD3* mit *SMAD7*. Somit war inhibitorische *SMAD7* mit dem aktivatorischen *SMAD3* des TGF β -Signalwegs positiv korreliert.

	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFBRI</i>	(0,46)**	(0,55)**	0,34*	0,35*	0,57**
<i>SMAD2</i>		(0,30)*	(0,11)	(0,14)	(0,25)
<i>SMAD3</i>			(0,30)*	(0,44)**	(0,24)
<i>SMAD4</i>				0,39*	0,16
<i>SMAD7</i>					0,04

Tab. 12 Korrelation der Genexpression für die durch 3 Gy induzierten Effekte in LCLs. Darstellungsmodus analog zu Tab. 10.

Neben den Korrelationen nach Behandlung mit TGF β 1 (Tab. 11) sowie 3 Gy (Tab. 12) sollten die entsprechenden paarweisen Beziehungen auch für die kombinierte Behandlung untersucht werden. Dies ist in Tab. 13 dargestellt. Am stärksten waren hier *TGFBRI* mit *CDKN1A*, gefolgt von *TGFBRI* mit *SMAD7*, *TGFBRI* mit *SMAD2*, *TGFBRI* mit *SMAD4* und *SMAD7* mit *CDKN1A* korreliert. Damit waren die jeweils deutlichsten Korrelationen bei den Einzelbehandlungen (*TGFBRI* mit *SMAD7* bei TGF β 1 bzw. *TGFBRI* mit *CDKN1A* bei 3 Gy) auch bei der Doppelbehandlung am stärksten ausgeprägt.

	<i>SMAD2</i>	<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD7</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>TGFBR1</i>	(0,54)**	(0,26)*	(0,43)**	0,63**	0,66**
<i>SMAD2</i>		(0,09)	(0,22)	(0,32)*	(0,33)*
<i>SMAD3</i>			(0,35)*	(0,20)	(0,21)
<i>SMAD4</i>				(0,37)*	(0,35)*
<i>SMAD7</i>					0,41**

Tab. 13 Korrelation der Genexpression für die durch TGFβ1 und 3 Gy induzierten Effekte in LCLs. Die Vorgehensweise entspricht der in Tab. 10 .

4.2.2 Reproduzierbarkeit von Genexpressionsänderungen in LCLs

Von LCLs ist die Problematik bekannt, dass die Effizienz der EBV-Transformation sehr heterogen ist. Dies wirkt sich auf das Wachstumsverhalten und den Metabolismus der Zellen aus. Hinzu kommt, dass sich die einzelnen Zelllinien während der Kultivierung verändern können. Daraus resultiert die bekannte Problematik, dass sich schwache bis mäßige Effekte – wie sie typischerweise für Genpolymorphismen zu erwarten sind – oft nur schwer reproduzieren lassen. Um konstante Faktoren wie Genpolymorphismen sinnvoll zu testen, müssen die funktionellen Parameter zu einem gewissen Grade reproduzierbar sein. Daher wurde gefordert, dass die an zwei unterschiedlichen Tagen erhobenen Funktionsmessungen nominal statistisch signifikant mit einem p-Wert $< 0,05$ korreliert sein sollten.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden für 11 LCL-Linien die Experimente komplett wiederholt. Dafür wurde jeweils ein neues Aliquot der Zellen aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut und somit sicher gestellt, dass Kulturzeit und Passagenanzahl mit der Erstmessung vergleichbar waren.

In Tab. 14 ist für sechs Zielgene die Korrelation der Expression zwischen den Wiederholungsmessungen aufgeführt. Dabei zeigten sich statistisch signifikante positive Korrelationen für das Kontrollniveau von *CDKN1A* und für die Induktion von *SMAD7* durch TGFβ1. Bei den Effekten von TGFβ1 auf die Expression des Rezeptors *TGFBR1* war eine nominale statistische Signifikanz nur bei nicht-parametrischer Analyse (nach Spearman's rho) zu sehen.

Gen		Kontrolle	<i>TGFBI</i> -K	3Gy-K	T3Gy-K
<i>CDKN1A</i>	Spearman's rho	0,67	0,27	0,18	0,43
	p-Wert Spearman	0,02	0,42	0,59	0,19
	Pearson r	0,61	0,14	0,50	0,53
	p-Wert Pearson	0,04	0,68	0,12	0,09
<i>SMAD2</i>	Spearman's rho	-0,31	0,40	-0,65	-0,06
	p-Wert Spearman	0,36	0,22	0,03	0,85
	Pearson r	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	p-Wert Pearson	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>SMAD3</i>	Spearman's rho	-0,14	-0,08	0,09	0,15
	p-Wert Spearman	0,69	0,81	0,79	0,67
	Pearson r	-0,14	0,20	-0,08	-0,06
	p-Wert Pearson	0,69	0,57	0,84	0,86
<i>SMAD4</i>	Spearman's rho	0,00	-0,23	0,25	0,30
	p-Wert Spearman	1,00	0,50	0,47	0,37
	Pearson r	0,12	-0,11	n.a.	0,39
	p-Wert Pearson	0,72	0,76	n.a.	0,23
<i>SMAD7</i>	Spearman's rho	-0,12	0,77	0,23	0,19
	p-Wert Spearman	0,73	0,005	0,50	0,57
	Pearson r	-0,11	0,77	n.a.	n.a.
	p-Wert Pearson	0,75	0,006	n.a.	n.a.
<i>TGFBR1</i>	Spearman's rho	0,30	0,72	0,36	0,64
	p-Wert Spearman	0,37	0,01	0,27	0,04
	Pearson r	0,29	0,50	0,28	0,52
	p-Wert Pearson	0,39	0,12	0,40	0,10

Tab. 14 Inter-Tag-Korrelation der Expressionsparameter für 11 LCLs. Für den zweiten Messtag wurden jeweils neue Aliquots aufgetaut. Es sind für das Kontrollniveau und für die drei Behandlungen in Relation zur Kontrolle die Korrelationen zwischen den beiden Messtagen aufgeführt. Diese Berechnungen basieren auf den Ct-Werten der *Real time*-Messungen (= $-\log_2$ [Transkriptzahlen]). Dadurch war in manchen Fällen eine Normalverteilung gegeben und der Korrelationskoeffizient nach Pearson konnte berechnet werden (ansonsten nicht anwendbar, mit n.a. abgekürzt). Nominal signifikante p-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

4.2.3 Zellvitalität

Dass Bestrahlung ab einer gewissen Dosis den Anteil der vitalen Zellen reduziert, ist zu erwarten. Es sollte hier das Ausmaß der Strahlenwirkung auf die LCLs, dessen Streubreite sowie ein möglicher additiver Effekt von TGFβ1 und Bestrahlung untersucht werden. Dazu wurden die bestrahlten und TGFβ1-behandelten Zellen im Brutschrank bei 37°C für 30 h inkubiert und dann der prozentuale Anteil an Propidiumiodid-negativen Zellen durch FACS-Messung ermittelt.

Der Anteil der auf diese Weise als vital ermittelten Zellen lag ohne Bestrahlung im Median bei etwa 83%, in den bestrahlten Proben bei etwa 70%. Dabei zeigte sich eine erhebliche, Zell-spezifische Variabilität. Bei den empfindlichsten Linien waren nach 3 Gy mehr als 50% der Zellen Propidiumiodid-positiv (d.h. nekrotisch). Demgegenüber war bei einer Zelllinie die Vitalität nach Bestrahlung nahezu identisch mit der zugehörigen Kontrolle und bei einer weiteren Linie wurde sogar eine leichte Zunahme des Anteils der vitalen Zellen beobachtet (um 1-4%).

Mit dem nicht-parametrischen paarweisen Rangsummentest nach Wilcoxon wurde geprüft, ob es zwischen zwei zu vergleichenden Bedingungen statistisch signifikante Unterschiede gab. Dabei hatte TGFβ1 keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellvitalität, sowohl ohne ($p = 0,7$) als auch mit Bestrahlung. Die Verminderung der Zellvitalität durch Bestrahlung war – wie erwartet – hoch signifikant (zwischen 3 Gy und Kontrolle bzw. zwischen TGFβ1 und TGFβ1+3 Gy jeweils $p = 2 \cdot 10^{-9}$).

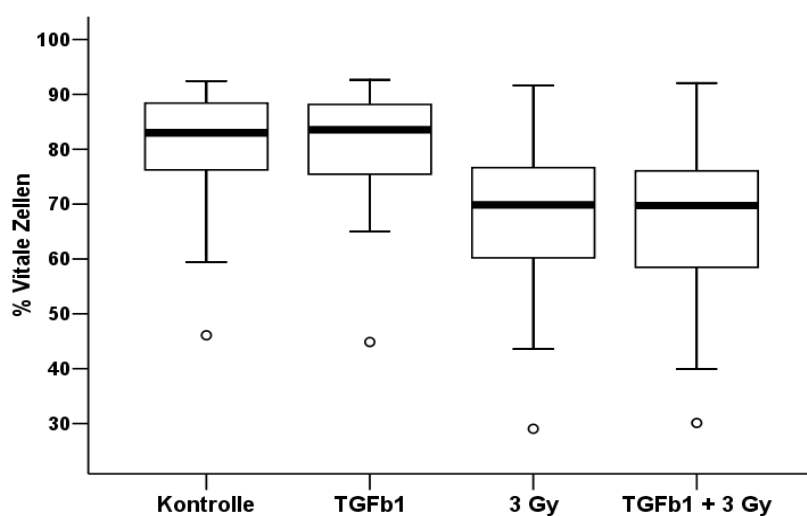


Abb. 7 Einfluss von TGFβ1 und 3 Gy-Bestrahlung auf die Vitalität von LCLs. Diese Messungen wurden an 48 LCLs nach einer Inkubationszeit von 30 h nach Bestrahlung mittels FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurde mit Propidiumiodid gefärbt und es konnten klar zwei Zellpopulationen – eine mit intakter und eine mit nicht intakter Zellmembran – differenziert werden. Die Konzentration an TGFβ1 betrug standardmäßig 5 ng/ml.

Ähnlich wie bei den Expressionsmessungen sollte auch hier analysiert werden, inwieweit sich das Ausmaß der beobachteten Behandlungseffekte auf die Zellvitalität für die einzelnen LCL-Linien reproduzieren lässt. Dies wurde als eine wesentliche Voraussetzung für ein sinnvolles Testen eines Einflusses genetischer Faktoren angesehen. Die Korrelationsanalysen für die Zellvitalität wurden hier mit 13 LCL-Linien vorgenommen.

Abb. 8 soll die Reproduzierbarkeit der Vitalität anhand der Wiederholungsmessungen zeigen. In der Inter-Tag-Korrelation der LCL-Zellen sieht man eine hohe Übereinstimmung der Zellvitalität. Wie bereits oben illustriert (Abb. 7) gab es keinen Nettoeffekt von TGF β 1 auf die Vitalität der LCL-Zellen und die Inter-Tag-Messungen für diese Behandlung waren nicht korreliert. Demgegenüber bestand für die beiden Messtage eine starke Korrelation der durch 3 Gy veränderten Zellvitalität, etwas schwächer auch bei der kombinierten Behandlung.

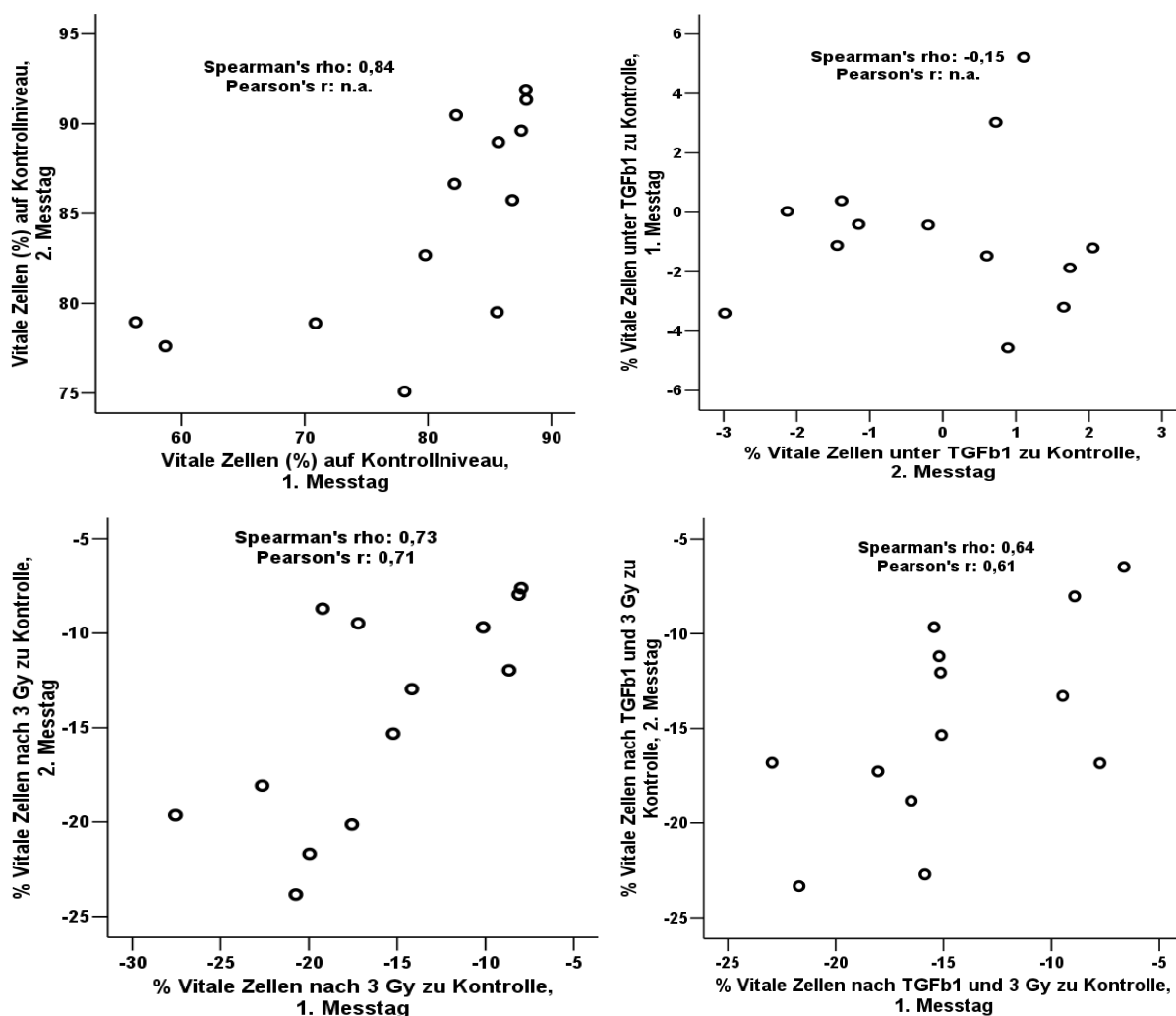


Abb. 8 Inter-Tag-Korrelationen der Zellvitalität bei den LCLs. Mit FASC-Messungen wurden die Anteile der vitalen, d.h. Propidiumiodid-negativen Zellen bestimmt. Jede der 13 LCL-Linien ist als ein Kreis repräsentiert, mit der Koordinate für den 1. Messtag auf der x-Achse und für den 2. auf der y-Achse. Es wurden der nicht-parametrische Spearman-rho-Koeffizient berechnet und bei Vorliegen einer Normalverteilung auch der Pearson r. Das obere linke Bild zeigt die Verhältnisse auf Kontrollniveau, die anderen für die durch die Behandlungen hervorgerufenen Veränderungen gegenüber der Kontrolle.

Weiterhin wurden paarweise Korrelationen zwischen den gemessenen Genexpressionen und der Zellvitalität verglichen. Dabei zeigte sich nur für die durch TGF β 1 induzierten Effekte eine nominal statistisch signifikante Beziehung zwischen der *CDKN1A*-Expression und dem Anteil der vitalen Zellen (Abb. 9). Unter TGF β 1-Behandlung hatte mehr *CDKN1A* tendenziell einen etwas geringeren Anteil an vitalen Zellen zur Folge (nicht-parametrisch $\rho = 0,31$, mit $p = 0,02$ und parametrisch $r = 0,33$ mit $p = 0,01$). Der Zusammenhang ist jedoch geringgradig und bei Berücksichtigung multipler Korrelationsvergleiche nicht statistisch signifikant.

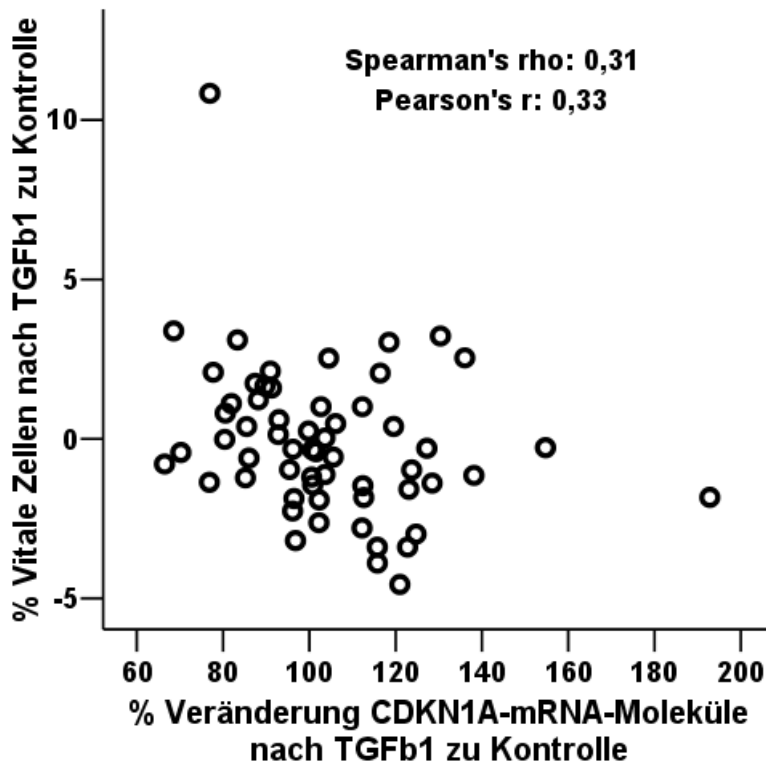


Abb. 9 Zusammenhang zwischen *CDKN1A*-Expression und Zellvitalität nach TGF β 1-Behandlung. Diese Daten basieren auf 59 Messreihen, wobei 11 LCLs doppelt gemessen wurden.

4.2.4 Assoziation mit Genvarianten

Die bei funktionellen Messungen beobachtete Variabilität setzt sich aus unterschiedlichen Komponenten zusammen: Bei den hier durchgeführten Analysen mit LCLs lässt sich diese Variabilität in einen für jede Zelllinie konstanten und einen veränderlichen Anteil unterteilen. Zu letzterem zählen z.B. Einflüsse durch die Anzahl der Passagen einer Zelllinie, sich verändernde Umgebungsbedingungen oder auch Varianzen bei der Erhebung der Messparameter. Der für jede Zelllinie konstante Anteil sollte zu einem gewissen Anteil die genetisch fixierte Variabilität widerspiegeln. Um also genetische Varianten auf einen möglichen Einfluss auf funktionelle Parameter zu testen, sollte ein substantieller Anteil der Messvariabilität konstant und damit zu einem wesentlichen Teil genetisch determiniert sein.

Wie Tab. 14 zu entnehmen, war eine signifikante Korrelation zwischen den für elf Zelllinien zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmten Expressionsmessungen nur für die Basalexpression von *CDKN1A* und insbesondere für die TGF β 1-induzierte Zunahme der *SMAD7*-Expression zu verzeichnen. Demzufolge wurden Varianten des *CDKN1A*-Gens mit dessen Expression auf Kontrollniveau verglichen. Da die Induktion von *SMAD7* durch TGF β 1 einen negativen Feedback-Mechanismus des TGF β -Signalwegs darstellt und über diesen Signalweg vermittelt wird, kommen als mögliche Kandidaten alle Gene in Frage, welche „upstream“ der *SMAD7*-Induktion liegen, d.h. unter anderem auch alle Komponenten des TGF β -Signalwegs.

Die in meiner Arbeit verwendeten LCLs gehören zu den Zellen, an welchen im Rahmen des HapMap-Projekts mittlerweile etwa 4 Millionen genetischer Positionen auf SNPs genotypisiert sind. Diese stellen gegenwärtig das am dichtesten durch genetische Varianten kartierte Kollektiv weltweit dar. Für die Assoziationsanalysen mit meinen funktionellen Daten wurden also die genetischen Polymorphismen dieser LCLs für die interessierenden Kandidatengene von der HapMap-Homepage (<http://www.hapmap.org>) heruntergeladen. Zuerst wurden die monomorphen Positionen, d.h. Loci ohne genetische Variabilität in den betrachteten 48 LCLs, von der weiteren Analyse aussortiert. Für die übrigen wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft, welches bis auf eine einzige Ausnahme bei allen SNPs erfüllt war. Übrig blieben dann insgesamt 470 SNPs in den Genen *CDKN1A*, *TGFBRI*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* und *SMAD7*.

Die LCL-Studie hatte explorativen Charakter. Bei der Vielzahl der getesteten Genotyp-Phänotyp-Assoziationen ist mit einer großen Zahl falsch positiver Befunde zu rechnen, wenn man das Signifikanzniveau von 0,05 anwendet, d.h. wenn die Wahrscheinlichkeit für ein

falsch positives Resultat bei 5% liegt. Um die Zahl falsch positiver Ergebnisse zu verringern, wurde ein Signifikanzniveau von 0,005 gefordert (nach Jonckheere-Terpstra-Trend-Test). Nach der sehr konservativen Bonferroni-Korrektur hätte man die Grenze von 0,05 durch die Anzahl der Tests dividieren müssen. Um dann aber noch einen interessanten Befund zu erhalten, müsste bei der begrenzten Fallzahl von 48 LCL-Linien eine Genvariante einen gewaltigen Effekt haben, was so nicht zu erwarten ist. Folgende Aspekte sollten bei der Bewertung der Festsetzung der Signifikanzgrenze auf 0,005 bedacht werden. Diese repräsentiert zwar nicht eine Adjustierung auf die tatsächlich durchgeführten Tests, minimierte aber erheblich die Zahl der scheinbar positiven Assoziationen verglichen mit einer Grenze von 0,05. Bei diesem Studienteil handelte es sich explizit um ein exploratives Vorgehen mit einer hohen Sensitivität, potenziell interessante Genvarianten tatsächlich zu erkennen unter Inkaufnahme eines hohen Risikos für falsch positive Ergebnisse. Die hier identifizierten Genvarianten bedürfen somit dringender funktioneller Validierung durch weitere Studien oder molekular-biologische Experimente. Nachfolgend werden folglich nur Assoziationen bei Unterschreiten des Signifikanzniveaus von 0,005 als relevant betrachtet.

4.2.4.1 CDKN1A

Auf basalem Expressionsniveau waren nur die Transkriptbestimmungen für *CDKN1A*, welches als Positivkontrolle für bestrahlungsinduzierte Genexpression diente, zwischen den Wiederholungsmessungen signifikant korreliert (Tab. 14). Somit stellte sich die Frage, ob Varianten im Genbereich von *CDKN1A* einen Einfluss auf dessen Expression haben. Eine signifikante Assoziation mit der oben definierten Grenze von 0,005 fand sich für keinen dieser Genotypen, weder in Bezug auf die Genexpression von *CDKN1A*, noch auf die Zellvitalität.

4.2.4.2 TGFBR1

Bei TGFBR1 war eine ganze Reihe von Genpolymorphismen mit der durch 3 Gy veränderten Genexpression von TGFBR1 und SMAD7 assoziiert (Abb. 10). Dass hier so viele Genvarianten als signifikant erschienen, ist in der sehr hohen genetischen Kopplung zwischen diesen Varianten begründet. Tatsächlich handelt es sich mehr oder weniger um eine einzige Assoziation, welche dem großen Block mit hohem Kopplungsungleichgewicht entspricht (dunkle Rauten unten in Abb. 10). Da es geringe Nuancen in diesem Kopplungsgrad gibt, konnte eine Variante identifiziert werden, welche noch ein wenig stärker als die übrigen mit beiden Expressionsparametern assoziiert war (durch Pfeile in Abb. 10 markiert). Die Effekte dieser Variante, rs10819635, waren auf die durch 3 Gy hervorgerufene Expressionsänderung

von *TGFBR1* und *SMAD7* praktisch gleich (siehe dazu auch Abb. 11). Es sollte hier allerdings berücksichtigt werden, dass die durch 3 Gy hervorgerufenen Transkriptionsänderungen von *TGFBR1* und *SMAD7* keine signifikante Korrelation zwischen zwei Messtagen zeigten (Tab. 14). Auf die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung hatten diese Genvarianten hingegen keinen Einfluss.

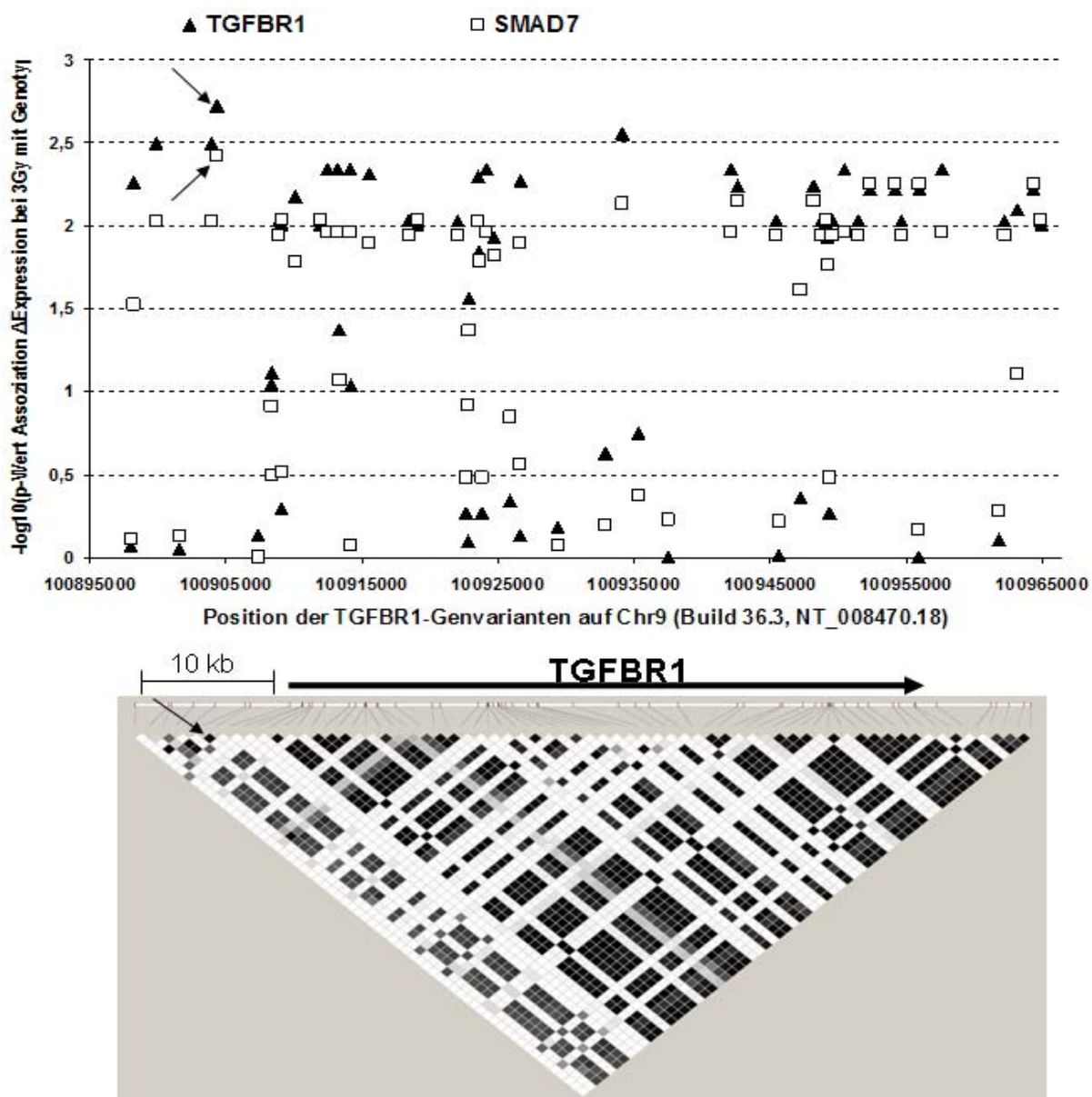


Abb. 10 *TGFBR1*-SNPs und Effekte von 3 Gy auf die Expression von *TGFBR1* und *SMAD7*. Es sind hier alle 64 SNPs mit mehr als einem Allel für die kaukasischen Proben der HapMap-Datenbank im Genbereich von *TGFBR1* einschließlich ± 10 kb flankierender Sequenzen dargestellt. Im oberen Bildteil ist der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes für die Assoziation zwischen Genotypen einerseits und den durch 3 Gy veränderten Genexpressionen von *TGFBR1* und *SMAD7* illustriert. Die p-Werte wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test errechnet. Das nominale statistische Signifikanzniveau von 0,05 entspricht dabei einem Wert von 1,3 auf der y-Achse, das hier verwendete Niveau von 0,005 einem Wert von 2,3. Unten findet sich der zugehörige Kopplungsplot der Genpolymorphismen. Je dunkler eine Raute gefärbt ist, desto stärker ist der genetische Kopplungsgrad zwischen den beiden betreffenden SNPs (Bild erstellt mit der Software HaploView). Die statistisch auffälligste Genvariante ist in beiden Bildteilen durch Pfeile markiert. Die beiden Teilbilder sind in den Positionen der SNP-Anordnung aufeinander abgestimmt.

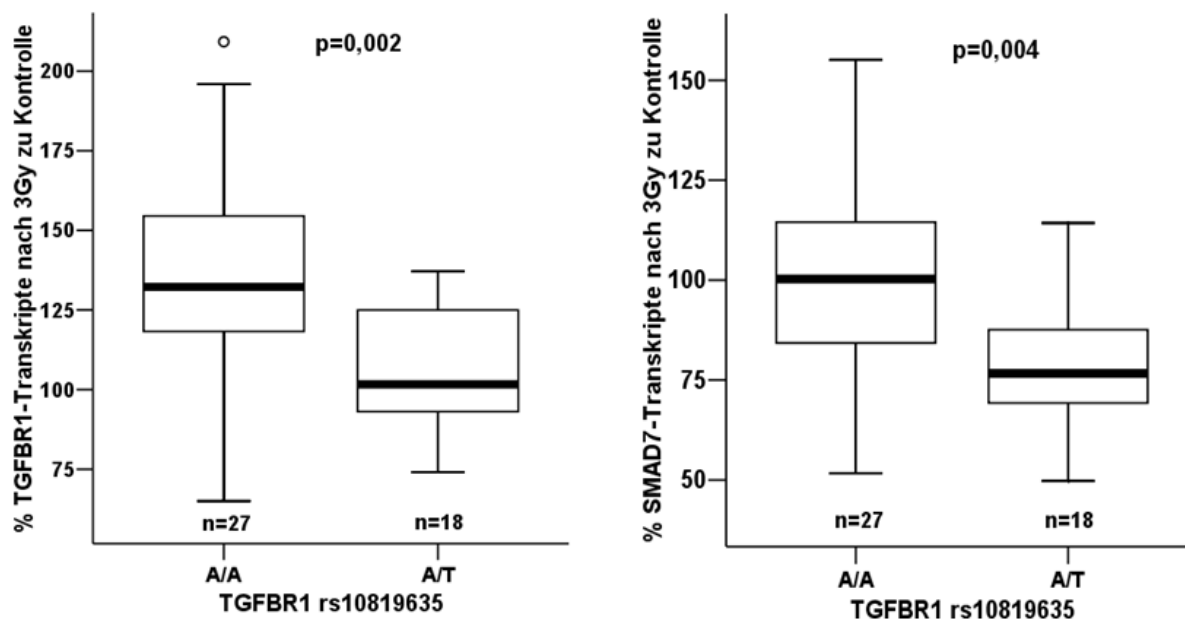


Abb. 11 Boxplots für den *TGFBR1*-SNP mit der stärksten Genotyp-Phänotyp-Assoziation. Es ist der Einfluss des SNPs *rs10819635* auf die durch 3 Gy veränderte Expression von *TGFBR1* (links) bzw. *SMAD7* (rechts) dargestellt. Die p-Werte wurden mit dem Test nach Jonckheere-Terpstra berechnet.

4.2.4.3 *SMAD3*

Das auffälligste Signal für eine Assoziation mit den gut reproduzierbaren Effekten von Bestrahlung auf die Zellvitalität (Abb. 8) ergab sich dabei für eine intronische *SMAD3*-Variante (Pfeil in Abb. 12). Der Einfluss dieses SNPs zeigte sich moderat bereits bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy und trat stärker hervor, wenn mit TGFβ1 vorbehandelt wurde (siehe auch Abb. 13). Dieser SNP, *rs17293408*, ist in Intron 1 des *SMAD3*-Gens lokalisiert und befindet sich in einer Region mit geringer genetischer Kopplung (helle Rauten im unteren Teil von Abb. 12).

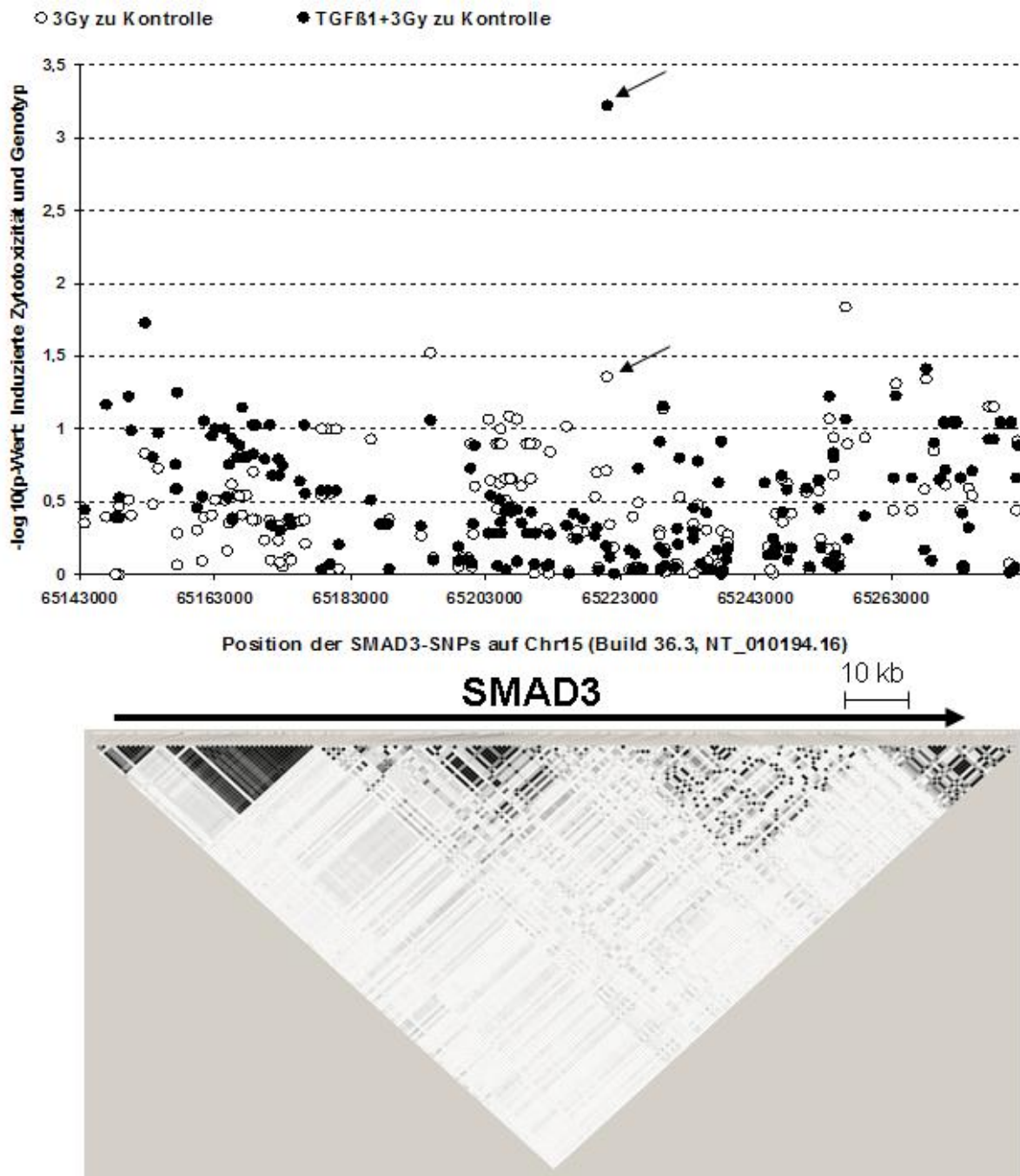


Abb. 12 Assoziation von *SMAD3*-SNPs mit der Strahlen-induzierten Zytotoxizität. Der Darstellungsmodus ist analog zu Abb. 10. Jedoch sind hier im oberen Bildteil zwei Funktionsparameter aufgeführt, die Zytotoxizität durch 3 Gy ohne und nach Vorbehandlung mit 5 ng/ml TGFβ1. Jede der 187 polymorphen Positionen im *SMAD3*-Gen einschließlich ± 10 kb flankierender Sequenzen ist somit durch einen Kreis für die Assoziation mit jedem der beiden Funktionsparameter repräsentiert. Die Pfeile kennzeichnen die auffälligste Genvariante.

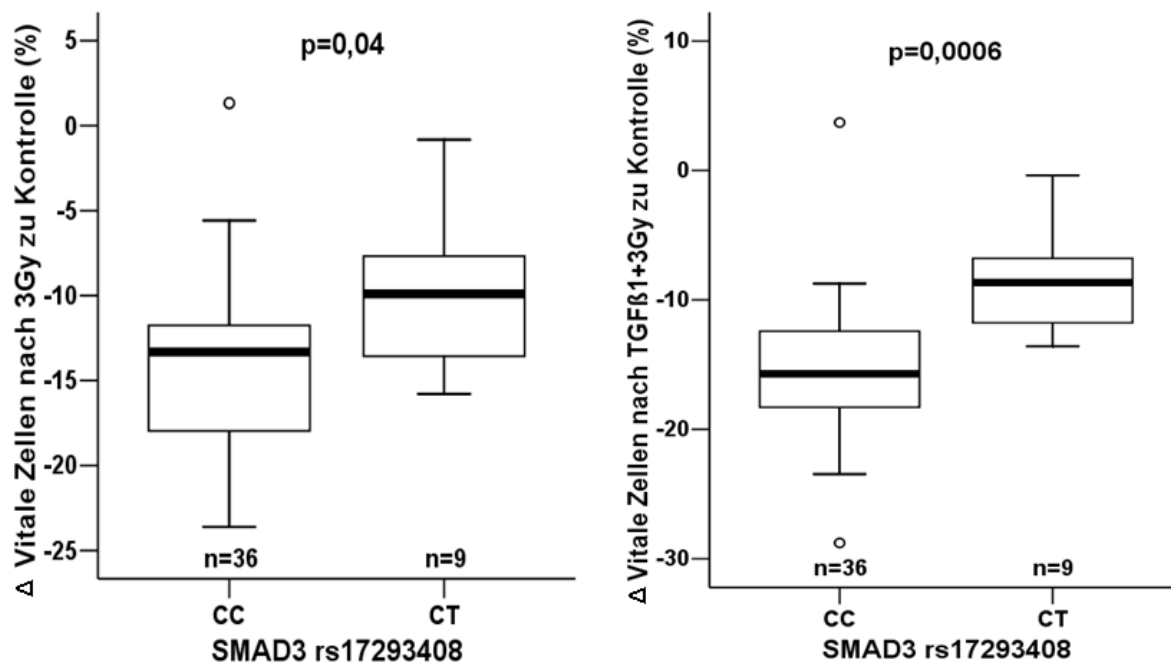


Abb. 13 Detaillierte Boxplots für die auffälligste *SMAD3*-Variante aus Abb. 12. Es ist hier der Einfluss dieser Variante auf die Kontroll-bereinigten durch 3 Gy ohne (links) bzw. nach 16 h Vorbehandlung mit 5 ng/ml TGFβ1 hervorgerufene Zytotoxizität veranschaulicht. Die statistische Testung erfolgte mit dem Jonckheere-Terpstra-Test (auch wenn hier nur zwei Genotypgruppen vorhanden) und die zugehörigen p-Werte sind eingetragen.

4.2.4.4 *SMAD7*

Die gut dokumentierte *SMAD7*-Induktion durch TGFβ1-Behandlung spiegelte sich auch in der besten Reproduzierbarkeit aller in dieser Arbeit in LCLs untersuchten Genexpressionsänderungen wider (Tab. 14). Für diesen Parameter fanden sich jedoch keine signifikant assoziierenden Genpolymorphismen im *SMAD7*-Gen.

Die Effekte von TGFβ1 auf die Vitalität der LCLs waren gering, bewegten sich auf Kontrollniveau (siehe Abb. 7) und korrelierten nicht zwischen den beiden Messtagen (Tab. 8). Dies ist bei der Assoziationstestung mit Genotypen zu bedenken. Im *SMAD7*-Gen konnte ein Cluster in Intron 3 von drei miteinander in hohem Kopplungsungleichgewicht stehenden SNPs identifiziert werden, welche die Effekte von TGFβ1 auf die Zellvitalität beeinflussten (Pfeil in Abb. 14 oben). Aus Abb. 15 ist zu ersehen, dass das Variantenallel eines dieser Polymorphismen, *rs12956924*, die Zellvitalität nach TGFβ1-Behandlung geringgradig steigerte, während die Variantenallele der beiden anderen SNPs einen gegenteiligen Effekt hatten.

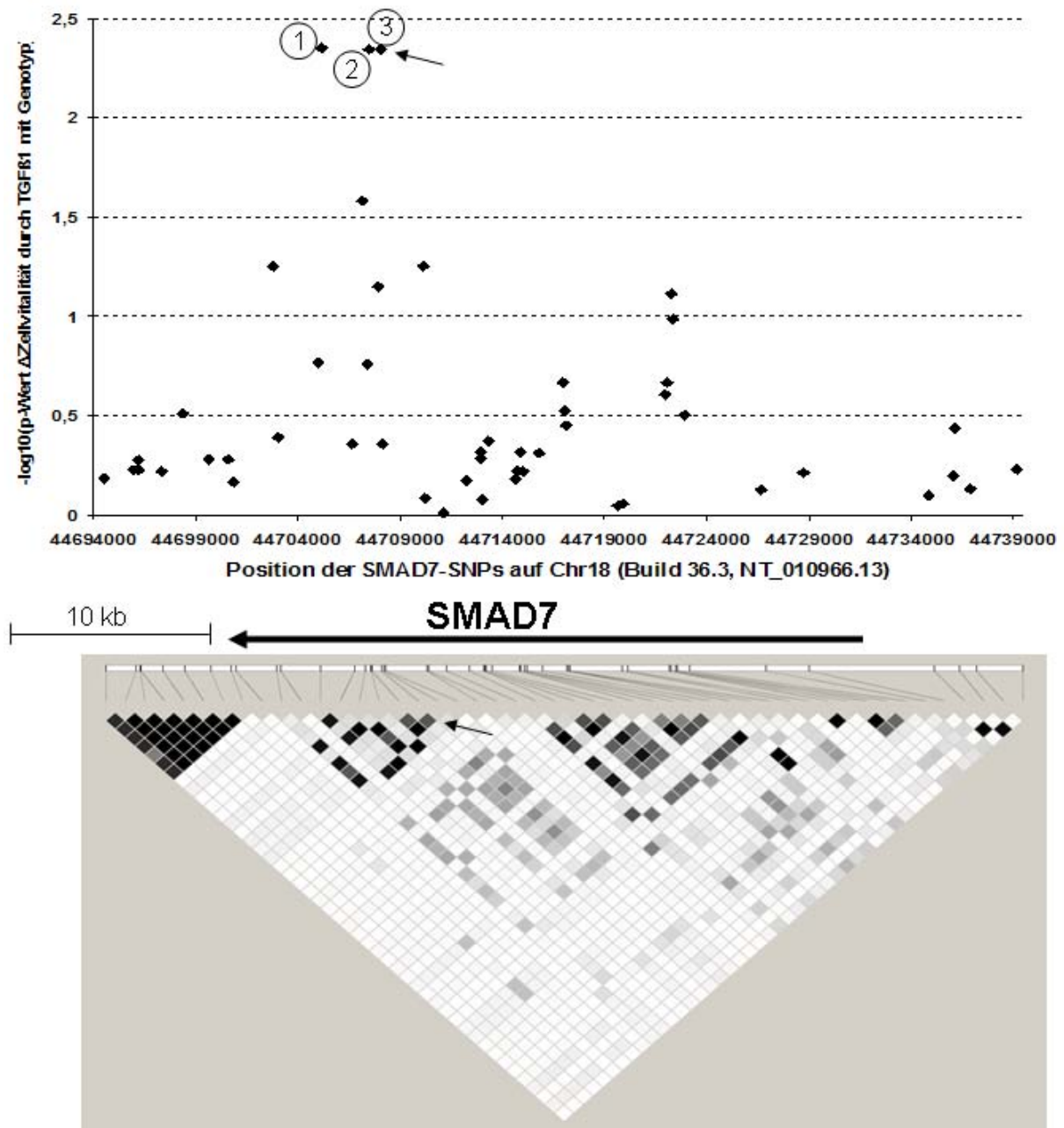


Abb. 14 Effekte von *SMAD7*-SNPs auf die Zellviitalitat unter TGFβ1. Das Prinzip der Darstellung ist wie zuvor in Abb. 10 und Abb. 12. Der betrachtete Genbereich erstreckt sich über das *SMAD7*-Gen ± 10 kb in 5'- und 3'-Richtung und beinhaltet 50 Genpolymorphismen. Die drei SNPs mit der stärksten Assoziation zur TGFβ1-modulierten Zellviitalitat sind mit den Ziffern „1“, „2“ und „3“ gekennzeichnet. Der Pfeil kennzeichnet die entsprechende Zuordnung zum Kopplungsplot im unteren Bildteil.

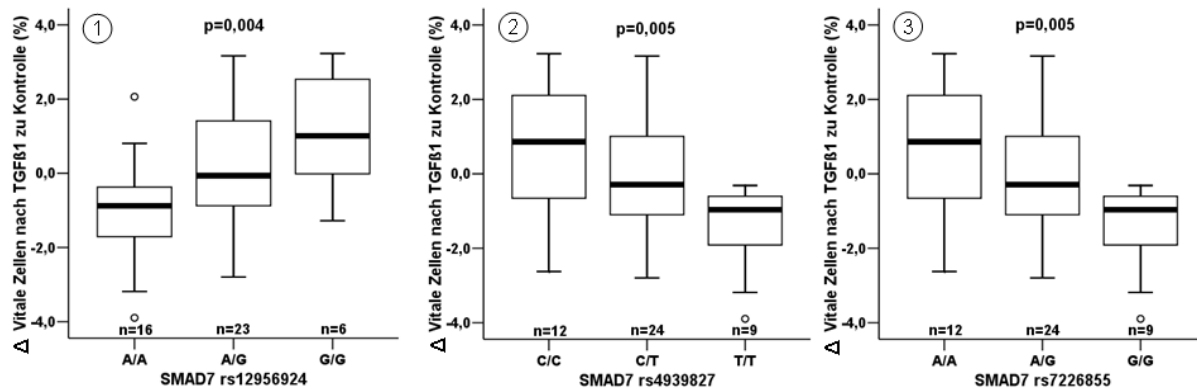


Abb. 15 Boxplots zur Veranschaulichung der am stärksten assoziierenden *SMAD7*-SNPs. Die Kennzeichnung mit den Ziffern „1“, „2“ und „3“ entspricht der in Abb. 14. Die p-Werte zur statistischen Bewertung des Einflusses dieser drei SNPs auf die durch TGFβ1 modulierte Zellvitalität (also in Relation zur unbehandelten Kontrolle) wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Test ermittelt.

4.2.4.5 *TGFBR2*, *SMAD2* und *SMAD4*

Varianten aus der HapMap-Datenbank in den Genbereichen von *TGFBR2*, *SMAD2* und *SMAD4* zeigten keine Effekte auf die gemessenen Funktionsparameter Genexpression und Zellvitalität, weder auf Basalniveau noch nach TGFβ1-Behandlung bzw. Bestrahlung.

4.3 T-Lymphozyten

Insgesamt wurden für diese Studie 100 unverwandte Probanden rekrutiert, von denen T-Lymphozyten (CD3⁺-Zellen) gewonnen wurden. Personen mit Infekten wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. Zusätzlich wurde ein Differenzialblutbild angefertigt, um bei größeren Auffälligkeiten im Nachhinein Proben von der Analyse ausschließen zu können. Obwohl phänotypisch nicht eindeutig erkennbar, wurden die Messwerte einer Probandin nicht berücksichtigt, da sie nicht kaukasischer Abstammung war und dies erst bei nochmaligem Durchsehen des Probandenfragebogens auffiel. Mit den T-Lymphozyten wurden vier unterschiedlichen Behandlungen in Duplikaten auf 12-Well-Platten (Kontrolle, 2 Gy, TGFβ1, und anti-TGFβ1) durchgeführt. Die Zellvitalität wurde 28 und 48 h nach Behandlung mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt (n = 99 primäre Zelllinien). Für die Genexpressionsmessungen gingen bei der RNA-Isolierung zwei Serien verloren, so dass hierfür die Zellen von 97 Probanden verwendet werden konnten.

4.3.1 Genexpression in T-Lymphozyten

Ziel war hier in Analogie zu den Untersuchungen mit Fibroblasten und LCLs die quantitative Bestimmung der Expressionsparameter von Genen des TGFβ-Signalwegs. Die Auswahl der Zielgene für die T-Lymphozyten orientierte sich an den Ergebnissen der beiden zuvor analysierten Zellarten. Somit wurden *SMAD3*, *SMAD7* und *TGFBR1* als Zielgene ausgewählt.

Eine Reduktion der Zahl der zu analysierenden Gene war in Anbetracht der großen Probenzahl dieses Studienteils (Probandenzahl multipliziert mit der Zahl der Behandlungen) und den daraus resultierenden Kosten für die *Real time*-Expressionsmessungen erforderlich. Außerdem wurden vier Referenzgene für jede Probe gemessen (*GAPDH*, *HPRT1*, *UBC* und *YWHAZ*).

Zunächst sollte die Variabilität der Expression der Gene *SMAD3*, *SMAD7* und *TGFBR1* auf Kontrollniveau dargestellt werden. Dies ist in Abb. 16 zu sehen. *SMAD3* zeigte dabei eine Streubreite um den Faktor 5, während diese bei *SMAD7* und *TGFBR1* nur bei Faktor 3 lag.

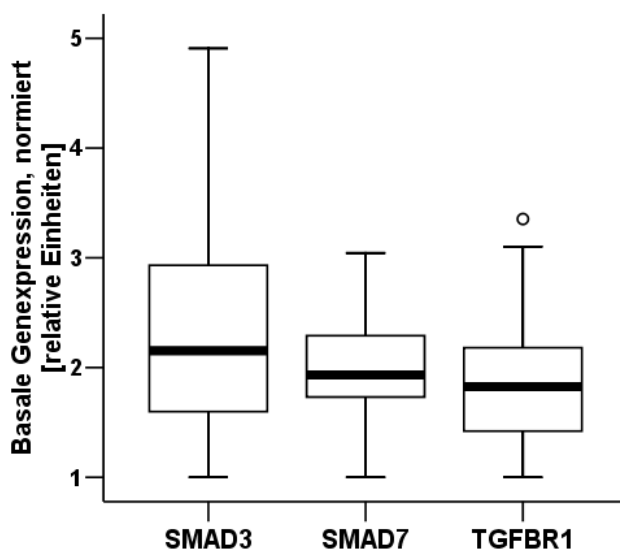


Abb. 16 Variabilität der Expression von *SMAD3*, *SMAD7* und *TGFBR1* auf Basalniveau in T-Lymphozyten. Die Rohdaten der Expressionsmessungen wurden zunächst auf das gewichtete Mittel der Referenzgene *GAPDH*, *HPRT1*, *UBC* und *YWHAZ* bezogen. Die so normierten Werte wurden für jedes der drei Zielgene in relativen Einheiten zum jeweils niedrigsten Wert ausgedrückt. Somit ist der Faktor der Gesamtvariabilität direkt aus dem Boxplot ablesbar. Die Zahl der Proben war jeweils $n = 97$.

Ein wichtiges Ziel war, festzustellen, ob die drei verschiedenen Behandlungen 2 Gy Bestrahlung, TGF β 1 und anti-TGF β 1 in den T-Lymphozyten gegenüber der Kontrolle statistisch signifikante Transkriptionsänderungen von Genen des TGF β -Signalwegs bedingen. Weiterhin interessierte das Ausmaß dieser etwaigen Veränderungen. Dazu wurden die Expressionsstärken der Gene *SMAD3*, *SMAD7* und *TGFBR1* nach 24 h Inkubation bei 37°C analysiert. In Abb. 17 sind deren prozentuale Anteile gegenüber der Kontrolle dargestellt.

Unter Berücksichtigung der Normierung auf *GAPDH*, *HPRT1*, *UBC* und *YWHAZ* führte die 2 Gy-Bestrahlung bei allen drei Zielgenen zu einer geringen bis mäßigen Expressionsabnahme; am deutlichsten war dies bei *SMAD3* der Fall, wenngleich auch hier die relative Abnahme im Median nur 11,2% betrug. Unter TGF β 1-Behandlung war bezüglich *SMAD3* eine Expressionsminderung im Median um 14,4% zu verzeichnen, während *SMAD7* (+72,8%) bzw. *TGFBR1* (+43,8%) deutlich zunahm. Diese Befunde waren statistisch hoch signifikant. Dennoch gab es auch hier einige wenige Zelllinien, bei denen ein entgegengesetzter Effekt zu beobachten war. Bei der Behandlung mit anti-TGF β 1 kam es bei *SMAD3*

zu einer Zunahme um 15,8%, wohingegen sich die Transkription von *SMAD7* um 34,8% verminderte und diejenige von *TGFBR1* sich gegenüber der Kontrolle nicht änderte.

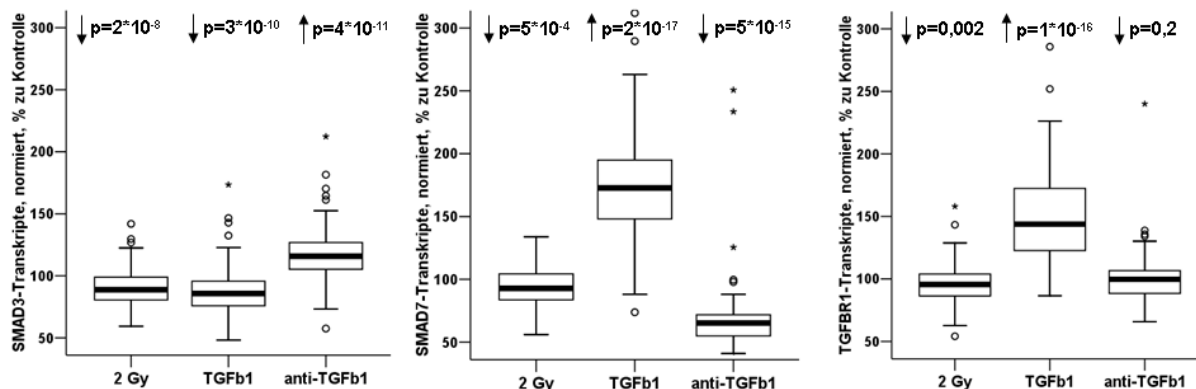


Abb. 17 Behandlungs-induzierte Expressionsänderungen von *SMAD3*, *SMAD7* und *TGFBR1* in T-Zellen. Es wurden jeweils 97 primäre T-Lymphozyten-Kulturen (10^6 Zellen/ml) mit 2 Gy, 5 ng/ml TGF β 1 und 250 ng/ml anti-TGF β 1 behandelt und nach 24 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank RNA asserviert. Die Rohdaten der Expressionsmessungen wurden zunächst auf ein gewichtetes Mittel der Referenzgene *GAPDH*, *HPRT1*, *UBC* und *YWHAZ* normiert. Die so erhaltenen Werte für die drei Behandlungen wurden als Transkriptzahlen auf die zugehörigen Kontrollen bezogen. Diese Prozentwerte sind in der Abbildung dargestellt, links für *SMAD3*, in der Mitte für *SMAD7* und rechts für *TGFBR1*. Die Testung auf statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Behandlungen zu den Kontrollen erfolgte paarweise mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Rangsummentest und die entsprechenden p-Werte sind eingetragen.

4.3.2 Zellvitalität in T-Lymphozyten

Neben den Einflüssen von Bestrahlung, TGF β 1 und anti-TGF β 1 auf die Genexpression (siehe 4.3.1) sollten auch die Effekte dieser Behandlungen auf die Zellvitalität gemessen werden. Dabei interessierte auch die Frage, ob eine Korrelation zwischen Genexpression von *TGFBR1*, *SMAD3* und *SMAD7* und Zellvitalität bestand.

Dazu war zunächst jede Behandlung als Duplikat auf 12-Well-Platten für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert worden. Danach wurde jeder dieser Ansätze in Doppelbestimmung auf eine schwarze 96-Well-Platte zu 40.000 Zellen/Well überführt (d.h. jede Behandlung war somit 4-fach auf dieser Platte repräsentiert). Nach Zugabe von AlamarBlue[®] wurde für weitere 4 bzw. 24 h bei 37°C inkubiert und nach diesen Zeiten (insgesamt 28 bzw. 48 h) jeweils das Fluoreszenzsignal gemessen.

Wie erwartet war die Zellvitalität nach 2 Gy-Bestrahlung vermindert. Obwohl statistisch hoch signifikant, war diese Abnahme vergleichsweise geringfügig (im Median nach 28 h um 7%, nach 48 h um 15% im Vergleich zur Kontrolle). Damit wurden frühere Befunde bestätigt, denen zufolge T-Lymphozyten eine besonders resistente Subpopulation der PBMCs darstellen (Campean 2007; Janke 2009). Auffällig war die stark signifikante Reduktion der Zellvitalität unter TGF β 1 (sowohl nach 28 als auch nach 48 h). Anti-TGF β 1 zeigte nach 28 h noch keine

Veränderung gegenüber der Kontrolle, nach 48 h war jedoch die Zellvitalität auch hier leicht vermindert (statistisch deutlich signifikant). Die behandlungsinduzierten Veränderungen der Zellvitalität waren zwischen den beiden Messzeitpunkten zwar statistisch sehr signifikant positiv miteinander korreliert, im Ausmaß aber eher mäßiggradig (Spearman-rho-Werte 0,46-0,54).

Ein Zusammenhang mit der Genexpression von *TGFBR1*, *SMAD3* und *SMAD7* bestand nicht, weder für die nach 28 noch nach 48 h Inkubation gemessene Zellvitalität.

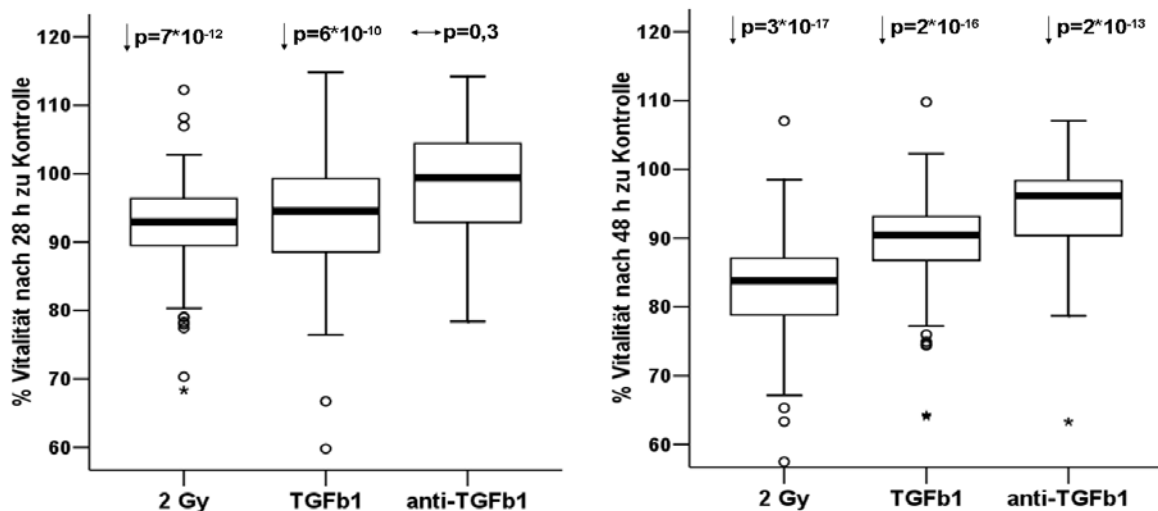


Abb. 18 Effekte von Bestrahlung, TGFβ1 und anti-TGFβ1 auf die Zellvitalität von T-Lymphozyten. 24 h nach den Behandlungen wurde AlamarBlue® dazugegeben. Die Fluoreszenz-Messung mittels TECAN Ultra-Mikroplattenlesegerät erfolgte nach weiteren 4 h (d.h. nach insgesamt 28 h Inkubation bei 37°C, linkes Bild, jeweils 91 Zelllinien) bzw. nach weiteren 24 h (insgesamt 48 h, rechtes Bild, jeweils 95 Zelllinien). Die Konzentrationen für die beiden Zytokine waren 5 ng/ml. Es sind jeweils die auf die mitgeführten Kontrollen bezogenen Messwerte angegeben. Diese sind ein Parameter der mitochondrialen Aktivität und spiegeln somit die Zellvitalität wider. Die p-Werte geben die statistische Signifikanz einer jeden Behandlung gegenüber der Kontrolle ab und wurden mit dem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest berechnet.

4.3.3 Assoziationen mit Genvarianten

Im TGFβ-Signalweg wurden 21 Genvarianten zur Genotypisierung ausgewählt. Diese Auswahl beruhte auf Genvarianten, für die in der Abteilung Klinische Pharmakologie bereits Assoziationen mit funktionellen Parametern (nominale Signifikanz mit $\alpha=0,05$) gefunden wurden bzw. die in der oben beschriebenen LCL-Studie assoziiert waren. In diesem Sinn sollte die hier angestellten Genotyp-Phänotyp-Assoziationen als Bestätigungsstudie für frühere Ergebnisse dienen. Dies umfasste eine Variante im Gen für *TGFBR2*, fünf für *TGFBR1*, sieben für *SMAD3*, fünf für *SMAD7* und drei für *SMAD4*. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht als Gütekriterium für die Genotypisierung war für alle untersuchten Genvarianten erfüllt. Die Kenndaten der analysierten Genvarianten für die T-Lymphozyten-Studie sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Gen	SNP	Genomische Lokalisation (Chromosom: Position ¹)	Genetisches Element	Basenaustausch	WT ²	Het ²	Var ²	MAF ³	Chi-Test ⁴ (HWE)
<i>TGFBR2</i>	<i>rs11466531</i>	3:30708842	3' UTR ⁵	G>C	94	9	0	0,04	0,9
<i>TGFBR1</i>	<i>rs10819635</i>	9:100904331	Promotor	A>T	62	28	6	0,21	0,5
<i>TGFBR1</i>	<i>rs11466445</i>	9:100907377	Exon 1	(GCG) ₃ >del ⁶	91	11	1	0,06	0,6
<i>TGFBR1</i>	<i>rs6478974</i>	9:100914224	Intron 1	A>T	26	56	21	0,48	0,7
<i>TGFBR1</i>	<i>rs10988716</i>	9:100926637	Intron 1	T>C	61	31	4	0,20	1,0
<i>TGFBR1</i>	<i>rs11568785</i>	9:100945655	Intron 5	A>G	92	11	0	0,05	0,8
<i>SMAD3</i>	<i>rs11632964</i>	15:65150627	Intron 1	A>G	23	62	18	0,48	0,1
<i>SMAD3</i>	<i>rs6494629</i>	15:65161165	Intron 1	A>G	26	54	23	0,49	0,9
<i>SMAD3</i>	<i>rs11856909</i>	15:65165087	Intron 1	G>A	34	43	17	0,41	0,9
<i>SMAD3</i>	<i>rs2118613</i>	15:65165461	Intron 1	G>C	26	58	19	0,47	0,4
<i>SMAD3</i>	<i>rs17293408</i>	15:65221112	Intron 1	C>T	97	15	0	0,07	0,8
<i>SMAD3</i>	<i>rs4776344</i>	15:65252417	Intron 5	G>A	88	14	1	0,08	0,9
<i>SMAD3</i>	<i>rs3743343</i>	15:65273829	3' UTR	T>C	53	42	8	0,28	1,0
<i>SMAD7</i>	<i>rs4939827</i>	18:44707461	Intron 3	T>C	29	47	27	0,49	0,7
<i>SMAD7</i>	<i>rs12953717</i>	18:44707927	Intron 3	C>T	36	46	21	0,43	0,7
<i>SMAD7</i>	<i>rs6507876</i>	18:44712919	Intron 3	A>C	89	12	2	0,08	0,2
<i>SMAD7</i>	<i>rs4464148</i>	18:44713030	Intron 3	T>C	52	41	10	0,30	0,9
<i>SMAD7</i>	<i>rs1873191</i>	18:44722249	Intron 3	A>G	44	49	10	0,33	0,8
<i>SMAD4</i>	<i>rs10502913</i>	18:46822269	Intron 2	G>A	67	30	6	0,20	0,6
<i>SMAD4</i>	<i>rs3764465</i>	18:46825370	Intron 2	T>C	44	45	14	0,35	0,9
<i>SMAD4</i>	<i>rs17663887</i>	18:46843716	Intron 9	T>C	83	19	1	0,10	1,0

Tab. 15 Charakteristik der 21 genotypisierten Varianten. ¹ Position auf dem jeweiligen Chromosom gemäß GeneBank-Version 36.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). ² Anzahl der Personen mit Genotypkonfiguration für homozygotes Wildtypallel (WT), für Heterozygotie (Het) oder für homozygotes Variantenallel (Var). ³ MAF = minor allele frequency (Häufigkeit des selteneren Allels, in der Spalte „Basenaustausch“ rechts des „>“-Symbols). ⁴ Chi-Quadrat-Test zur Prüfung des Hardy-Weinberg-Equilibriums (HWE). ⁵ UTR = untranslatierte Region. ⁶ del=Deletion.

Nachfolgend sind nun die Assoziationen der 21 analysierten Genotypen mit den funktionellen Parametern Genexpression von *SMAD3*, *SMAD7* und *TGFBR1* sowie Zellvitalität dargestellt. Da es sich hier um Validierungsexperimente zur Identifizierung funktioneller Genvarianten handelt, werden nur die Assoziationen als relevant betrachtet, die in ähnlicher Weise zuvor beobachtet wurden, d.h. entweder in bereits publizierten Daten (Schirmer et al. 2009) oder in einer früheren medizinischen Dissertationsschrift (Janke 2009) oder in meiner eigenen Serie mit LCLs (siehe oben). Die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Assoziationen sind nach Genen sortiert.

4.3.3.1 Assoziationen im *TGFBR2*-Gen

Für die Genvariante rs11466531 in der 3' untranslatierten Region von *TGFBR2* lagen keine konsistenten, signifikanten Zusammenhänge zwischen der genannten früheren Studie und meinen Daten vor, weder in Bezug auf Genexpressions-, noch auf Zellvitalitätsparameter.

4.3.3.2 Assoziationen im *TGFBR1*-Gen

Für eine 9bp-Deletionsvariante im Exon 1 von *TGFBR1* (*rs11466445*, Variante als *6A bezeichnet, Wildtyp-Allel als *9A) wurde bei Vorliegen des Variantenallels eine verringerte Reaktion der Expression von *SMAD*-Genen *downstream* des *TGFBR1* sowie eine reduzierten Zellvitalität in PBMCs nach Stimulation mit TGFβ1 bzw. Röntgenstrahlung postuliert (Schirmer et al., 2009).

In meiner Studie war die Zellvitalität nach TGFβ1-Behandlung bei Vorhandensein des *6A-Allels stärker gegenüber der Kontrolle vermindert als beim homozygoten *9A/*9A-Wildtyp (Abb. 19 links). Umgekehrt war in Gegenwart von *6A die Suppression von *SMAD7* durch anti-TGFβ1 (TGFβ1-neutralisierender Antikörper) schwächer ausgeprägt als bei *9A/*9A (Abb. 19 rechts). Ein signifikanter Einfluss auf die entsprechende Expressionsänderung von *SMAD7* durch TGFβ1 bestand jedoch nicht (Abb. 19 Mitte). Auf die Transkription der beiden anderen analysierten Gene (*TGFBR1* und *SMAD3*) hatte diese Genvariante keinen statistisch signifikanten Effekt. Der partiell mit der *6A-Variante gekoppelte SNP *TGFBR1 rs11568785* zeigte einen statistischen Trend zu einer leicht erhöhten basalen *TGFBR1*-Transkription ($p = 0,06$ nach Mann-Whitney-U-Test, Abbildung).

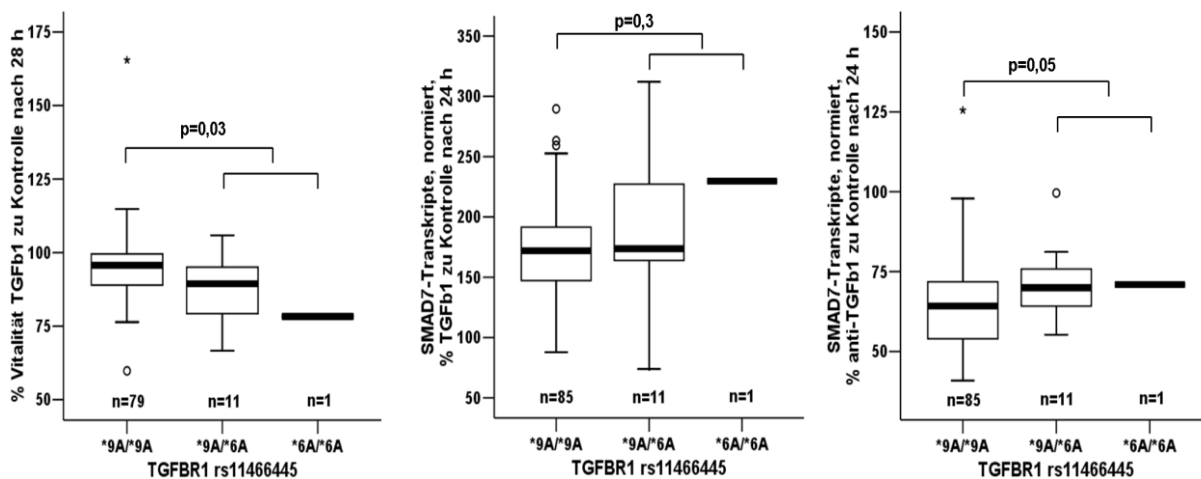


Abb. 19 Funktionelle Assoziationen der Variante *TGFBR1**6A. Links ist der Einfluss auf die Zellvitalität nach TGFβ1-Behandlung dargestellt, in der Mitte und rechts auf die Genexpressionsänderung von *SMAD7* nach TGFβ1 bzw. anti-TGFβ1. Die Inkubationszeiten waren 28 h bei der Zellvitalität (davon die letzten vier mit dem Nachweisreagenz AlamarBlue®) bzw. 24 h bei den Expressionsanalysen, jeweils bei 37°C. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt, wobei die eine Probe mit Homozygotie für *6A mit den Heterozygoten kombiniert und dem homozygoten Wildtyp gegenüber gestellt wurde. Zur Expressionsnormierung diente ein gewichtetes Mittel aus *GAPDH*, *HPRT1*, *UBC* und *YWHAZ*.

Eine weitere Variante in *TGFBR1* (*rs6478974*) zeigte in meiner Studie einen Einfluss auf die durch 2 Gy Bestrahlung veränderte *SMAD3*-Expression sowie die Zellvitalität. Dabei fanden sich in Abhängigkeit des T-Allels dieses SNPs nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle sowohl weniger *SMAD3*-Transkripte (Abb. 20 links) als auch eine stärker verminderte Zellvitalität (Abb. 20 Mitte und rechts, wobei 48 h nach Bestrahlung keine nominale statistische Signifikanz erreicht wurde).

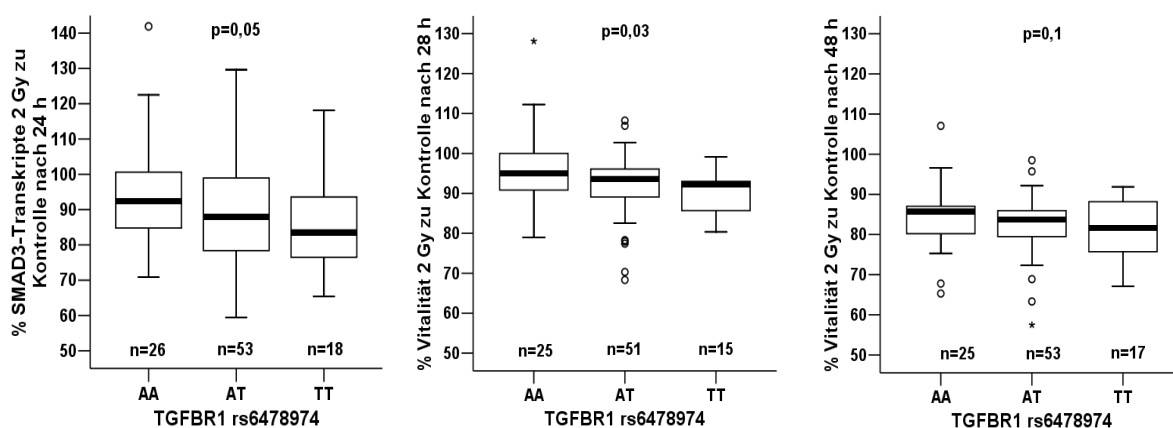


Abb. 20 Einfluss des SNPs *rs6478974* auf Strahlen-induzierte *SMAD3*-Transkription und Zellvitalität. Die mit 2 Gy behandelte Probe und die unbestrahlte Kontrolle waren bei 37°C 24 h (im Fall der Transkriptionsmessungen, linkes Bild) sowie 28 bzw. 48 h (davon die letzten 4 bzw. 24 h mit AlamarBlue®, mittleres und rechtes Bild) inkubiert worden. Wie oben wurden die Rohdaten der *SMAD3*-Expression auf ein gewichtetes Mittel aus *GAPDH*, *HPRT1*, *UBC* und *YWHAZ* normiert. Die statistische Testung erfolgte hier mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test, welcher die Zahl der Variantenallele von *rs6478974* berücksichtigt.

Für den oben beschriebenen Zusammenhang des SNPs *TGFBR1 rs10819635* mit der *SMAD7*-Expression nach Bestrahlung von LCLs (siehe Abb. 11 rechts) zeigte sich mit den CD3-Zellen zwar ein ähnlicher Trend (reduzierte Transkription beim Variantenallel), eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht ($p = 0,10$ nach Jonckheere-Terpstra-Trend-Test).

4.3.3.3 Assoziationen im *SMAD3*-Gen

Von den ausgewählten sieben *SMAD3*-SNPs zeigten fünf eine nominale statistische Signifikanz mit der Zellvitalität und/oder der Änderung der *SMAD3*-Genexpression infolge mindestens einer der drei durchgeführten Behandlungen (2 Gy-Bestrahlung, Inkubation mit 5 ng/ml TGF β 1 bzw. 5 ng/ml anti-TGF β 1). Dabei fiel auf, dass drei räumlich eng benachbarte SNPs am stärksten die Veränderung der Zellvitalität durch TGF β 1 beeinflussten (Abb. 21). Hinsichtlich einer Modulation der *SMAD3*-Expression war der stärkste Effekt durch *rs17293408* bei TGF β 1-Behandlung zu beobachten. Für diesen SNP hatten 84 meiner Probanden den Genotyp *CC* und 13 *CT*; homozygote *TT*-Träger fanden sich in diesem Kollektiv nicht. Bei Zellen mit *CC*-Genotyp war die TGF β 1-vermittelte *SMAD3*-Suppression deutlich stärker ausgeprägt als bei *CT*-Genotyp. Umgekehrt waren Zellen mit *CT* nach allen drei Behandlungen vitaler als mit *CC*, nominal signifikant für 2 Gy und anti-TGF β (in beiden Fällen $p = 0,04$), statistischer Trend für TGF β 1 ($p = 0,07$).

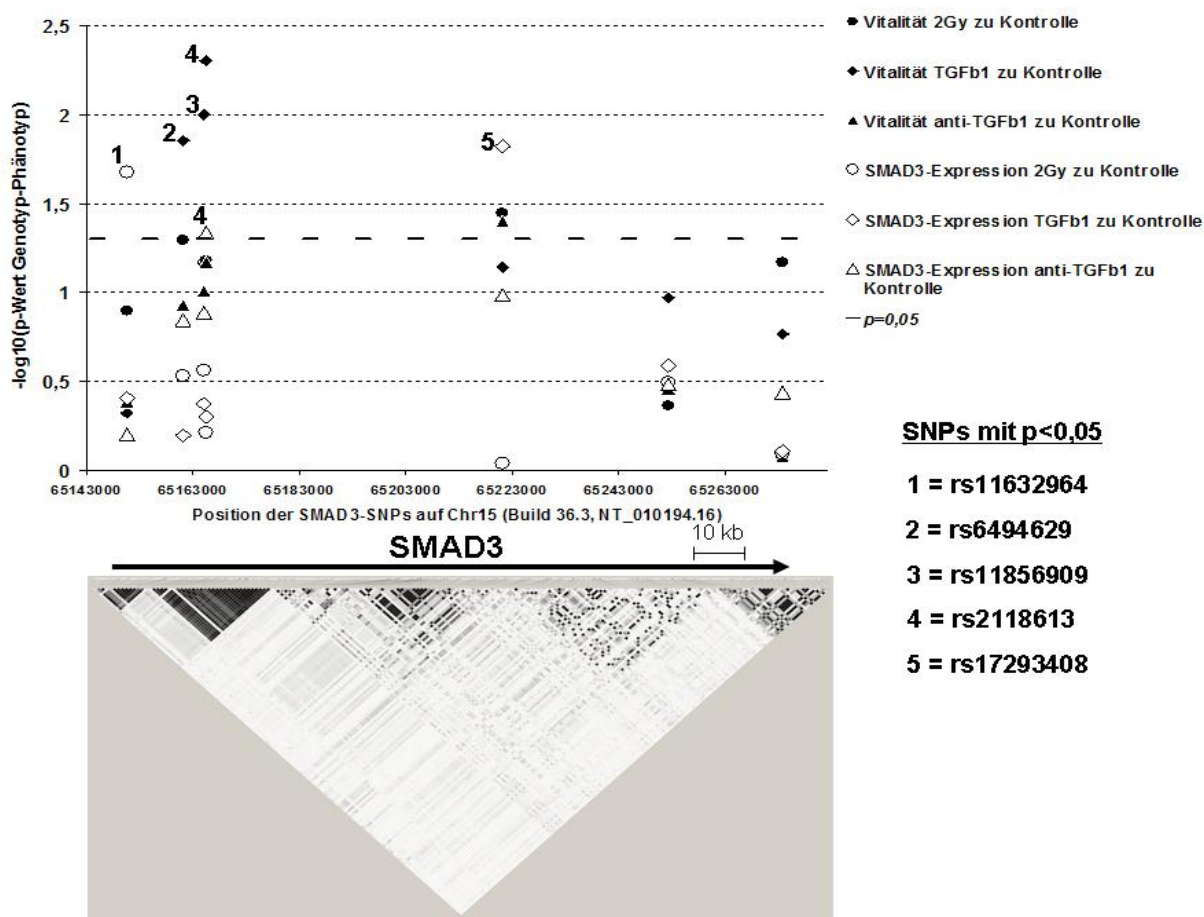


Abb. 21 Genotyp-Phänotyp-Assoziationen für die untersuchten sieben *SMAD3*-SNPs. In der oberen Bildhälfte ist der auf der x-Achse die SNP-Position, auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus der p-Werte (ermittelt mit Jonckheere-Terpstra-Trend-Test) zwischen dem jeweiligen SNP einerseits und den sechs Funktionsparametern andererseits aufgetragen. Das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. Den Positionen dieser SNPs entsprechend ist in der unteren Bildhälfte die genetische Variabilität als LD-Plot über den gesamten Bereich des *SMAD3*-Gens zugeordnet (Daten aus HapMap, dargestellt mit HaploView),

4.3.3.4 Assoziationen im *SMAD4*-Gen

Von den drei untersuchten SNPs im *SMAD4*-Gen war einer nominal signifikant mit einer veränderten Zellvitalität nach TGFβ1-Behandlung assoziiert. Bei Vorliegen des C-Variantenallels waren die CD3-Zellen – dem AlamarBlue[®]-Assay zufolge – nach 28 und 48 h Inkubation mit TGFβ1 etwas vitaler als beim *T/T*-Genotyp an dieser Position (Abb. 22).

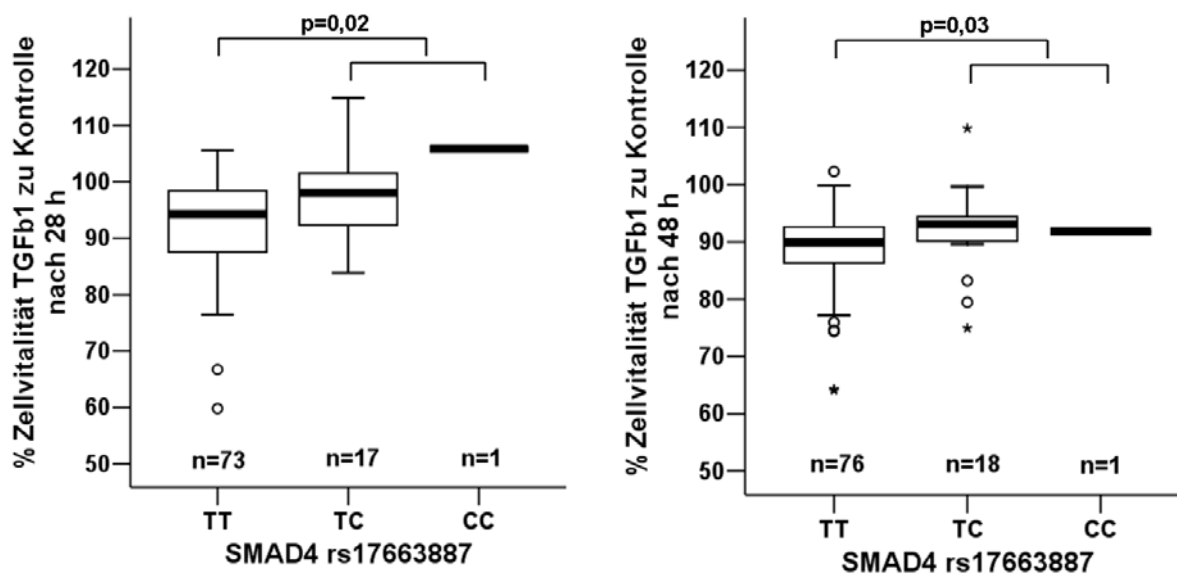


Abb. 22 Modulation der Zellvitalität unter TGFβ1 durch den SNP *rs17663887* im *SMAD4*-Gen. Die CD3-Zellen wurden 28 h (links) bzw. 48 h (rechts) lang mit 5 ng/ml humanem rekombinatem TGFβ1 bei 37°C inkubiert und dann zu diesen Zeitpunkten mittels AlamarBlue®-Assay die Zellvitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die statistische Testung erfolgte hier mit dem Mann-Whitney-U-Test, wobei die eine Probe mit CC-Genotyp mit dem heterozygoten Trägerstatus kombiniert wurde.

4.3.3.5 Assoziationen im *SMAD7*-Gen

Im *SMAD7*-Gen waren – früheren Daten und eigenen Ergebnissen mit LCLs entsprechend – fünf Genvarianten ausgewählt worden. Dabei fanden sich wenig signifikante Assoziationen mit den funktionellen Messparametern. Am plausibelsten erschienen erhöhte *SMAD7*- und *TGFBR1*-Expressionen (letztere statistisch zumindest als Trend) für das C-Variantenallel von *rs6507876* unter Einwirkung von TGFβ1 (Abb. 23). Es wurde nur ein homozygoter CC-Trägerstatus gefunden, welcher für die Auswertung mit den heterozygoten AC-Zellen kombiniert wurde. Die generell durch TGFβ1 beobachtete deutliche Induktion von *SMAD7* und *TGFBR1* (Abb. 17) wurde durch diese Genvariante somit noch verstärkt. Auffällig war zudem eine wesentlich stärkere Korrelation der Induktion von *SMAD7* und *TGFBR1* bei Vorliegen des Variantenallels (AC+CC, Pearson's $r = 0,72$) verglichen mit dem AA-Genotyp ($r = 0,39$). Die insgesamt durch TGFβ1 leicht verminderte Zellvitalität (Abb. 18) wurde durch diesen SNP nicht beeinflusst.

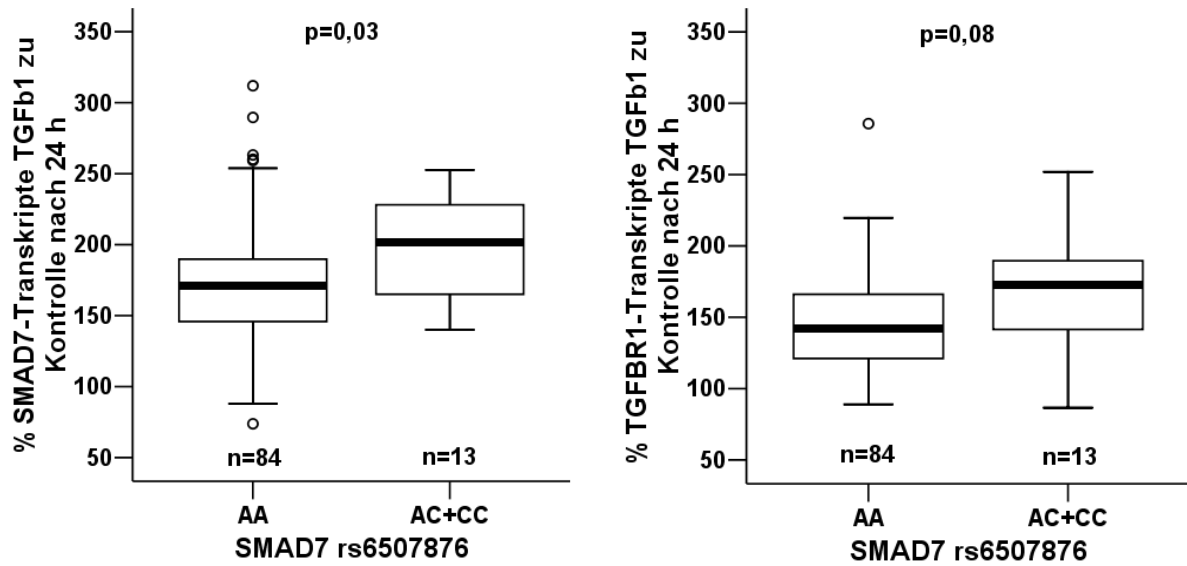


Abb. 23 Modulation der TGFβ1-vermittelten *SMAD7*- und *TGFBR1*-Induktion durch *SMAD7-rs6507876*. Nach 24 h Inkubation mit 5 ng/ml TGFβ1 bei 37°C wurde die gegenüber der Kontrolle veränderte Expression von *SMAD7* (links) bzw. *TGFBR1* (rechts) ermittelt und in Abhängigkeit der Variante *rs6507876* im *SMAD7*-Gen dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft.

5 Diskussion

5.1 Genexpressionsänderungen und Regulation

Ein Teilziel dieser Arbeit bestand darin, Genexpressionsänderungen im TGF β -Signalweg unter unterschiedlichen Stimuli zu analysieren. Auf diese Weise sollten auch Erkenntnisse über die Regulation der Genexpression gewonnen werden.

Als eine grundsätzliche Beobachtung fiel auf Kontrollniveau eine Reihe enger Korrelationen von Genen des TGF β -Signalwegs auf. Besonders ähnlich waren sich in dieser Hinsicht die beiden genetisch unveränderten Zelltypen. So waren bei den Fibroblasten die beiden Rezeptoren sehr stark miteinander korreliert, eine Beobachtung, die zuvor auch schon bei nativen PBMCs gemacht wurde (Schirmer et al. 2009). Einige Korrelationen in den Fibroblasten wurden durch Bestrahlung sogar noch verstärkt (zwischen *TGFBR1* und *TGFBR2*), andere wurden deutlich abgeschwächt (zwischen *TGFBI* und *CTGF*). Es ist bekannt, dass *CTGF* nicht nur über den TGF β -Signalweg reguliert wird, sondern dieses – auch unter physiologischen Bedingungen – im Sinne eines negativen *Feedback-Loops* auf diesen zurückwirkt (Wahab et al. 2005). Dies könnte ein Grund für die beobachteten Korrelationen zwischen *CTGF* mit *TGFBI* und *SMAD7* in unbehandelten Fibroblasten sein.

Man geht heute davon aus, dass strahleninduzierte Fibrose zunächst durch TGF β in Gang gesetzt wird, sich anschließend aber die *CTGF*-Induktion selbst unterhalten kann (Haydont et al. 2008). Etwas überraschend war daher die strahlendosisabhängige Suppression der *CTGF*-Transkription in Fibroblasten (Abb. 5). Ähnliches wurde allerdings auch nach *ex-vivo*-Bestrahlung von Fibroblasten mit UV-Licht berichtet. Im exakt identischen Zeitfenster von 24 h war dabei die mRNA von *CTGF* um 80% reduziert (Quan et al. 2002). Es ist noch unklar, ob ein Zusammenhang zwischen dieser initialen *CTGF*-Reduktion *ex vivo* und *in vivo* im Rahmen fibrotischer Prozesse der nach Bestrahlung einsetzenden Expressionssteigerung besteht (Vozenin-Brotons et al. 2003). In Blutzellen und aus diesen hergestellten LCLs ist *CTGF* praktisch nicht experimentiert. Dieser Fragestellung könnte weiter nachgegangen werden, indem in einer Folgestudie eine größere Zahl von Fibroblasten von Patienten mit einer Radiotherapie gewonnen werden. Diese Zellen sollten dann *ex vivo* bestrahlt und die entsprechenden Expressionsmuster mit den klinisch aufgetretenen Strahlentoxizitäten verglichen werden.

Bei den Genen des TGF β -Signalwegs war in bestrahlten Fibroblasten eine milde, aber signifikante Induktion von *SMAD2* nachweisbar. Außer der Positivkontrolle *CDKN1A* war

dieses Gen bei den Fibroblasten das einzige, dessen Transkription nach Bestrahlung erhöht war. Dies deckt sich sehr gut mit entsprechenden Daten von *ex vivo* bestrahlten PBMCs (Schirmer et al. 2009). Im Gegensatz dazu stellten sich die Ergebnisse für die LCLs dar: *SMAD2* war hier nach Bestrahlung nicht induziert, auch *SMAD3* und *SMAD4* waren weitgehend unverändert (und nicht wie bei den Fibroblasten induziert). Sogar umgekehrt verhielt es sich mit *TGFBR1*, welcher bei den Fibroblasten unter Bestrahlung weniger, bei den LCLs aber vermehrt transkribiert wurde (Abb. 6), wenngleich in beiden Fällen die Effektmaße eher moderat waren. In der Literatur wurde argumentiert, dass eine Abnahme von *TGFBR1*-mRNA ein Indiz für Empfindlichkeit, eine Zunahme hingegen für Resistenz auf Bestrahlung ist und somit ein Biomarker zur Differenzierung sein könnte (Mauduit et al. 2001). Die hier untersuchten Zelllinien lassen diesen Schluss allerdings nicht zu, da nach Bestrahlung die Zellvitalität der LCLs stärker reduziert war (Abb. 7) als bei den T-Lymphozyten (Abb. 18).

In Bezug auf *SMAD7* fand sich eine Parallelität zwischen den LCLs und den T-Lymphozyten, welches in diesen beiden Zelltypen durch Bestrahlung supprimiert wurde (siehe Abb. 6 und Abb. 17), nicht jedoch in den Fibroblasten. Die Stärke dieses Effektes ist aber gering, weshalb dieser möglicherweise zuvor bei der inhomogenen Mischpopulation der LCLs nicht detektiert wurde (Schirmer et al. 2009). Eine Verminderung von *SMAD7* in T-Lymphozyten als Reaktion auf Bestrahlung könnte zu einer Disinhibition des TGF β -Signalwegs beitragen (Kunzmann et al. 2003). Da sich TGF β selbst induzieren kann, könnte eine erhöhte Stimulation des TGF β -Signalwegs zu einer vermehrten TGF β 1-Produktion und Initiierung eines profibrotischen Signals führen (Schultze-Mosgau et al. 2006).

5.2 Effekte von TGF β auf die Zellvitalität

Bei T-Lymphozyten verminderte TGF β 1 die mit dem AlamarBlue[®]-Assay bestimmte Zellvitalität (Abb. 18). Dies steht in Einklang mit früheren Befunden in der Abteilung Klinische Pharmakologie (Janke 2009) und mit Literaturberichten, denen zufolge TGF β 1 auf aktivierte T-Lymphozyten pro-apoptotisch wirkt (Chung et al. 2000). Auf Grund des durch die Isolierprozedur hervorgerufenen Stresses ist eine Aktivierung der T-Lymphozyten naheliegend. Die Hypothese, dass eine Antagonisierung von TGF β 1 durch einen neutralisierenden Antikörper die Zellvitalität erhöhen könnte, wurde aber nicht bestätigt. Bei den LCLs hatte TGF β 1 keinen Effekt auf die durch FACS-Messungen ermittelte Apoptoserate, weder als einzige Behandlung noch in Kombination mit Bestrahlung (Abb. 7).

5.3 Identifizierung und Validierung funktioneller Genvarianten

In einem Genom-weiten Ansatz sollten zunächst neue potenziell funktionelle Genvarianten im TGF β -Signalweg identifiziert werden. Dazu sollten Assoziationsanalysen zwischen funktionellen Messparametern (Genexpressionsänderungen, Zellvitalität) einerseits und Genvarianten andererseits durchgeführt werden. Als Untersuchungsmaterial wurden hierfür LCLs aus dem HapMap-Projekt verwendet, welches aktuell das am dichtesten auf genetische Varianten untersuchte menschliche Kollektiv darstellt. Von den in unserem Labor vorhandenen 59 LCLs konnten leider nur 48 erfolgreich in Kultur gebracht werden. Ein weiteres Problem stellte die funktionelle Variabilität innerhalb der einzelnen LCLs dar. Ist diese zu stark ausgeprägt, werden Assoziationsanalysen mit Genotypen unmöglich. Daher wurde für 13 LCLs der funktionelle Endpunkt „Zellvitalität“ wiederholt, wobei die Zelllinien das Experiment von Beginn an komplett zweimal durchlaufen hatten. Besonders für den Untersuchungsfaktor „Bestrahlung mit 3 Gy“ zeigte sich eine stark positive Korrelation zwischen den beiden Messtagen (Abb. 8), d.h. es lag eine substantielle Reproduzierbarkeit der Daten für die einzelnen Zelllinien vor. Somit konnten Genotyp-Phänotyp-Analysen durchgeführt werden. Dabei wurden die Genotypen der HapMap-Datenbank für die zellgebundenen Komponenten des klassischen TGF β -Signalwegs (die beiden Rezeptoren *TGFBR1* und *TGFBR2* sowie die Signaltransduktionsmoleküle *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* und *SMAD7*) mit den Genexpressions- und Apoptosemessungen der LCLs in Beziehung gesetzt. Anschließend wurden diejenigen Genvarianten in der Lymphozyten-Studie auf Funktionalität überprüft, welche entweder im Genom-weiten Ansatz mit den LCLs oder aus früheren Studien mit Lymphozyten nominal signifikante Assoziationen mit Funktionsmessungen zeigten.

5.3.1 TGFBR2

Für Genvarianten im *TGFBR2* konnten keine signifikanten Assoziationen nachgewiesen werden, weder bei T-Lymphozyten noch bei LCLs. In diesem Genbereich liegt nur wenig genetische Kopplung vor. Diese geringe Konservierung könnte ein Hinweis auf das Fehlen funktionell relevanter Genpolymorphismen in diesem Gen sein.

5.3.2 TGFBR1

Im *TGFBR1* sind über einen weiten Bereich viele Varianten eng miteinander gekoppelt und bilden einen großen Block mit hohem Kopplungsungleichgewicht (Abb. 10 unten). Die SNPs dieses Blocks waren mit der durch 3 Gy veränderten Genexpression von *TGFBR1* und

SMAD7 assoziiert (Abb. 10 oben). Die nominale stärkste Assoziation zeigte dabei der SNP *rs10819635* in der Promotorregion von *TGFBR1* (Abb. 11). Interessanterweise war die verminderte Genexpression in Gegenwart des Variantenallels unabhängig davon, ob das Gen beim Wildtyp durch Bestrahlung induziert (bei *TGFBR1*) oder supprimiert (bei *SMAD7*) war. Allerdings ist hier zu bedenken, dass die bestrahlungsinduzierten Genexpressionsänderungen in den LCLs zwischen zwei Messtagen nicht korreliert waren. Ein Zusammenhang zwischen einer *TGFBR1*-Variante und der *SMAD7*-Expressionsregulation erscheint jedoch durchaus plausibel, da *SMAD7* über den TGF β -Signalweg reguliert wird (Kunzmann et al. 2003). Bei den T-Lymphozyten war dieser Effekt ebenfalls in Bezug auf die Bestrahlungs-vermittelte Änderung der *SMAD7*-Expression zu sehen (wenngleich nur als statistischer Trend). Allerdings fehlte eine Assoziation mit der entsprechenden *TGFBR1*-Genexpressionsänderung bei T-Lymphozyten. Daher bleibt noch fraglich, ob der SNP *rs10819635* tatsächlich funktionell ist.

In der Literatur gibt es eine Reihe von Berichten, die eine klinische Bedeutung einer Deletionsvariante im Signalpeptid von *TGFBR1* (*6A) besonders bei kolorektalen Karzinomen nahelegen (Bian et al. 2007; Pasche et al. 2005; Xu und Pasche 2007). Weiterhin wurde eine Hypofunktionalität mit erhöhter Apoptoseempfindlichkeit beschrieben (Schirmer et al. 2009). Diese Hypothese kann hier zumindest dadurch unterstützt werden, dass die physiologische Suppression von *SMAD7* bei Antagonisierung von TGF β 1 in Gegenwart des *6A-Allels schwächer ausgeprägt war (Abb. 19 rechts). Der zuvor postulierte Effekt auf die Zellvitalität nach Bestrahlung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies kann jedoch auch in einer unterschiedlichen Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials (sortierte T-Lymphozyten in meiner und PBMCs in der früheren Studie) und in einem anderen Nachweisverfahren (AlamarBlue[®]-Assay gegenüber Apoptose mittels Durchflusszytometrie) bedingt sein. In Anbetracht der Fülle der Prozesse, in die TGF β involviert ist, muss von kontext- und zelltypabhängigen Effekten von *6A ausgegangen werden.

Bei den T-Lymphozyten war eine weitere Genvariante, *rs6478974*, nach Bestrahlung mit einer verminderten *SMAD3*-Expression und einer geringeren Zellvitalität assoziiert (Abb. 20). Ein Effekt dieses Polymorphismus unter vergleichbaren Bedingungen (T-Lymphozyten, Art und Dosis der Bestrahlung sowie Inkubationszeiten) war in der Abteilung Klinische Pharmakologie bereits beobachtet worden (bislang unveröffentlichte Daten), allerdings in umgekehrter Richtung: Das A-Allel dieses SNPs ging damals mit einer geringeren *SMAD3*-Transkription infolge 2 Gy-Bestrahlung einher, in meinen Daten mit einer höheren. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass ich in meiner Studie umgekehrte Allelfrequenzen dieses

SNPs im Vergleich zu den Datenbankeinträgen und der erwähnten Vorstudie gefunden habe: 55% gegenüber 45% des A-Allels, was jedoch noch innerhalb der Streubreite liegt. Nach Feststellung dieser Diskrepanz wurden die Genotypdaten nochmals kontrolliert. Eine Fehlkodierung konnte ausgeschlossen werden. Somit kann dieser gegensätzliche Befund gegenwärtig nicht geklärt werden und eine Funktionalität dieser Variante ist somit eher zweifelhaft.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die postulierte Hypofunktionalität von *TGFBR1*6A* (Schirmer et al. 2009) auch hier bestätigt werden konnte, wenngleich auch Kontextspezifische Effekte zu beachten sind. Der SNP *rs10819635* erscheint als ein lohnender Kandidat für zukünftige Untersuchungen, da die Befunde in den T-Lymphozyten und den LCLs hier sehr ähnlich waren. Dass bei letzteren eine nominale statistische Signifikanz nicht erreicht wurde, ist in Anbetracht der Frequenz des selteneren Allels von 21% und der nur 48 zur Verfügung stehenden LCLs verständlich. Bei der dritten Variante (*rs6478974*), bei welcher sich die Daten meiner Studie entgegengesetzt zu denen einer früheren Studie verhielten, muss zum jetzigen Zeitpunkt eher von einem Zufallsbefund ausgegangen werden.

5.3.3 SMAD3

Im folgenden soll eine mögliche Funktionalität der fünf *SMAD3*-SNPs aus Abb. 21 in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den LCLs und einer früher durchgeführten Studie sowie der Literaturlage kritisch beleuchtet werden.

Bei den LCLs zeigte der SNP *rs17293408* in der kombinierten Behandlung aus TGFβ1 und Bestrahlung das mit Abstand stärkste Signal (Abb. 12 und Abb. 13). Das seltenere Allel ging mit einer reduzierten Strahlenempfindlichkeit einher, auch bei der alleinigen Bestrahlung. Bei den T-Lymphozyten war dasselbe Allel ebenfalls mit einer höheren Vitalität nach Bestrahlung verbunden (Abb. 21). Außerdem war in der oben bereits erwähnten früheren Studie der Abteilung Klinische Pharmakologie eine geringere Apoptoserate mit 2 Gy bestrahlter T-Lymphozyten für dieses Variantenallel beobachtet worden (hier allerdings nur ein statistischer Trend mit $p = 0,097$). Die molekularen Mechanismen hinter dieser Beobachtung sind noch unklar, auch gibt es in der Literatur noch keine Berichte über eine Funktionalität dieses SNPs. Ein möglicher Deutungsansatz zur molekularen Wirkweise dieser Variante könnten die Ergebnisse nach spezifischer TGFβ1-Stimulation liefern. Während diese Behandlung insgesamt ein geringgradige, aber hoch signifikante Reduktion der *SMAD3*-Expression bewirkte (Abb. 17), war dies bei den Variantenträgern von *rs17293408* nicht der Fall. Es scheint, dass bei Vorliegen dieses Allels der TGFβ-Signalweg in seiner Funktion verändert,

möglicherweise weniger „responsiv“ ist. Die konsistenten Effekte auf die Zellvitalität in drei unabhängigen Studien (siehe nachstehend Abb. 24) lässt diese Variante als interessanten Kandidaten zur Prüfung in klinischen Studien erscheinen.

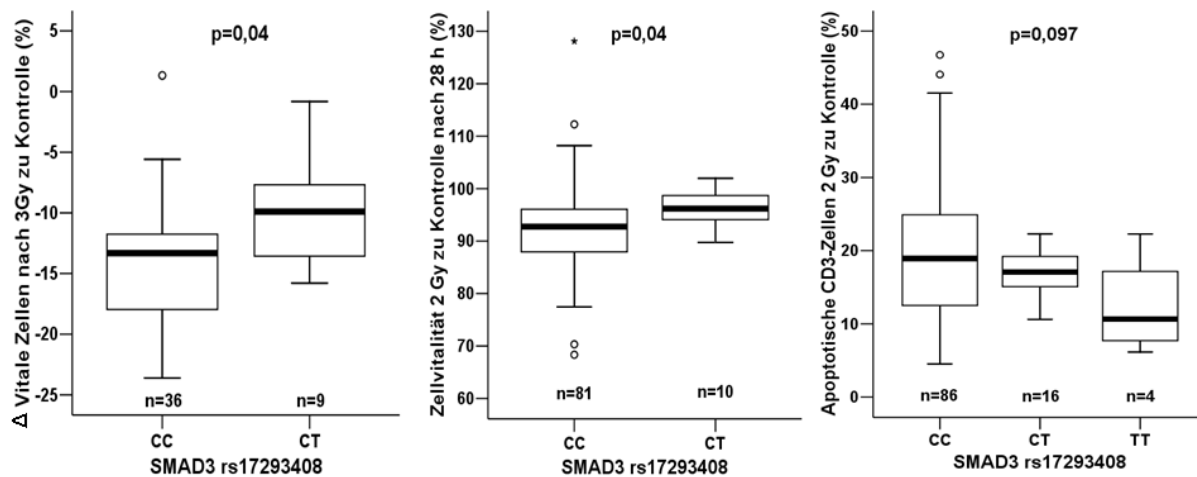


Abb. 24 Reproduzierbarer Effekt von *SMAD3* *rs17293408* auf die Zellvitalität nach Bestrahlung. Im linken (LCL-Studie) und mittleren Bild (eigene T-Lymphozyten-Studie) ist die Variante mit einer erhöhten Zellvitalität und im rechten Bild (frühere T-Lymphozyten-Studie) entsprechend mit einer geringeren Apoptoserate assoziiert. In meinen Studien fanden sich keine *TT*-Homozygotie, hier erfolgte die statistische Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test, im rechten Bild mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test.

Ein weiterer SNP in *SMAD3*, *rs11632964*, zeigte in meiner Lymphozyten-Studie einen Effekt auf die *SMAD3*-Transkriptionsänderung nach Bestrahlung (weniger Transkripte bei Vorliegen des Variantenallels). Jedoch waren für diese Behandlungsbedingung keine vergleichbaren Zusammenhänge bei den LCLs oder der früher durchgeführten Lymphozyten-Studie feststellbar. Deshalb und auch in Anbetracht fehlender Literaturdaten wird diesem SNP aus jetziger Sichtweise keine größere Bedeutung zugemessen. Allerdings ist hier anzumerken, dass bei der früheren Studie neben Lymphozyten auch noch andere mononukleäre Blutzellen (insbesondere Monozyten) in den gemessenen Proben enthalten waren. Wenngleich die Lymphozyten den Hauptteil dieses Zellgemisches ausmachten, muss mit Anteilen anderer Zelltypen in der Größenordnung von 10% gerechnet werden, was eventuell einen Einfluss auf das Ergebnis haben könnte.

Die drei anderen *SMAD3*-SNPs, *rs6494629*, *rs11856909* und *rs2118613*, bilden ein Cluster eng miteinander gekoppelter SNPs, d.h. zwischen diesen liegt ein hoher Grad an LD, *linkage disequilibrium*, vor (r^2 paarweise $> 0,6$). Die nachfolgende Diskussion konzentriert sich daher auf einen dieser SNPs, auf *rs11856909*, für den bereits zuvor ein reproduzierbarer Einfluss auf die Zytotoxizität der Bestrahlung nachgewiesen wurde (Janke 2009, Abb. 25 links und

Mitte). Dieser Befund einer stärkeren Strahlenresistenz bei Homozygotie für das A-Variantenallel konnte nun erneut bestätigt werden (Abb. 25 rechts). Im Vergleich dazu war die Strahlenresistenz (gemessen 48 h nach 2 Gy) bei den homozygoten Allelen von *rs6494629* und *rs2118613* etwas schwächer ausgeprägt als bei *rs11856909*. Durch die wiederholte Reproduzierbarkeit des Einflusses von *rs11856909* auf die strahlenvermittelte Zellvitalität sollte dieser SNP nun unbedingt in klinischen Studien mit Strahlentherapie geprüft werden. Die vorliegenden ex-vivo-Daten scheinen so robust zu sein, dass eine nominale statistische Signifikanz trotz unterschiedlicher Versuchs- und Messbedingungen (Nekrose von PBMCs, Apoptose von nicht-sortierten T-Lymphozyten und AlamarBlue®-Assay mit sortierten T-Lymphozyten) belegt werden konnte. Bei der Suche nach mechanistischen Erklärungen fand sich kein Zusammenhang zwischen diesem SNP und der *SMAD3*-Genexpressionsänderung nach Bestrahlung, weder in meiner noch in den vorangegangenen Studien mit PBMCs. Nur bei den LCLs zeigte sich auf Basalniveau ein Trend zu einer geringeren *SMAD3*-Expression in Gegenwart des A-Allels ($p = 0,06$). Da dies aber bei den primären Blutzellen aller drei Studien nicht der Fall war, kann die Beobachtung bei den LCLs hier nicht eingeordnet werden. In der Literatur ist dieser SNP bislang nicht beschrieben.

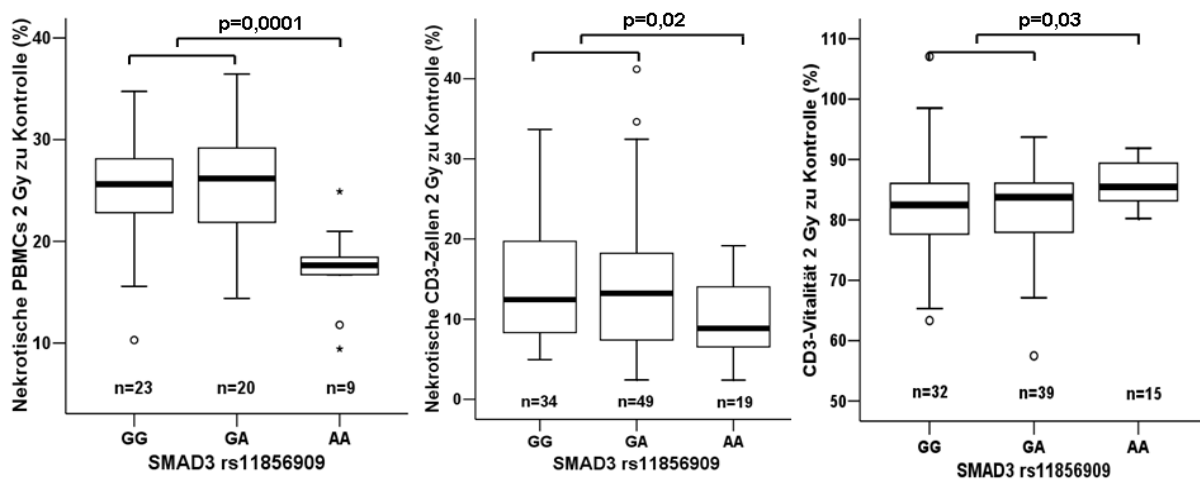


Abb. 25 Mehrfach bestätigte Assoziationen des *SMAD3*-SNPs *rs11856909* mit zellulärer Strahlenresistenz. Das linke und mittlere Bild zeigen mit FACS gemessene Nekroseraten aus zwei früheren Studien, das rechte die mit AlamarBlue® bestimmte Zellvitalität in meiner Studie. Strahlendosis (2 Gy) und Inkubationszeiten (48 h) und waren in allen drei Studien identisch. Ebenso wurden grundsätzlich als Phänotyp die Strahlen-induzierten Veränderungen betrachtet. Die statistische Testung erfolgte unter der Annahme eines rezessiven Effektes des A-Allels mittels Mann-Whitney-U-Test.

5.3.4 SMAD4

In der Validierungsstudie mit sortierten T-Lymphozyten wurde eine nominale statistische Signifikanz nur zwischen *rs17663887* und der Zellvitalität unter TGFβ1-Einfluss beobachtet. Dies deckte sich jedoch nicht mit den Vorstudien, in denen ein Effekt dieses SNPs auf die

basale *SMAD7*-Expression postuliert wurde. Zusammenfassend gesagt, liegt hier der Schluss nahe, dass es für die hier untersuchten Bedingungen in *SMAD4* eher keine funktionell bedeutsamen Genvarianten gibt. Während *SMAD4*-Mutationen in Krebszellen häufig sind (z.B. Lazzereschi et al. 2005; Maliekal et al. 2003; Woodford-Richens et al. 2001a; Woodford-Richens et al. 2001b), konnte für ererbte Polymorphismen in diesem Genbereich bislang keine Funktionalität nachgewiesen werden (Milet et al. 2007).

5.3.5 SMAD7

SMAD7-Polymorphismen könnten eine Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome spielen, wie zunächst durch einen Genom-weiten Ansatz identifiziert (Broderick et al. 2007), durch Resequenzierung fokussiert (Pittman et al. 2009) und später durch gezielte Genotypisierung von *SMAD7* repliziert (Slattery et al.). Zu diesem als „Risiko-Region“ identifizierten Genbereich gehören auch die stark miteinander gekoppelten SNPs *rs12956924*, *rs4939827* und *rs7226855*. Diese SNPs beeinflussten in meiner LCL-Studie zwar nicht die *SMAD7*-Expression, aber die Zellvitalität nach TGF β 1-Stimulation (Abb. 15), wenngleich sich keine Korrelation des funktionelle Parameters bei Wiederholungsmessungen für 13 LCLs zeigte. Daher muss die Hypothese, ob diese SNPs den TGF β -Signalweg modulieren, auf Grund dieser Daten sehr zurückhaltend formuliert werden, umso mehr, als in den kaum noch teilungsfähigen peripheren Blutleukozyten ein entsprechender Einfluss dieser SNPs gegeben war, weder in meiner noch in den zuvor durchgeführten Studien. Im Unterschied zu den drei vorgenannten SNPs war in den T-Lymphozyten die TGF β 1-induzierte *SMAD7*-Expression in Gegenwart des Variantenallels von *rs6507876* stärker als beim Wildtyp (Abb. 23). Eine Bestätigung dafür fand sich aber nicht in den beiden früheren Studien mit PBMCs. Allerdings war ein ähnlicher Effekt von *rs6507876* auf die *SMAD7*-Transkription in den LCLs zu beobachten mit $p = 0,1$ (alleinige TGF β 1-Behandlung) und $p = 0,02$ (TGF β 1 und anschließend 3 Gy). Möglicherweise war dieser Effekt zuvor durch das heterogene PBMC-Gemisch maskiert. Eine klinische Bedeutung dieses SNPs ist bislang jedoch nicht bekannt.

5.4 Überlegungen zur Vergleichbarkeit der durchgeführten Studien

Die hervorragende Reproduzierbarkeit zweier Genotypassoziationen mit der Zytotoxizität von Bestrahlung in drei unabhängigen Kollektiven primärer peripherer Leukozyten ist ein starkes Argument für deren Vergleichbarkeit, auch dann, wenn Versuch- und Messbedingungen sich etwas unterscheiden. Umgekehrt ließen sich zwischen diesen Studien auf mRNA-Ebene kaum Assoziationen reproduzieren. Das könnte dadurch bedingt sein, dass in den beiden früheren

Studien die RNA aus dem gesamten Zellgemisch der PBMCs und nicht wie in meiner Arbeit aus einer homogenen Population isolierter T-Lymphozyten gewonnen wurde. Für die Erfordernis eines möglichst homogenen Zelltyps bei Expressionsanalysen spricht auch die partielle Übereinstimmung von Daten aus den LCLs und den isolierten T-Lymphozyten. Umgekehrt lassen sich zytotoxische Effekte auf die LCLs nur sehr bedingt mit denen auf primäre und kaum noch teilungsfähige Zellen vergleichen (Konsistenz nur für die Assoziation einer *SMAD3*-Variante). Inwieweit die hier verwendeten Zelltypen repräsentativ für das einer Strahlentherapie exponierte Normalgewebe *in vivo*, oder gar für die Tumorzellen sind, müsste durch zukünftige Studien untersucht werden.

5.5 Kritische Auseinandersetzung

Die Stärken dieser Arbeit liegen in einer multimodalen Charakterisierung der durch Röntgenstrahlung hervorgerufenen Änderungen in der Expression von Genen des TGF β -Signalwegs und der Zellvitalität sowie deren Beeinflussung durch Keimbahn-Polymorphismen in Genen dieses Signalwegs. Dies wird deutlich durch

- den Vergleich unterschiedlicher Zelltypen
- die Verwendung weitgehend homogener Zellpopulationen als Untersuchungsmaterial: Fibroblasten, LCLs, Isolierung der T-Zell-Fraktion aus peripheren Leukozyten
- die Verwendung umfassender Genotypen bei den LCLs
- die Kombination aus explorativem Vorgehen (bei den LCLs) und Validierung ausgewählter SNPs (bei den T-Lymphozyten)
- den Abgleich der Daten mit Ergebnissen früher durchgeführter Studien zu diesem Themenkomplex.

Mit dieser kombinierten Vorgehensweise sollte einerseits möglichst kein potenziell funktioneller Polymorphismus in den betrachteten Genen übersehen werden, andererseits aber die durch das multiple Testen eklatante Gefahr falsch positiver Befunde reduziert werden. Durch diese Strategie konnte die Assoziation einer *SMAD3*-Variante mit der Strahlenempfindlichkeit nun ein drittes Mal belegt werden, wodurch die funktionelle Bedeutung dieser Variante oder einer mit ihr genetisch gekoppelten sehr wahrscheinlich ist.

Aus technischer Sicht ist besonders hervorzuheben, dass die durchflusszytometrisch gemessenen Effekte von Bestrahlung auf die Vitalität von LCLs erstaunlich gut zwischen zwei Messtagen korrelierten. Dies ist insbesondere beachtenswert, wenn man die stark

heterogene Proliferation dieser Zellen bedenkt, was bei den häufig verwendeten Zellvitalitätsassays ein erhebliches Problem darstellt. Eine Reihe von Kriterien belegt die Qualität der Genexpressionsmessungen (nur geringe Toleranz zwischen den Doppelbestimmungen, eindeutige Schmelzpunktkurve zum Nachweis eines spezifischen Produktes, Eichgerade zur Dokumentation eines guten dynamischen Bereichs bei der Amplifikation der Produkte, Verwendung eines gewichteten Mittels mehrerer Referenzgene zur Normalisierung).

Es sollte auch auf einige Schwächen dieser Arbeit hingewiesen werden, die sowohl konzeptioneller als auch biologisch-technischer Art waren. Die Zahl der Fibroblasten war zu klein, um außer den Effekten auf die Genexpression auch die Beeinflussung durch Genpolymorphismen untersuchen zu können. Eine kleine Fallzahl ist auch kritisch bei den LCLs, insbesondere in Hinblick auf die große Zahl der explorativ getesteten Genotypen, wengleich diese Problematik durch die Selektion weniger Gene im Vergleich zu einer Genom-weiten Analyse erheblich reduziert wurde. Leider standen mir zu diesem Zeitpunkt keine größeren Zahlen von LCL-Kulturen zur Verfügung. Biologischerseits waren insbesondere die Effekte auf die Genexpression in LCLs (abgesehen von der *SMAD7*-Induktion durch $TGF\beta 1$) zwischen zwei Messtagen nicht reproduzierbar, was die Aussagekraft von Assoziationsanalysen mit Genvarianten an dieser Stelle einschränkt. Insgesamt gesehen hat meine Arbeit jedoch einige interessante und robuste Befunde erbracht, die weitere wissenschaftliche Untersuchungen nahelegen, z.B. die Erhöhung der Strahlenresistenz durch eine *SMAD3*-Variante.

5.6 Ausblick

Die Ergebnisse meiner Arbeit sollen dem besseren Verständnis der funktionellen und genetischen Variabilität im $TGF\beta$ -Signalweg dienen. Die hier gefundenen Assoziationen sollten in klinischen Studien überprüft werden. Der gegenwärtigen Literaturlage zufolge wäre ein Zusammenhang z.B. mit den Nebenwirkungen einer Strahlentherapie denkbar. Weiterhin könnten die hier beschriebenen Polymorphismen auch Marker einer individuellen Strahlenempfindlichkeit sein. Dies gilt insbesondere für die nun in drei *in-vitro*-Studien nachgewiesene erhöhte Strahlenresistenz bei Vorliegen einer intronischen *SMAD3*-Variante. Die einer funktionellen Assoziation zu Grunde liegenden Mechanismen sollten, nach Bestätigung in klinischen Studien, durch eingehende molekular-biologische Untersuchungen geklärt werden. Das würde auch ein besseres Verständnis der komplexen biologischen

Prozesse fördern, was letztlich auch zur Optimierung von Therapien oder gar zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen kann.

6 Zusammenfassung

Der TGF β -Signalweg ist in eine Vielzahl biologischer Funktionen involviert und daher relevant für eine Fülle von Krankheitsbildern. Dazu zählen kardiovaskuläre, neurologische, onkologische Erkrankungen wie auch therapiebedingte Nebenwirkungen wie die strahleninduzierte Fibrose. Der klassische TGF β -Signalweg besteht aus Liganden (z.B. TGF β 1), zellmembrangebundenen Rezeptoren (TGF β R1, TGF β R2) sowie intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen, den SMADs, die signalaktivierend (SMAD2, SMAD3, SMAD4) oder -inhibierend wirken (SMAD7). Die Funktionsweise des TGF β -Signalwegs spiegelt sich auch im Expressionszustand seiner Komponenten wider. Man nimmt an, dass zur funktionellen Variabilität dieses Signalwegs auch genetische Polymorphismen in den genannten Genen beitragen. Zur Identifizierung funktionell relevanter Genpolymorphismen eignen sich z.B. lymphoide Zellen, da diese relativ gut von einer großen Zahl genetisch unterschiedlicher Personen gewonnen werden können und der TGF β -Signalweg in diesen Zellen eine wichtige Rolle für deren Vitalität spielt.

Es wurden für diese Arbeit humane Fibroblasten (n=21 gesunde Spender), lymphoblastoide Zelllinien (LCLs, n=48) und T-Lymphozyten (n=100 gesunde Spender) verwendet. Diese Zellen wurden bestrahlt (3 Gy bei LCLs, 2 Gy bei Fibroblasten und T-Lymphozyten), mit TGF β 1 (5 ng/ml) bzw. mit anti-TGF β 1 (250 ng/ml) inkubiert. Die Effekte auf die Expression von Genen des TGF β -Signalwegs wurden durch *real time*-PCR analysiert. Die Zellvitalität in LCLs wurde durchflusszytometrisch und die der T-Lymphozyten mittels AlamarBlue[®]-Assay gemessen. Die LCLs waren kommerziell erworben und zugehörige dichte Genotypdaten der interessierenden Gene wurden aus der HapMap-Datenbank verwendet. Für den Studienteil mit den T-Lymphozyten wurden insgesamt 21 Polymorphismen in den TGF β -Signalweggenen auf Grundlage früherer Studien ausgewählt und mittels Primerextensionsverfahren bestimmt.

Als wesentliche Ergebnisse meiner Arbeit können formuliert werden: Während *SMAD7* durch TGF β 1-Stimulation – wie erwartet – induziert wurde, fand sich eine Suppression bei Behandlung mit anti-TGF β . Bestrahlungs-Effekte auf die unterschiedlichen Zelltypen waren in Bezug auf Genexpressionsänderungen sehr heterogen; am auffälligsten war in Fibroblasten eine vermehrte Transkription von *SMAD2* und eine verminderte von *SMAD3* und *SMAD4*. Genotyp-Phänotyp-Assoziationen ergaben für zwei Polymorphismen tendenziell übereinstimmende Resultate zwischen LCLs und Lymphozyten in Bezug auf die Genexpression. Einer befindet sich im Promotorbereich von *TGFBR1* (*rs10819635*), welcher nach Bestrahlung mit einer geringeren *SMAD7*-Transkription einherging. Demgegenüber

wurde bei Vorliegen eines Polymorphismus in *SMAD7* (*rs6507876*) infolge TGF β 1-Stimulation mehr *SMAD7* transkribiert. Im Hinblick auf die Zellvitalität nach Bestrahlung waren tendenziell ähnliche Effekte zwischen LCLs und T-Lymphozyten für eine *SMAD3*-Variante (*rs17293408*) zu sehen. Bei einem Cluster von mehreren Polymorphismen war in LCLs nach TGF β 1-Behandlung die Zellvitalität bei demjenigen Allel vermindert, welches in der Literatur als Risikoallel für kolorektale Karzinome beschrieben ist. Als besonders starker Befund für den Einfluss einer Genvariante auf die Strahlensensibilität kann die in Gegenwart einer intronischen *SMAD3*-Variante (*rs11856909*) erhöhte Strahlenresistenz gewertet werden. Der Effekt dieser Variante in zwei vorangegangenen Studien wurde nun von mir ein drittes Mal in analoger Weise beobachtet.

Der neutralisierende Antikörper gegen TGF β 1 scheint sich zur Untersuchung einer Blockade des TGF β -Signalwegs hinsichtlich der sehr empfindlichen Autoregulation auf Genexpressionsebene zu eignen. Die Studie mit den T-Lymphozyten diene zur Validierung von Genotyp-Assoziationen aus früheren Untersuchungen mit Leukozyten bzw. der eigenen Daten mit den LCLs. Die Eignung letzterer insbesondere im Hinblick auf die Analyse globaler Parameter muss wegen der sehr heterogenen Zellteilungsrate mit Vorsicht betrachtet werden. Die potenziell interessanten Auswirkungen von Bestrahlung auf die Expression von Genen des TGF β -Signalwegs in Fibroblasten sollte an einem größeren Kollektiv reproduziert werden. Damit wäre es möglich, zu überprüfen, ob die bei den lymphoiden Zellen gefundenen Genotyp-Assoziationen sich auch dort zeigen. Ein weiterer Schritt zur Belegung einer medizinischen Relevanz der hier beschriebenen Genpolymorphismen wäre deren Analyse in klinischen Studien, z.B. bei Patienten, welche eine Strahlentherapie erhalten, und zwar sowohl mit dem Endpunkt Toxizität als auch Effizienz der Therapie. Sollte sich eine oder mehrere dieser Varianten als bedeutsam bestätigen, sollten die zu Grunde liegenden Mechanismen durch molekular-biologische Experimente geklärt werden. Ein auf diese Weise verbessertes Verständnis würde sowohl zur Therapieoptimierung als auch zur Entwicklung neuer Behandlungsansätze beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Afrakhte M, Moren A, Jossan S, Itoh S, Sampath K, Westermark B, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P (1998): Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun* 249 (2), 505-511

Ahmadzadeh M, Rosenberg SA (2005): TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *J Immunol* 174 (9), 5215-5223

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J, Herskind C, Haviland J, Owen R, Homewood J, Bliss J, Yarnold J (2005): TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother Oncol* 75 (1), 18-21

Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sorensen FB, Overgaard J (2006): Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM--a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol* 82 (8), 577-586

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003): Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116 (Pt 2), 217-224

Argmann CA, Van Den Diepstraten CH, Sawyez CG, Edwards JY, Hegele RA, Wolfe BM, Huff MW (2001): Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (12), 2011-2018

Attisano L, Wrana JL (2002): Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296 (5573), 1646-1647

Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1998): Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 66 (8), 1014-1020

Barcellos-Hoff MH (1993): Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland. *Cancer Res* 53 (17), 3880-3886

Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA (1994): Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93 (2), 892-899

Bayat A, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW (2004): Genetic susceptibility to keloid disease: transforming growth factor beta receptor gene polymorphisms are not associated with keloid disease. *Exp Dermatol* 13 (2), 120-124

- Bian Y, Knobloch TJ, Sadim M, Kaklamani V, Raji A, Yang GY, Weghorst CM, Pasche B (2007): Somatic acquisition of TGFBR1*6A by epithelial and stromal cells during head and neck and colon cancer development. *Hum Mol Genet* 16 (24), 3128-3135
- Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Bottinger EP (2000): A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 14 (2), 187-197
- Bjorkerud S (1991): Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb* 11 (4), 892-902
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000): Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342 (18), 1350-1358
- Bommireddy R, Saxena V, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Singh RR, Doetschman T (2003): TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes. *J Immunol* 170 (9), 4612-4622
- Border WA, Noble NA (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331 (19), 1286-1292
- 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
- Calonge MJ, Massague J (1999): Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells. *J Biol Chem* 274 (47), 33637-33643
- Campean R (2007): Genexpression im TGFB (Transforming Growth Factor Beta)-Signalweg in humanen Lymphozyten: Bedeutung genetischer Varianten für die Reaktion auf Röntgenstrahlung. Zahnmedizinische Dissertation,
- Chen T, de Vries EG, Hollema H, Yegen HA, Vellucci VF, Strickler HD, Hildesheim A, Reiss M (1999): Structural alterations of transforming growth factor-beta receptor genes in human cervical carcinoma. *Int J Cancer* 82 (1), 43-51
- Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, Takigawa M, Takehara K (2005): Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203 (2), 447-456
- Chung EJ, Choi SH, Shim YH, Bang YJ, Hur KC, Kim CW (2000): Transforming growth factor-beta induces apoptosis in activated murine T cells through the activation of caspase 1-like protease. *Cell Immunol* 204 (1), 46-54
- Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, Balasubramanian S, Reed MW, Pooley KA, Scollen S, Baynes C, Ponder BA, Chanock S et al. (2007): A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 39 (3), 352-358

Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998): Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93 (7), 1159-1170

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M et al. (2004): Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10 (9), 942-949

Daley D, Morgan W, Lewis S, Willis J, Elston RC, Markowitz SD, Wiesner GL (2007): Is TGFBR1*6A a susceptibility allele for nonsyndromic familial colorectal neoplasia? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 (5), 892-894

Damaraju S, Murray D, Dufour J, Carandang D, Myrehaug S, Fallone G, Field C, Greiner R, Hanson J, Cass CE et al. (2006): Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12 (8), 2545-2554

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF (1995): Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (12), 5545-5549

Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R (2003): Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 159 (3), 283-300

De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Bacher K, Vral A, De Neve W, Thierens H (2006): TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65 (4), 1240-1248

Derynck R, Zhang YE (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425 (6958), 577-584

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001): TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29 (2), 117-129

Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R (1995): Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270 (18), 10618-10624

Ellenrieder V (2008): TGFbeta regulated gene expression by Smads and Sp1/KLF-like transcription factors in cancer. *Anticancer Res* 28 (3A), 1531-1539

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

Filippi CM, Juedes AE, Oldham JE, Ling E, Togher L, Peng Y, Flavell RA, von Herrath MG (2008): Transforming growth factor-beta suppresses the activation of CD8+ T-cells when

naive but promotes their survival and function once antigen experienced: a two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes* 57 (10), 2684-2692

Flanders KC (2004): Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85 (2), 47-64

Galliher AJ, Schiemann WP (2006): Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8 (4), R42

Galliher AJ, Neil JR, Schiemann WP (2006): Role of transforming growth factor-beta in cancer progression. *Future Oncol* 2 (6), 743-763

Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA (1993): Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* 150 (10), 4494-4503

Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H (1988): Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 8 (10), 4162-4168

Georgiadou P, Sbarouni E (2009): Effect of hormone replacement therapy on inflammatory biomarkers. *Adv Clin Chem* 47 59-93

Giotopoulos G, Symonds RP, Foweraker K, Griffin M, Peat I, Osman A, Plumb M (2007): The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br J Cancer* 96 (6), 1001-1007

Gold LI (1999): The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10 (4), 303-360

Gomis RR, Alarcon C, Nadal C, Van Poznak C, Massague J (2006): C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 10 (3), 203-214

Gorelik L, Flavell RA (2001): Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7 (10), 1118-1122

Grainger DJ (2007): TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74 (2), 213-222

Grainger DJ, Metcalfe JC (1995): A pivotal role for TGF-beta in atherogenesis? *Biol Rev Camb Philos Soc* 70 (4), 571-596

Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC (1994a): Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 370 (6489), 460-462

Grainger DJ, Kemp PR, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC (1994b): Transforming growth factor beta decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by

extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cyclic AMP before entry into M phase. *Biochem J* 299 (Pt 1) 227-235

Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC (1995): Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med* 1 (10), 1067-1073

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD (1999): Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 8 (1), 93-97

Gray AM, Mason AJ (1990): Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247 (4948), 1328-1330

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH et al. (1996): DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271 (5247), 350-353

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1), 57-70

Hannon GJ, Beach D (1994): p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371 (6494), 257-261

Hansson GK, Robertson AK (2004): TGF-beta in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (6), E137; author reply E137-138

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL et al. (1997): The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89 (7), 1165-1173

Haydont V, Riser BL, Aigueperse J, Vozenin-Brotans MC (2008): Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF-beta1. *Am J Physiol Cell Physiol* 294 (6), C1332-1341

Ignotz RA, Massague J (1987): Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell* 51 (2), 189-197

Ignotz RA, Endo T, Massague J (1987): Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 262 (14), 6443-6446

Inge TH, Hoover SK, Susskind BM, Barrett SK, Bear HD (1992): Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 52 (6), 1386-1392

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P (2000): Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 267 (24), 6954-6967

- Janke JH: Bedeutung genetischer Variabilität im TGFB-Signalweg für Gentranskription, Proteinbildung und Zellvitalität: Untersuchungen zur Wirkung therapeutischer Strahlendosis und des TGFβ1-Liganden. Medizinische Dissertation (2009)
- Kaklamani VG, Hou N, Bian Y, Reich J, Offit K, Michel LS, Rubinstein WS, Rademaker A, Pasche B (2003): TGFBR1*6A and cancer risk: a meta-analysis of seven case-control studies. *J Clin Oncol* 21 (17), 3236-3243
- Karlsson G, Liu Y, Larsson J, Goumans MJ, Lee JS, Thorgeirsson SS, Ringner M, Karlsson S (2005): Gene expression profiling demonstrates that TGF-beta1 signals exclusively through receptor complexes involving Alk5 and identifies targets of TGF-beta signaling. *Physiol Genomics* 21 (3), 396-403
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS (1986): Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163 (5), 1037-1050
- Kosaki K, Bassi MT, Kosaki R, Lewin M, Belmont J, Schauer G, Casey B (1999): Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development. *Am J Hum Genet* 64 (3), 712-721
- Kothapalli R, Buyuksal I, Wu SQ, Chegini N, Tabibzadeh S (1997): Detection of ebaf, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding. *J Clin Invest* 99 (10), 2342-2350
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J (1999): A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13 (7), 804-816
- Kruse JJ, Floom BG, te Poele JA, Russell NS, Stewart FA (2009): Radiation-induced activation of TGF-beta signaling pathways in relation to vascular damage in mouse kidneys. *Radiat Res* 171 (2), 188-197
- Kunzmann S, Wohlfahrt JG, Itoh S, Asao H, Komada M, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB (2003): SARA and Hgs attenuate susceptibility to TGF-beta1-mediated T cell suppression. *FASEB J* 17 (2), 194-202
- Lazzereschi D, Nardi F, Turco A, Ottini L, D'Amico C, Mariani-Costantini R, Gulino A, Coppa A (2005): A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours. *Oncogene* 24 (34), 5344-5354
- Leask A, Abraham DJ (2004): TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18 (7), 816-827
- Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, Baba H, Kohnoe S, Sugimachi K (1999): Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 17 (2), 607-614
- Maliekal TT, Antony ML, Nair A, Paulmurugan R, Karunakaran D (2003): Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer. *Oncogene* 22 (31), 4889-4897

- Mallat Z, Tedgui A (2002): The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 13 (5), 523-529
- Martin M, Lefaix J, Delanian S (2000): TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47 (2), 277-290
- Massague J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6 597-641
- Massague J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67 753-791
- Massague J, Blain SW, Lo RS (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103 (2), 295-309
- Matsuzaki K (2009): Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 14 2923-2934
- Mauduit C, Siah A, Foch M, Chapet O, Clippe S, Gerard JP, Benahmed M (2001): Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50 (1), 203-212
- McDonald CC, Alexander FE, Whyte BW, Forrest AP, Stewart HJ (1995): Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial. The Scottish Cancer Trials Breast Group. *BMJ* 311 (7011), 977-980
- McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE (2004): Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *J Immunol* 172 (7), 4275-4284
- Mempel TR, Pittet MJ, Khazaie K, Weninger W, Weissleder R, von Boehmer H, von Andrian UH (2006): Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 25 (1), 129-141
- Milet J, Dehais V, Bourgain C, Jouanolle AM, Mosser A, Perrin M, Morcet J, Brissot P, David V, Deugnier Y et al. (2007): Common variants in the BMP2, BMP4, and HJV genes of the hepcidin regulation pathway modulate HFE hemochromatosis penetrance. *Am J Hum Genet* 81 (4), 799-807
- Millet C, Zhang YE (2007): Roles of Smad3 in TGF-beta signaling during carcinogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 17 (4), 281-293
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T et al. (1999): Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18 (20), 3098-3103
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH (1991): A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* 10 (5), 1091-1101
- Moustakas A (2002): Smad signalling network. *J Cell Sci* 115 (Pt 17), 3355-3356

- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH (2001): Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114 (Pt 24), 4359-4369
- Mummery CL, van den Eijnden-van Raaij AJ (1993): Type beta transforming growth factors and activins in differentiating embryonal carcinoma cells, embryonic stem cells and early embryonic development. *Int J Dev Biol* 37 (1), 169-182
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA et al. (1999): The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96 (3), 319-328
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH et al. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389 (6651), 631-635
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S et al. (2000): Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (6), 2626-2631
- Oklu R, Hesketh R (2000): The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 352 Pt 3 601-610
- Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A (1988): Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 107 (2), 771-780
- Pardali E, ten Dijke P (2009): Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front Biosci* 14 4848-4861
- Pasche B, Kolachana P, Nafa K, Satagopan J, Chen YG, Lo RS, Brener D, Yang D, Kirstein L, Oddoux C et al. (1999): TbetaR-I(6A) is a candidate tumor susceptibility allele. *Cancer Res* 59 (22), 5678-5682
- Pasche B, Knobloch TJ, Bian Y, Liu J, Phukan S, Rosman D, Kaklamani V, Baddi L, Siddiqui FS, Frankel W et al. (2005): Somatic acquisition and signaling of TGFBR1*6A in cancer. *Jama* 294 (13), 1634-1646
- Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P (1988): Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (4), 1105-1108
- Phanish MK, Wahab NA, Hendry BM, Dockrell ME (2005): TGF-beta1-induced connective tissue growth factor (CCN2) expression in human renal proximal tubule epithelial cells requires Ras/MEK/ERK and Smad signalling. *Nephron Exp Nephrol* 100 (4), e156-165
- Pittman AM, Naranjo S, Webb E, Broderick P, Lips EH, van Wezel T, Morreau H, Sullivan K, Fielding S, Twiss P et al. (2009): The colorectal cancer risk at 18q21 is caused by a novel variant altering SMAD7 expression. *Genome Res* 19 (6), 987-993

- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994): p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8 (1), 9-22
- Qi W, Chen X, Poronnik P, Pollock CA (2006): The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 38 (1), 1-5
- Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ (2002): Connective tissue growth factor: expression in human skin in vivo and inhibition by ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 118 (3), 402-408
- Quarmby S, Fakhoury H, Levine E, Barber J, Wylie J, Hajeer AH, West C, Stewart A, Magee B, Kumar S (2003): Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int J Radiat Biol* 79 (2), 137-143
- Raines EW, Ferri N (2005): Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res* 46 (6), 1081-1092
- Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA, Jr. (1987): Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 166 (4), 991-998
- Ravitz MJ, Wenner CE (1997): Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res* 71 165-207
- Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, Ashcroft G, Mitchell JB, Flanders KC (2001): Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 120 (1 Suppl), 43S-47S
- Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK (2003): Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest* 112 (9), 1342-1350
- Roelen BA, Goumans MJ, van Rooijen MA, Mummery CL (1997): Differential expression of BMP receptors in early mouse development. *Int J Dev Biol* 41 (4), 541-549
- Roussa E, von Bohlen und Halbach O, Krieglstein K (2009): TGF-beta in dopamine neuron development, maintenance and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* 651 81-90
- Ruegamer JJ, Ho SN, Augustine JA, Schlager JW, Bell MP, McKean DJ, Abraham RT (1990): Regulatory effects of transforming growth factor-beta on IL-2- and IL-4-dependent T cell-cycle progression. *J Immunol* 144 (5), 1767-1776
- Schirmer MA, Hoffmann AO, Campean R, Janke JH, Zidek LM, Hoffmann M, Kruse M, Sehrt D, Tzvetkov MV, Rave-Frank M et al. (2009): Bioinformatic and functional analysis of TGFBR1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 19 (4), 249-259
- Schmierer B, Hill CS (2007): TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (12), 970-982

Schultze-Mosgau S, Kopp J, Thorwarth M, Rodel F, Melnychenko I, Grabenbauer GG, Amann K, Wehrhan F (2006): Plasminogen activator inhibitor-I-related regulation of procollagen I (alpha1 and alpha2) by antitransforming growth factor-beta1 treatment during radiation-impaired wound healing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (1), 280-288

Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J (2004): Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117 (2), 211-223

Shi Y, Massague J (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113 (6), 685-700

Singh NN, Ramji DP (2006): The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 17 (6), 487-499

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N et al. (2006): The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314 (5797), 268-274

Skoglund J, Song B, Dalen J, Dedorson S, Edler D, Hjern F, Holm J, Lenander C, Lindfors U, Lundqvist N et al. (2007): Lack of an association between the TGFBR1*6A variant and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res* 13 (12), 3748-3752

Slattery ML, Herrick J, Curtin K, Samowitz W, Wolff RK, Caan BJ, Duggan D, Potter JD, Peters U Increased risk of colon cancer associated with a genetic polymorphism of SMAD7. *Cancer Res* 70 (4), 1479-1485

Smyth MJ, Strobl SL, Young HA, Ortaldo JR, Ochoa AC (1991): Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 146 (10), 3289-3297

Tedgui A, Mallat Z (2006): Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86 (2), 515-581

Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M et al. (2005): A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 353 (26), 2747-2757

Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA (1990): A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (4), 1486-1490

Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekely CA, Tan J, Duman RS, Flavell RA (2008): Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med* 14 (6), 681-687

- 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
- Tzakas P, Wong BY, Logan AG, Rubin LA, Cole DE (2005): Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and peak bone mass: association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the heel. *BMC Musculoskelet Disord* 6 29
- Uchida K, Nagatake M, Osada H, Yatabe Y, Kondo M, Mitsudomi T, Masuda A, Takahashi T, Takahashi T (1996): Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res* 56 (24), 5583-5585
- Ulloa L, Doody J, Massague J (1999): Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397 (6721), 710-713
- Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S et al. (2003): Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56 (2), 561-572
- Wahab NA, Weston BS, Mason RM (2005): Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res* 307 (2), 305-314
- Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, 3rd, Hamilton SR (2001): Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344 (16), 1196-1206
- Wolfrim LA, Walz TM, James Z, Fernandez T, Letterio JJ (2004): p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J Immunol* 173 (5), 3093-3102
- Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, Wasan HS, Roylance RR, Bodmer WF, Tomlinson IP (2001a): SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17), 9719-9723
- Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Poulsom R, Bevan S, Salovaara R, Aaltonen LA, Houlston RS, Wright NA, Tomlinson IP (2001b): Comprehensive analysis of SMAD4 mutations and protein expression in juvenile polyposis: evidence for a distinct genetic pathway and polyp morphology in SMAD4 mutation carriers. *Am J Pathol* 159 (4), 1293-1300
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994): Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370 (6488), 341-347
- Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA (2007): Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 13 (18 Pt 1), 5262-5270
- Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC, Samuni AM, Felici A, Reiss M, Yarkoni S et al. (2004): Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of

transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem* 279 (15), 15167-15176

Xu Y, Pasche B (2007): TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1 R14-20

Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K (1998): Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 13 (10), 1569-1576

Zeisberg M, Strutz F, Muller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 13 Suppl 3 S111-120

Zhang HT, Zhao J, Zheng SY, Chen XF (2005): Is TGFBR1*6A really associated with increased risk of cancer? *J Clin Oncol* 23 (30), 7743-7744; author reply 7744-7746

Zhang Q, Jang TL, Yang X, Park I, Meyer RE, Kundu S, Pins M, Javonovic B, Kuzel T, Kim SJ et al. (2006): Infiltration of tumor-reactive transforming growth factor-beta insensitive CD8+ T cells into the tumor parenchyma is associated with apoptosis and rejection of tumor cells. *Prostate* 66 (3), 235-247

8 Eigene Veröffentlichungen

Aus dieser Dissertationen sind hervorgegangen:

Publikationen

Schirmer MA, Brockmüller J, Rave-Fränk M, Virsik P, Wilken B, Kühnle E, Campean R, Hoffmann AO, Müller K, Goetze RG, Neumann M, Janke JH, Nasser F, Wolff HA, Ghadimi BM, Schmidberger H, Hess CF, Christiansen H, Hille A: A putatively functional haplotype in the gene encoding transforming growth factor-beta1 (TGFβ1) as a potential biomarker for radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [in press].

Schirmer MA, Janke JH, Neumann M, Wolff H, Rave-Fränk M, Christiansen H, Brockmüller J: Identification of functional SMAD3 polymorphisms (Manuskript in Vorbereitung).

Tagungsbeiträge

Schirmer MA, Rave-Fränk M, Virsik P, Wilken B, Kühnle E, Müller K, Wolff HA, Goetze RG, Neumann M, Janke JH, Campean R, Hoffmann AO, Hille A, Schmidberger H, Ghadimi BM, Hess CF, Brockmüller J, Christiansen H (2009): TGFβ1 production and radiosensitivity in dependence on genetic haplotypes: Unrevealing DNA damage-sensitizing effects of TGFβ1. *1st International Meeting on Molecular-Based Treatment of GI-Cancer*.

Danksagung

Herr Prof. Dr. med. J. Brockmöller möchte ich besonderen Dank aussprechen, da er es mir überhaupt erst ermöglicht hat, in seiner Abteilung wissenschaftlich zu arbeiten, um meine Dissertation anzufertigen. Dank des mir entgegen gebrachten Vertrauens konnte ich dieses interessante Thema meiner Arbeit letztlich zum Erfolg führen.

Ganz herzlich möchte ich Markus Schirmer danken, welcher mir als Betreuer über den ganzen Zeitraum immer hilfreich zur Seite stand. Ich habe seine Kompetenz und fachlichen Ratschläge sehr geschätzt und auch, dass Probleme zügig in Teamarbeit gelöst wurden. In gleicher Weise möchte ich ihm auch für die immer währende angenehme Stimmung in der Arbeitsgruppe danken.

Besonders möchte ich mich bei cand. med. Robert Götze bedanken, mit welchem ich wunderbare Stunden voller Humor und Arbeitseifer im Labor verbracht habe. Ohne ihn hätte bei dieser Arbeit im nachhinein etwas gefehlt. Meinem Freund Herrn cand. med. Finn Lornsen danke ich sehr dafür, dass wir eine so gute Zusammenarbeit im Team hatten.

Nicht vergessen möchte ich all die anderen beteiligten Mitarbeiter und Doktoranden der Abteilung Klinische Pharmakologie, welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, so dass ich meine wissenschaftliche Arbeit immer unter guter Anleitung voranbringen konnte und die für eine angenehme Atmosphäre sorgten, in der ich gerne meine Dissertation angefertigt habe.

Ich danke auch der Abteilung für Strahlentherapie, besonders Frau Rave Fränk, für die gute Kooperation bei den Strahlenexperimenten.