

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

**Einflussnahme von TGF β auf die
Strahlensensibilität lymphoblastoider Zellen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Katarina Springer, geb. Müller
aus
Magdeburg

Göttingen 2015

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

I. Berichterstatter/in: PD Dr. med. H. A. Wolff

II. Berichterstatter/in: PD Dr. med. J. Gaedcke

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.04.2016

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
1.1 Von den Anfängen der Genetik bis in die Gegenwart	1
1.2 Das Internationale HapMap-Projekt.....	2
1.3 Einzelnukleotid-Polymorphismen	4
1.4 Kopplungsungleichgewicht	4
1.5 TGF β -Signalweg und Wirkungsweise.....	5
1.6 Röntgenstrahlung und deren Folgen	7
1.7 Der Mikrokerntest	8
1.8 Ziel der Arbeit	10
2. Material	12
2.1 Puffer und Medien.....	12
2.2 Zellen.....	13
2.3 Geräte	13
2.4 Zubehör	14
2.5 Software	15
2.6 Datenbanken.....	16
3 Methoden	17
3.1 Anzucht und Vorbereitung der LCLs.....	17
3.2 Vorversuche	18
3.2.1 Dosis-Effekt-Kurve.....	18
3.2.2 Inkubationszeit.....	18
3.3 Bestrahlung der LCLs	19
3.4 Zytozentrifuge	19
3.5 Anfärben der Zellen.....	20
3.6 Der Mikrokerntest	20
3.6.1 Kriterien für BN.....	20
3.6.2 Kriterien für MNi.....	21
3.6.3 Kriterien für NPB	21
3.6.4 Kriterien für Apoptosen	22

3.6.5 Kriterien für Nekrosen.....	22
3.7 Mikroskopische Auswertung.....	23
3.8 Analyisierte Gene	24
3.9 Statistik.....	25
4. Ergebnisse	27
4.1 Mikroskopische Auswertung der LCLs.....	27
4.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	28
4.3 Beeinflussung der TGF β 1-Wirkung durch Genpolymorphismen	29
4.3.1 BRCA1	30
4.3.2 BRCA2	32
4.3.3 ERCC2.....	34
4.3.4 LIG1.....	36
4.3.5 MLH1	37
4.3.6 MSH6.....	38
4.3.7 NBN.....	40
4.3.8 XRCC1	41
4.3.9 SMAD3.....	42
4.3.10 SMAD4.....	44
4.3.11 TGFBR1.....	45
4.3.12 TGFBR2	46
4.3.13 TGFB1	47
5. Diskussion.....	48
5.1 BRCA1	48
5.2 BRCA2.....	50
5.3 ERCC2	51
5.4 LIG1	53
5.5 MLH1	55
5.6 MSH6	56
5.7 NBN	57
5.8 XRCC1	59
5.9 SMAD3	61
5.10 SMAD4	63
5.11 TGFBR1	64
5.12 TGFBR2	66

5.13 TGFB1.....	67
5.14 Ausblick.....	70
6. Zusammenfassung.....	72
7. Anhang.....	74
8. Literaturverzeichnis.....	75

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abbildung 1: SNPs und Haplotypen.....	4
Abbildung 2: Austausch von DNA durch crossing over (modifiziert nach Passarge 2004, S. 101)....	5
Abbildung 3: TGFβ-Signalweg (modifiziert nach Pinzani und Marra 2001, S. 403).....	6
Abbildung 4: Zellzyklus-Kontrollpunkte (modifiziert nach Passarge 2004, S. 95).....	8
Abbildung 5: Entstehung von NPB durch dizentrische Chromosomen.....	10
Abbildung 6: Dosis-Effekt-Kurve (modifiziert nach Hennies 2010, S. 36).	18
Abbildung 7: Mehrkernige Zellen.	18
Abbildung 8: Zweikernige Zellen.	20
Abbildung 9: Mikrokern-Entstehung.	21
Abbildung 10: Spät-apoptotische Zelle (100fache Vergrößerung).	22
Abbildung 11: Nekrosen.	22
Abbildung 12: : Einfluss von TGFβ1 auf MNi (links) und NPB (rechts) in mit 3 Gy bestrahlten Zellen.	28
Abbildung 13: Inter-Tag-Korrelation für die Anzahl an NPB.	29
Abbildung 14: Auswahl der Kandidatengene.	30
Abbildung 15: BRCA1-SNPs und ihre Assoziation zu Strahlen-induzierter Zytotoxizität.....	31
Abbildung 16: Detaillierter Boxplot für die auffälligste BRCA1-Variante.	32
Abbildung 17: Darstellung von BRCA2 entsprechend zu Abbildung 15.	33
Abbildung 18: Boxplot für den BRCA2-SNP rs9567552.....	34
Abbildung 19: Boxplot für rs3916839 aus dem ERCC2-Gen.	35
Abbildung 20: MNi-Induktion in Abhängigkeit vom ERCC2-SNP rs1799793.	35
Abbildung 21: Darstellung des LIG1-Gens analog zu Abbildung 15.....	36
Abbildung 22: Boxplots für die SNPs rs20580 und rs20581 aus dem LIG1-Gen.....	37
Abbildung 23: Boxplot für den MLH1-SNP rs1800734. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde GG gegenüber AG + AA verglichen.	38
Abbildung 24: Boxplots für die Polymorphismen rs10440109 und rs3774332 aus dem MLH1-Gen. Die statistische Testung erfolgte nach Mann-Whitney-U.	38
Abbildung 25: MSH6-Gen entsprechend Abbildung 15.....	39
Abbildung 26: NPB-Induktion durch 3 Gy-Bestrahlung bei rs3136245 aus dem MSH6-Gen.	40
Abbildung 27: Modulation der NPB nach 3 Gy-Bestrahlung durch rs2020911 und Kompensation durch TGFβ1.....	40
Abbildung 28: Modulation der NPB durch den NBN-SNP rs3026271.	41

Abbildung 29: Boxplot für rs25487 im XRCC1-Gen.....	42
Abbildung 30: Assoziation von SMAD3-SNPs mit den strahlen-induzierten DNA-Schäden.	43
Abbildung 31: Auswirkungen der SMAD3-Variante rs11856909 auf die MNi-Entstehung.	44
Abbildung 32: Variante rs893473 aus dem SMAD3-Gen.	44
Abbildung 33: Modulation der NPB durch rs17663997 im SMAD4-Gen.	45
Abbildung 34: MNi und Deletionsvariante *6A (rs11466445) im TGFBR1-Gen.	45
Abbildung 35: NPB und SNP rs11568785 im TGFBR1-Gen.....	46
Abbildung 36: Effekte der TGFBR2-SNPs rs9858487 und rs995435 auf die durch 3 Gy- Bestrahlung induzierten NPB. Die statistische Testung erfolgte bei beiden Varianten mit dem Mann- Whitney-U-Test.....	47
Abbildung 37: TGFB1-Variante rs1800469.....	47

Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1: Chemikalien zum Ansatz der Puffer und Medien.	12
Tabelle 2: Geräte.	13
Tabelle 3: Zubehör.	14
Tabelle 4: Software.	15
Tabelle 5: Datenbanken.....	16
Tabelle 6: Zusammensetzung des Diff-Quik [®] Färbesets.	20
Tabelle 7: Untersuchte Gene mit Anzahl und Art der analysierten polymorphen Positionen.....	24
Tabelle 8: Rohdatenblatt für die Auszählung des Mikrokerntests. Beispielhaft ist eine ausgezählte Zelllinie dargestellt.	74

Abkürzungen

BER	Basenexzisionsreparatur
BN	<i>binucleated cells</i> , zweikernige Zellen
bp	Basenpaar(e)
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2</i> , Genname
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cyt B	Cytochalasin B
d.h.	dass heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Viren
ERCC2	<i>excision repair cross-complementing, complementation group 2</i> , Genname
et al.	<i>et alii</i> , und andere
etc.	et cetera
FKS	fetales Kälber Serum
ggf.	gegebenenfalls
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
G ₁ /G ₂ -Phase	Gap 1/Gap 2-Phase
Gy	Gray, Energiedosis
kb	Kilobase(n)
LCL	<i>lymphoblastiod cell line</i> , lymphoblastiode Zelllinie
LD	<i>linkage disequilibrium</i> , Kopplungsungleichgewicht
LIG1	<i>DNA ligase 1</i> , Genname
MAF	<i>minor allele frequency</i> , Häufigkeit des selteneren Allels
Min	Minute(n)
mind.	mindestens
MLH1	<i>mutL homolog of E.coli 1</i> , Genname
MN	<i>micronucleus</i> , Mikrokern
MNi	<i>micronuclei</i> , Mikrokerne
MSH6	<i>mutS homolog of E.coli 6</i> , Genname
NBN	<i>nibrin</i> , Genname

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDI	<i>nuclear division index</i> , Kernteilungsindex
NDCI	<i>nuclear division cytotoxicity index</i> , Kernteilungszytotoxizitätsindex
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NGS	<i>next generation sequencing</i> , Sequenzierungsmethode
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i> , Nonsens-vermittelter mRNA-Abbruch
NPB	<i>nucleoplasmic bridges</i> , Kernplasmabrücken
Nr.	Nummer
o.ä.	oder ähnlich
OT	Objektträger
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S-Phase	Synthese-Phase
S.	Seite
SMAD2/3/4/7	<i>mothers against decapentaplegic homolog of drosophila 2/3/4/7</i> , Genname
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
t-AML	therapiebedingte Akute Myeloische Leukämie
TFIIH	<i>transcription factor II H</i> , Proteinname
TGFB1	<i>transforming growth factor beta 1</i> , Genname
TFGBR1/2	<i>transforming growth factor beta receptor 1/2</i> , Genname
u.a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich
v.a.	vor allem
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing in chinese hamster cells 1</i> , Genname
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Von den Anfängen der Genetik bis in die Gegenwart

Gregor Mendel legte 1866 mit der Veröffentlichung seines Werkes „Versuche über Pflanzenhybriden“ den Grundstein für die heutige Genetik. Jedoch gerieten seine Forschungsergebnisse lange Zeit in Vergessenheit. Erst Anfang des 20. Jahrhunderts wurde seine Theorie wieder entdeckt und hielt Einzug in die damalige Wissenschaft. Die nach ihm benannten Mendelschen Regeln, die den Vererbungsvorgang einfacher Erbgänge beschreiben, ebneten den Weg für die im Jahre 1904 vorgestellte Chromosomentheorie der Vererbung von Walter Sutton und Theodor Boveri. Sie belegt das heute in der klassischen Genetik allgemein bekannte Prinzip, dass die Chromosomen den materiellen Träger der Gene darstellen (Boveri 1902, Sutton 1903). Bereits im Jahre 1878 beschrieb Walter Flemming den Prozess der Zellteilung, für den er später den Begriff Mitose prägte. Zehn Jahre später, 1888, wurde durch H.W. Waldeyer der Begriff Chromosomen eingeführt (Cremer und Cremer 1988). All dies führte 1906 zur Gründung des Fachgebietes der Genetik durch William Bateson (Bateson 2002).

Es dauerte nicht lange, bis 1909 der britische Internist Archibald Garrod die Bedeutung der Mendelschen Gesetze bei der Vererbung von Stoffwechselerkrankungen erkannte sowie zu der Erkenntnis gelangte, dass auch nicht zu Krankheit führende individuelle biochemische Unterschiede zwischen den Individuen bestehen (Bearn 1996).

In der zweiten Hälfte der 1940er Jahre entdeckten Erwin Chargaff und Kollegen die Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin in der DNA (Vischer und Chargaff 1948). Sie bildeten die Grundlage für den 1953 von Watson und Crick publizierten strukturellen Aufbau des DNA-Grundgerüsts. Mit ihrer Beschreibung der Doppelhelix-Struktur (Watson und Crick 1953) konnte nun der Mechanismus der Transkription genauer erklärt werden. Ein weiterer Schritt auf dem Weg zur Decodierung der DNA war vollbracht. In den sich anschließenden Jahren überschlugen sich die Entdeckungen in der Genetik regelrecht. 1956 veröffentlichte Joe Hin Tjio erstmalig die korrekte Anzahl von 46 Chromosomen in einem diploiden Chromosomensatz menschlicher Zellen. Zuvor wurde mehr als 30 Jahre lang eine Anzahl von 48 Chromosomen angenommen, jedoch konnte dafür kein Beweis erbracht werden (Harper 2006). Dies ermöglichte nun die Erforschung numerischer Chromosomenaberrationen wie der Trisomie 21 (Lejeune et al. 1959). 1960 wurde erstmalig das Philadelphia-Chromosom beschrieben. 1970 gelang Jonathan Beckwith die Isolierung eines einzelnen Gens aus E.coli. 1975 erfolgte die vollständige DNA-Sequenzierung eines

Bakteriophagen durch Sanger, Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert (1977) – um nur einige Ereignisse zu nennen. All diese Forschungsergebnisse gipfelten im Jahre 2003 in der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms durch das Humangenomprojekt (Gregory et al. 2006). Seither wurde das Genom von mehr als 1000 Individuen dekodiert (The 1000 Genomes Project Consortium 2012).

Somit gingen die anfänglichen Anstrengungen, Gene ausfindig zu machen die z.B. für die Vererbung von Blutgruppenmerkmalen verantwortlich sind (von Dungen und Hirszfeld 1910), dazu über, Gene zu entschlüsseln die bestimmte Erkrankungen verursachen. Zusammenhänge zwischen *APOE4* bei Morbus Alzheimer (Strittmatter und Roses 1996) oder *Faktor V Leiden* bei tiefer Beinvenenthrombose (Dahlbäck 1997) konnten in jüngster Vergangenheit bereits aufgezeigt werden. Bis zum Jahr 2020 sollen alle monogenen Erkrankungen in Bezug auf ihre ihnen innewohnenden molekularen Defekte aufgeklärt werden (Pfeufer und Krawczak 2013). Vor allem DNA-Sequenzvariationen, sogenannte SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*, Einzelnukleotid-Polymorphismen) rücken dabei immer mehr in den Fokus der Untersuchungen.

1.2 Das Internationale HapMap-Projekt

Die Erforschung des Zusammenhanges zwischen SNPs als möglichen Risikofaktor für das Vorhandensein oder Leiden an einer bestimmten Erkrankung hat sich das internationale HapMap-Projekt zur Aufgabe gemacht. Dieser Zusammenschluss international tätiger Wissenschaftler und ihrer Geldgeber aus China, Großbritannien, Japan, Kanada, Nigeria und den Vereinigten Staaten von Amerika (siehe auch: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) hat sich zum Ziel gesetzt Einzelnukleotid-Polymorphismen zu untersuchen, um ihren Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen zu entschlüsseln.

Da eine positive Familienanamnese einen der größten Risikofaktoren für die Wahrscheinlichkeit, im Laufe seines Lebens an einer bestimmten Erkrankung zu leiden, darstellt, gilt heute als allgemeingültig und wird gerade bei Erkrankungen wie Chorea Huntington (Walker 2007) oder Brustkrebs immer wieder deutlich (Fackenthal und Olopade 2007). Mehr als 1000 Gene, die den Gesetzmäßigkeiten der Mendelschen Regeln folgen, wurden bereits identifiziert. Dabei ist nur eine einzige Abweichung in einem Gen im Sinne eines Polymorphismus, eines *short tandem repeats* o.ä. notwendig und gleichzeitig ausreichend, um eine Erkrankung zu verursachen (The HapMap Consortium 2005). Somit ist die Identifikation von Gendefekten durch SNPs ein logischer Schritt um Fortschritte in der Prävention, Diagnostik und Therapie bei Erkrankungen zu erzielen und ihre Pathologie zu verstehen. Jedoch ist nicht jede Erkrankung auf einen einzelnen Gendefekt zurückzuführen wie es beispielsweise bei Porphyrie (Goerz und Merk 1985) der Fall ist. Vielmehr

handelt es sich oftmals um das Zusammenspiel von mehreren Genen und der Interaktion mit ihrer Umwelt.

Als das Internationale HapMap-Projekt 2002 aus der Taufe gehoben wurde, stellte die Sanger-Sequenzierung die Methode der Wahl bei der Sequenzierung des Genoms dar. Da dies sehr kosten- und zeitaufwändig war und eine Genom-weite Betrachtung von Genvarianten zu diesem Zeitpunkt die finanziellen und personellen Mittel der Arbeitsgemeinschaft gesprengt hätte, beschränkte man sich auf die Analyse einiger vielversprechender Kandidatengene (The International HapMap Consortium 2003). Hierbei wurden die SNPs als genetische Marker eingesetzt, um einen Zusammenhang zwischen Genregion und Erkrankung zu finden. Dabei wird die These vertreten, dass DNA-Sequenzvariationen auf Mutationsereignisse in einem bestimmten Gen zurückgehen und mit benachbarten Varianten, die sich zum Zeitpunkt der Mutation in besagtem Abschnitt befunden haben, gekoppelt sind (siehe Kapitel 1.4).

Seither etablierte sich als neue – vor allem kosteneffizientere Methode – das *next generation sequencing* (NGS). Einsparungen um das bis zu 1000fache (Pfeufer und Krawczak 2013) und die mittlerweile Genom-weite Betrachtung der Genvarianten werden dadurch möglich.

Obwohl es keine Population gibt, die am besten für diese Untersuchungen qualifiziert ist, hat sich das HapMap-Konsortium auf eine bestimmte Bevölkerungsgruppe festlegen müssen. Dabei fiel die Entscheidung auf 90 Probanden aus dem Volksstamm der Yoruba aus Nigeria, 45 nicht verwandte Japaner aus Tokio, 45 Han-Chinesen aus Beijing und 90 Personen aus Utah, USA mit nord- und westeuropäischen Vorfahren (The International HapMap Consortium 2003). All diesen Populationen ist gemein, dass sie einen gemeinsamen geographischen Ursprung aufweisen und somit Homogenität bezüglich ihrer Haplotypen besitzen. 83 % der in der Weltbevölkerung vorkommenden Haplotypen finden sich in den DNA-Proben, die das HapMap-Projekt erhoben hat (Conrad et al. 2006). Dies bietet den Vorteil, dass bei einer Erkrankungshäufung in dieser Population ein sonst seltener Polymorphismus in seiner Häufigkeitsverteilung häufiger anzutreffen ist als in einer nicht betroffenen Kontrollgruppe. Mittels dieser Methode konnten in der Vergangenheit bereits Gene identifiziert werden, die beispielsweise für Zystische Fibrose (Kerem et al. 1989) verantwortlich sind.

Gegenwärtig wurden durch das HapMap-Projekt rund zehn Millionen Polymorphismen untersucht und die Ergebnisse in einer Datenbank im Internet zur Verfügung gestellt. Dabei beschränkt sich die Kooperation auf DNA-Varianten, die mit einer MAF (*minor allele frequency*) von $\geq 5\%$ vorkommen, d.h. dass das seltenere Allel in der Bevölkerung eine Frequenz von $\geq 5\%$ besitzt. Polymorphismen mit einer MAF $< 5\%$ werden derzeit nicht betrachtet, da das Aufspüren dieser Varianten noch sehr zeit- und kostenintensiv ist. Unstrittig ist dennoch, dass auch sie einen

wesentlichen Beitrag zur Entstehung erblich bedingter Erkrankungen leisten (The International HapMap Consortium 2010).

1.3 Einzelnukleotid-Polymorphismen

Das menschliche Genom unterscheidet sich von Mensch zu Mensch nur in rund 0,1 % seiner Nukleotide (Li und Sadler 1991). Dies entspricht einer Abweichung alle 1000 Basen. Bei der überwiegenden Anzahl dieser Abweichungen handelt es sich um Einzelnukleotid-Polymorphismen, kurz SNPs, die rund 90 % der Variabilität des menschlichen Genoms ausmachen. Sie stellen eine

zumeist durch Punktmutation geänderte Basenabfolge in einem bestimmten Abschnitt der DNA dar. Je nach Basenaustausch kann dabei die Information des Codons verändert werden und in einem Aminosäureaustausch resultieren (nicht-synonymer SNP) oder unbemerkt bleiben, da das Codon weiter für die gleiche Aminosäure codiert (synonymer SNP) (Ramensky et al. 2002). Kommt dieser

Aminosäureaustausch in einem codierenden Bereich der DNA vor, kann dies Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben und physiologische Defekte nach sich ziehen. Neben diesen *coding* SNPs gibt es auch *regulatory* SNPs, die die Transkription beeinflussen sowie *structural RNA* SNPs, die die RNA-Prozessierung stören können. Diese können beispielsweise funktionslose Proteine nach sich ziehen, wenn ein Aminosäureaustausch im Bereich einer Spleißstelle eine defekte mRNA produziert.

Ein Polymorphismus definiert sich als ein Vorkommen des selteneren Allels mit einer Häufigkeit von > 1 % in der Bevölkerung. Derzeit wird ihre Gesamtzahl auf über zehn Millionen geschätzt (Reich et al. 2003). Neben SNPs gibt es noch Deletionen, Insertionen, *variable tandem nucleotide repeats*, Mikrosatelliten und *copy number variations*.

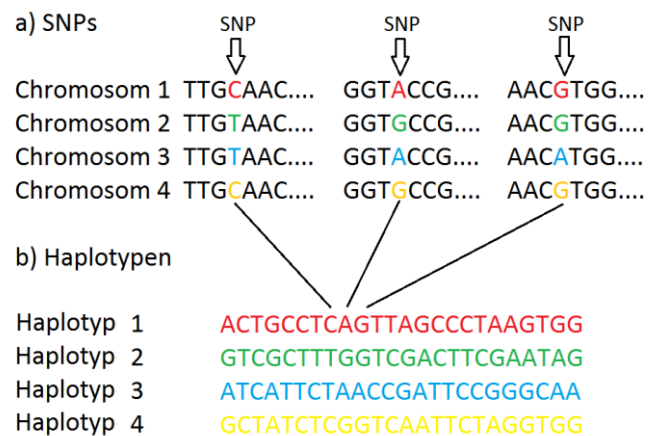


Abbildung 1: SNPs und Haplotypen

a) Ausschnitt der DNA mit vier Versionen desselben Chromosomenabschnittes. Zu sehen sind identische DNA-Sequenzen, die an drei Stellen einen Basenaustausch aufweisen, einen SNP. b) Die Summe der geänderten Basenabfolgen im Chromosom bildet eine Variante eines Haplotypen (modifiziert nach The International HapMap Consortium 2003, S. 790).

1.4 Kopplungsungleichgewicht

Das *linkage disequilibrium* (LD) oder auch Kopplungsungleichgewicht beschreibt, inwieweit zwei Allele miteinander gekoppelt sind. Zu bedenken ist dabei, dass Gene entsprechend der dritten Mendelschen Regel normalerweise unabhängig voneinander vererbt werden und jedes Allel mit 50 % Wahrscheinlichkeit an die Nachkommen weitergegeben wird. Jedoch lässt sich beobachten, dass sich bestimmte Abschnitte in den Chromosomen deutlich seltener trennen. Dies liegt daran, dass eine Aufspaltung während der Rekombination umso unwahrscheinlicher ist, je dichter die

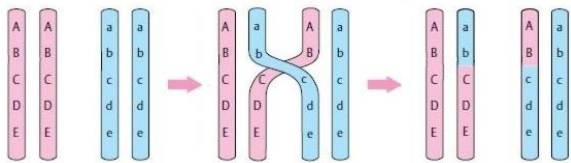


Abbildung 2: Austausch von DNA durch *crossing over* (modifiziert nach Passarge 2004, S. 101).

Gene beieinander liegen. Diese Gene werden also nicht komplett unabhängig voneinander vererbt, da sie durch Kopplung voneinander abhängen. Dabei gibt es bestimmte Regionen in den Chromosomen, sogenannte „hot spots“, in denen überproportional viele Polymorphismen vorkommen die miteinander

gekoppelt sind. Dies wird durch das *crossing over* in der Reduktionsteilung der Meiose bedingt. Durch das Nebeneinanderlagern von mütterlichen und väterlichen Chromosomen kommt es zum Austausch von DNA-Abschnitten (Abbildung 2). Je näher sich zwei Gene dabei sind, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit für ein *crossing over* genau an dieser Stelle. Die Austauschwahrscheinlichkeit ist also abhängig von der Distanz zwischen den beiden Genorten. Je näher sie zusammen liegen, desto größer ist ihr LD, da eine Trennung sehr unwahrscheinlich wird. Liegen die Loci der Allele auf unterschiedlichen Chromosomen, besteht keine Kopplung. Im Grunde stellen Chromosomen somit Mosaik dar die durch Mutation, Rekombination, genetischen Drift und Selektion entstanden sind. Sie repräsentieren dabei an bestimmten Stellen die Haplotypen unserer Vorfahren. Per definitionem besitzen zwei Gene, die sich durchschnittlich alle 100 Meiosen trennen einen Abstand von 1 centiMorgan. Dies entspricht etwa 1 Million Basenpaaren, kann jedoch sehr variieren (Passarge 2004).

1.5 TGF β -Signalweg und Wirkungsweise

Das Zytokin TGF β 1 (*transforming growth factor beta 1*) ist wie auch TGF β 2 und TGF β 3 die alle am gleichen Rezeptor binden, Initiator des TGF β -Signalwegs und an diversen physiologischen zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration beteiligt, aber auch an pathologischen Ereignissen wie Karzinogenese und Entzündungsreaktionen (Massagué et al. 2000). Um sie einleiten zu können muss TGF β 1 eine Signalkaskade auslösen, indem es an seinen oberflächennah gelegenen Rezeptor TGF β R2 bindet und diesen in räumliche

Nähe zu TGFβR1 bringt. Aufgrund der Serin/Threonin-Kinase-Aktivität ist es dem TGFβ-Rezeptor 2 möglich, den TGFβ-Rezeptor 1 zu phosphorylieren. Anschließend wird das Signal von TGFβR2/1-Komplex mittels Phosphorylierung der Proteine aus der SMAD (*mothers against decapentaplegic homologs of drosophila*)-Familie weitergeleitet (Bachman und Park 2005).

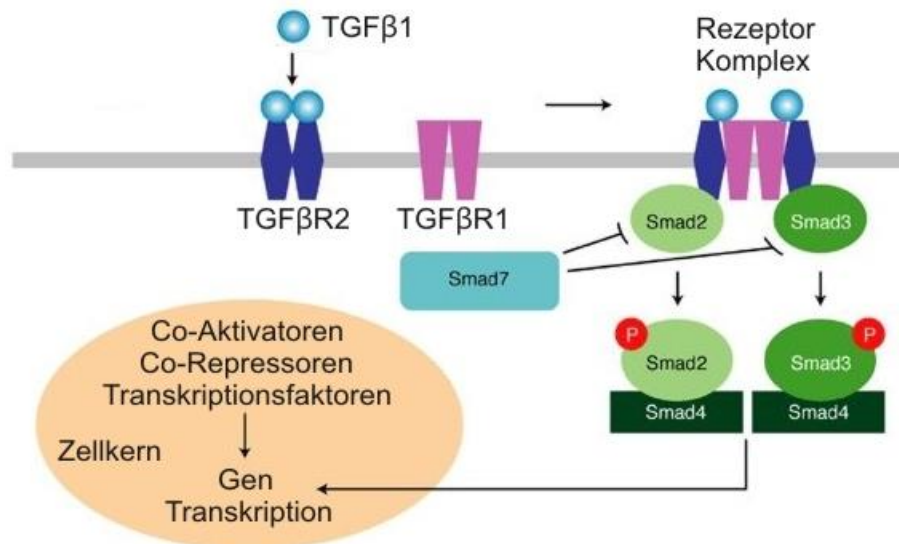


Abbildung 3: TGFβ-Signalweg (modifiziert nach Pinzani und Marra 2001, S. 403).

Die Erkennung der SMAD-Proteine durch den TGFβ-Rezeptor wird durch das nahegelegene Zinkfinger-FYVE-Domäne-enhaltende Protein 9 erleichtert (Shi und Massagué 2003). Dadurch schließen sich SMAD2 und SMAD3 zu einem heterooligomeren Komplex mit SMAD4 zusammen. Diese SMAD2/4-SMAD3/4-Komplexe wandern anschließend in den Zellkern, um dort je nach Zellart und abhängig von ihren beteiligten Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, als Transkriptionsfaktoren zu agieren (Moustakas et al. 2001). Der SMAD-Komplex kann dabei direkt mit geringer Affinität und Spezifikation an die DNA binden und dadurch mit anderen DNA-bindenden Proteinen interagieren, um bestimmte Zielgene zur Transkriptionsregulation anzuvisieren (Wrana 2000). Die Inhibition des TGFβ-Signalwegs wird u.a. durch SMAD7 gesteuert, indem der TGFβ-Rezeptor-Komplex kompetitiv gehemmt wird (Zhong et al. 2010). Die SMAD7-Interaktion führt mit Hilfe der E3-Ubiquitin-Ligase SMURF2 zum Rezeptorabbau, indem der TGFβ/SMAD7/SMURF2-Komplex seinerseits Richtung Proteasomen wandert, um dort zerlegt zu werden. TGFβ1 kann dabei die Transkription von SMAD7 über die Aktivierung von SMAD3 steuern (von Gersdorff et al. 2000).

Weiterhin kann TGFβ1 über SMAD3 und SMAD4 einen Zellzyklusarrest am G₁/S-Kontrollpunkt initialisieren, um DNA-Reparaturen vornehmen zu lassen (Massagué und Gomis 2006). Auch kann über die Hemmung von NFκB durch TGFβ1 Apoptose ausgelöst (Arsura et al. 2003) und durch die Bindung der TGFβ-Rezeptoren an das SHC-transforming 1-Protein die Umwandlung von

epitheliale in mesenchymale Zellen in Gang gesetzt werden (Hayashida et al. 1999).

Die TGF β -Superfamilie übt entscheidenden Einfluss auf die embryonale Entwicklung von Muskeln (Slager et al. 1993), Gefäßen (Gleizes et al. 1997) und Organen aus (Mummery 2001) und steuert wie bereits eingangs erwähnt die Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Schmierer und Hill 2007). Daraus ergibt sich eine Vergesellschaftung des TGF β -Signalwegs mit physiologischen Prozessen wie Immunantwort, Regeneration, Defektreparatur und Wundheilung, aber auch pathologischen Begebenheiten wie überschießende Entzündungsreaktionen und Karzinogenese (Weller et al. 2001). Da bekannt ist, dass TGF β 1 an der Bildung extrazellulärer Komponenten wie Kollagen beteiligt ist, steht es in Beziehung zu vielen Erkrankungen bei denen es zu einer Dysfunktion der Bildung extrazellulärer Matrix kommt. Beispielsweise führt ein Überschuss an TGF β 1 während der Wundheilung zu Fibrose und Narbenbildung (Penn et al. 2012). Auch chronische Prozesse wie die radiogene Fibrose nach Anwendung von Strahlentherapie (Hneino et al. 2012) wurden beobachtet oder fibrotische Veränderungen in den Nieren (Lan 2011) und der Leber (Gressner et al. 2002). Hingegen wird ein Mangel v.a. an TGF β 1 bei chronischen, nicht-heilenden Wunden beschrieben (Kim et al. 2003).

1.6 Röntgenstrahlung und deren Folgen

1927 bewies H.J. Muller an *Drosophila melanogaster* die Möglichkeit der Induktion von DNA-Schäden durch Röntgenstrahlung. Dadurch konnten nun Einzel- und Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlen in der DNA bewusst erzeugt werden (van der Schans et al. 1983). Die damit einhergehende genomische Instabilität kann u.a. zu Chromosomenaberrationen, Genmutationen, Mikrokern-Entstehung oder gar zum Zelltod führen (Toyokuni et al. 2009). Daher ist es von wesentlicher Bedeutung die genetische Integrität durch Reparatursysteme aufrecht zu erhalten. Dazu zählen v.a. leistungsfähige Mechanismen, die den Großteil der entstandenen Defekte schnellstmöglich beseitigen, da es sonst zu bleibenden DNA-Schäden kommen kann.

Die natürliche Mutationsrate liegt bei $\sim 10^{-8}$ Ereignissen pro Base pro Generation und beträgt bei einem diploiden Chromosomensatz mit 6×10^9 Basenpaaren etwa 60 Defekte pro Zelle (Lynch 2010). Dagegen entstehen bei 1 Gy-Röntgenstrahlung ca. 4000 – 5000 Schäden pro Zelle, hauptsächlich Basenschäden und Einzelstrangbrüche, aber auch Doppelstrangbrüche oder *crosslinks* (DNA-Protein-Vernetzungen). Damit diese Zellen nicht in den Zelltod gehen, müssen Reparaturenzyme eingreifen. Dies geschieht mittels Zellzykluskontrolle, d.h. an entscheidenden Punkten im Zellzyklus wie der G₁ (Gap 1)- oder G₂ (Gap 2)-Phase, kommt der Zellzyklus zum Erliegen um den vorhandenen DNA-Schaden zu reparieren (Natarajan und Palitti 2008). Dabei ist der Zeitpunkt des Arrestes von entscheidender Bedeutung, da die Zellen v.a. während der Mitose-

und der G₂-Phase am empfindlichsten auf Strahlung reagieren, wohingegen sie in der S (Synthese)-Phase relativ strahlenresistent sind. Kann der Fehler nicht behoben werden, kann die Zelle die Apoptose einleiten. Dabei werden drei verschiedene Arten des Zelltods unterschieden:

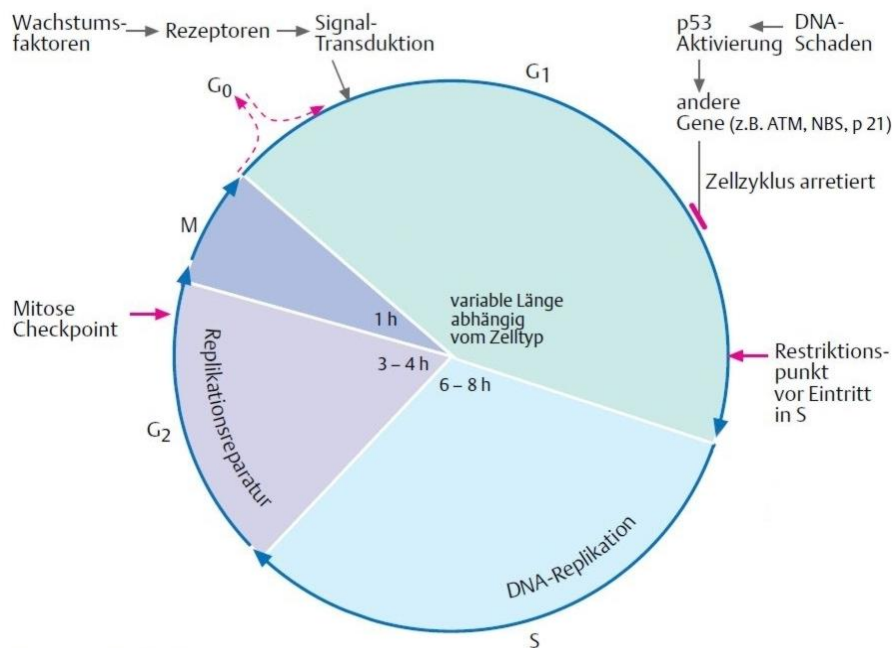


Abbildung 4: Zellzyklus-Kontrollpunkte (modifiziert nach Passarge 2004, S. 95).

1.) Zelltod mit schneller Zwischenphase, wenn dieser direkt oder nur wenige Stunden nach Bestrahlung eintritt; 2.) Zelltod mit verzögerter Zwischenphase, sofern dieser nach einem G₂-Block stattfindet und 3.) Mitose-assoziiertes Zelltod, der nach einer oder mehreren Zellteilungen zu verzeichnen ist (Endlich et al. 2000). Dabei wird die Hypothese vertreten, dass der Zelltod mit schneller Zwischenphase durch DNA-Doppelstrangbruch-Erkennungssysteme getriggert, der Zelltod mit verzögerter Zwischenphase von Schädigungen während der G₂-Phase eingeleitet und der Mitose-assoziierte Zelltod durch letale Chromosomenaberrationen ausgelöst wird (Radford und Murphy 1994). Welcher Weg jedoch eingeschlagen wird, hängt von der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Bestrahlung, der Radiosensitivität der Zellen und von der Fraktionierung der Strahlendosis ab sowie der Anwesenheit von Sauerstoff im Gewebe (Senn 2001) und unterliegt interindividuellen Unterschieden. Jedem Individuum liegt dabei eine andere zelluläre Strahlensensibilität zugrunde, die beispielsweise durch Deletionen oder *loss of function* in bestimmten Kandidatengenen wie *BRCA2* oder *p53*, beeinflusst wird (Rosen et al. 1999).

1.7 Der Mikrokerntest

Bereits in den 1930er und 1940er Jahren wurden die ersten Beobachtungen bezüglich der Induktion von Mikrokerneln (MNi) durch Röntgenstrahlung getätigt (Carlson 1938, Sax 1941). Heute nutzt

man dieses Wissen um Chromosomenschäden auf zellulärer Ebene nachzuweisen. Per definitionem handelt es sich bei MNi um Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die von einer eigenen Plasmamembran umgeben sind. Ihre Bildung wird durch Chromosomenaberrationen verursacht, die in der Anaphase der Mitose eine Fehlverteilung der Bruchstücke nach sich zieht. Anschließend kondensieren die zurückgebliebenen Chromosomenstrukturen in der Interphase zu einem oder mehreren MNi. Diese lassen sich anfärben und lichtmikroskopisch nachweisen. In der Hämatologie ist dieses Phänomen bereits seit mehr als 100 Jahren als Howell-Jolly-Körperchen bekannt, wobei ursprünglich die Entstehung der Kernfragmente auf einer Fehlverteilung der Chromosomen zurückgeführt wurde (Howell 1890, Sears und Udden 2012).

Die ersten Tests, die später zur Entwicklung des heute bekannten Mikrokerntests führten, wurden 1957 an Favabohnen (*Vicia faba*) durchgeführt (Neary et al. 1957). Dabei war ein Zusammenhang zwischen induzierten DNA-Schäden und ionisierenden Strahlen zu erkennen (Neary 1959). Daraus wurde die Idee geboren, das genotoxische Potential eines Agens mittels entstandener Mikrokerne direkt nachzuweisen. Der Mikrokerntest erleichterte somit das Aufspüren chromosomaler Schäden und wurde durch die Forschungsergebnisse von Heddle und Schmid in der Fachwelt endgültig etabliert (Heddle 1973, Schmid 1975). Im Laufe der Zeit wurde der Test an verschiedenen Zellarten durchgeführt. Dabei zeigten sich Lymphozyten als besonders geeignet, da sie leicht und schnell zu kultivieren sind und eine hohe Empfindlichkeit besitzen (Antoine et al. 1981, Fenech und Morley 1985a, Venkatachalam et al. 1999). Außerdem konnte eine Korrelation von entstandenen MNi mit Alter und Strahlendosis beobachtet werden (Fenech und Morley 1986). Mit der Einführung der Zytokinese-Block-Technik durch Fenech und Morley (Fenech und Morley 1985b, 1986), bei der Cytochalasin B (Cyt B) die Zytokinese unterbindet – bei weiterhin bestehender Karyokinese – gelang es eine höhere Sensitivität zu erlangen, da diese Vorgehensweise die unterschiedliche Kinetik der Zellteilung berücksichtigte (Fenech 2000). Die Zugabe von Cyt B, einem Mikrofilament-Inhibitor, zieht eine gestörte Zytoplasmaverteilung nach sich, bei der zweikernige Zellen (BN) entstehen. Alle Zellen, die nach Exposition mit dem Agens die Mitose vollziehen, können dadurch sichtbar gemacht und ausgezählt werden. Somit lassen sich 60-90 % der azentrischen Fragmente erfassen (Ramalho et al. 1988). Die Darstellung der dizentrischen Chromosomen erfolgt in Form von Kernplasmabrücken (NPB). Sie entstehen, wenn das Chromatin in der Anaphase der Mitose gleichzeitig an beide Zellpole gezogen wird (Abbildung 5). Anschließend legt sich eine Kernmembran um das Chromatin und bildet eine Verbindung zwischen beiden Zellkernen.

Die mitotische Aktivität der Zellpopulation wird mittels Kernteilungsindex (NDI) wiedergegeben. Sein Wert liegt zumeist im Bereich $1 \leq \text{NDI} \leq 2$ und ermöglicht die Erfassung der Zellvitalität. Um

auch Apoptosen und Nekrosen mit einbeziehen zu können, die vor allem bei hohen Dosen genotoxischer Agenzien entstehen, wurde der Kernteilungszytotoxizitätsindex (NDCI) eingeführt.

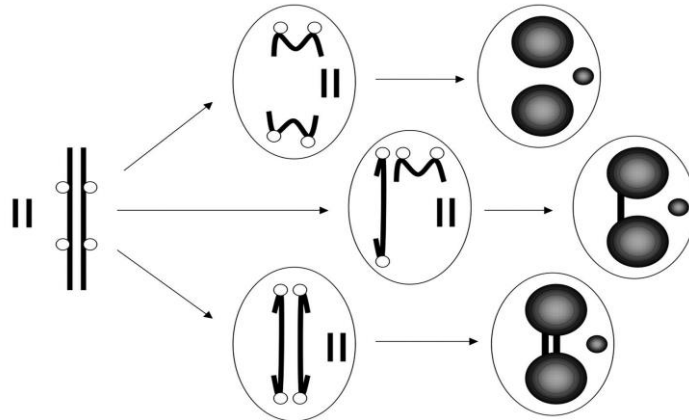


Abbildung 5: Entstehung von NPB durch dizentrische Chromosomen.

Idealerweise werden entsprechend in der Abbildung alle Fragmente erfasst. Jedoch können nicht 100 % der aberrierten Chromosomen mikroskopisch dargestellt werden, da bei der Formierung der Zellkerne α - und dizentrische Fragmente vollständig oder teilweise in die Kernmembran mit eingeschlossen und dadurch nicht mehr sichtbar werden (modifiziert nach Vral et al. 2011, S. 14).

Die Rate an DNA-Schäden lässt sich jedoch nicht nur durch ionisierende Strahlen beeinflussen, auch beispielsweise Chemotherapeutika oder Zytokine sind dazu befähigt. Daher hielten sie u.a. in die Tumorthherapie Einzug. Eines dieser Zytokine stellt TGF β 1 dar, welchem in früheren Arbeiten bereits eine Assoziation mit DNA-Schäden nachgewiesen werden konnte (Schirmer et al. 2011). Dabei gingen erniedrigte TGF β 1-Konzentrationen in lymphozytären Zellen mit einer verringerten DNA-Schädigung nach ionisierender Strahlung einher.

1.8 Ziel der Arbeit

Grundlage meiner Dissertation bildeten Arbeiten aus den Abteilungen für Klinische Pharmakologie und für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen, die den Einfluss von Genpolymorphismen auf die Zellvitalität und auf Expressionsparameter im TGF β -Signalweg nach TGF β 1-Stimulation und Bestrahlung darlegten (Câmpean 2007, Janke 2009). Darauf aufbauend konnten potentiell funktionelle Genvarianten identifiziert werden, die unter TGF β 1-Behandlung über einem negativen Rückkopplungsmechanismus zu einer *SMAD7* mRNA-Induktion und zu einer *SMAD3*-Suppression führten (Neumann 2012). Auch konnte ein hypofunktionaler Polymorphismus im *TGFBI*-Gen nachgewiesen werden, der mit erniedrigten Plasmakonzentrationen von TGF β 1 einherging (Schirmer et al. 2011). Um die Auswirkungen der Expressionsänderungen auf die DNA-Reparatur genauer quantifizieren zu können, war es Ziel

meiner Arbeit, DNA-Schäden in LCLs (*lymphoblastoid cell lines*, lymphoblastioid Zelllinien) nach TGF β 1-Stimulation und Bestrahlung zu ermitteln. Dabei sollten folgende Hypothesen geprüft werden:

- TGF β 1 führt zu einer Erhöhung der Strahlensensibilität in lymphozytären Zellen. Dazu wurden im HapMap-Projekt vorcharakterisierte LCLs mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt, mit TGF β 1 vorbehandelt oder einer kombinierten Behandlung von 3 Gy-Bestrahlung und TGF β 1-Vorinkubation unterworfen. Als Endpunkt der Analyse kam der Mikrokerntest zur Anwendung.
- Polymorphismen in Genen des TGF β -Signalwegs oder in Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, beeinflussen die Strahlenreaktion der LCLs. Dabei wurden über 1750 Genpolymorphismen aus 23 Kandidatengen betrachtet. Die Polymorphismen konnten der Datenbank des HapMap-Projektes entnommen und mit den eigenen Analysen korreliert werden.

2. Material

2.1 Puffer und Medien

Tabelle 1: Chemikalien zum Ansatz der Puffer und Medien.

Cytochalasin B von <i>Drechslera dermatioidea</i> Katalog-Nr. C6762-5MG	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid Artikel-Nr. D2650	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol (99 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälber Serum Katalog-Nr. S0115	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Glukose Katalog-Nr. G7021	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
HEPES Katalog-Nr. H7523-250G	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol (99 %) Katalog-Nr. 106009	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) Katalog-Nr. 106329	Merck	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin Katalog-Nr. A2213	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
RPMI 1640 Pulvermedium 5 l Katalog-Nr. T121-05	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
rekombinantes humanes TGFβ1 Artikel-Nr. C-63504	PromoCell GmbH	Heidelberg, Deutschland

Als Nährmedium für die LCLs dient RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Pulvermedium, welches mit 7,13 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), 11,92 g HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) und 12,5 g Glukose versetzt wird. Anschließend werden 25 ml aliquotiertes Penicillin (10 000 U/ml)/Streptomycin (10 000 µg/ml) zugeführt. Das Medium wird mit bidestilliertem Wasser auf fünf Liter aufgefüllt und der gesamte Ansatz sterilfiltriert. Danach

werden je 450 ml der Lösung mit 50 ml hitze-inaktiviertem FKS (fetales Kälber Serum) versehen. Dadurch erhält man ein Verhältnis RPMI:FKS = 9:1. Das FKS wurde zuvor für 30 Min bei 56 °C im Wasserbad hitze-inaktiviert.

Für die Herstellung des unter Kapitel 3.1 verwendeten Cytochalasin B-Zusatzes werden 5 mg des Cyt B-Pulvermediums in 8,3 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, 600 µg/ml) aufgelöst. Anschließend werden 75 µl dieser Lösung in 10 ml RPMI überführt. Dadurch ergibt sich eine Konzentration von 4,5 µg/ml Cyt B Lösung.

2.2 Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um LCLs. Dies sind mittels Transfektion durch Epstein-Barr-Viren (EBV) immortalisierte B-Lymphozyten. Sie wurden vom Coriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, USA, bereitgestellt, welches die Zellen im Rahmen des HapMap-Projektes vertreibt. Bei diesen LCLs handelt es sich um Zellen nicht verwandter Spender, die wie im Kapitel 1.2 beschrieben aus dem Bundesstaat Utah in den USA stammen und kaukasischen Ursprungs sind. Von den 59 ausgesuchten Zelllinien konnten ihrerseits 48 erfolgreich angezüchtet werden.

Die 48 verwendeten Zelllinien laufen beim Coriell Institute unter folgenden ID-Nummern: GM06993, GM06994, GM07000, GM07022, GM07034, GM07055, GM07056, GM07345, GM07357, GM11832, GM11839, GM11840, GM11992, GM11993, GM11994, GM12003, GM12004, GM12005, GM12006, GM12043, GM12044, GM12056, GM12057, GM12144, GM12145, GM12146, GM12154, GM12155; GM12156, GM12234, GM12239, GM12248, GM12249, GM12717, GM12750, GM12751, GM12760, GM12762, GM12763, GM12812, GM12813, GM12814, GM12815, GM12872, GM12873, GM12874, GM12891, GM12892.

2.3 Geräte

Tabelle 2: Geräte.

Canon PowerShot A640	Canon	Krefeld, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Function Line BB16 (37°C, 5 % CO ₂)	Heraeus-Christ Instrument	Hanau, Deutschland
Eppendorf Research® Pipette (200 µl)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® Pipette (1000 µl)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Standard 18	Carl Zeiss	Göttingen, Deutschland

Pipetboy plus Pipettierhilfe	Integra Biosciences	Chur, Schweiz
Invertiertes Phasenkontrastmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss	Göttingen, Deutschland
Reinstwasser-System Arium 611VF	Sartorius	Göttingen, Deutschland
RS225 X-Ray Box	Gulmay Medical LTD	Surrey, GB
Werkbank Lamin Air	Heraeus-Christ Instrument	Hanau, Deutschland
Zytozentrifuge Shandon Cytospin [®] 4	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

2.4 Zubehör

Tabelle 3: Zubehör.

Cellstar [®] 15 ml PP-Test-Tubes Katalog-Nr. 188-271	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser für Haemacytometer (20 x 26mm) Artikel-Nr. 3700000	LO Laboroptik GmbH	Lancing, Großbritannien
Diff-Quik [®] Färbeset Referenz-Nr. 130832	Medion Diagnostics AG	Düdingen, Schweiz
epT.I.P.S. Reloads, 2-200 µl Bestell-Nr. 0030073428	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Reloads, 50-1000 µl Bestell-Nr. 0030073460	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Immersionsöl 518F 100 ml Bestell-Nr. 444963-0000-000	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Safe-lock tubes 2,0 ml Bestell-Nr. 0030120094	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Objekträger (76 x 26 mm) Artikel-Nr. VA11310004FKB	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH	Braunschweig, Deutschland
Serological Pipette 10 ml in 1/10 ml Bestell-Nr. 86.1254.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Serological Pipette 25 ml in 2/10 ml Bestell-Nr. 86.1685.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Shandon EZ Cytofunnels [®] Trichter, Produkt-Nr. A78710003	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

Shandon Filter Cards TPX Produkt-Nr. 5991022	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Sterilfilter Filtropur L 0.2 LS Bestell-Nr. 83.1827.001	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer 0,0025 mm ² Neubauer improved Artikel-Nr. 1110000	LO-Laboroptik GmbH	Friedrichsdorf, Deutschland
Einmal-Pasteur-Pipetten 3,5 ml Bestell-Nr. 861172	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

2.5 Software

Tabelle 4: Software.

OpenOffice Writer, Version 2007	Textbearbeitung
OpenOffice Calc, Version 2007	Tabellenbearbeitung
Tests, MS-DOS Anwendung	mikroskopische Auszählung, programmiert von PD Dr. med. H. Wolff, Göttingen
Corel Photo-Paint Essentials 4	Fotobearbeitung
HaploView-Software (http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview)	grafischen Aufbereitung von Daten aus den Genotyp-Datenbanken
SPSS Version 12.0	Darstellung von Messdaten und Testung auf mögliche Assoziationen

2.6 Datenbanken

Tabelle 5: Datenbanken.

dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/	Datenbank zur genetischen Keimbahn-Variabilität beim Menschen
HapMap-Projekt	http://www.hapmap.org/index.html.en http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov	Genotypen-Datenbank Version August 2010
HGNC	http://www.genenames.org/	Informationen zu Genen, mRNA und Proteinen sowie Polymorphismen
GeneAtlas	http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/google/gene.php	
GeneCards	http://www.genecards.org/	
OMIM	http://omim.org	Online Mendelian Inheritance in Man® – Online Katalog über genetische Störungen
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	Literatur

3 Methoden

3.1 Anzucht und Vorbereitung der LCLs

Die Anzucht der LCLs erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen durch M. Neumann und R. Götze. Ihr Vorgehen wird in den Arbeiten „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“ (Neumann 2012) und in „Biomarker für oxidativen Stress bei Entzündungsreaktionen: Bedeutung von Genpolymorphismen und Genexpression der NADPH-Oxidase unter pro- und anti-inflammatorischen Bedingungen“ (Götze 2013) genauer ausgeführt.

Wurde im Institut für Klinische Pharmakologie eine ausreichende Zellzahl von 22,8 Millionen Zellen angezchtet, wurden für das weitere Vorgehen in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen zweimal zwei 600 μ l Ansätze mit je 600.000 Zellen für jede Zelllinie separiert. Zweien dieser Ansätze wurde zuvor TGF β 1 zugesetzt, die anderen zwei Proben blieben unbehandelt. Je ein Ansatz der TGF β 1 behandelten und unbehandelten Probe wurden nun mit 3 Gy-Röntgenstrahlungen bestrahlt. Genauere Ausführungen diesbezüglich siehe Kapitel 3.3. Somit entstanden die Behandlungsbedingungen 5 ng/ml TGF β 1, 3 Gy-Röntgenstrahlung, 5 ng/ml TGF β 1 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung und eine unbehandelte Kontrolle in allen 48 Zelllinien. Direkt im Anschluss wurde jeder Probe 1,4 ml RPMI Nährlösung zugesetzt, um eine Zelldichte von 300 000 Zellen/ml zu erhalten. Abschließend wurde den Proben aller Behandlungsbedingungen 15 μ l Cytochalasin B beigefügt (7,5 μ l/ml), bevor sie für 28 h in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubierten. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse prüfen zu können, wurden bei 14 LCLs die Versuchsanordnungen zu einem späteren Zeitpunkt in gleicher Weise erneut durchgeführt. Daraus ergaben sich insgesamt 62 Zelllinien, von denen zwei Ansätze aufgrund einer einmalig aufgetretenen technischen Störung des Bestrahlungsgerätes verworfen werden mussten. Somit lag eine Gesamtzahl von 60 LCLs vor, die im Ergebnisteil besprochen werden.

3.2 Vorversuche

3.2.1 Dosis-Effekt-Kurve

Bevor mit der Bestrahlung der LCLs begonnen wurde, wurde die Blutprobe eines gesunden Spenders *in vitro* bestrahlt. Dabei kamen verschiedene Dosen zwischen 0 und 4 Gy zur Anwendung, um eine Dosis-Effekt-Kurve zu erhalten (Abbildung 6). Das entstandene Verhältnis der MNi in BN in Abhängigkeit zur Bestrahlung stellte sich dabei nahezu linear dar ($y = 0,84 + 13,17x$; $R = 0,99341$). Aufgrund des deutlichen Bestrahlungseffektes, bei erhaltener Übersichtlichkeit und Auszählbarkeit des Präparates, wurde eine Dosis von 3 Gy für die Bestrahlung der LCLs gewählt.

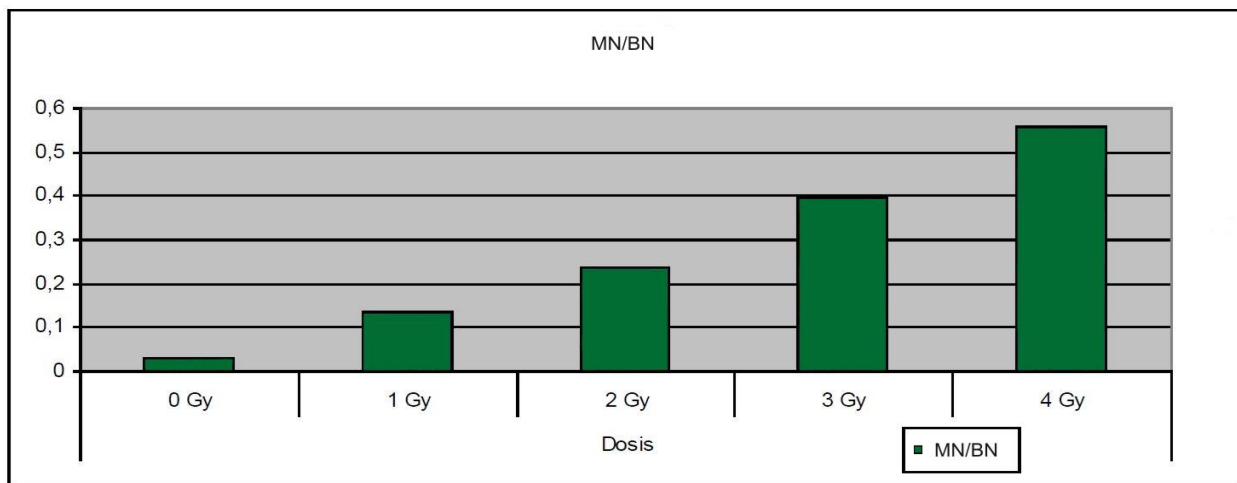


Abbildung 6: Dosis-Effekt-Kurve (modifiziert nach Hennies 2010, S. 36).

3.2.2 Inkubationszeit

Die Zugabe von Cyt B, welches aus Schimmelpilzen gewonnen wird, unterbindet die Zytokinese bei erhaltener Karyokinese (Carter 1967). Dies erfolgt durch Blockierung der Mikrofilamentformation. Somit sorgt es für eine Anreicherung von Zellkernen in Zellen, bei denen Mitose stattgefunden hat. Nach der ersten Zellteilung sind demnach zwei Zellkerne in einer Zelle aufzufinden. In der Literatur wird ein Prozentsatz von 35 – 60 % an BN unter allen lebenden Zellen als optimal für die Anwendung des Mikrokerntests beschrieben (Fenech 2000). Dies wird zumeist nach einer Inkubationszeit von 28 h erreicht. Um die Hypothese zu überprüfen, wurde eine Versuchsreihe mit Inkubationszeiten von 26, 28 und 30 h

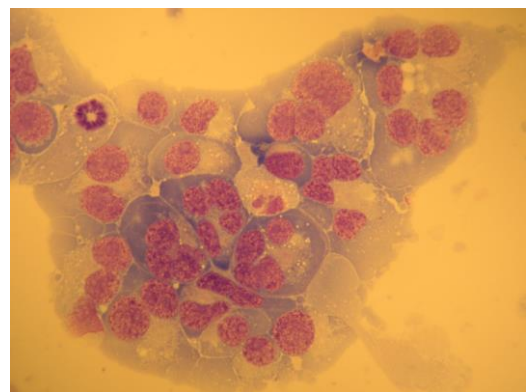


Abbildung 7: Mehrkernige Zellen.

Nach 30 h Inkubationszeit entstanden mehr als 30 % mehrkernige Zellen (Canon PowerShot A640, 100fache Vergrößerung).

durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass nach 26 h noch nicht ausreichend BN vorhanden waren. Nach 30 h lag hingegen ein zu großer Anteil an Zellen mit zumeist drei bis vier Zellkernen vor, da bereits die zweite mitotische Teilung vollzogen wurde (Abbildung 7). Dadurch nahmen diese Zellen einen zu hohen Anteil an allen Zellen ein und waren bei der Auszählung der BN hinderlich. Somit wurde eine Inkubationszeit von 28 h wie auch in der Literatur beschrieben angewandt.

3.3 Bestrahlung der LCLs

Die Bestrahlung der LCLs wurde mit dem Röntgenstrahler Xstrahl RS225 der Firma Gulmay Medical Ltd. (Surrey, Großbritannien) vorgenommen. Dabei wurde eine Dosisrate von 1 Gy pro Minute (Min) über einen Zeitraum von 3 Min eingesetzt. Die Gesamtdosis betrug 3 Gy, bei einer Stromstärke von 200 KV und 15 mA Spannung. Als Filter wurde Kupfer in einer Stärke von 0,5 mm verwendet. Weiterhin wurde eine Tischhöhe von 500 mm gewählt, woraus sich ein Felddurchmesser von 310 mm ergab.

Es wurden je zwei Eppendorf-Gefäße, eine TGFβ1 vorbehandelte und eine unbehandelte Probe, in der Mitte des Bestrahlungstisches platziert. Um eine gleichmäßige Dosisverteilung in allen Proben zu erhalten, rotierte der Tisch während des Bestrahlungsvorganges.

3.4 Zytozentrifuge

Die Zellen wurden nach 28 stündiger Inkubation mittels Zytozentrifuge Shandon Cytospin[®] 4 der Firma Thermo Scientific auf die Objektträger (OT) aufgebracht. Dazu wurde die Nährlösung zunächst vorsichtig resuspendiert. 500 µl der Lösung wurden dann in ein Cellstar[®]-Röhrchen überführt und mit 500 µl RPMI Nährlösung vermischt. So verblieben 1,5 ml mit 300 000 Zellen/ml und man erhielt zusätzlich 1 ml mit 150 000 Zellen/ml. Die zuvor mit Datum, Behandlungsbedingung, Zellzahl und LCL Nummer beschrifteten OT wurden mit einer doppelt gelochten Filterkarte und einem Cytofunnel[®] bestückt. Aus beiden Verdünnungen wurden nun fünfmal je 100 µl entnommen und in je ein Cytofunnel[®] überführt. Dabei handelt es sich um einen Trichter, welcher mittels Kanal mit dem OT verbunden ist. Durch die Zentrifugalkräfte werden die Zellen als Monolayer auf die OT Oberfläche gedrückt, ohne ihre Integrität zu verlieren. Die Filterkarte dient dazu, das abzentrifugierte Nährmedium aufzufangen. Die Zytozentrifuge wurde auf 1500 Umdrehungen pro Min, über einen Zeitraum von 5 Min bei langsamer Beschleunigung eingestellt. Aufgrund der Abflachung der Zellen gelang eine gute Zellkern-Darstellung. Nach Beendigung der Zentrifugation lagen für jede Behandlungsbedingung fünf OT mit je einem 30 000 Zellen Spot und einem 15 000 Zellen Spot vor.

3.5 Anfärben der Zellen

Nach der Zentrifugation wurden die OT für 10 Min luftgetrocknet und anschließend in einer mit Methanol befüllten Küvette für weitere 10 Min fixiert. Für das Einfärben der Zellen wurde das Diff-Quik® Färbeset der Firma Medion Diagnostics verwendet, eine Schnellfärbemethode, vergleichbar mit der Giemsa-May-Grünwald Färbung.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Diff-Quik® Färbesets.

Diff-Quik I Färbelösung	Eosin Y (1,22 g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6) Konservierungsmittel: Natriumazid 0,1 % (g/v)
Diff-Quik II Färbelösung	Thiazin-Farbstoff (1,1 g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6)

Die OT wurden fünfmal für je eine Sekunde in eine Färbeküvette mit der Diff-Quik I Lösung getaucht. Dieser Vorgang wurde mit der Diff-Quik II Lösung in gleicher Weise wiederholt. Zwischen den Eintauchvorgängen wurden die OT kurz abgetropft. Direkt danach erfolgte die Reinigung der OT von Farbresten mittels Spülung mit bidestilliertem Wasser. Zum Schluss wurden die OT bei Raumtemperatur getrocknet.

3.6 Der Mikrokerntest

3.6.1 Kriterien für BN

Bevor mit der Auszählung der BN begonnen wird, muss definiert werden wie die Auswahl der BN erfolgt:

- die Zelle muss zwei Zellkerne besitzen
- die zwei Zellkerne müssen eine intakte Kernmembran aufweisen und innerhalb desselben Zytoplasmas liegen
- die beiden Zellkerne müssen annähernd die gleiche Größe aufweisen sowie in Färbemuster und Farbintensität übereinstimmen
- bei Vorhandensein einer NPB zwischen den Zellkernen darf deren Durchmesser nicht mehr als $\frac{1}{4}$ des größten Kerndurchmessers betragen

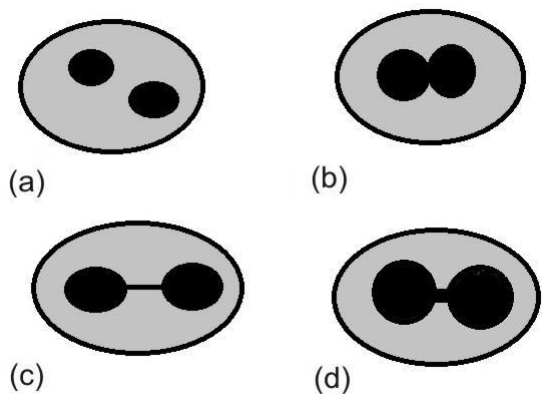


Abbildung 8: Zweikernige Zellen.

(a) Ideale BN; (b) Zellkerne berühren sich ohne zu überlappen; (c) schmale NPB zwischen den Zellkernen; (d) breite NPB (modifiziert nach Fenech 2000, S. 85).

- die Zellkerne dürfen sich berühren, aber idealerweise nicht überlappen (sollte es dennoch zu einer Überlagerung kommen, kann diese Zelle nur als zweikernige Zelle gewertet werden, wenn die Grenzen der Zellkerne eindeutig voneinander abgrenzbar sind)
- der Zytoplasmasaum muss intakt und eindeutig von der Zellmembran der benachbarten Zellen abzugrenzen sein

Diese Eigenschaften sind auch auf mehrkernige Zellen übertragbar.

3.6.2 Kriterien für MNi

MNi sind zumeist eine direkte Folge von DNA-Schäden, verursacht durch beispielsweise kanzerogenen Chemikalien oder Röntgenstrahlung (Natarajan und Zwanenburg 1982). Dabei kann es u.a. zu Chromosomenverlust durch azentrische Chromosomen oder fehlgewanderte Chromosomen, die nicht bis zu den Zellpolen gelangt sind, kommen, oder zu Chromosomenbrüchen, die bei mangelhafter Reparatur des Doppelstranges zum Verlust des DNA-Abschnittes führen können (Abbildung 9). Die MNi dienen dabei als Marker für das den Chemikalien innewohnende genotoxische Potential oder als Vorhersagewert für die Strahlensensibilität von z.B. Tumoren. Sie sind wie folgt definiert:

- der Durchmesser eines MN beträgt zwischen $\frac{1}{3}$ und $\frac{1}{16}$ des größten Durchmessers eines Zellkerns – dies entspricht $\frac{1}{9}$ bis $\frac{1}{256}$ des Volumens des Zellkerns
- MNi sind in ihrer Form rund bis oval
- MNi sind nicht lichtbrechend und daher leicht von Artefakten wie Farbrückständen zu unterscheiden
- MNi sind nicht mit den Zellkernen verbunden
- MNi dürfen den Zellkern berühren, aber diesen nicht überlappen; die Abgrenzung der Membran des MN und der des Zellkerns muss möglich sein
- MNi sollten die gleichen Farbintensität wie der Zellkern aufweisen, können aber auch gelegentlich stärker gefärbt sein

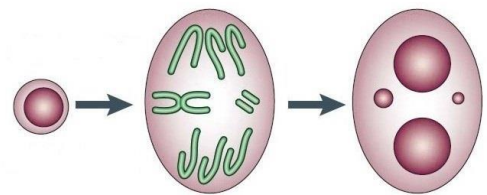


Abbildung 9: Mikrokern-Entstehung.

Entstehung von MNi durch Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen (modifiziert nach Fenech 2007, S. 1084).

3.6.3 Kriterien für NPB

Ebenso wie die MNi sind auch NPB eindeutig definiert. Zu ihren Auszählkriterien gehören:

- NPB sind durchgängige Plasma-Verbindungen zwischen dem Kernplasma der Zellkerne
- die Breite einer NPB kann variieren, darf aber $\frac{1}{4}$ des Durchmessers der Zellkerne nicht

überschreiten

- NPB sollten die gleichen Farbeigenschaften aufweisen wie die Zellkerne
- in seltenen Fällen kann es mehr als eine NPB geben
- eine BN mit NPB darf ggf. MNi enthalten

Am besten lassen sich NPB in BN nachweisen, bei der es zu keiner Berührung oder Überlappung der Zellkerne kommt.

3.6.4 Kriterien für Apoptosen

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Bei ihm handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, welcher das Gegenstück zur Proliferation darstellt und mit ihr im Gleichgewicht steht. Dabei werden zumeist Zellen beseitigt, bei denen es zu Funktionsverlusten, irreparablen Zellschäden oder Mutationen gekommen ist (Böhm und Schild 2003). Morphologisch unterscheidet sich die Apoptose von der Nekrose durch folgende Merkmale:

- früh-apoptotische Zellen zeichnen sich durch Chromatin-Kondensation im Zellkern aus, wobei das Zytoplasma und die Zellgrenzen intakt bleiben
- spät-apoptotische Zellen weisen einen Zerfall in kleinere Kernkörperchen auf, wobei die Zellmembran intakt bleibt
- die Farbintensität von Zellkern, Kernfragmenten und Zytoplasma ist meist kräftiger ausgebildet als in lebenden Zellen

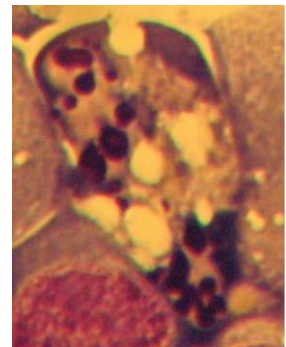


Abbildung 10: Spät-apoptotische Zelle (100fache Vergrößerung).

Bei der Apoptose werden im Gegensatz zur Nekrose die umliegenden Zellen nicht affektiert. Es kommt zu einer Zelleminierung ohne Entzündungsreaktion.

3.6.5 Kriterien für Nekrosen

Die Nekrose beschreibt den pathologischen Untergang von Zellen. Sie wird u.a. durch den schädigenden Einfluss von Noxen wie Giften, Radikalen, Strahlung oder Bakterien verursacht und geht mit einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe einher. Sie lässt sich wie folgt charakterisieren:

- früh-nekrotische Zellen weisen zahlreiche Vakuolen v.a. im Zytoplasma, aber auch im Zellkern auf und sind durch ein blasses Zytoplasma gekennzeichnet sowie eine beginnenden Auflösung der Zellmembran

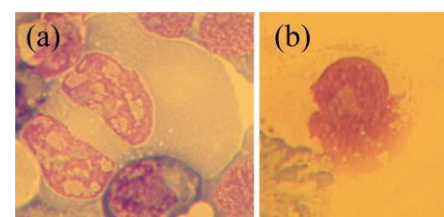


Abbildung 11: Nekrosen.

(a)Früh-nekrotische Zelle; (b) spät-nekrotische Zelle (100fache Vergrößerung).

- spät-nekrotische Zellen zeigen einen Zytoplasmaverlust und eine sich auflösende Kernmembran, bei der Kernmaterial austreten kann
- die Farbintensität von Zellkern und Zytoplasma ist zumeist geringer als in lebenden Zellen

3.7 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit dem Lichtmikroskop Standard 18 der Firma Zeiss bei 100facher Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl. Dabei wurden bei jeder der vier Behandlungsbedingungen (5 ng/ml TGFβ1, 3 Gy-Röntgenstrahlung, 5 ng/ml TGFβ1 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung, unbehandelte Kontrolle) aller 62 Zelllinien 1000 BN ausgezählt und die Anzahl der vorkommenden MNi sowie der NPB in diesen Zellen festgehalten. Die Kriterien, die jedes Datenblatt erfassen sollte, orientierten sich dabei an den Vorgaben von M. Fenech (Fenech 2000):

- Beschriftung des OT mit LCL-Nummer und Behandlungsbedingung
- Anzahl aller ausgezählten BN
- Anteil der BN mit keinem, einem, zwei, drei oder mehr MNi in mind. 1000 BN
- Gesamtzahl aller MNi in den ausgezählten BN
- Anteil der MNi an 1000 BN
- Anteil der BN mit MNi an 1000 BN
- Anzahl der BN mit NPB
- Verhältnis von ein-, zwei-, drei- und vierkernigen Zellen in 500 lebensfähigen Zellen
- NDI und NDCI
- Anteil der Apoptosen und Nekrosen an 500 Zellen

Weiterhin wurden alle gleichzeitig vorkommenden dreikernigen und mehrkernigen Zellen ($n > 3$) erfasst sowie deren Anteil an MNi und NPB.

Für die Berechnung des Kernteilungsindex (NDI) war die Erfassung aller ein-, zwei-, drei- und vierkernigen Zellen in 500 lebensfähigen Zellen notwendig, für den Kernteilungszytotoxizitätsindex (NDCI) zusätzlich die Erfassung von Apoptosen und Nekrosen in 500 Zellen.

Die Berechnung des NDI ergibt sich aus folgender Formel, wobei $M1 - M4$ die Anzahl der Zellkerne und N die Anzahl der gezählten lebensfähigen Zellen entspricht:

$$NDI = \frac{(M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4)}{N}$$

Der NDCI lässt sich wie der NDI aus der Anzahl der Zellkerne (M1 – M4) ermitteln sowie der Zahl der Apoptosen und Nekrosen. Nx bezieht sich hierbei auf alle gezählten Zellen:

$$NDCI = \frac{(Apoptosen + Nekrosen + M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4)}{Nx}$$

Ein Beispiel wie das Datenblatt zur Erfassung aller Rohdaten aussieht, findet sich im Anhang.

3.8 Analyisierte Gene

In dieser Arbeit wurden 1771 SNPs aus insgesamt 23 Kandidatengenen betrachtet. Die Genbezeichnung entspricht indes der offiziellen Nomenklatur der NCBI-Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Die Analyse der ausgewählten Genpolymorphismen umfasst den jeweiligen Genbereich inklusive der endständigen 10 kb (Kilobasen) der 5'- und 3'-Region. Dabei wurden die Genotypen in der Version vom August 2010 von der HapMap-Datenbank herunter geladen.

Betrachtet wurden alle singulären biallelischen Positionen; dazu gehören alle Genvarianten, bei denen zwei Allele an einer Position vorhanden sind. Der Tabelle sind sowohl die Gesamtzahl der Varianten als auch die Unterteilung in Transitionen, Transversionen und singuläre Allel-Deletionen zu entnehmen.

Tabelle 7: Untersuchte Gene mit Anzahl und Art der analysierten polymorphen Positionen.

Genname	Gengröße ±10kb	Zahl der genotypisierten polymorphen Positionen	Transitionen	Transversionen	Deletionen
<i>ATM</i>	166,3	113	68	43	2
<i>BRCA1</i>	101,2	82	62	20	0
<i>BRCA2</i>	104,2	139	98	41	0
<i>CDKN1A</i>	30,9	58	43	15	0
<i>ERCC2</i>	39,2	39	23	16	0
<i>LIG1</i>	74,9	90	69	21	0
<i>MLH1</i>	77,5	55	39	16	0
<i>MSH2</i>	100,2	61	35	26	0
<i>MSH6</i>	43,9	36	23	13	0

<i>NBN</i>	71,3	118	79	39	0
<i>PRKDC</i>	207,1	56	38	18	0
<i>RAD50</i>	107,7	49	37	12	0
<i>RAD51</i>	57	57	34	23	0
<i>SMAD2</i>	118,1	97	63	34	0
<i>SMAD3</i>	149,3	189	134	55	0
<i>SMAD4</i>	74,8	32	21	11	0
<i>SMAD7</i>	50,9	50	40	10	0
<i>TGFB1</i>	43	30	25	5	0
<i>TGFBR1</i>	69,1	65	46	19	0
<i>TGFBR2</i>	107,6	146	96	50	0
<i>TP53</i>	39,2	26	17	9	0
<i>XRCC1</i>	52,3	59	42	17	0
<i>XRCC5</i>	117	124	87	37	0

3.9 Statistik

Nachfolgend sollen die in der vorliegenden Arbeit angewandten statistischen Analysemethoden vorgestellt werden, welche sämtlich mit SPSS Version 12.0 durchgeführt wurden.

Daten, die zwecks einer statistischen Testung erhoben werden, können unverbunden (= unabhängig) sein, sofern sie nur in einer der untersuchten Teilmengen auftauchen oder verbunden (= abhängig), d.h. sie sind Bestandteil mehrerer Messungen. Dies ist für die Wahl des richtigen Tests von großer Bedeutung. Gleiches gilt für das Verteilungsmuster der gemessenen Variablen. Diese können entweder parametrisch (= normalverteilt) oder nicht-parametrisch sein. Entsprechend unterscheidet man zwischen parametrischen und nicht-parametrischen Tests. Erstgenannte setzen eine Normalverteilung bei den erhobenen Stichproben voraus und benötigen eine ausreichend große Stichprobenmenge von möglichst $n \geq 80$. Jedoch sind sie nur auf Intervallskalenniveau durchführbar. Nicht-parametrische Tests bedürfen keiner Voraussetzungen bezüglich des Verteilungsmusters der Daten und schließen auch normalverteilte Messdaten mit ein. Weiterhin können sie auch bei kleinen Stichprobenmengen ($n \leq 20$) angewandt werden, weisen daher jedoch eine geringere Teststärke auf.

Um zu überprüfen, ob für die erhobenen Variablen meiner Analyse eine Normalverteilung vorlag, kam der Shapiro-Wilk-Test zur Anwendung. Lag keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung vor ($p > 0,05$), kamen parametrische Testverfahren zum Einsatz, ansonsten wurde auf nicht-parametrische Methoden zurückgegriffen.

Nicht-parametrische Tests, die in meiner Auswertung zur Anwendung kamen, sind der Mann-Whitney-U-Test und der Jonckheere-Terpstra-Trend-Test für unverbundene und der Rangsummentest nach Wilcoxon für verbundene Stichproben. Zur graphischen Darstellung von Häufigkeitsverteilungen wurden Histogramme, Boxplots und Scatterplots erstellt.

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse lässt sich die Art (Richtung) und die Stärke eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen bestimmen. Dabei wird entsprechend des Verteilungsmusters beim parametrischen Ansatz der Pearson'sche Korrelationskoeffizient und beim nicht-parametrischen Ansatz der Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient verwendet. In meiner Analyse der Inter-Tag-Korrelation für die Anzahl an NPB lagen nicht-normalverteilte Datensätze vor, weshalb der Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient ρ zum Einsatz kam. Sein Wert liegt zwischen -1 und +1, wobei +1 einen perfekt positiven und -1 einen perfekt negativen Zusammenhang beschreibt. Kein Zusammenhang ist gegeben, wenn $\rho = 0$. Die statistische Signifikanz der Korrelation wird durch den p-Wert angegeben. Dargestellt wurden die Messgrößen in einem X-Y-Scatterplot.

Die Regressionsanalyse ist die häufigste Form der Ursachen- und Wirkungsanalyse und beschreibt den Zusammenhang zwischen zwei Variablen mit einer Regressionsgleichung. Diese lässt sich aus der Geraden ableiten, die die Punktwolke im Streudiagramm optimal repräsentiert. Dabei kann zwischen linearer und ordinaler Regression unterschieden werden. Der Unterschied zwischen den beiden Analyseverfahren liegt im Skalenniveau. Während bei der linearen Regression sowohl die abhängige als auch die erklärende Variable intervallskaliert sind, sind diese bei der ordinalen Regression ordinalskaliert.

4. Ergebnisse

Von den ausgewählten 59 LCLs des HapMap-Kollektivs konnten 48 erfolgreich angezchtet werden. Von diesen wiederum wurden 14 Zelllinien als Replikate mit einigen Wochen Abstand behandelt. An den LCLs wurden die Effekte von Röntgenstrahlung, TGF β 1 und deren Kombination (Röntgenstrahlung bei TGF β 1-Vorbehandlung) auf die Entstehung von DNA-Schäden in Form von MNi und NPB untersucht. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang ein möglicher Einfluss von Genpolymorphismen in bestimmten Kandidatengen des TGF β -Signalwegs und DNA-Reparaturgenen exploriert. Die verfügbaren Genotypen in den untersuchten Zielgenen wurden aus der HapMap-Datenbank entnommen.

4.1 Mikroskopische Auswertung der LCLs

Von den insgesamt 62 LCLs (inklusive aller Replikate) konnten alle Zelllinien unter dem Mikroskop nach den Kriterien des Kapitels 3.6 und 3.7 ausgezählt werden. Jedoch mussten zwei einfach behandelte Zelllinien vollständig verworfen werden. Dies war durch einen einmaligen Ausfall des Bestrahlungsgerätes bedingt, wodurch die Behandlungsbedingungen 3 Gy-Bestrahlung und TGF β 1-Inkubation 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung nicht vorlagen. Außerdem musste eine doppelt behandelte Zelllinie teilweise verworfen werden, da die Auszählung der Behandlungsbedingung 5 ng/ml TGF β 1 und der Kontrolle aufgrund schlechter OT-Qualität nicht vorgenommen werden konnte; die Behandlungsbedingungen 3 Gy-Bestrahlung und TGF β 1 16 h vor 3 Gy blieben davon jedoch unbeeinflusst. Dadurch ergab sich eine Summe von $n = 60$ für die Behandlungsbedingungen 3 Gy-Bestrahlung und 5 ng/ml TGF β 1 16h vor 3 Gy-Bestrahlung bzw. $n = 59$ für 5 ng/ml TGF β 1 und die Kontrolle.

Es wurde der Effekt, den TGF β 1 auf die Strahlenreaktion der Zellen ausübte, untersucht. Der gepaarte nicht-parametrische Rangsummentest nach Wilcoxon zeigte für die 46 einfach behandelten LCLs eine Signifikanz von $p = 0,004$ für die Erhöhung der NPB-Induktion nach TGF β 1-Vorbehandlung. Zuvor war mit dem Shapiro-Wilk-Test die Verteilung der beiden zu vergleichenden Gruppen geprüft worden. Da insbesondere bezüglich der MNi bei den mit TGF β 1 vorbehandelten Zellen eine starke Abweichung von der Normalverteilung festzustellen war ($p < 0,001$), kam hier ebenfalls der nicht-parametrische Rangsummentest nach Wilcoxon zur Anwendung. Dabei bestand eine Tendenz von $p = 0,08$ für eine erhöhte MNi-Induktion nach TGF β 1-Vorbehandlung.

Die ermittelten p-Werte ergaben unter Einbeziehung aller 60 Messungen, die durch Wiederholungsmessungen zur Überprüfung der Inter-Tag-Korrelation bedingt sind, eine Signifikanz von $p = 0,005$

für die NPB-Induktion nach TGF β 1-Vorbehandlung und $p = 0,04$ für die MNi. Dabei wurde bei Mehrfachmessungen der Mittelwert gebildet.

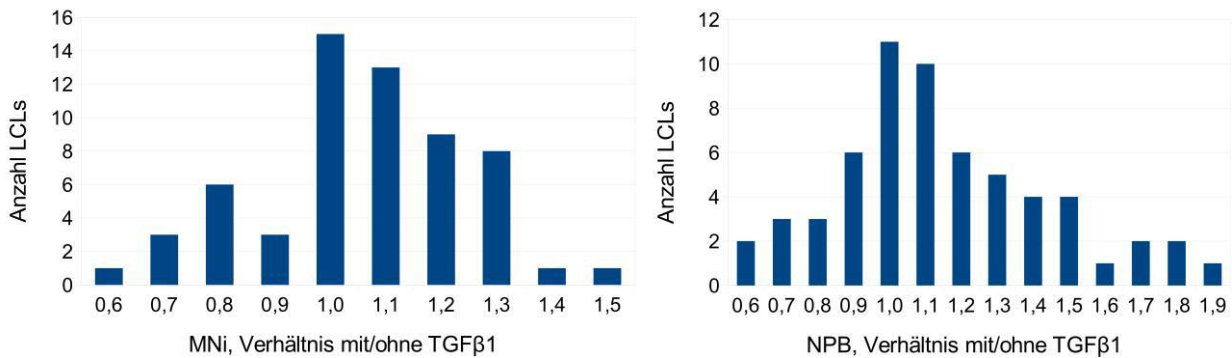


Abbildung 12: : Einfluss von TGF β 1 auf MNi (links) und NPB (rechts) in mit 3 Gy bestrahlten Zellen.

Für die LCLs ist jeweils der Quotient der Häufigkeitsverteilung mit versus ohne TGF β 1-Vorinkubation bei Bestrahlung mit 3Gy dargestellt. Dabei besagt ein Quotient von „1“ auf der x-Achse, dass kein Unterschied durch TGF β 1-Vorbehandlung bezüglich induzierter DNA-Schäden nachweisbar war, bei Werten <1 reduzierte, bei Werten >1 steigerte TGF β 1 die MNi und NPB-Anzahl.

4.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Da bekannt ist, dass die Effizienz der EBV-Transformation bei LCLs sehr heterogen ist, hat dies Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und den Stoffwechsel der Zellen. Auch kommt es zu Veränderungen während der Kultivierung einzelner Zelllinien. Dies kann sich erheblich auf die Zellparameter auswirken. Um für die einzelnen Zelllinien konstante Faktoren wie Genpolymorphismen sinnvoll untersuchen zu können, müssen funktionelle Parameter zu einem bestimmten Grad wiederholbar messbar sein. Hierfür wurde jeweils eine statistische Korrelation mit einem p -Wert $\leq 0,05$ gefordert.

Um zu prüfen, inwieweit sich die zytologischen Endpunkte innerhalb einer Zelllinie reproduzieren lassen, wurde für einige LCLs wie in Kapitel 3.1 beschrieben die gesamte Versuchsdurchführung im Abstand einiger Wochen wiederholt. Dabei gingen 13 Zelllinien in die Auswertung mit ein, da die nicht vollständig auswertbare Zelllinie ausgeschlossen wurde. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung beider Messtage wurden anschließend miteinander korreliert. In Abbildung 13 ist für die Behandlungsbedingungen 3 Gy sowie TGF β 1 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung die Induktion von NPB in BN in den Wiederholungsmessungen aufgeführt. Dabei war eine nominale statistische Signifikanz zu sehen.

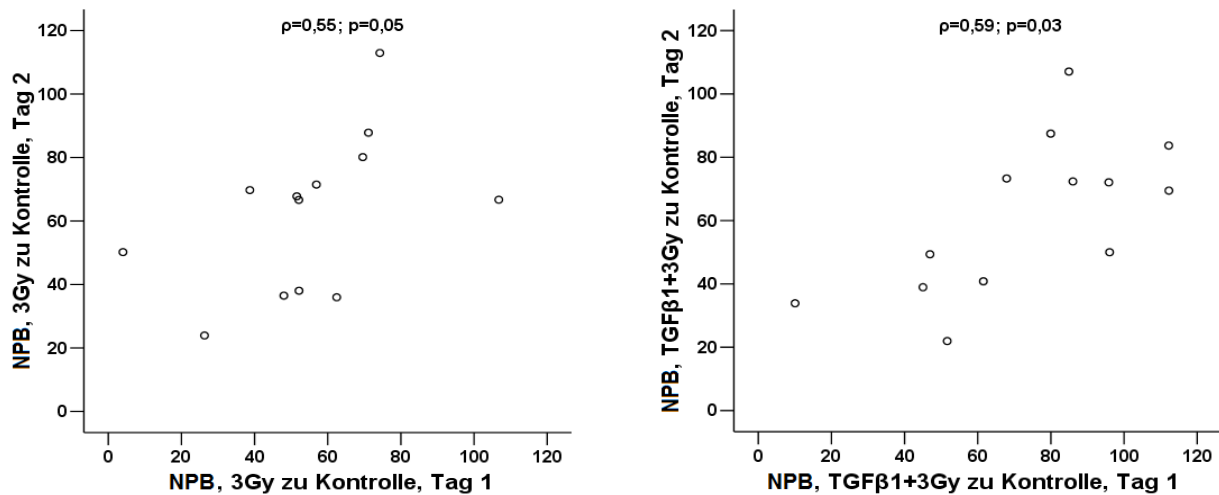


Abbildung 13: Inter-Tag-Korrelation für die Anzahl an NPB.

Links sind die Kontroll-bereinigten Daten für die Bestrahlung mit 3 Gy, rechts nach zusätzlicher Vorbehandlung mit TGFβ1 veranschaulicht. Durch die mikroskopische Auswertung wurden die NPB in BN ermittelt. Jede der 13 LCLs ist als Kreis dargestellt. Auf der x-Achse sind die Messdaten für den 1. Messtag, auf der y-Achse für den 2. Messtag abgebildet. Der statistische Zusammenhang wurde mit dem nicht-parametrischen Rangkorrelationskoeffizienten rho geprüft und ist in der Abbildung mit dem zugehörigen p-Wert angegeben.

Für alle weiteren Parameter wie NDI, NDCI, Apoptosen, Nekrosen oder MNi ergaben sich keine statistisch signifikanten Inter-Tag-Korrelationen. Somit konzentrierten sich die nachfolgenden Assoziationsanalysen mit den Genotypen hauptsächlich auf die NPB als Phänotypen.

Bei einigen v.a. klinisch relevanten Varianten wurde trotz fehlender Inter-Tag-Korrelation eine Betrachtung des MNi-Phänotyps vorgenommen, da diese von besonderem Interesse für die Forschung sind.

4.3 Beeinflussung der TGFβ1-Wirkung durch Genpolymorphismen

Es wurden für die 46 LCLs alle in diesen Zellen vorkommenden SNPs in 23 Kandidatengenen auf die Beeinflussung der Induktion von MNi bzw. NPB in BN hin analysiert. Insgesamt wurden 1771 SNPs (Tabelle 7) betrachtet. Bei den Genen handelt es sich um sieben Vertreter des TGFβ-Signalwegs sowie 16 DNA-Reparaturgene (Abbildung 14).

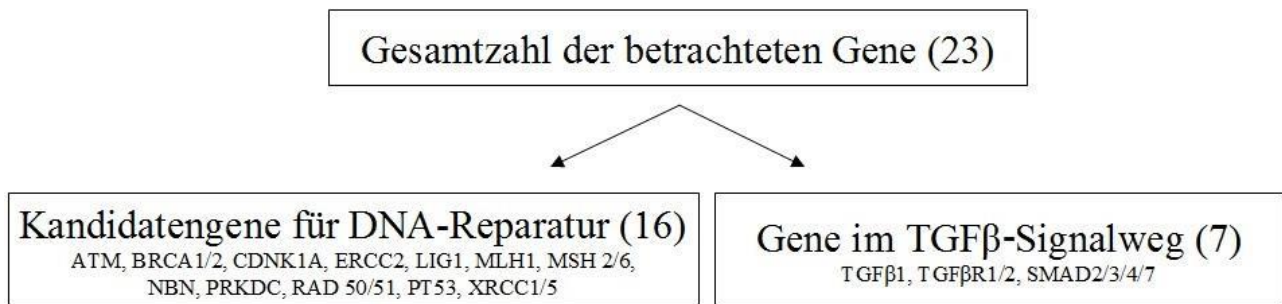


Abbildung 14: Auswahl der Kandidatengene.

Bei der Untersuchung der Korrelation der veränderten Strahlensensibilität bei Vorliegen eines bestimmten Polymorphismus in den LCLs konnte bei dieser explorativen Analyse in 13 Genen ein nominal signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Dieser wurde allgemein mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ definiert. Gab es für einen SNP in der Literatur bereits Berichte über eine klinische oder funktionelle Relevanz, wurde ein p-Wert von 0,05 als ausreichend erachtet. In den nachfolgenden Kapiteln sind die stärksten Assoziationen, nach Genen geordnet, beschrieben.

4.3.1 *BRCA1*

Das auffälligste Signal in *BRCA1*-Gen zeigte die Variante rs4986852 (Pfeil in Abbildung 15). Der Einfluss dieses SNP zeigte sich bereits bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy ($p = 0,05$, Abbildung 16). Dort kam es im Median zu 90 NPB, sofern das Variantenallel vorlag ($n = 4$) und zu 64 NPB bei Vorhandensein des Wildtypallels ($n = 37$). Der Effekt verstärkte sich, wenn mit TGF β 1 vorbehandelt wurde ($p = 0,003$). Dabei stieg die Zahl der NPB bei dem Variantenallel im Median auf 104, beim Wildtypallel auf 73. Hingegen hatte die alleinige TGF β 1-Behandlung keinen signifikanten Effekt auf die Entstehung von NPB ($p = 0,3$). Bei diesem SNP handelt es sich um eine *missense*-Mutation im Exon 11 des *BRCA1*-Gens, welche einen Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin an Position 1040 nach sich zieht (Ser1040Asn).

Die ebenfalls in Abbildung 15 markierten SNPs rs799913 und rs8176104 stellen Intronvarianten dar, bei denen keine Kopplung zu rs4986852 vorliegt.

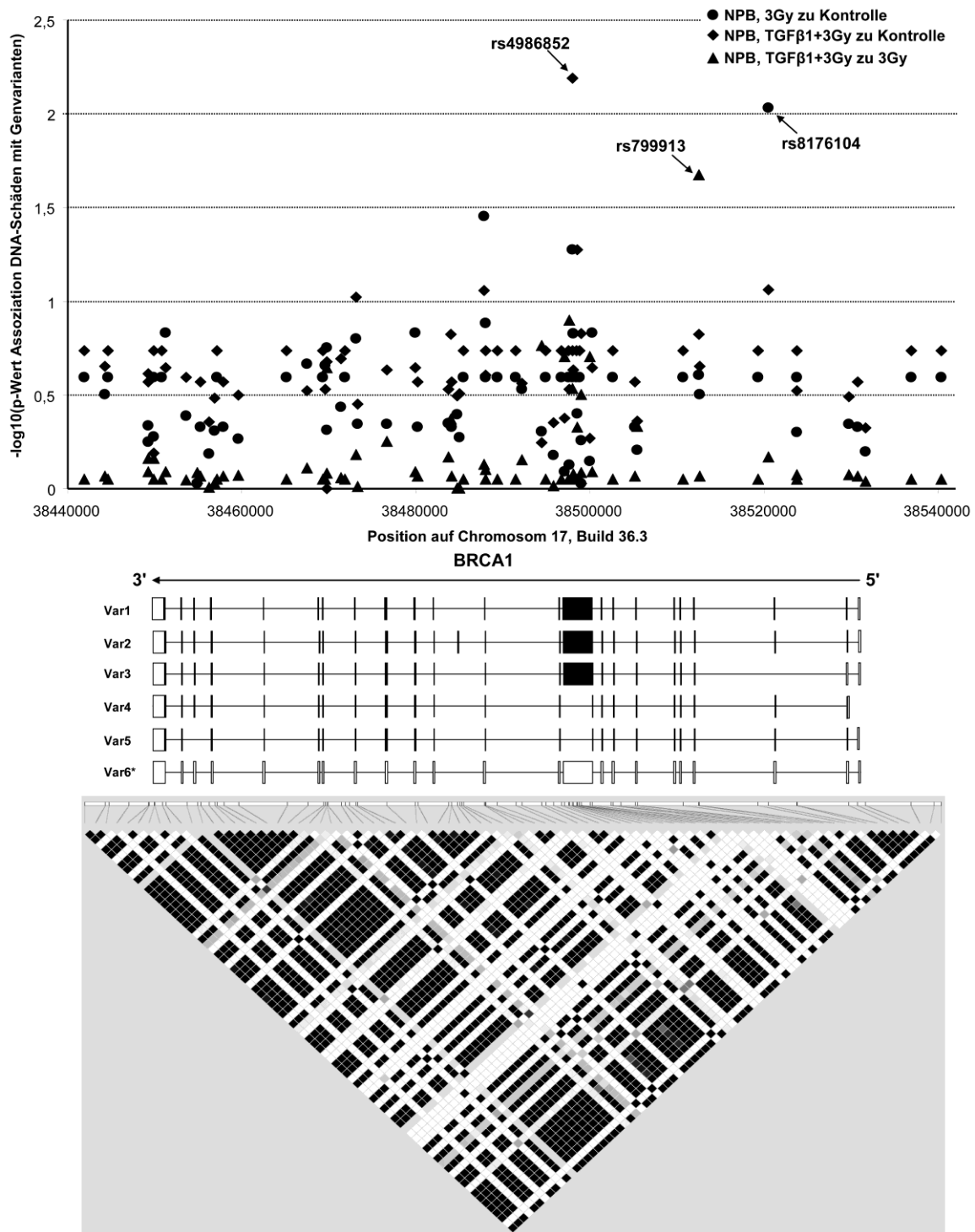


Abbildung 15: BRCA1-SNPs und ihre Assoziation zu Strahlen-induzierter Zytotoxizität.

Jede der 82 polymorphen Positionen im BRCA1-Gen, einschließlich der ± 10 kb flankierenden Sequenzen, ist durch ein Symbol (siehe Legende) für die Assoziation mit einem der drei Funktionsparameter repräsentiert. Im oberen Bildteil ist der negative dekadische Logarithmus des p-Wertes für die Assoziation zwischen DNA-Schäden in Form von NPB und entsprechender Genvariante dargestellt. 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 Niveau von 0,005 einem Wert von 2,3. Im unteren Bildteil

befindet sich der zugehörige Kopplungsplot der Genpolymorphismen. Je dunkler eine Raute gefärbt ist, desto stärker ist der genetische Kopplungsgrad zwischen den beiden betreffenden SNPs (Bild mit HaploView Software erstellt). Die statistisch auffälligsten Genvarianten sind im oberen Bildteil durch Pfeile markiert und beschriftet. Die beiden Teilbilder sind in den Positionen der SNP Anordnung aufeinander abgestimmt.

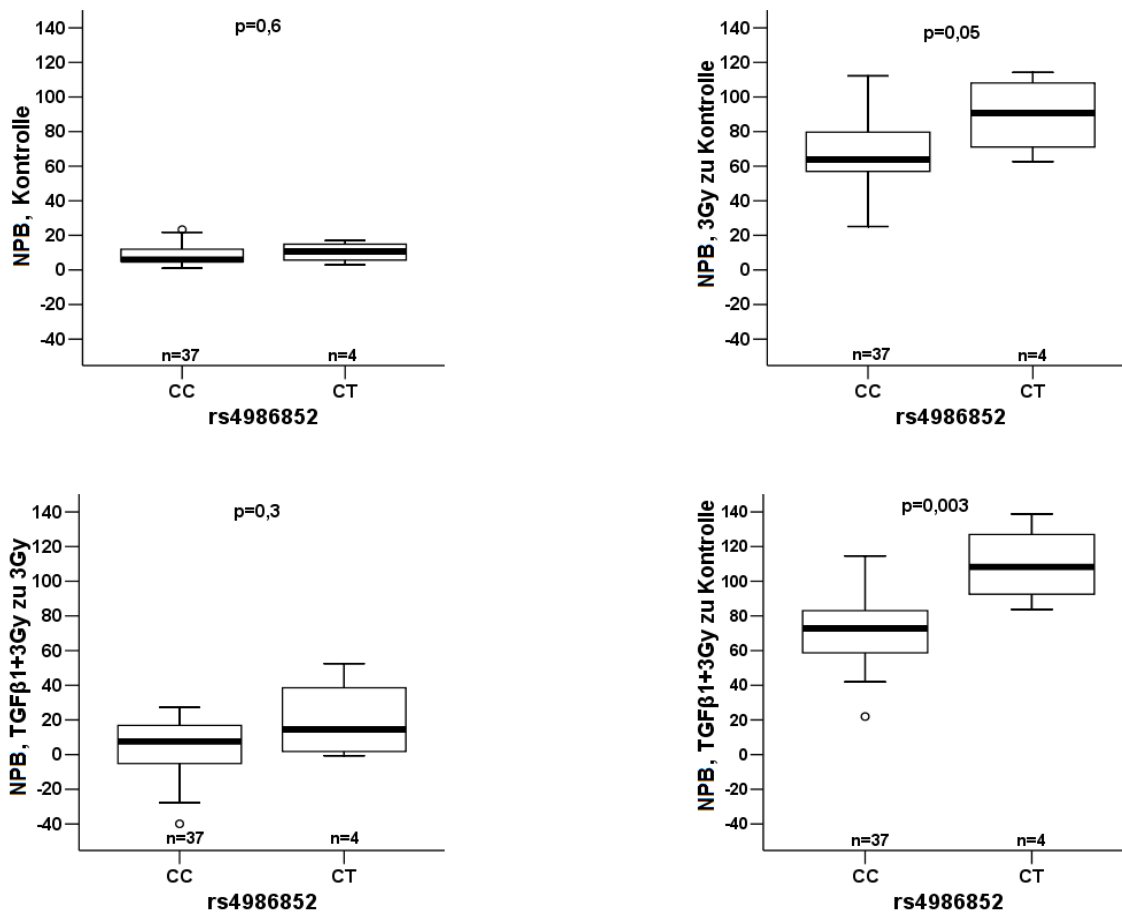


Abbildung 16: Detaillierter Boxplot für die auffälligste BRCA1-Variante.

Hier ist der Einfluss der Variante auf die Induktion von NPB veranschaulicht, wobei keine der verwendeten Zelllinien homozygot für das Variantenallel war. Oben: Das Vorliegen des Variantenallels führt auf Kontrollniveau (links) zu keiner vermehrten Entstehung von DNA-Schäden, bei 3 Gy hingegen verursacht diese eine vermehrte NPB-Bildung (rechts). Unten: Ein reiner TGFβ1-Effekt liegt nach Bereinigung des Strahlungseffektes nicht vor (links). Der Strahleneffekt wird jedoch durch die Zugabe von TGFβ1 verstärkt (rechts). Die statistische Testung erfolgte hier mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test, die zugehörigen p-Werte sind eingetragen.

4.3.2 BRCA2

Insgesamt fanden sich im BRCA2-Gen zwölf Varianten mit $p \leq 0,02$ ($-\log_{10} > 1,5$) (Abbildung 17). Das Variantenallel des Polymorphismus rs9567552 ging nach 3 Gy-Bestrahlung mit einer vermehrten Entstehung von NPB einher ($p = 0,01$) wie Abbildung 18 zu entnehmen ist. Ein modellierender Effekt von TGFβ1 konnte in Zusammenhang mit diesem SNP nicht nachgewiesen

werden ($p = 0,9$ bei TGF β 1-Vorbehandlung). Diese Variante liegt in der 5'-UTR (*untranslated region*) des *BRCA2*-Gens.

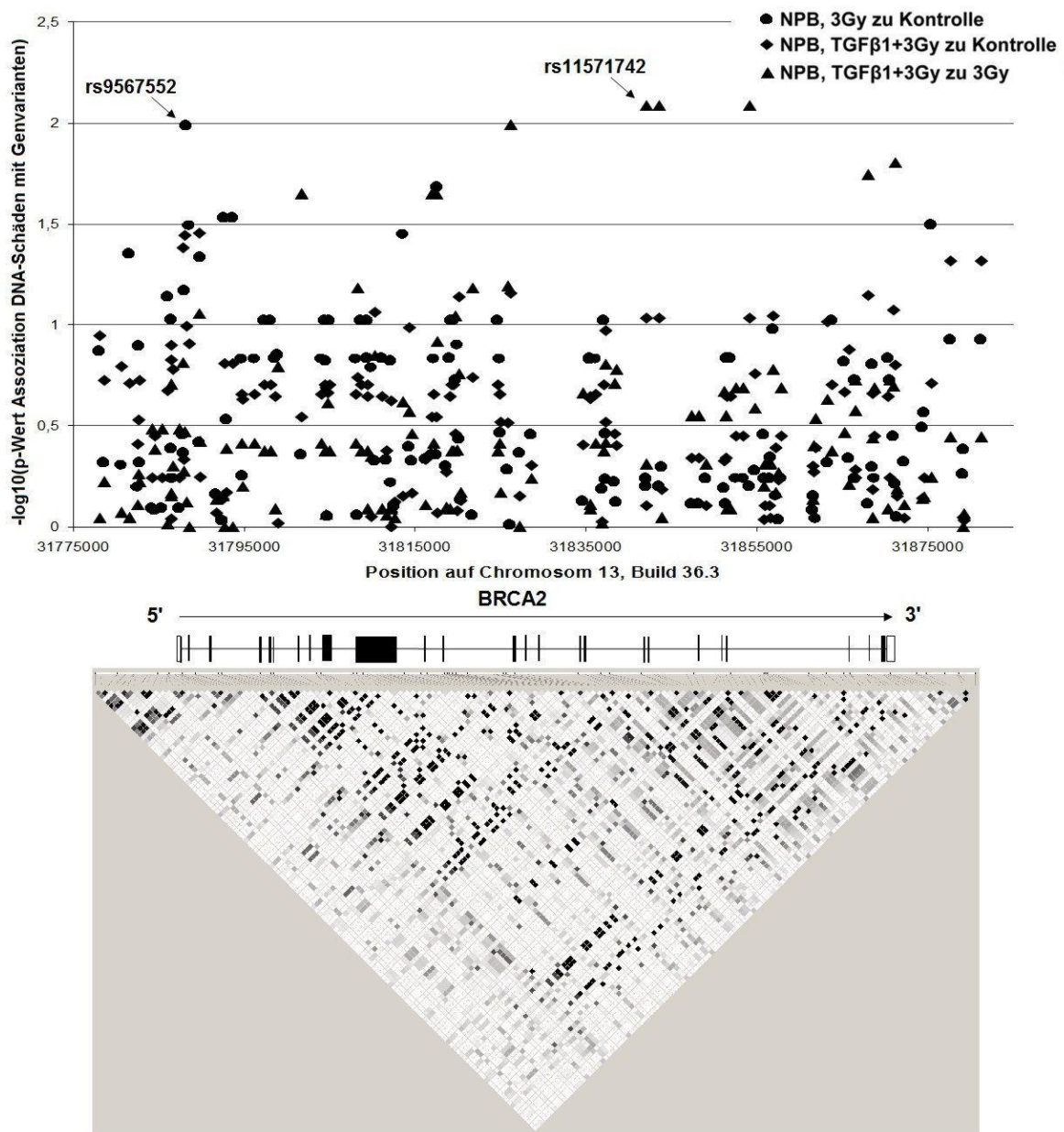


Abbildung 17: Darstellung von *BRCA2* entsprechend zu Abbildung 15.

Zu sehen sind alle 139 SNPs im *BRCA2*-Gen, einschließlich der ± 10 kb flankierenden Sequenzen. Die p -Werte wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test errechnet.

Für den Effekt der TGF β 1-Vorbehandlung fand sich eine Assoziation von drei mit $r^2 = 1,0$ gekoppelten Polymorphismen, welche alle intronisch sind. Beispielhaft dafür ist rs11571742 in Abbildung 17 markiert. Jedoch ist für keine dieser drei Varianten in der Literatur eine medizinische oder funktionelle Bedeutung beschrieben.

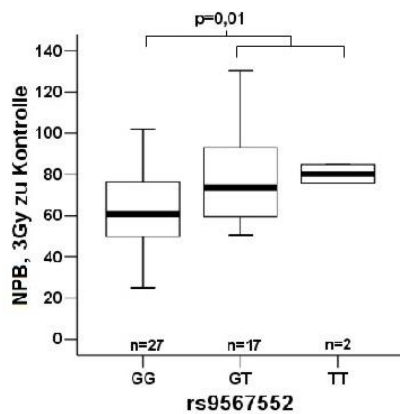


Abbildung 18: Boxplot für den BRCA2-SNP rs9567552.

Es ist der Einfluss des SNP auf die durch 3 Gy-Bestrahlung entstandenen NPB dargestellt. Bei Vorliegen des Variantenallels kommt es vermehrt zu DNA-Schäden. Für das Variantenallel heterozygote und homozygote Zelllinien wurden in der statistischen Analyse zusammengefasst und mittels Mann-Whitney-U-Test dem homozygoten Wildtypallel-Status gegenüber gestellt.

4.3.3 ERCC2

Die stärkste Assoziation im ERCC2-Gen zwischen Vorliegen eines Genpolymorphismus und induzierten DNA-Schäden fand sich für rs3916839. Dabei handelt es sich um eine vergleichsweise seltene Intronvariante, für welche nur drei der untersuchten LCLs heterozygot sind. Wie in Abbildung 19 zu sehen, führte das Vorliegen des Variantenallels sowohl zu einer vermehrten Bildung von MNi als auch NPB, allerdings nur bei alleiniger Bestrahlung ($p = 0,001$ bei MNi bzw. $p = 0,04$ bei NPB). In an dieser Position heterozygoten Zelllinien wurden durch alleinige Behandlung mit 3 Gy im Median fast doppelt so viele MNi und NPB induziert. Bei Zugabe von TGF β 1 nach Bereinigung des Strahleneffektes kam es zu einer Abnahme der DNA-Schäden, welche bei den Mikrokernen besonders ausgeprägt war ($p = 0,0001$). Während sich die Induktion der MNi durch die TGF β 1-Vorbehandlung beim Wildtyp nicht änderte, nahmen diese bei Vorliegen des Variantenallels im Durchschnitt um 120 MNi ab.

Im ERCC2-Gen werden in der Literatur besonders zwei Genpolymorphismen, die zu Aminosäureaustauschen führen, in Bezug auf ihre DNA-Reparaturleistung diskutiert. Rs1799793 (Asp312Asn) und rs13181 (Lys751Gln). Während Lys751Gln keine der untersuchten Funktionsparameter beeinflusste, konnte für Asp312Asn eine leicht erhöhte Rate an MNi mit zunehmender Anzahl des T-Variantenallels festgestellt werden (entspricht Asn). Dieser Effekt wurde durch vorherige Behandlung mit TGF β 1 noch etwas verstärkt (Abbildung 20). Vergleichbare Effekte auf die anderen Phänotypen, insbesondere NPB, fanden sich nicht.

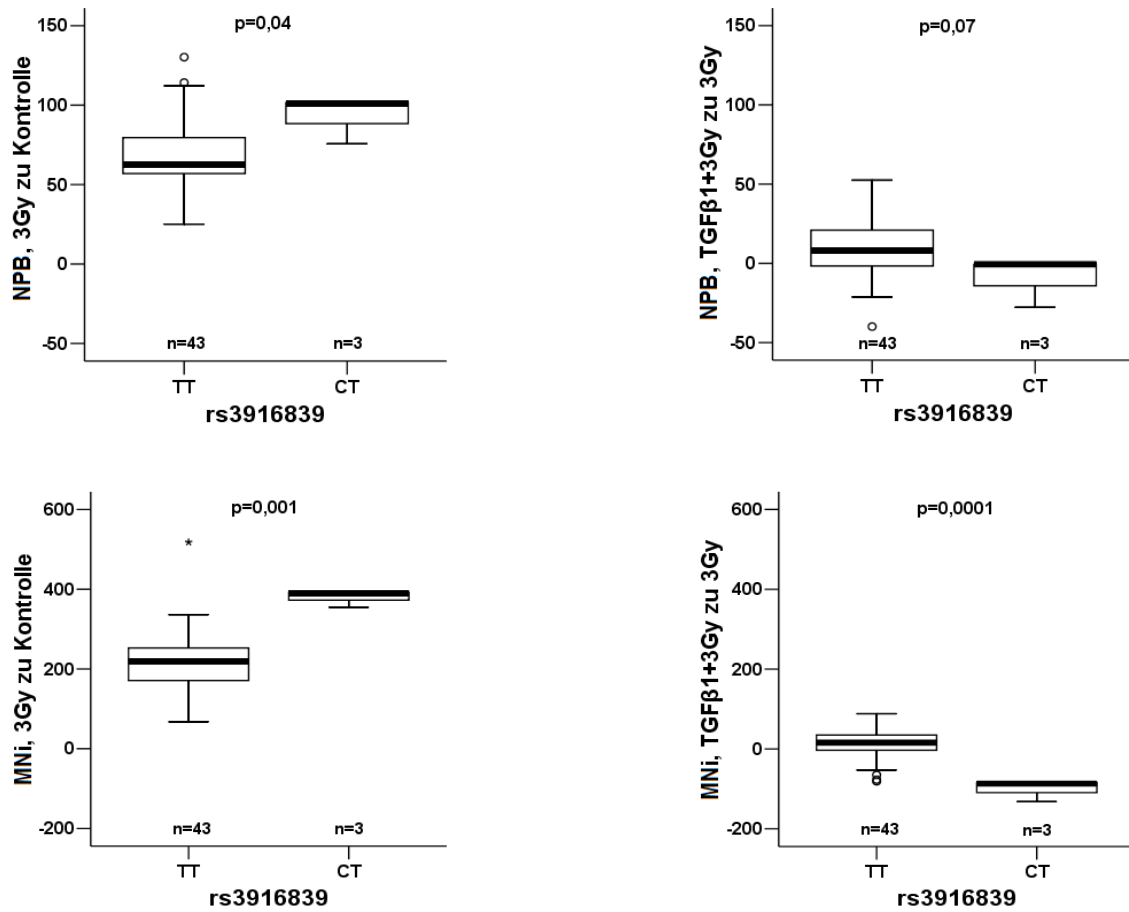


Abbildung 19: Boxplot für rs3916839 aus dem ERCC2-Gen.

Obere Zeile: NPB (links alleinige Bestrahlung mit 3 Gy, rechts zusätzliche Vorinkubation mit 5 ng/ml TGFβ1 für 16 h bei 37 °C), untere Zeile analog für MNi. Die Bewertung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

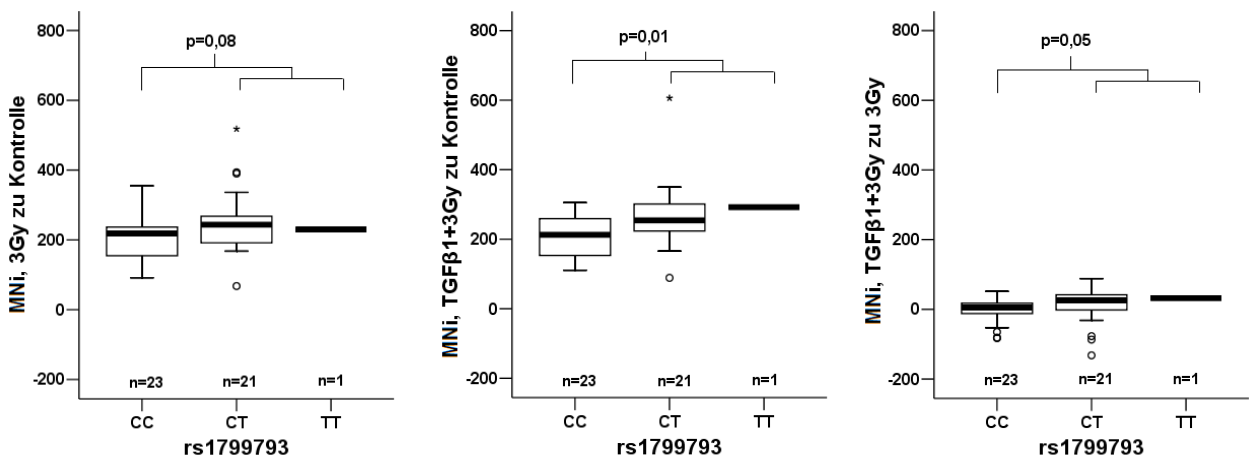


Abbildung 20: MNi-Induktion in Abhängigkeit vom ERCC2-SNP rs1799793.

Für den statistischen Test nach Mann-Whitney-U wurde der CC-Genotyp mit der Kombination aus CT und TT verglichen.

4.3.4 *LIG1*

Beim *LIG1*-Gen zeigten eine Reihe von Polymorphismen Assoziationen mit der NPB-Induktion durch alleinige Bestrahlung (Abbildung 21). Der ausgeprägteste Befund ergab sich hierbei für rs2386523, gefolgt von vier mit $r^2 > 0,9$ gekoppelten SNPs, wovon beispielhaft rs156641 in Abbildung 21 markiert ist. Diese vier SNPs sind mit dem erstgenannten (rs2386523) nur marginal gekoppelt ($r^2 = 0,08$). Bei den genannten fünf Polymorphismen handelt es sich um Intronvarianten.

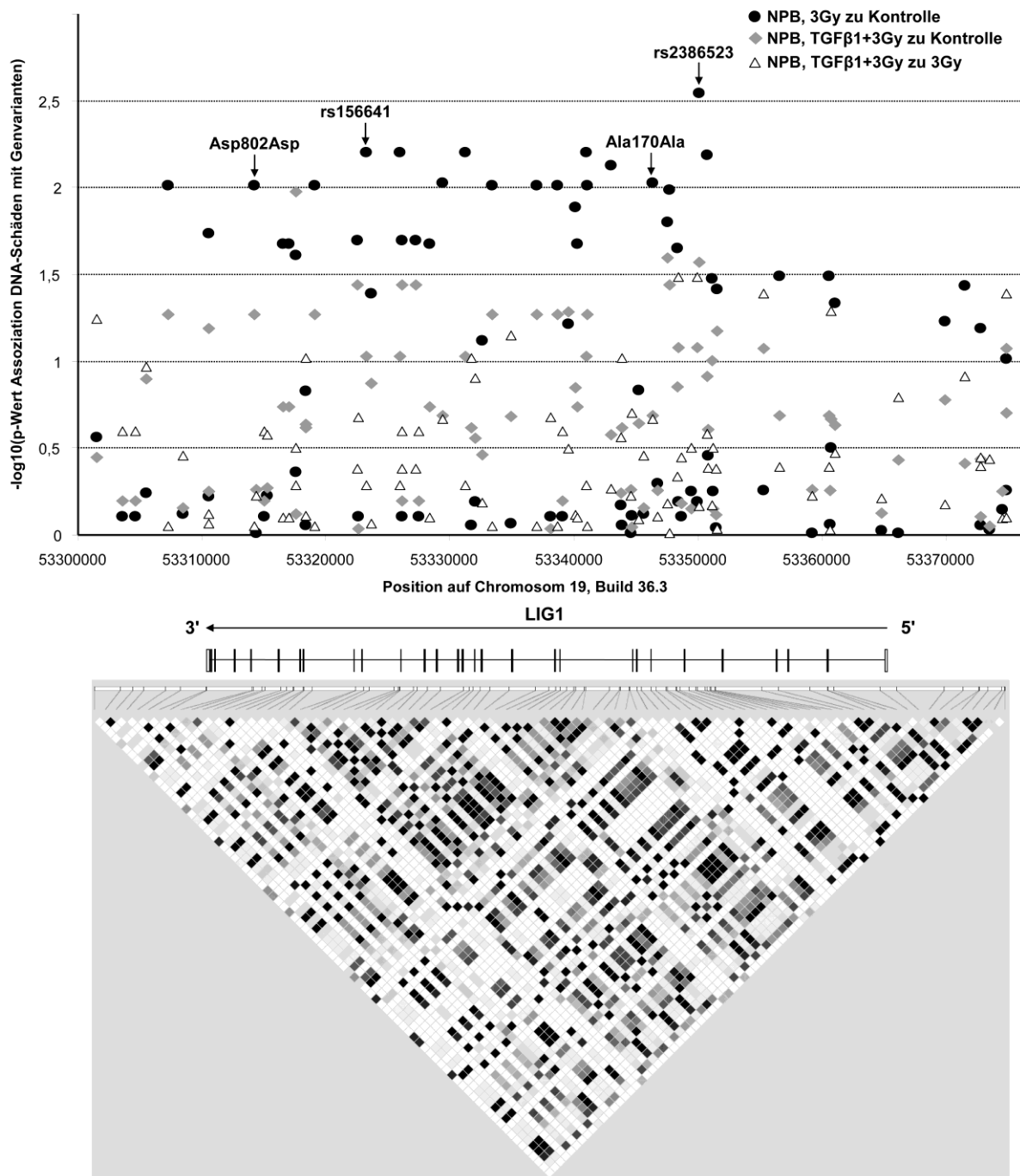


Abbildung 21: Darstellung des *LIG1*-Gens analog zu Abbildung 15.

Es werden alle 90 SNPs des *LIG1*-Gens erfasst, einschließlich der ± 10 kb flankierenden Sequenzen. Mit

Pfeilen gekennzeichnet sind vier Varianten, auf welche im Text näher eingegangen wird. Für die Ermittlung der *p*-Werte wurde der Jonckheere-Terpstra-Trend-Test angewandt.

Weiterhin fanden sich zwei stumme Mutationen, die eine Assoziation für einen alleinigen Bestrahlungseffekt mit $p = 0,009$ für rs20580 (Ala170Ala) bzw. $p = 0,01$ für rs20581 (Asp802Asp) aufwiesen. Beide sind mit $r^2 = 0,70$ untereinander gekoppelt, wobei das T-Allel von rs20580 mit dem G-Allel von rs20581 verknüpft ist, woraus sich der optisch gegensätzliche Effekt in Abbildung 22 ergibt. Darüber hinaus besteht eine starke Kopplung von $r^2 = 0,81$ für rs20580 bzw. $r^2 = 0,73$ für rs20581 mit dem oberen Polymorphismus rs2386523, während die genetische Kopplung mit rs156641 deutlich geringer ist ($r^2 = 0,19$ mit rs20580 bzw. mit $r^2 = 0,29$ mit rs20581). Wurden alle *LIG1*-SNPs mit einer Assoziation von $p < 0,01$ auf die Entstehung von NPB bei 3 Gy-Bestrahlung gemeinsam in einer linearen Regressionsanalyse getestet, ergab sich als einzig signifikanter Prädiktor rs2386523.

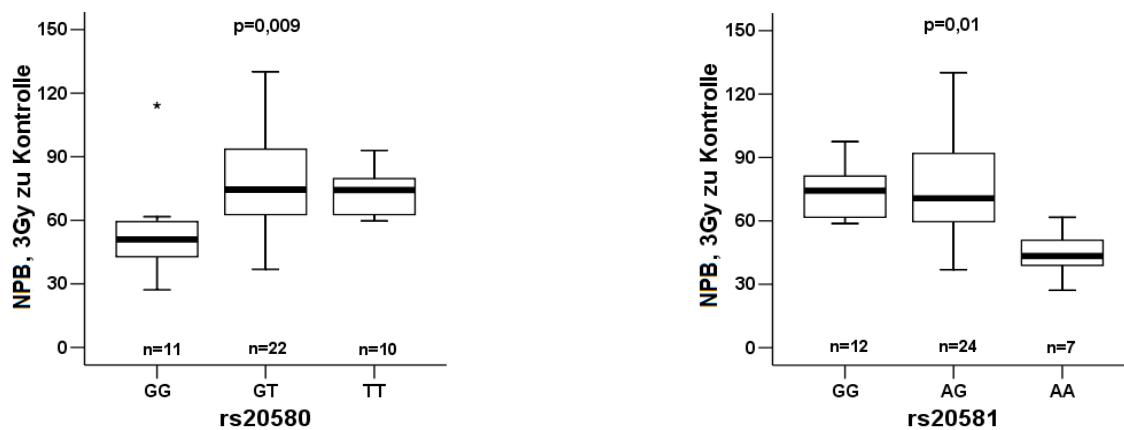


Abbildung 22: Boxplots für die SNPs rs20580 und rs20581 aus dem *LIG1*-Gen.

Die angegebenen *p*-Werte wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test ermittelt und prüfen einen kochoninanten Alleleffekt.

4.3.5 *MLH1*

In einer umfassenden Metaanalyse war das Variantenallel von rs1800734 in der Promoterregion dieses Gens lokalisiert mit Mikrosatelliten-Instabilität bei kolorektalen Karzinomen in Verbindung gebracht worden (Whiffin et al. 2011). Es zeigte sich eine Assoziation von NPB-Induktion bei der TGF β 1-Vorbehandlung ($p = 0,05$), wohingegen ein reiner Strahleneffekt nicht belegt werden konnte ($p = 0,5$, Abbildung 23).

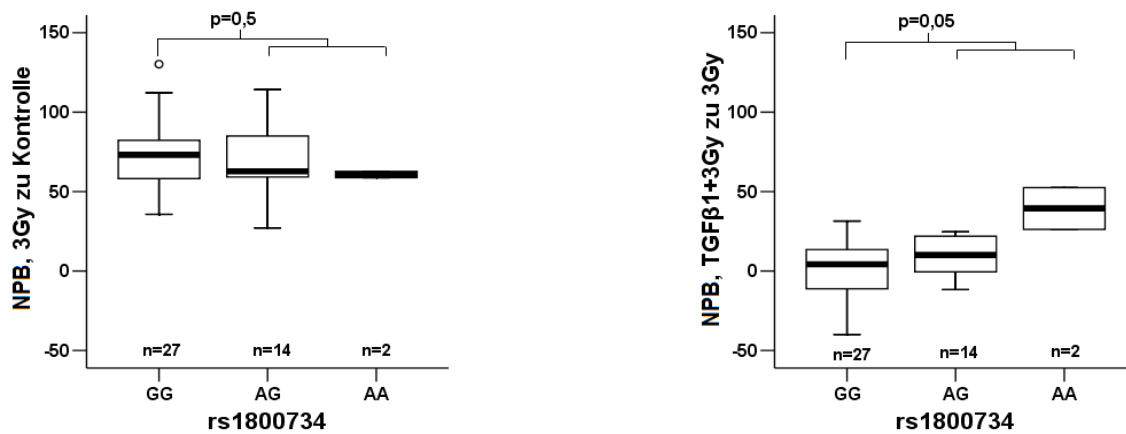


Abbildung 23: Boxplot für den *MLH1*-SNP rs1800734. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde GG gegenüber AG + AA verglichen.

Zwei weitere Polymorphismen im *MLH1*-Gen waren univariant mit $p < 0,05$ mit der durch 3 Gy hervorgerufenen NPB-Induktion assoziiert (rs3774332 und rs10440109, Abbildung 24). Lineare und ordinale Regressionsanalysen mit diesen beiden Varianten ließen lediglich einen Effekt für rs3774332 ($p = 0,04$) in Zelllinien heterozygot an dieser Position erkennen ($n = 4$).

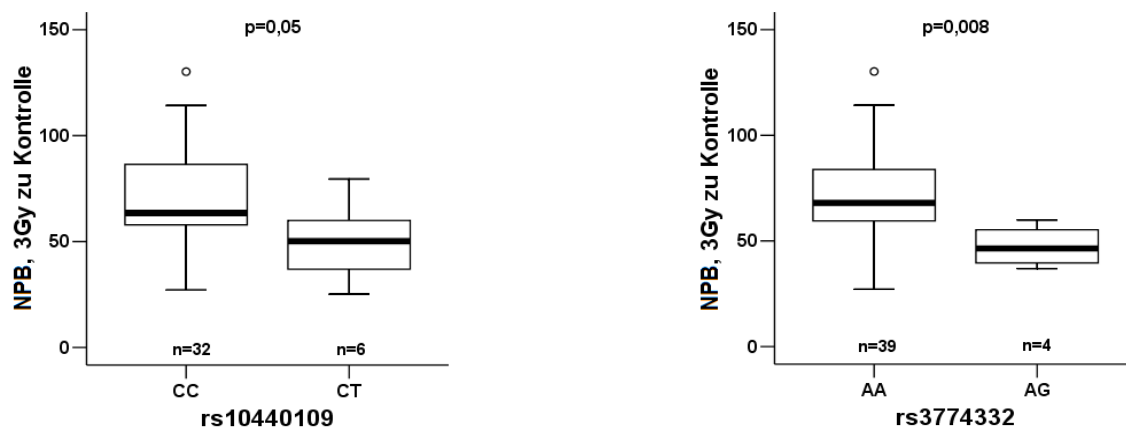


Abbildung 24: Boxplots für die Polymorphismen rs10440109 und rs3774332 aus dem *MLH1*-Gen. Die statistische Testung erfolgte nach Mann-Whitney-U.

4.3.6 *MSH6*

Das stärkste Signal für eine Assoziation von Bestrahlung mit der Entstehung von NPB ergab sich für die *MSH6*-Variante rs3136245 (Abbildung 25) mit einem p-Wert von 0,001, während die Vorbehandlung mit TGFβ1 keinen Einfluss hatte (Abbildung 26). Bei diesem SNP handelt es sich um eine Intronvariante im *MSH6*-Gen.

Bei zwei sehr eng miteinander gekoppelten Varianten (rs2020911 und rs2710163, $r^2 = 0,8$) war die

Rate an NPB nach 3 Gy-Bestrahlung bei Vorliegen des selteneren Variantenallels deutlich reduziert. Dies ist beispielhaft in Abbildung 27 illustriert. Interessanterweise wurde dies durch vorherige Behandlung mit TGFβ1 praktisch vollständig kompensiert und der vormals protective Effekt des Variantenallels gegenüber der Strahlenwirkung wurde aufgehoben ($p = 0,7$). Bei diesem SNP handelt es sich um eine Intronvariante nahe der Intro-Exon Grenze.

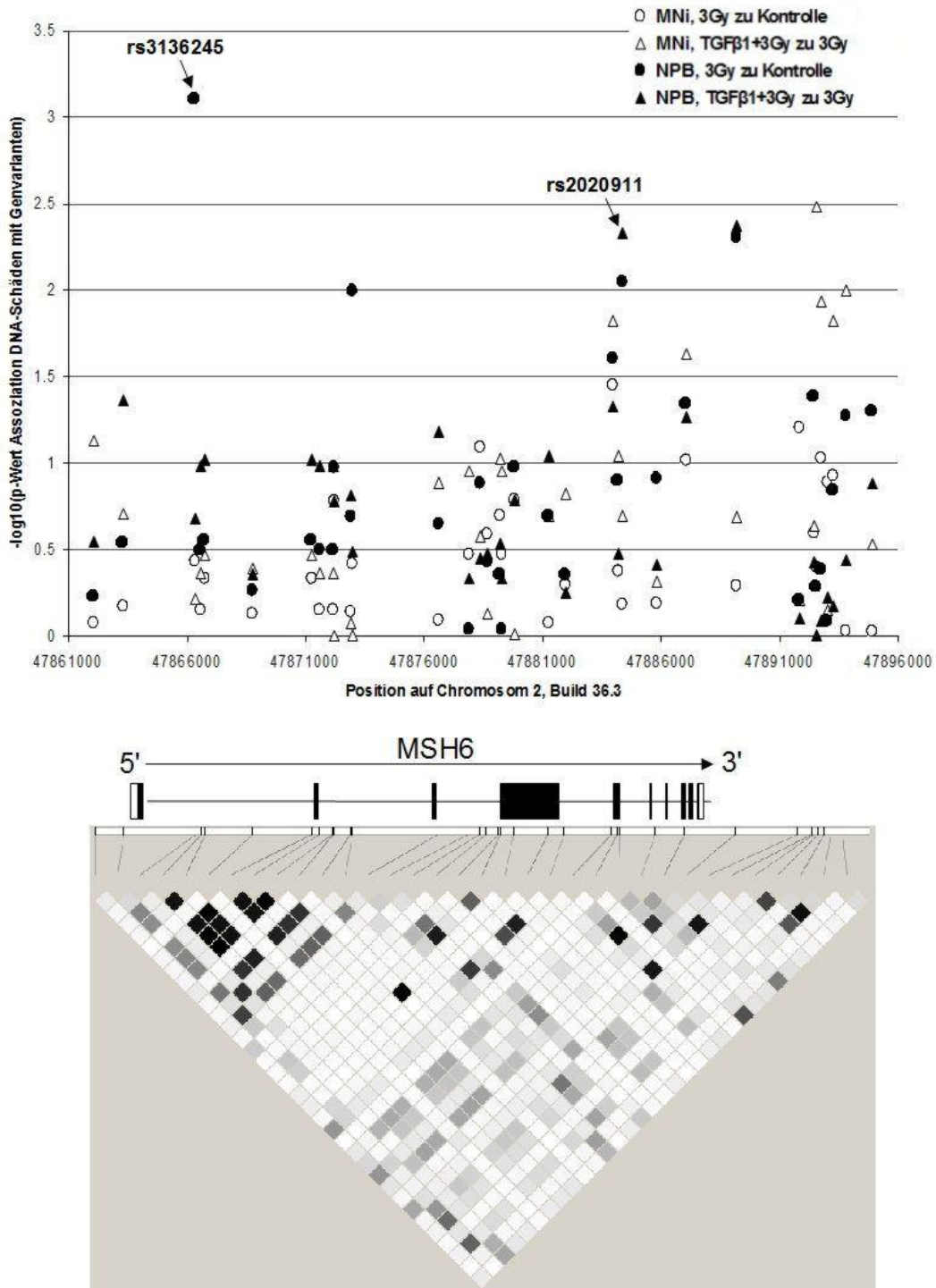


Abbildung 25: MSH6-Gen entsprechend Abbildung 15.

Dargestellt sind die 36 SNPs des MSH6-Gens, einschließlich der ± 10 kb flankierenden Sequenzen. Es wurde

der Jonckheere-Terpstra-Trend-Test angewandt.

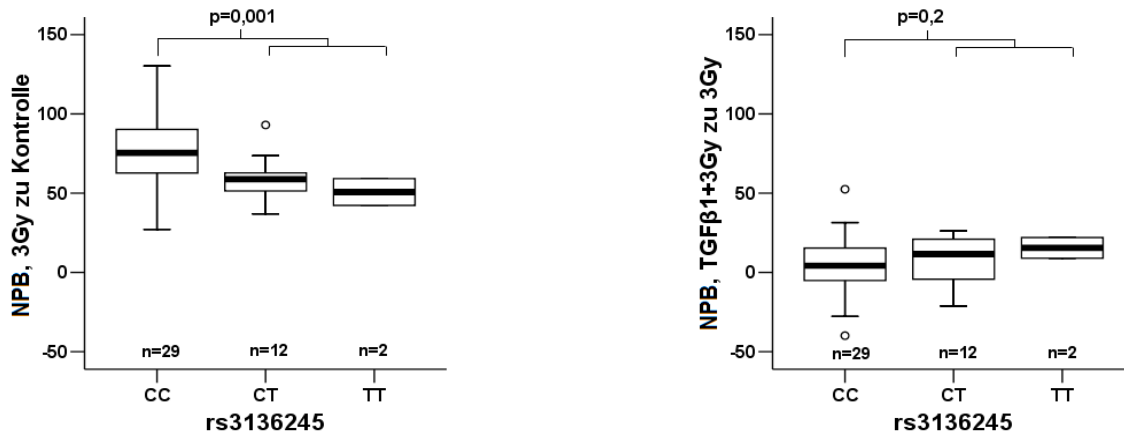


Abbildung 26: NPB-Induktion durch 3 Gy-Bestrahlung bei rs3136245 aus dem MSH6-Gen.

Die statistische Prüfung eines Effektes zwischen CC einerseits und CT + TT andererseits erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test.

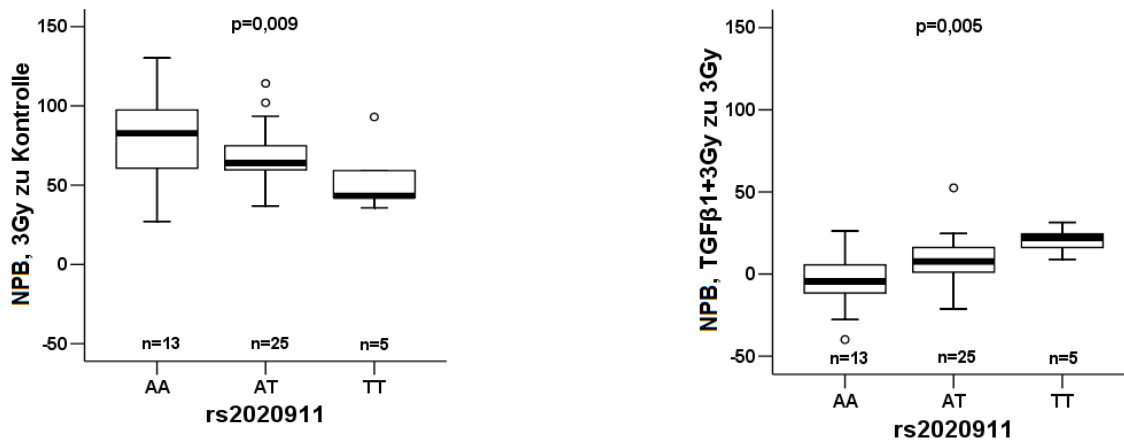


Abbildung 27: Modulation der NPB nach 3 Gy-Bestrahlung durch rs2020911 und Kompensation durch TGFβ1.

Die statistische Prüfung wurde mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test vorgenommen, der eine ordinale Skalierung der drei Genotyp-Konfigurationen annimmt.

4.3.7 NBN

Die stärkste Assoziation im NBN-Gen fand sich bei der Intronvariante rs3026271 (Abbildung 28). Hier führte das heterozygote Variantenallel (n = 12) dazu, dass sich mehr NPB bildeten (im Median 70), als beim Wildtyp (n = 34, im Median 57 NPB). Allerdings trifft diese Betrachtung nur für die alleinige Bestrahlung mit 3 Gy zu (p = 0,01). Die Zugabe von TGFβ1 änderte daran nichts (p = 0,3), weshalb die Modulation der NPB-Bildung nach kombinierter Behandlung in Relation zur Kontrolle ähnlich wie die alleinige Bestrahlung war (p = 0,02).

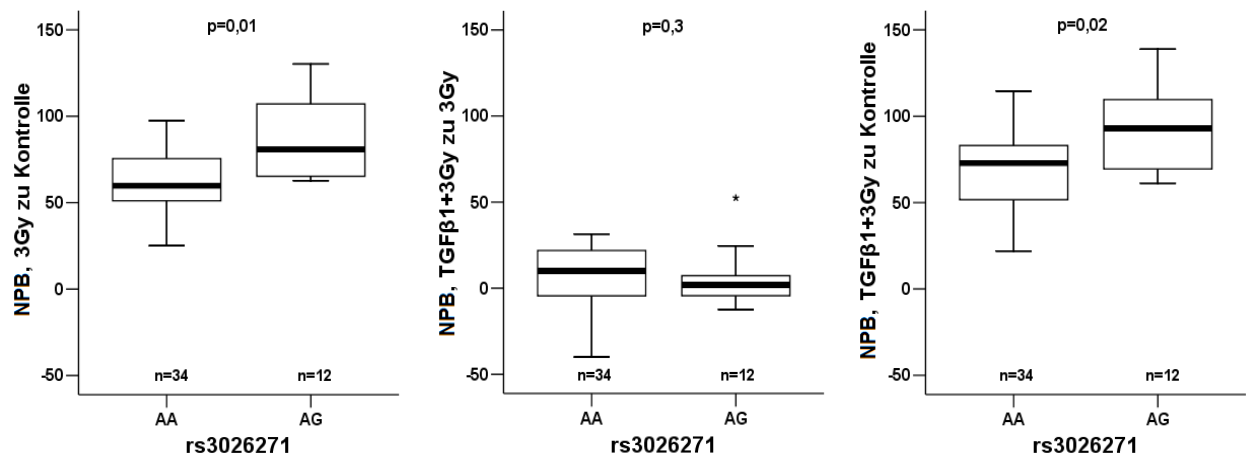


Abbildung 28: Modulation der NPB durch den NBN-SNP rs3026271.

Die Darstellung zeigt links die alleinige Bestrahlung mit 3 Gy, in der Mitte den strahlen-bereinigten TGFβ1-Effekt (5 ng/ml TGFβ1 für 16 h bei 37 °C), rechts die kombinierte Behandlung. Beide Genotypengruppen wurden jeweils mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Ergänzend sei noch vermerkt, dass eine signifikante Korrelation zwischen den Allelen von rs3026271 und rs1063054 (Spearman rho = -0,37, p = 0,004) bestand. Bis auf drei hatten alle Zelllinien mit dem Variantenallel von rs1063054 das Wildtypallel von rs3026271. Dieser SNP wies keinen alleinigen TGFβ1-Effekt auf. TGFβ1 verstärkte hier jedoch die Strahlenwirkung signifikant (p = 0,04), wobei das Wildtypallel deutlich strahlensensibler war.

4.3.8 XRCC1

Im XRCC1-Gen fand sich kein Polymorphismus, der eine Assoziation von p < 0,01 aufwies. Jedoch finden sich in der Literatur viele Daten zur Variante rs25487, dem Aminosäureaustausch Gln399Arg in Exon 10. Bei Vorkommen des Variantenallels dieses Polymorphismus reduzierte eine TGFβ1-Vorbehandlung die Strahlen-bedingte Induktion von NPB, besonders, wenn das Variantenallel homozygot vorlag (Abbildung 29).

Des Weiteren war rs25487 mit rs25486, einer Intronvariante, welche nahe der Intron-Exon Grenze zu rs25487 liegt, gekoppelt (r² = 1,0). Dem entsprechend geht das Variantenallel von rs25486 nach Beseitigung des Strahleneffektes unter TGFβ1-Vorbehandlung ebenfalls mit einer niedrigeren Anzahl von DNA-Schäden einher als der Wildtyp.

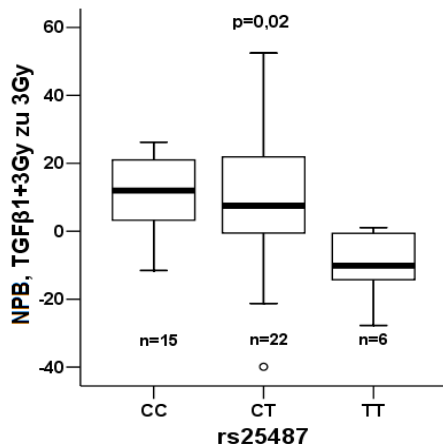


Abbildung 29: Boxplot für rs25487 im XRCC1-Gen.

Der p-Wert wurde mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test ermittelt.

4.3.9 SMAD3

Im *SMAD3*-Gen findet sich insbesondere im 5'-Bereich von Intron 1 ein größerer Block an hohem LD, welcher einer starken genetischen Kopplung entspricht (Abbildung 30). Die stärksten Assoziationen ergaben sich für die als „Cluster 1“ markierten SNPs mit der Modulation der MNi-Bildung durch TGFβ1. Beispielhaft ist dies für rs11856909 in Abbildung 31 illustriert. Mit demselben Phänotyp waren in abgeschwächter Form SNPs des Clusters 2 assoziiert, die keinen zusammenhängenden Block bilden. Da sich für die MNi bei den Wiederholungsmessungen innerhalb der einzelnen LCLs keine Reproduzierbarkeit herausstellte, sind die hier genannten Assoziationen mit Genotypen zurückhaltend zu betrachten.

Bei den durch die Wiederholungsmessungen statistisch signifikant reproduzierbaren NPB konnte für zwei SNPs in *SMAD3* eine Assoziation mit $p < 0,05$ identifiziert werden. Die Variante rs893473 hatte bei der TGFβ1-Vorbehandlung Auswirkungen auf die NPB-Induktion im Sinne einer vermehrten Entstehung beim Variantenallel ($p = 0,005$, Abbildung 32). Für rs12900401 erwies sich der Wildtyp als deutlich strahlensensibler ($p = 0,02$).

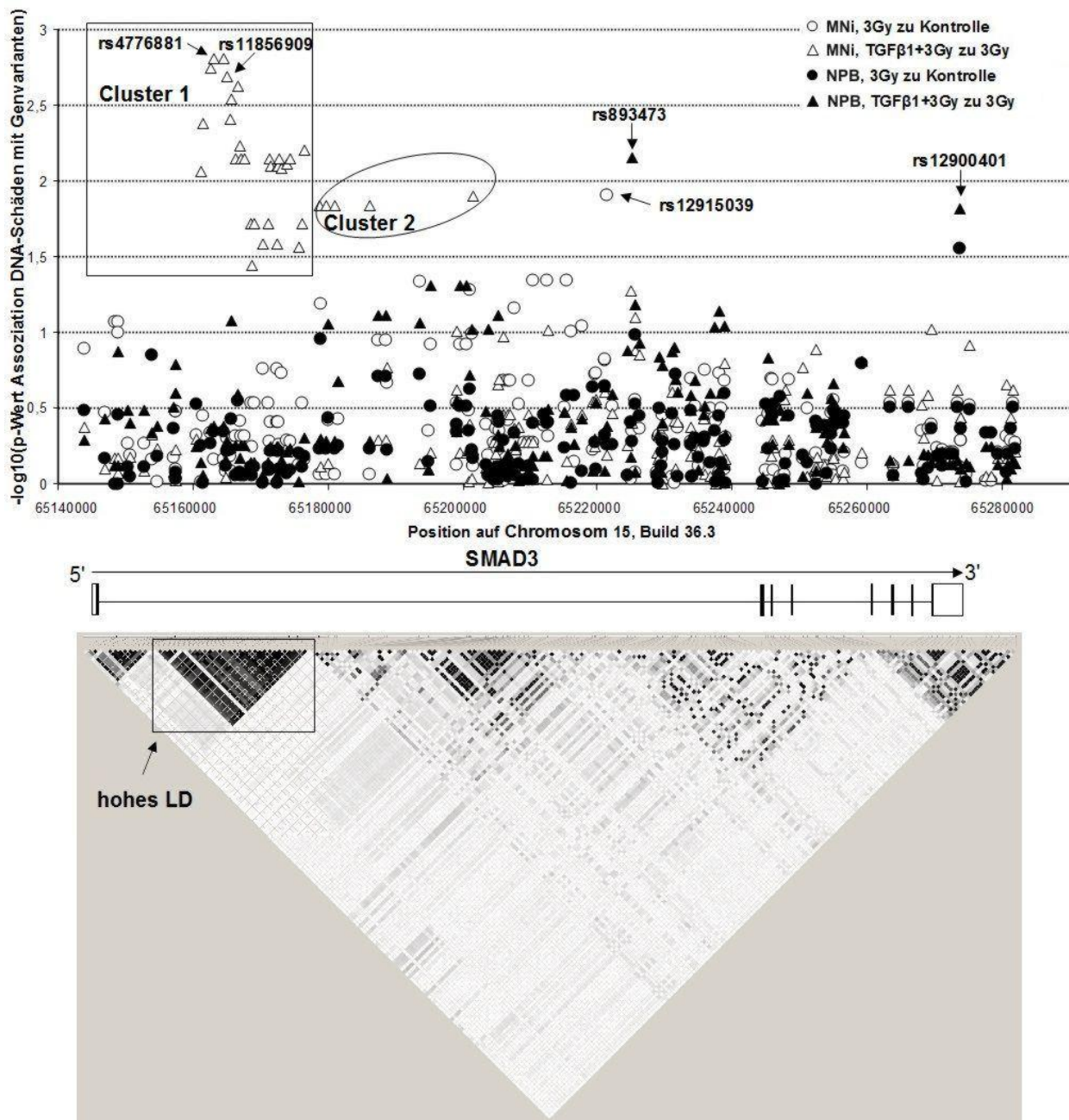


Abbildung 30: Assoziation von SMAD3-SNPs mit den strahlen-induzierten DNA-Schäden.

Der Darstellungsmodus ist analog zu Abbildung 15. Im oberen Bildteil werden vier Funktionsparameter aufgeführt. Für jede der 189 polymorphen Positionen im SMAD3-Gen einschließlich der ± 10 kb flankierenden Sequenzen ist durch ein Symbol (siehe Legende) die Assoziation mit den vier Funktionsparametern aufgezeigt. Dabei entspricht Cluster 1 einer Gruppe von 30 und Cluster 2 von fünf gekoppelten SNPs. Die Pfeile kennzeichnen für jeden Funktionsparameter die jeweils auffälligste Genvariante. Im unteren Bildabschnitt wird der Kopplungsplot dargestellt. Die SNPs aus Cluster 1 fallen in den als hohes LD gekennzeichneten Bereich. Die p -Werte wurden mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test errechnet.

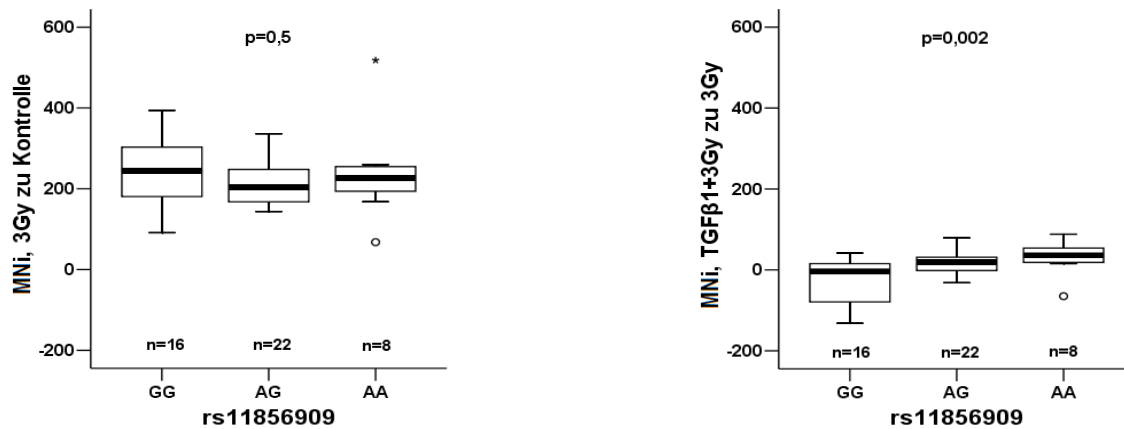


Abbildung 31: Auswirkungen der SMAD3-Variante rs11856909 auf die MNi-Entstehung.

Links sind die Daten nach 3 Gy-Bestrahlung dargestellt, rechts nach Vorbehandlung mit TGFβ1 (5 ng/ml TGFβ1 für 16 h bei 37 °C). Die statistische Testung erfolgte mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test.

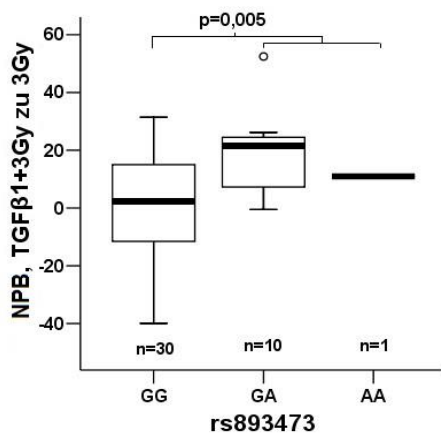


Abbildung 32: Variante rs893473 aus dem SMAD3-Gen.

Die statistische Prüfung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, wobei die Genotypen GA und AA zusammengefasst und den GG-Genotypen gegenübergestellt wurden.

4.3.10 SMAD4

Im SMAD4-Gen fanden sich drei Polymorphismen, die eine Assoziation zur NPB-Entstehung bei Bestrahlung zeigten ($p < 0,01$). Es bestand zusätzlich eine Kopplung zwischen $r^2 = 0,88$ und 1,0 zwischen diesen Varianten. Dabei handelt es sich um rs948588, rs948589 und rs17663887, wobei Letzterer beispielhaft als Boxplot illustriert ist (Abbildung 33). Die Anwesenheit des Variantenallels führte bei alleiniger Bestrahlung zu einer verstärkten Induktion von NPB ($p = 0,005$). Die TGFβ1-Vorbehandlung wirkte sich hier nicht aus ($p = 0,2$).

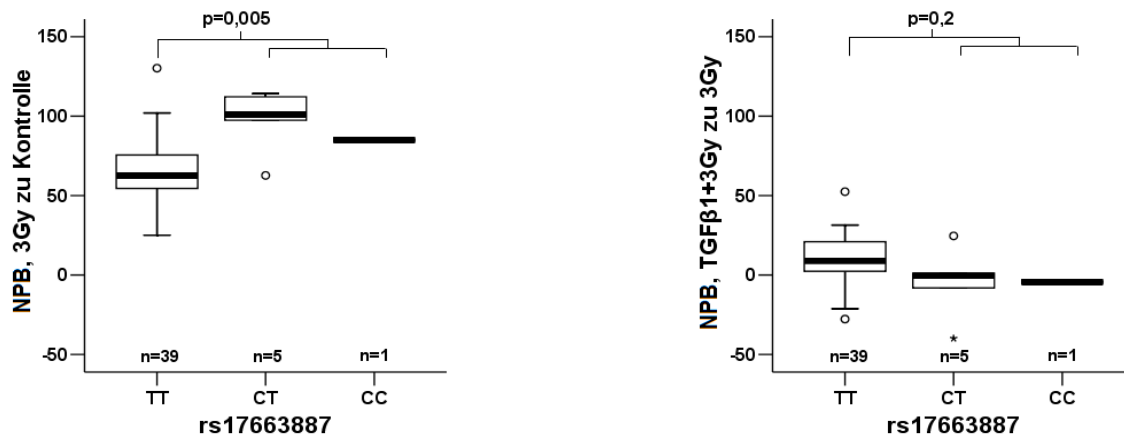


Abbildung 33: Modulation der NPB durch rs17663997 im SMAD4-Gen.

Hier wurden die Genotypen mit CT und CC zusammengefasst und auf Unterschiede zu TT mittels Mann-Whitney-U-Test geprüft.

4.3.11 TGFBR1

Im *TGFBR1*-Gen fand sich keine Variante mit einer Assoziation von $p < 0,01$. Dennoch soll an dieser Stelle auf die Varianten rs11466445 (*6A) und rs11568785 eingegangen werden. Die *6A-Variante ist in der Literatur vielfach beschrieben und mit rs11568785 partiell gekoppelt ($r^2 = 0,68$). Für *6A fanden sich für das Variantenallel nach Bestrahlung etwas weniger MNi als beim Wildtyp ($p = 0,04$, Abbildung 34). Ohne Beeinflussung blieb die Vorinkubation mit TGFβ1 ($p = 0,6$).

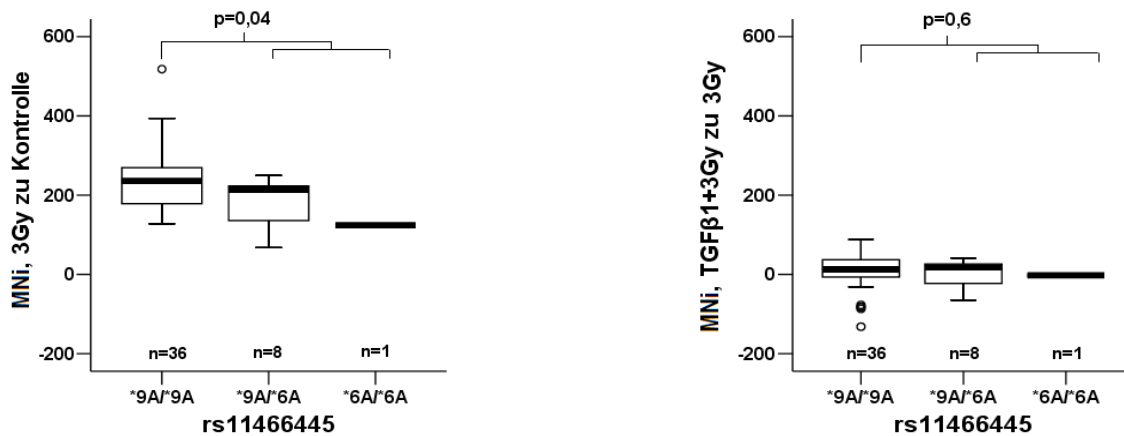


Abbildung 34: MNi und Deletionsvariante *6A (rs11466445) im TGFBR1-Gen.

Für die Testung mit Mann-Whitney-U wurden die Genotypen 9A/6A und *6A/*6A zusammengefasst und zu *9A/*9A in Beziehung gesetzt.

Der mit *6A partiell gekoppelte SNP rs11568785 wirkte sich tendenziell auf die durch TGFβ1-Vorinkubation veränderte Bildung von NPB aus, wobei hier die Homozygotie des A-Wildtypallels

im Median die durch 3 Gy hervorgerufene NPB-Rate leicht erhöhte (Abbildung 35).

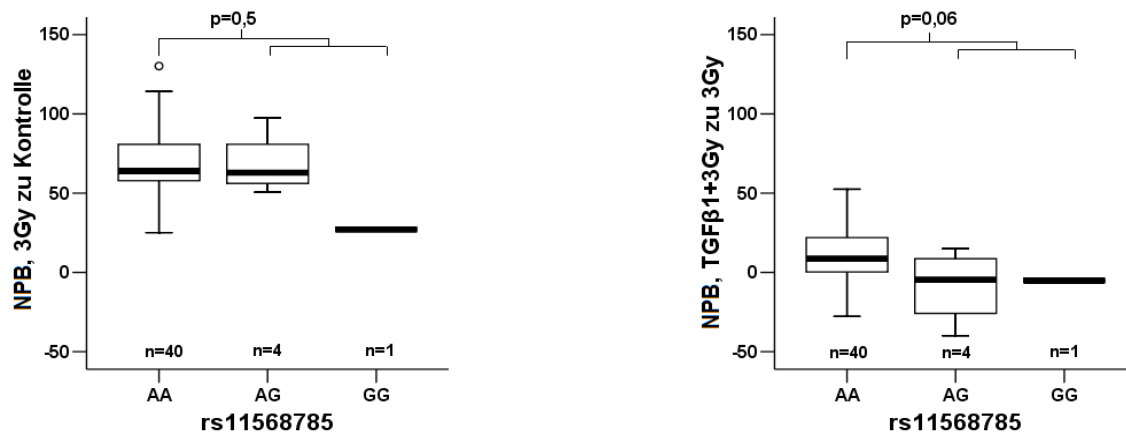


Abbildung 35: NPB und SNP rs11568785 im TGFBR1-Gen.

Das linke Diagramm zeigt die Beziehung zur 3 Gy-Bestrahlung, das rechte die Modulation durch TGFβ1 (5 ng/ml TGFβ1 für 16 h bei 37 °C). Die p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt, wobei heterozygoter und homozygoter Status für das Variantenallel der Homozygotie für das Wildtypallel gegenüber gestellt wurde.

4.3.12 TGFBR2

Im TGFBR2-Gen konnten vier SNPs identifiziert werden, die mit der Entstehung von NPB bei 3 Gy-Bestrahlung mit $p < 0,01$ assoziiert waren. Dabei betrug das LD von drei Varianten 1,0 (rs995435, rs3773636, rs1864615). Die Vierte (rs9858487) wies ein $r^2 = 0,16$ mit den anderen drei Polymorphismen auf. Beispielhaft sind daher die Effekte für rs995435 und rs9858487 als Boxplots dargestellt (Abbildung 36). Bei Vorliegen des Variantenallels von rs995435 ($n = 16$) entstanden im Median 83 NPB, beim Wildtyp ($n = 26$) nur 61 NPB ($p = 0,006$). Aufgrund der geringen genetischen Kopplung zu diesem SNP sind die Effekte von rs9858487 ($p = 0,003$) als weitgehend unabhängig zu betrachten. Homozygote Zelllinien lagen für keine der beiden SNPs vor. In einem ordinalen Regressionsmodell zeigten bezüglich der Induktion von NPB durch 3 Gy beide SNPs eine additive Wirkung ($p = 0,001$).

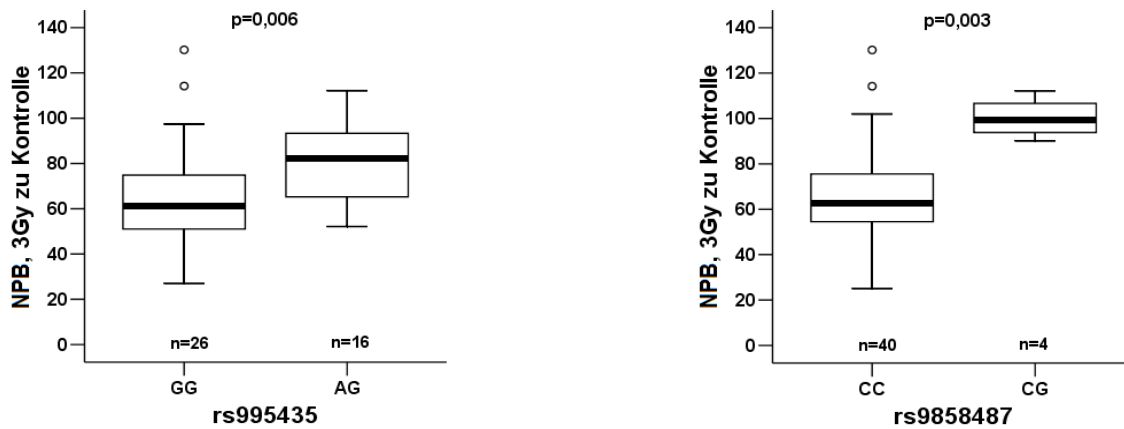


Abbildung 36: Effekte der TGFBR2-SNPs rs9858487 und rs995435 auf die durch 3 Gy-Bestrahlung induzierten NPB. Die statistische Testung erfolgte bei beiden Varianten mit dem Mann-Whitney-U-Test.

4.3.13 TGFBI

Von besonderem Interesse war der in der Literatur viel beschriebene Polymorphismus rs1800469 (-509C>T), welcher in der Promotorregion des TGFBI-Gens zu finden ist. Das Vorliegen dieses Polymorphismus war mit einer erhöhten Bildung von MNi verbunden (Abbildung 37). Die alleinige Bestrahlung mit 3 Gy führte beim Wildtyp (n = 21) zur Bildung von 188 Mikrokernen, beim homozygoten Variantenallel (n = 6) hingegen im Median zu 241 (p = 0,03). Bezüglich der NBP konnte kein vergleichbarer Effekt nachgewiesen werden. Bei der Vorinkubation mit exogenem TGFβ1 ist die Analyse von endogenen TGFBI-Varianten nicht sinnvoll.

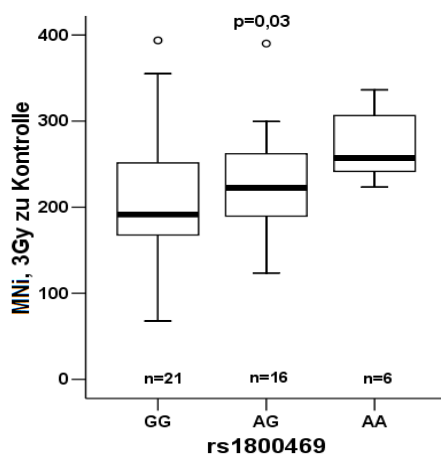


Abbildung 37: TGFBI-Variante rs1800469.

Das Vorhandensein des Variantenallels führt bei reiner Bestrahlung zu einer vermehrten MNi-Induktion. Hier wurde der ko-dominante Alleleffekt mittels Jonckheere-Terpstra-Trend-Test geprüft.

5. Diskussion

Im folgenden Diskussionsteil werden die bedeutendsten und klinisch relevantesten Befunde der Assoziationsanalysen in den LCLs beurteilt und mit entsprechenden Literaturdaten verglichen. Dabei wird eine mögliche Einflussnahme von Genpolymorphismen auf die Effekte von Röntgenstrahlung, TGF β 1 und Röntgenstrahlung bei TGF β 1-Vorbehandlung exploriert. Vor allem die genetischen Ursachen für das unterschiedliche Ausmaß an DNA-Schäden in Form von NPB werden diskutiert, sowohl in bestimmten Kandidatengen des TGF β -Signalwegs als auch in einigen DNA-Reparaturgenen. Dadurch soll eine Einordnung meiner Ergebnisse in den Kontext der derzeitigen Forschung zu TGF β 1 erfolgen. Die Gliederung entspricht dabei dem Ergebnisteil.

5.1 *BRCA1*

Das Tumorsuppressorgen *BRCA1* (*breast cancer 1*) befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 und besitzt fünf Isoforme. Es verfügt über 23 Exone, wobei Exon 11 von besonderem Interesse ist, da es rund 60 % der codierenden Sequenzen des *BRCA1*-Gens und 55 % aller Mutationen enthält. Funktionell handelt es sich um ein DNA-Reparaturgen, das an der homologen Rekombinationsreparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Generell führt eine Mutation im *BRCA1*-Gen, die eine *loss of function* oder Deletion nach sich zieht, zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Erkrankung an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom (Easton et al. 1995, Tonin et al. 1998) sowie Prostata- (Langston et al. 1996) oder Pankreaskarzinom (Al-Sukhni et al. 2008).

Die in meiner Untersuchung auffällige Variante rs4986852 befindet sich im Exon 11 und stellt eine *missense*-Mutation dar. Dabei kommt es zum Austausch von Serin zu Asparagin an Position 1040 (Ser1040Asn) der 1863 Aminosäuren umfassenden mRNA. Bei 3 Gy-Bestrahlung kam es bei Vorliegen des Variantenallels zu einem signifikanten Anstieg an NPB im Vergleich zum Wildtyp ($p = 0,05$). Die Variante war also deutlich strahlensensibler (Abbildung 16). Dieser Effekt wurde unter Zugabe von TGF β 1 sogar noch verstärkt ($p = 0,003$).

Da *BRCA1* im Zellzyklus den Kontrollpunkt G₂-M mitreguliert (Wang B et al. 2009), kann das Vorliegen einer Mutation eine unzureichende Zellzykluskontrolle an diesem Punkt nach sich ziehen (Larson et al. 1997). Des Weiteren führt ionisierende Strahlung zu einem Zellzyklusarrest. Zhong et al. konnten zeigen, dass die Konzentration von *BRCA1* in Brustkrebs-positiven Zellen nach Bestrahlung erniedrigt ist (Zhong et al. 1999). Eine Inhibition der *BRCA1*-Expression führt indes zu einem beschleunigten Wachstum maligner Brustzellen (Thompson et al. 1995). Außerdem gelang

der Nachweis, dass Zellen, die das Wildtyp-BRCA1 Protein exprimierten eine erhöhte Resistenz gegenüber genotoxischen Substanzen besitzen (Zhong et al. 1999). Ein vergleichbares Bild ergab auch meine Analyse der TGF β 1 vorinkubierten Zellen. LCLs, in denen das Wildtypallel vorlag, waren nach TGF β 1-Vorbehandlung strahlenresistenter als Zellen, in denen das Variantenallel exprimiert wurde ($p = 0,003$).

Eine *frameshift* Mutation im Exon 11, die ein verkürztes Protein entstehen lassen kann, führt unter Umständen zu einer defekten Zellzykluskontrolle am G₂-M Kontrollpunkt (Dong et al. 2003). Dies hängt damit zusammen, dass Exon 11 einen Bereich darstellt, in dem es zur Interaktion von u.a. RAD50 und RAD51 mit BRCA1 kommt (Welsh und King 2001). Durch einen Verlust in diesem Bereich ist die Interaktion insuffizient und die DNA-Reparatur wird nur mangelhaft ausgeführt. Die Variante rs4986852 befindet sich genau in den beiden betroffenen Domänen. Welche Auswirkungen dies aber explizit auf das Zusammenspiel der DNA-Reparaturgene untereinander hat, bleibt unklar, da derzeit keine entsprechenden Daten vorhanden sind.

Friedman und Castilla beschrieben schon früh den seltenen SNP rs4986852 (Allelhäufigkeit unter Kaukasiern 4,8 %), doch konnte eine Assoziation mit Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen nicht nachgewiesen werden (Friedman et al. 1994), zumal das Variantenallel auch in gesunden Kontrollgruppen zu finden war (Castilla et al. 1994, Arnold et al. 2002). In der Literatur wird der Polymorphismus auch als *unclassified variant* geführt (Cleas 2004), d.h. dass für diese Variante bisher keine Assoziation beschrieben werden konnte. Savas und Ozcelik äußerten die Vermutung, dass der Aminosäureaustausch Ser1040Asn zu einer vermehrten oder verminderten Phosphorylierung des BRCA1-Proteins führt, konnten aber nicht beweisen, in welche Richtung der Effekt geht (Savas und Ozcelik 2005). Dies wiederum würde im Falle einer vermehrten Phosphorylierung zu einer vermehrten DNA-Reparatur und umgekehrt führen (Chen et al. 1996). Da bei meiner Analyse das Vorliegen des Variantenallels zu vermehrten DNA-Schäden führte, könnte man die Daten als das Ergebnis einer verminderten Phosphorylierung von BRCA1 und somit einer verminderten Proteinfunktionalität im Sinne einer unzureichenden DNA-Reparatur interpretieren. Sollte sich diese Hypothese bewahrheiten, könnte TGF β 1 einen potentiellen Therapieansatz darstellen. Ähnlich Platinderivaten fungierte TGF β 1 in meiner Analyse als „Radiosensitizer“ und war in Kombination der alleinigen Bestrahlung in Bezug auf die Genotoxizität überlegen. Sofern bei einer malignen Entartung das Variantenallel rs4986852 nachgewiesen werden kann, könnte die Applikation von TGF β 1 zu einer erhöhten Strahlensensibilität im tumorösen Gewebe führen und somit einen gesteigerten Zelluntergang verursachen.

5.2 BRCA2

Wie auch *BRCA1* gehört *BRCA2* (*breast cancer 2*) zu den Tumorsuppressorgenen und ist an der homologen Rekombinationsreparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt. Es wird mittels Phosphorylierung durch *BRCA1* aktiviert und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Zellzykluskontrolle. Zu finden ist es auf dem langen Arm von Chromosom 13 und besitzt 27 Exone, die in ein 3418 Aminosäuren umfassendes Protein translatiert werden. Es wurden Assoziationen von *BRCA2* Mutationen mit Mamma- und Ovarialkarzinomen beschrieben (Tonin et al. 1998), außerdem mit Pankreas- (Murphy et al. 2002) und Prostatakarzinomen (Giusti et al. 2003). Weiterhin wird u.a. eine Keimbahnmutation im *BRCA2*-Gen für die Fanconi Anämie Typ D1 verantwortlich gemacht (Wagner et al. 2004) und scheint eine Rolle bei der Entstehung von Wilms-Tumoren (Reid et al. 2005), Glioblastomen (Alter et al. 2007) und Medulloblastomen zu spielen (Reid et al. 2005).

Der SNP rs9567552 liegt intronisch im 5'-UTR und ging in meiner Untersuchung bei Vorhandensein des Variantenallels mit einer vermehrten Entstehung von NPB unter 3 Gy-Bestrahlung einher (Abbildung 18). Da die Introns beim Spleißvorgang aus der mRNA herausgeschnitten werden, ist ein Einfluss von Intronvarianten auf die Proteinfunktionalität umstritten, wird aber dennoch nicht ausgeschlossen. Dies spiegelt sich auch in den verfügbaren Literaturbelegen für rs9567552 wider. Lediglich ein gehäuftes Vorkommen des Variantenallels bei bipolaren Störungen wurde bisher beschrieben (Tesli et al. 2010). Dies wird auf die Rolle von *BRCA2* während der Gehirnentwicklung zurückgeführt. Frappart et al. berichteten in diesem Zusammenhang über eine gestörte Neurogenese und eine vermehrte Bildung von Medulloblastomen in Mäusen, in denen *BRCA2* ausgeschaltet wurde (Frappart et al. 2007). Sie wiesen eine geringere Hirnmasse und Mikrozephalie im Vergleich zu gesunden Mäusen auf, welches sich aus einer durch *BRCA2*-Verlust vermehrt induzierten Apoptose herleiten lässt. Dennoch muss *BRCA2* nicht vollständig ausgeschaltet sein, um mit einer erhöhten Inzidenz für Hirntumoren vergesellschaftet zu sein. Es reichen bereits Mutationen wie Deletionen aus (Offit et al. 2003). Nichtsdestoweniger kann die gestörte Entwicklung des Gehirns ihrerseits schwere psychiatrische Erkrankungen nach sich ziehen. Allerdings konnte dieser Beweis für die Variante rs9567552 nicht abschließend geführt werden. Eventuell hat die Position der Intronvariante nahe des 5'-UTR Einfluss auf die Bindung der RNA-Polymerase während der Transkription oder der Polymorphismus modifiziert die Cap-Struktur am 5'-Ende und sorgt so für Instabilität in der mRNA. Weiterhin wäre ein Einfluss auf die Promoteraktivität wie es bei Polymorphismen im *MLH1*-Gen bereits nachgewiesen werden konnte denkbar. Jedoch ließen meine Ergebnisse keine Einflussnahme von TGF β 1 auf die Strahlensensibilität der LCLs in Zusammenhang mit *BRCA2* erkennen.

5.3 ERCC2

Das auf dem langen Arm von Chromosom 19 gelegene DNA-Reparaturgen *ERCC2* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2*) besteht aus 23 Exonen. Seine mRNA translatiert für ein 760 Aminosäuren umfassendes Protein, welches an der Transkriptionsinitiierung und der Einzelstrang Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beteiligt ist. ERCC2 stellt eine von zehn Untereinheiten des TFIIH (*transcription factor II H*) dar, welche sich zum Präinitiationskomplex zusammenschließen (Schaeffer et al. 1994). Nach dessen Zusammenbau ist ERCC2 im Speziellen an der Öffnung des DNA-Doppelstranges beteiligt, um je nach Bedarf, entweder die Transkription einzuleiten oder den schadhafte Bereich für die NER freizulegen (Moriel-Carretero und Aguilera 2010). Bei Letzterem werden u.a. durch UV-Strahlung induzierte Thymindimere durch Herausschneiden eines ca. 30 bp umfassenden Bereichs entfernt. Bei Vorliegen eines Defekts im *ERCC2*-Gen entstehen Erkrankungen wie Xeroderma pigmentosum Typ D, Trichothiodystrophie oder das Cockayne-Syndrom (Johnson und Squires 1992).

Der bei uns mit dem stärksten Signal assoziierte Polymorphismus rs3916839 zeigte bei Vorliegen des Variantenallels unter der TGFβ1-Vorbehandlung eine signifikante Reduktion der MNi-Anzahl ($p = 0,0001$). Dabei ging das Variantenallel bei alleiniger Bestrahlung mit einer vermehrten Entstehung von DNA-Schäden einher ($p = 0,001$). Unter Zugabe von TGFβ1 hingegen kam es zu einem gegenteiligen Effekt, bei dem sich die Zahl der MNi gegenüber dem Wildtypallel verringerte (Abbildung 19). Somit ließ sich die Anzahl der DNA-Schäden in Zellen mit Variantenallel mit Hilfe von TGFβ1 auf das Niveau des Wildtyps absenken. Es kann davon ausgegangen werden, dass der SNP rs3916839 selbst nicht für den beobachteten Effekt verantwortlich ist, da bisher sowohl kein Zusammenhang zwischen Vorliegen des Variantenallels und einer Erkrankung aufgezeigt werden konnte als auch wie bereits bei rs9567552 im *BRCA2*-Gen dieser Polymorphismus intronisch gelegen ist und eine Allelfrequenz von lediglich 3 % unter der kaukasischen Ethnizität aufweist. Die Position des SNP zwischen Exon 11 und Exon 12 liegt außerhalb der katalytischen Domäne, in einem Bereich, der gleichzeitig für RAD3 codiert. Dieses zählt zwar zu den DNA-Helikasen, ihm wird aber bisher keine größere Bedeutung beigemessen. RAD3, ein *ERCC2*-Homolog der *Saccharomyces cerevisiae* Hefe (Friedberg 1992), ist funktionell für die Auffindung und Lokalisation von Basenschäden während der NER zuständig. Zellen mit RAD3 Mangel sind jedoch weiterhin lebensfähig und weisen ein normales Wachstum auf (Sung et al. 1988). Somit führt ein Defekt voraussichtlich nicht zu einem essentiellen Funktionsverlust des *ERCC2*-Proteins. Anzunehmen ist vielmehr, dass durch die Zugabe von TGFβ1 vermehrt Apoptose eingeleitet wurde. Schuster und Krieglstein konnten darlegen, dass mit zunehmender TGFβ1-Konzentration auch

vermehrt Apoptose initiiert wird (Schuster und Kriegstein 2002). Dadurch nahmen die geschädigten Zellen wahrscheinlich nicht an der Mitose teil und erschienen anschließend nicht mehr als BN mit MNi oder NPB unter dem Mikroskop. Auch ist denkbar, dass rs9567552 mit einem anderen SNP gekoppelt ist, welcher den eigentlichen Effekt verursacht, jedoch aufgrund der geringen Zahl an untersuchten Zelllinien in meinen Ergebnissen keine signifikante Assoziation erkennen ließ.

Beim zweiten Polymorphismus aus dem *ERCC2*-Gen, rs1799793, war das Variantenallel in meiner Analyse mit einer vermehrten MNi-Entstehung unter allen drei Behandlungsbedingungen assoziiert (Abbildung 20). Dabei zeigte die kombinierte Behandlungsbedingung (TGFβ1-Inkubation 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung) das stärkste Signal ($p = 0,01$). Der SNP aus Exon 10 führt zu einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin an Position 312 (Asp312Asn). Diese Aminosäure ist ebenfalls Bestandteil des zuvor erwähnten TFIIH sowie im *RAD3*-Gen enthalten. Appelbaum et al. gehen davon aus, dass der Aminosäureaustausch die Azidität des Proteins und damit seine Struktur verändern könnte (Appelbaum et al. 2007). Dies würde zu einem veränderten Bindungsverhalten an der DNA-Helix führen. Jedoch wurde diese Hypothese von Lainé et al. widerlegt. Sie zeigten, dass der Austausch, ebenfalls außerhalb der katalytischen Domäne gelegen, keinen Einfluss auf die Funktionalität des TFIIH und somit die Transkription oder NER hat. Vielmehr bleibt in ihrer Studie die Helikase Aktivität in vollem Ausmaß erhalten und veränderte nicht wie in anderen Untersuchungen zuvor angenommen (Qiao et al. 2002, Spitz et al. 2001) die DNA-Reparaturleistung (Lainé et al. 2007).

In der Analyse von Seker et al. führte das Variantenallel von rs1799793 in LCLs bei Bestrahlung zu einer Steigerung der Apoptoserate um das 2,5 fache (Seker et al. 2001). Dies lässt auf eine mangelhafte DNA-Reparatur schließen, wodurch die Zellen aufgrund der massiven Schädigung in den Zelltod übergehen. Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen, bei denen die LCLs bei Vorhandensein des Variantenallels ebenfalls vermehrt DNA-Schäden aufwiesen. Diese These wurde durch eine Studie von Lunn et al. widerlegt. Dort zeigte sich keine Einflussnahme des SNP auf die Reparaturleistung strahlen-induzierter DNA-Schäden (Lunn et al. 2000).

Dennoch ist unbestritten, dass ein Zusammenhang zwischen der Variante und bestimmten Erkrankungen existiert. So war das Variantenallel beispielsweise mit einem erhöhten Blasen- (Chang CH et al. 2009, Stern et al. 2009), Prostata- (Bau et al. 2000, Rybicki et al. 2004) und Gallenblasenkarzinomrisiko assoziiert (Srivastava et al. 2010, Srivastava et al. 2011). Auch konnte ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Akustikusneurinomen (Rajaraman et al. 2010), Lungen- (Butkiewicz et al. 2001, Zhou et al. 2002, Hu et al. 2004), Mamma- (Tang et al. 2002, Justenhoven et al. 2004) und Pankreaskarzinomen belegt werden (McWilliams et al. 2008). Joshi et al. wiesen

eine Assoziation zwischen Variantenallel und kolorektalen Karzinomen nach (Joshi et al. 2009), Anantharaman et al. für Kopf/Halstumoren (Anantharaman et al. 2011).

Andere Studien erbrachten für das Variantenallel von rs1799793 ein verringertes Risiko für die Entstehung etwa von Basaliomen (Applebaum 2007), Osteosarkomen (Biason et al. 2012) und Lungenkarzinomen (Popanda et al. 2004, Benhamou und Sarasin 2005, Chang et al. 2008). Gleiches galt für Nierenzell- (Lin et al. 2008) und Prostatakarzinome (Agalliu et al. 2010). Einigen Untersuchungen konnten keine Assoziation zwischen Variantenallel und Mamma- (Han et al. 2009), kolorektalen Karzinomen (Hansen et al. 2007, Reeves et al. 2012) und Tumoren des Kopf/Halsbereiches (Gugatschka et al. 2011) finden.

In Therapie-assoziierten Untersuchungen ging das Variantenallel mit einer Verkürzung der Gesamtüberlebenszeit nach Platingabe bei Lungenkarzinomen einher (Gurubhagavatula et al. 2004, Dong et al. 2012). Dagegen erbrachte die Analyse von Chang-Claude et al. keinen Zusammenhang zwischen Variante und kutanen Spätnebenwirkungen nach Strahlentherapie bei Mammakarzinomen (Chang-Claude et al. 2009).

Es bleibt generell schwierig, die Ergebnisse allgemeingültig zu interpretieren, da für rs1799793 dutzende Literaturbelege existieren, die meine Ergebnisse sowohl stützen als auch widerlegen. Meine Hypothese schließt sich dem Tenor an, dass das Variantenallel zu einer vermehrten DNA-Schädigung führt, die unter Zugabe von TGF β 1 sogar verstärkt wird. Somit entstanden durch den Einfluss ionisierender Strahlung vermehrt DNA-Addukte, die sich in einer gesteigerten MNI-Entstehung äußerten. Ähnliches wurde bereits zuvor unter Benzo[a]pyren Stimulation beobachtet. Auch hier stieg die Anzahl der DNA-Addukte in Abhängigkeit zur Zahl der vorliegenden Variantenallele (Zhao et al. 2008). Demnach besitzen bestimmte Stoffe/Strahlen ein höheres genotoxisches Potential bei Personen homozygot für Asparagin an Position 312 (Variantenallel), als bei Individuen homozygot für Aspartat (Wildtyp). Auch hier übernahm TGF β 1 wahrscheinlich die Rolle des Radiosensitizers, der die Entstehung von DNA-Addukten noch verstärkte. Dadurch könnte TGF β 1 in den Fokus von Behandlungen tumoröser Erkrankungen rücken, die den SNP rs1799793 aufweisen. Gleiches könnte für rs3916839 zutreffen, sofern sich beweisen lässt, dass der Polymorphismus selbst für die von uns beobachteten Effekte verantwortlich ist. Da für beide Varianten lediglich ein signifikanter Zusammenhang in Bezug auf die MNI-Induktion zu sehen war, sind die Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten und bedürfen einer weiteren Untersuchung.

5.4 *LIG1*

Auf dem langen Arm von Chromosom 19 befindet sich neben *ERCC2* auch *LIG1* (*DNA ligase I*). Es besteht aus 28 Exonen und wird benötigt, um DNA-Bruchstücke ATP-abhängig miteinander zu

verbinden. Dazu zählen die Okazaki-Fragmente des Folgestranges bei der DNA-Replikation und die neusynthetisierten Fragmente nach stattgefunderer NER, Basenexzisionsreparatur (BER) und *mismatch* Reparatur.

Aufgrund seiner Funktion nahm man an, dass *LIG1* essentiell für das Zellüberleben ist. Jedoch konnten Bentley et al. zeigen, dass Zellen, die einen *LIG1*-Mangel ausweisen, dennoch lebensfähig sind (Bentley et al. 2002). Gleichwohl gehen Mutationen in diesem Gen mit Immundefizienz, erhöhter Anfälligkeit gegenüber genotoxischen Agenzien und Wachstumsretardierung einher und ähneln phänotypisch dem Bloom-Syndrom. Auch wenn biochemisch eine abweichende DNA-Ligaseaktivität nachgewiesen wurde, konnte man bisher keine Mutation im *LIG1*-Gen bei Patienten mit Bloom-Syndrom finden (Webster et al. 1992).

Bei meiner Analyse boten die Polymorphismen rs20580 aus Exon 7 und rs20581 aus Exon 25 die interessantesten Ergebnisse. Dabei ging das Variantenallel von rs20580 bei alleiniger Bestrahlung mit einer vermehrten ($p = 0,009$) und das Variantenallel von rs20581 mit einer verminderten Entstehung von NPB einher ($p = 0,01$, Abbildung 22). Dies ist auf eine reziproke Kopplung des T-Allels von rs20580 mit dem G-Allel von rs20581 mit $r^2 = 0,70$ zurückzuführen. Bei beiden handelt es sich um synonyme SNPs, d.h. dass der Basenaustausch keine Änderung der Aminosäure nach sich zieht. Dieser findet bei rs20580 an Position 170 (Ala170Ala) und bei rs20581 an Position 802 (Asp802Asp) des 919 Aminosäuren umfassenden Proteins statt.

Bisher übte das Variantenallel von rs20580 auf Krankheitsentstehungen keinen Einfluss aus. Eine Assoziation mit Gliomen wurde untersucht, konnte aber nicht nachgewiesen werden (Liu et al. 2009) und ein Zusammenhang mit der Entstehung von Lungenkarzinomen und Tumoren der oberen Luftwege wurde ebenfalls widerlegt (Shen et al. 2002, Lee et al. 2008). Gleiches gilt für rs20581; auch hier fand sich keine Assoziation des Variantenallels mit Karzinomen der oberen Luftwege oder Lungenkrebs (Chang et al. 2008, Lee et al. 2008). Diese Ergebnisse sind an sich nicht verwunderlich, denn obwohl sich rs20581 in einem Bereich befindet, der zum katalytischen Zentrum der DNA-Ligase gehört und direkt an der ATP-abhängigen Verschmelzung der DNA-Fragmente beteiligt ist, gilt ein Funktionsverlust aufgrund eines synonymen SNPs als unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, dass die stumme Mutation keine Konsequenzen nach sich zieht und die beobachteten Ergebnisse in diesem Fall zufälliger Natur sind. Auch wurde bei beiden Polymorphismen keine Einflussnahme des Variantenallels auf die Induktion genomischer Schäden unter der TGF β 1-Behandlung beobachtet.

5.5 *MLH1*

MLH1 (*mutL* homolog of *E.coli* *L*) gehört zu den *mismatch* Reparaturgenen und liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 3. Es umfasst 19 Exone und kann in vier verschiedene Proteinisoformen umgewandelt werden. Es ist bekannt, dass sich eine Mutation im codierenden Bereich der DNA im HNPCC Typ 2 (hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom Typ 2) (Papadopoulos et al. 1994), Muir-Torre Syndrom (Mangold et al. 2004) und Turcot-Syndrom äußern kann (Ricciardone et al. 1999). Dies ist auf die Funktion des Proteins, falsche Basenpaarungen in der DNA während der Replikation aufzuspüren und zu beseitigen, zurückzuführen (Iyer et al. 2005). Der *MLH1*-Polymorphismus rs1800734, auch -93G>A genannt, befindet sich in der 5'-*UTR* Core-Promoterregion, 93 bp vor dem Startcodon gelegen (Ito et al. 1999). Man geht davon aus, dass Polymorphismen in diesem Bereich Einfluss auf die *MLH1*-Protein Expression ausüben können, zumal bei einem nur zwei bp von rs1800734 entfernt gelegener SNP bereits eine Reduktion der Promoteraktivität um bis zu 75 % nachgewiesen werden konnte (Allan et al. 2008). In meiner Analyse war das Variantenallel mit einer vermehrten NPB-Entstehung unter TGFβ1-Vorbehandlung assoziiert (p = 0,05, Abbildung 23). Dies stützt die Vermutung, dass auch rs1800734 die Expression des *MLH1*-Proteins beeinflussen kann. Es ist anzunehmen, dass Zellen, die das Variantenallel exprimieren, eine geringere Proteinexpression besitzen und die DNA-Reparaturleistung herabgesetzt ist. Studien belegen diese Hypothese. Demnach gilt -93G>A als Risikoallel für die Entstehung kolorektaler Karzinome (Raptis et al. 2007, Allan et al. 2008). Dies ist auf eine gesteigerte DNA-Methylierung zurück zu führen, die ihrerseits ein Ablesen des DNA-Stranges während der Transkription verhindert und somit eine verminderte Proteinsynthese nach sich zieht (Herman et al. 1998). Vor allem ist dieses Phänomen in überwiegendem Maße bei Patienten mit Endometriums- und Kolonkarzinomen zu beobachten (Chen et al. 2007), die Mikrosatelliteninstabilität aufweisen (Raptis et al. 2007, Campbell et al. 2009). Weitere Studien zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Lungenkarzinomen (Park et al. 2004, Lo et al. 2011) sowie Zweittumoren nach Chemotherapie (Worrillow et al. 2008). Auch hier rückt die Methylierung der DNA in den Vordergrund. Worrillow et al. legten dar, dass die Verwendung methylierender Chemotherapeutika wie etwa Procarbazin (Natulan®) bei Patienten mit Hodgkin Lymphomen zu einer vermehrten Bildung von Mammakarzinomen und t-AML (therapiebedingte Akute Myeloische Leukämie) als eine Form der Spätnebenwirkung führt. Dies wird durch das Anhängen eines Methylrestes an das Sauerstoffatom v.a. an Guanin bewirkt. Dieser Prozess wird allgemein als zytotoxisch und mutagen eingestuft (Loveless 1969), da das 6 - O - Methylguanin, sofern es bei der *mismatch*-Reparatur als Vorlage dient, zu einer Basenfehlreparatur führen kann.

Normalerweise wird in intakten Zellen daraufhin der Zelltod eingeleitet. Bei einem Funktionsverlust von MLH1 hingegen, tolerieren die Zellen die Basenfehlpaarung und bleiben vital (Griffin et al. 1994). Somit können sich in diesen Zellen DNA-Schäden in vermehrten Ausmaß anreichern und zu einer Entartung führen. Weiterhin wird der Polymorphismus rs1800734 mit NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) in Verbindung gebracht (Santibanez Koref et al. 2010). Dabei handelt es sich um einen durch *nonsense* Mutationen in der mRNA vermittelten Kontrollmechanismus, der zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führt und die Expression verkürzter und funktionseingeschränkter Proteine verhindern kann. Santibanez Koref et al. konnten eine, wenn auch schwache Assoziation zwischen dem Variantenallel und NMD nachweisen. Dementsprechend wird es als Cis-Element eingestuft, welches entsprechend eines Silencers einen Synthesestopp einleiten und zu einer verringerten Proteinexpression führen kann (Chen et al. 2007, Santibanez Koref et al. 2010).

Wie bereits bei BRCA1 und ERCC2 führte auch hier die Zugabe von TGFβ1 zu einer vermehrten DNA-Schädigung, sofern das Variantenallel vorlag. Ob TGFβ1 dabei Einfluss auf die Promotoraktivität nimmt und diese herunter regelt oder zu einem vorzeitigen Synthesestopp führt, ist nicht geklärt. Dennoch könnte es in Zusammenhang mit rs1800734 abermals als Radiosensitizer eingesetzt werden. Sollten sich jedoch die Ergebnisse von Griffin et al. bestätigen, dass ein Funktionsverlust von MLH1 nicht mit dem Zelltod einhergeht, wäre in diesem Fall die Zugabe von TGFβ1 nicht angebracht.

5.6 MSH6

MSH6 (*mutS* homolog of *E.coli* ϕ) ist wie auch *MLH1* ein *mismatch* Reparaturgen. Es befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 und besteht aus zehn Exonen, die in zwei Proteinisoformen translatiert werden können. Das 1360 Aminosäuren umfassende Protein bildet mit MSH2 einen Heterodimer, der fehlerhafte Basenpaarungen von bis zu zwei bp Länge aufspürt und mittels ATPase Aktivität beseitigt (Gradia et al. 1997). Ein Defekt im *MSH6*-Gen wird u.a. für HNPCC Typ 5 (Wijnen et al. 1999), das Turcot-Syndrom (Auclair et al. 2007) und familiäre Endometriuskarzinome verantwortlich gemacht (Risinger et al. 1996)

Die drei auffälligsten Polymorphismen rs3136245, rs2020911 und rs2710163 waren bei Vorliegen des Variantenallels bei 3 Gy-Bestrahlung jeweils mit einer Reduktion der NPB-Anzahl assoziiert ($p = 0,001$, $p = 0,009$ und $p = 0,005$). Das Variantenallel war somit strahlenresistenter (Abbildung 26 für rs3136245, Abbildung 27 für rs2020911). Unter Zugabe von TGFβ1 hingegen änderte sich dieses Resultat nach Bereinigung des Strahleneffektes bei allen drei SNPs. Bei rs202911 und rs2710163 entstanden bei Vorliegen des Variantenallels mehr DNA-Schäden als beim

Wildtyp ($p = 0,005$ und $p = 0,004$). Hier konnte eine Umkehr der Strahlensensibilität beobachtet werden. Bei rs3136245 ermöglichte die TGF β 1-Zugabe eine Aufhebung der vorherigen Strahlenresistenz beim Variantenallel und führte zu einer Angleichung der Zahl der DNA-Schäden auf Wildtypniveau.

Alle drei SNPs sind intronisch gelegen und in der Literatur kaum beschrieben. Für das Variantenallel von rs3136245 konnte sowohl ein protektiver Effekt in Bezug auf das Risiko für die Erkrankung an einem Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Song et al. 2006) als auch eine Assoziation mit einer erhöhten Gefahr für dessen Entstehung (Schildkraut et al. 2010). Letztere Studie untersuchte ebenfalls den Zusammenhang zwischen rs2020911 und Ovarialkarzinomen, konnte jedoch keine Assoziation feststellen. Aufgrund seiner Lokalisation nahe der Exon-Intron-Grenze, wäre ein Einfluss von rs202911 auf die MSH6-Proteinfunktionalität möglich, konnte aber bisher nicht bewiesen werden. Für den Polymorphismus rs2710163 liegt derzeit keine Literatur vor. Genaugenommen befindet sich dieser SNP nahe des 3'-UTR von *FBXO11* (*E-box only protein 11*), einem Protein, das bei Patienten mit Vitiligo verringert ist (Le Poole et al. 2001). Dieser Bereich ist komplementär zum 3'-UTR von *MSH6*. Le Poole et al. vermuten, dass FBXO11 die MSH6-Proteinexpression beeinflussen kann, da er aufzeigen konnte, dass Vitiligo-Patienten mit FBXO11-Mangel ebenfalls einen MSH6-Mangel aufweisen.

Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die drei Variantenallele mit einer erhöhten DNA-Reparaturleistung einhergehen. Die gegenüber dem Wildtyp erhöhte Strahlenresistenz konnte in meiner Analyse durch TGF β 1 aufgehoben bzw. umgekehrt werden. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bisher unbekannt. Jedoch eröffnet sich dadurch die Möglichkeit, für Tumorerkrankungen, die eine Assoziation mit den oben genannten Polymorphismen aufweisen, neue Therapieoptionen zu erschließen. Eine mit TGF β 1 durchgeführte konkomitante Radiochemotherapie, bei der TGF β 1 (sub)letale Strahlenschäden durch eine zusätzliche medikamentöse Hemmung der DNA-Reparatur steigert, wäre denkbar.

5.7 NBN

NBN (*nibrin*) ist Bestandteil des an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligten MRE11/RAD50-Komplexes. Es wird auch alternativ als p95 oder NBS1 (*nijmegen breakage syndrome 1*) bezeichnet und befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 8. Es besteht aus 16 Exonen und wird in ein 754 Aminosäuren langes Protein umgeschrieben. Funktionell wirkt es an der homologen Rekombination mit, welche nach Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen oder während der DNA-Replikation notwendig werden kann (Tauchi et al. 2002) und ist am Aufspüren von DNA-Schäden am G₁-S Zellzykluskontrollpunkt involviert. Weiterhin dient es der

Aufrechterhaltung der Telomere (Lombard und Guarente 2000). Defekte im *NBN*-Gen wurden bisher bei der ALL (Akute Lymphoblastische Leukämie) (Varon et al. 2001) und im Nijmegen-Breakage Syndrom gefunden (Varon et al. 1998).

Beim Polymorphismus rs1063054 zeigte das Wildtypallel unter der Behandlungsbedingung TGFβ1-Inkubation 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung eine signifikant erhöhte Strahlensensibilität (ohne Abbildung, $p = 0,04$). Das Variantenallel wies indes weniger NPB auf. Dem SNP, im 3'-UTR des *NBN*-Gens lokalisiert, wurde in der Literatur bereits eine Assoziation mit Leber- und Lungen- (Park et al. 2010) sowie Mammakarzinomen nachgesagt (Sehl et al. 2009), sofern das Variantenallel vorlag.

Davon ausgehend, dass das 3'-UTR für die Stabilität der mRNA verantwortlich ist und eine Bindestelle für *microRNA* darstellt (Arnold et al. 2010), kann eine Alteration in diesem Bereich abnorme oder verkürzte Proteine entstehen lassen. Dies geschieht beispielsweise durch den Verlust oder die Schaffung neuer *microRNA*-Bindestellen (Yang et al. 2012), die ihrerseits Einfluss auf die posttranslationale Modulation der mRNA und somit Proteinexpression ausüben (Jiang et al. 2010). Daraus kann im Falle von *NBN* ein verändertes Verhalten bei der homologen Rekombination resultieren, welches wiederum eine fehlerhafte Reparatur nach sich ziehen kann. Bezogen auf meine Ergebnisse zu rs1063054 müsste das Wildtypallel eine Destabilisierung der mRNA auslösen, die zu einem Zerfall oder einer Verkürzung der mRNA oder des Proteins führt und somit einen Funktionsverlust von *NBN* verursacht. Auch wäre die Schaffung einer Bindestelle durch das Variantenallel zur Stabilisierung der mRNA denkbar, wodurch besonders funktionsfähige Proteine höherer Reparaturleistung entstehen. Meine Ergebnisse zu rs1063054 gehen jedoch nicht mit der derzeitigen Literatur konform, die ein umgekehrtes Verhalten annehmen. Dies kann durch ein zu geringes Kollektiv bedingt oder durch den Einfluss anderer Genvarianten verursacht sein, die mit dem SNP gekoppelt sind und dadurch den eigentlichen Effekt überlagern. Sollten sich meine Ergebnisse durch weitere Studien jedoch bestätigen lassen, wäre eine Applikation von TGFβ1 in das den Tumor umgebende gesunde Gewebe denkbar. Aufgrund der höheren Strahlenresistenz bei Vorliegen des Variantenallels unter der Behandlungsbedingung TGFβ1-Induktion 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung würde im Vergleich zum Wildtyp ein besserer Schutz der gesunden Zellen im Bestrahlungsfeld vor den Auswirkungen einer Radiotherapie ermöglicht werden.

Der zweite Polymorphismus, rs3026271, zeigte eine signifikante Korrelation mit rs1063054 (Spearman $\rho = -0,37$, $p = 0,004$). Bis auf drei Zelllinien hatten alle Probanden mit dem Variantenallel von rs1063054 das Wildtypallel von rs3026271. Im Gegensatz zu rs1063054 war hier das Variantenallel deutlich strahlensensibler (Abbildung 28), zeigte aber keine veränderte Strahlensensibilität unter der TGFβ1-Behandlung. Der SNP, intronisch gelegen, wurde bisher lediglich auf eine mögliche Assoziation mit Mammakarzinomen untersucht. Es konnte aber kein

Zusammenhang zwischen Vorliegen des Variantenallels und einem erhöhten Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden (Desjardins et al. 2009).

5.8 XRCC1

XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing defective repair in chinese hamster cells 1*) liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 und besteht aus 17 Exonen. Diese codieren für ein 633 Aminosäuren langes Protein, das an der BER (Cuneo und London 2010) und der NER beteiligt ist (Moser et al. 2007). Weiterhin nimmt XRCC1 an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen teil, welche u.a. durch ionisierende Strahlen oder alkylierende Agenzien entstanden sind (Whitehouse et al. 2001). Dazu bildet es mit *LIG3* (*DNA ligase 3*), *PARP* (*poly (ADP-ribose) polymerase*) und *POLβ* (*DNA polymerase beta*) einen Komplex (Abdel-Rahman und El-Zein 2000). Derzeit werden Defekte im *XRCC1*-Gen u.a. mit Zervix- (Mei et al. 2014), Mamma-, Kolon-, Prostata- und Lungenkarzinomen (Karahalil et al. 2012) in Verbindung gebracht.

In meiner Analyse führte der Polymorphismus rs25487 aus Exon 10 bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy zu keinen Unterschieden zwischen Wildtyp- und Variantenallel bezüglich der NPB-Induktion. Der SNP sorgte jedoch beim Variantenallel unter Zugabe von TGFβ1 16 h vor Bestrahlung mit 3 Gy für eine Verringerung der NPB-Anzahl (Abbildung 29, $p = 0,02$) und machte die LCLs strahlenresistenter.

Dem SNP, einer *missense*-Mutation an Position 399, bei der es zu einem Austausch von Arginin gegen Glutamin kommt (Arg399Gln), wird nachgesagt, bei Vorhandensein des Variantenallels unter ionisierender Strahlung zu einer fehlerhaften BER zu führen und die Zahl an Deletionen und Chromosomenaberrationen in Zellen, die das Variantenallel exprimieren, zu erhöhen (Au et al. 2003). Auch weisen Individuen, die das Glutamin (Variantenallel) anstelle von Arginin (Wildtyp) exprimieren, vermehrt DNA-Schädigungen in Form von erhöhten Schwester-Chromatid Austausch nach Bestrahlung auf (Duell et al. 2000). Dies lässt auf eine inadäquate Reparatur oder eine erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierenden Strahlen schließen (van der Straaten et al. 2006). Lunn et al. zeigten, dass der Polymorphismus mit erhöhten Aflatoxin-B₁-DNA-Addukten assoziiert ist und betroffene Zellen mehr Glycophorin-A-Mutationen aufweisen und begründen dies ebenfalls mit einer durch den Aminosäureaustausch bedingten, verringerten DNA-Reparaturleistung (Lunn et al. 1999).

Da der Polymorphismus aufgrund seiner Position Bestandteil der BRCT-I Domäne (*BRCA1 carboxyl-terminal*) ist, von Aminosäure 301 bis 402 reichend, kann das Vorkommen des Variantenallels eine veränderte Interaktion mit *LIG3* und *PARP* zur Folge haben (Abdel-Rahman und El-Zein 2000). Diese veränderten Bindungseigenschaften des *XRCC1*-Proteins können

ihrerseits die DNA-Reparatur nur in geringerem Ausmaß initiieren, und das, obwohl Zelllinien, in denen das homozygote Variantenallel vorliegt, höhere XRCC1-mRNA-Spiegel aufweisen (Zipprich 2010). Auch nimmt die Variante Einfluss auf die Einzelstrangreparatur an den G₁ und S/G₂ Zellzykluskontrollpunkten (Taylor et al. 2002). Eine Studie von Yu et al. wies jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Variantenallel bezüglich benzapyren-bedingter DNA-Adduktentstehung auf (Yu et al. 2012). Dies deckt sich mit meinen Ergebnissen.

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen ist es nachvollziehbar, dass für rs25487 eine Assoziation mit diversen Krebserkrankungen beschrieben werden konnte. Darunter finden sich Zusammenhänge zwischen dem Variantenallel und einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an Zervix- (Alsbeih et al. 2013a), Pankreas- (Nakao et al. 2012), Mamma- (The Breast Cancer Consortium 2006) oder Lungenkarzinomen (Guo et al. 2013) sowie Gliomen (Liu et al. 2009). Auch über Assoziationen mit Melanomen (Santonocito et al. 2012), Endometriums- (Hosono et al. 2013), Blasen- (Mao et al. 2013) und kolorektalen Karzinomen (Yin et al. 2012) wurde berichtet.

Allerdings konnte in anderen Studien kein Nachweis für Zusammenhänge zwischen dem Variantenallel und manchen Tumorerkrankungen, etwa Blasen- (Stern et al. 2009), Prostata- (Agalliu et al. 2010) oder Kolonkarzinomen (Curtin 2009) gefunden werden. Gleiches gilt für Pankreas- (Zhang et al. 2011) und Ösophaguskarzinome (Hiyama et al. 2007) sowie Tumoren im Kopf/Halsbereich (Chuang et al. 2011). Es ließen sich zudem auch Studien finden, die dem Variantenallel ein verringertes Risiko bescheinigten, etwa für die Entstehung dysplastischer Naevi (Liang et al. 2014), Blasen- (Li et al. 2013), Gallenblasen- (Srivastava et al. 2009), Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen der Haut (Nelson et al. 2002), Schilddrüsen- (Fard-Esfahani et al. 2011) und Zervixkarzinomen (Chen et al. 2011) sowie tAML (Seedhouse et al. 2002).

Einige Studien untersuchten die Assoziation zwischen Variantenallel und Therapieansprechen bei bestimmten Erkrankungen. Dabei zeigte das Variantenallel bei van der Straaten et al. ein geringeres Ansprechen der Patienten auf Oxaliplatin/5-Fluoruracil (van der Straaten et al. 2006). Bei Yoon et al. wurde eine erhöhte Resistenz der Zellen mit Variantenallel gegenüber einer Radiochemotherapie bei Ösophaguskarzinomen gefunden (Yoon et al. 2011). Letzteres deckt sich mit meinen Ergebnissen. Auch war das Vorhandensein des Glutamin mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer radiogener Pneumonitis assoziiert (Tucker et al. 2013) und ging mit einem verkürzten Gesamtüberleben bei Prostata- (Figg et al. 2013), Lungen- (Gurubhagavatula et al. 2004), Hepatozellulären- (Jung et al. 2012) und kolorektalen Karzinomen einher (Artac et al. 2009). Es fanden sich aber auch Studien, die der Variante in Bezug auf das Ansprechen einer Therapie positive Eigenschaften zusprechen. Dabei zeigte das Variantenallel von rs25487 ein verbessertes Ansprechen der Zellen auf Platin-haltige Chemotherapie bei Zervixkarzinomen (Chung et al. 2006),

weniger Spätnebenwirkungen nach Bestrahlung bei Nasopharynxkarzinomen (Alsbeih et al. 2010), ein verringertes Risiko für die Entwicklung einer radiogenen Pneumonitis (Yin et al. 2011) und ein verlängertes Gesamtüberleben nach Platingabe bei Lungen- (Giachino et al. 2007), kolorektalen Karzinomen (Kweekel et al. 2009) und Kopf/Halstumoren (Quintela-Fandino et al. 2006). Lediglich eine Studie konnte keine Assoziation des Variantenallels mit Platintoxizität nachweisen (Huang et al. 2008).

Aufgrund der uneinheitlichen Studienlage bezüglich Erkrankungsrisiken und Therapieansprechen in Zusammenhang mit rs25487 scheint eine allgemeine Anwendung von TGF β 1 nicht geboten. Von meinen Ergebnissen ausgehend, besteht die Überlegung, eine Applikation von TGF β 1 in das vom Tumor umgebene gesunde Gewebe zum Schutz vor den Auswirkungen einer Radiotherapie vorzunehmen, da hierbei die Zahl der DNA-Schäden signifikant gesenkt werden konnte.

Abschließend sei noch vermerkt, dass einige Studien eine kombinierte Betrachtung von rs25487 aus dem *XRCC1*-Gen und rs1799793 aus dem *ERCC2*-Gen vornahmen. Letzterer Polymorphismus wurde bereits oben beschrieben (Kapitel 5.3). Dabei konnte ein kombinierter Effekt, über die Einzeleffekte hinaus, bezüglich einer Assoziation der Variantenallele mit Prostatakarzinomen beobachtet werden (Rybicki et al. 2004) sowie eine XRCC1-ERCC2-Interaktion in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben bei Lungenkarzinomen (Gurubhagavatula et al. 2004). Sofern die Variantenallele gemeinsam vorkamen, bedingten sie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bzw. ein verkürztes Gesamtüberleben beim Träger.

Bei dem zweiten Polymorphismus, dessen Variantenallel in meiner Untersuchung mit einer Verringerung der NPB-Anzahl unter TGF β 1 Vorinkubation einherging, handelt es sich um die Intronvariante rs25486, nahe der Intron-Exon Grenze zu Exon 10. Der SNP wies eine Kopplung von $r^2 = 1,0$ mit rs25487 auf. Bisher wurde dem Polymorphismus eine Assoziation mit einem erhöhten Lungen- (Chang JS et al. 2009) und Mammakarzinomrisiko bescheinigt (Roberts et al. 2011). Inwieweit rs25486 einen eigenständigen Effekt aufweist oder sich gar modellierend auf rs25487 auswirkt, bleibt offen. Denkbar wäre eine Einflussnahme des SNP auf den Spleißvorgang und daraus resultierend eine veränderte Proteinlänge. Dieser Ansatz bedarf jedoch einer genaueren Überprüfung. Unabhängig von den pathophysiologischen Hintergründen könnte auch bei rs25486 ein Einsatz von TGF β 1 zum Schutz gesunden Gewebes bei stattfindender Radiotherapie angedacht werden.

5.9 SMAD3

Die SMAD-Proteine (*mothers against decapentaplegic homolog of drosophila*) des TGF β -Signalwegs (siehe Kapitel 1.5) werden entsprechend ihrer Funktion bei der Signaltransduktion in

drei Gruppen eingeteilt. Dazu gehören die regulatorischen (SMAD1/2/3/5/8), die inhibitorischen (SMAD6/7) und die co-aktivatorischen SMADs (SMAD4) (Wu et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf SMAD2/3/4/7, die vorwiegend in Blutzellen exprimiert werden. Da die Ergebnisse von SMAD2 keine Signifikanz von $p \leq 0,05$ aufwiesen, schließt sich an dieser Stelle die Betrachtung von SMAD3 an.

SMAD3 ist ein aus neun Exonen bestehendes Protein von 425 Aminosäuren Länge, das auf dem langen Arm von Chromosom 15 codiert wird und in fünf Isoforme translatiert werden kann. Es gehört zu den regulatorischen Proteinen der TGF β -Signalkaskade und ist zu 92 % mit SMAD2 identisch (Zhang et al. 1996). Es bildet zusammen mit SMAD2 und SMAD4 einen heterooligomeren Komplex, welcher als Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandert (siehe Kapitel 1.5). Nachweislich ist ein Defekt im *SMAD3*-Gen für das Loey-Dietz-Syndrom Typ 3 verantwortlich (Regalado et al. 2011). Dabei spielt der TGF β -Signalweg bei der Genese von Gefäßen eine wichtige Rolle und führt bei vorhandenen SMAD3-Mutationen zu einer Desorganisation der elastischen Fasern in den Gefäßen.

Aufgrund des hohen Kopplungsungleichgewichtes im *SMAD3*-Gen (Abbildung 30), zeigte meine Untersuchung eine Vielzahl signifikanter Assoziationen. Von den SNPs, welche unter TGF β 1-Zugabe 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung mit einer vermehrten MNI-Induktion einhergingen, wurden die beiden intronischen Varianten rs4776881 und rs12324036 in der Literatur beschrieben. Da die Reproduzierbarkeit der MNI-Induktion in der Inter-Tag Korrelation jedoch nicht signifikant war, sind die erhobenen Ergebnisse mit Zurückhaltung zu interpretieren. Den beiden Varianten wird ein protektiver Einfluss bezüglich der Entwicklung portopulmonaler Hypertension bei fortgeschrittener Leberinsuffizienz nachgesagt (Roberts et al. 2009). Ursache dafür kann beispielsweise eine Verkürzung des Proteins am C-terminalen Ende sein, die zu einer Hemmung des TGF β -Signalwegs führt (Zhang et al. 1996) oder die Einflussnahme des SNPs auf die SMAD3-Expression, in Form eines SMAD3-Mangels. Dieser ist bekanntlich mit einer reduzierten Produktion extrazellulärer Matrix verbunden und verursacht somit weniger Fibrosen (Roberts et al. 2001), die sich bei einer geringer ausgeprägter Leberfibrosierung in einer weniger starken Hypertension äußert. Inwieweit die beiden Varianten Einfluss auf die SMAD3-Expression nehmen, ist nicht abschließend geklärt. Entsprechend meinen Ergebnisse, bei denen es weder einen reinen Bestrahlungs-, noch alleinigen TGF β 1-Effekt gab, sondern die Zahl der MNI nur bei einer kombinierten Anwendung anstieg (Abbildung 31 mit $p = 0,002$, Abbildung 32 mit $p = 0,005$), kann vermutet werden, dass eine durch die Bestrahlung verursachte Modifikation von SMAD3, welche allein keine Auswirkungen auf die Proteinfunktionalität oder das Expressionslevel hätte, in Kombination mit TGF β 1 zu einer Expressionssteigerung geführt haben könnte.

Erhöhte SMAD3-Spiegel wurden bisher bei Patienten mit Sklerodermie nachgewiesen (Dong et al. 2002). In gegenteiliger Weise wurde bei SMAD3-knockout-Mäusen das Ausbleiben strahleninduzierter Hautfibrosen beobachtet (Flanders 2004). Da SMAD3 eine Schlüsselfunktion bei der Regulierung der extrazellulären Matrix einnimmt, erhalten SMAD3-Inhibitoren v.a. als Antiproliferativa eine immer größer werdende klinische Relevanz. Ein therapeutischer Ansatz bei der Behandlung chronischer Fibrosen oder Wundheilungsstörungen könnte die Applikation von TGFβ1 darstellen, da dieses zum einen die Proliferation am G₁/S Kontrollpunkt hemmt und zu einem Zellzyklus-Arrest führt (Matsuura et al. 2004) und zum anderen dessen Zugabe über die TGFβ1-Autoinduktion eine SMAD3-Suppression bedingt (Schirmer et al. 2009). Dies deckt sich mit vorangegangenen Studien aus dem Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen, bei denen unter Zugabe von TGFβ1 eine SMAD7-Expressionssteigerung erreicht wurde, die ihrerseits durch negative Feedback-Mechanismen eine Suppression von SMAD3 hervor rief (Neumann 2012).

5.10 SMAD4

SMAD4, lokalisiert auf dem langen Arm von Chromosom 18, zählt zu den Tumorsuppressorgenen. Das Protein, bestehend aus 552 Aminosäuren, wird aus einer zwölf Exone umfassenden mRNA-translatiert. Eine Inaktivierung von SMAD4 führt zu einer Ausschaltung der TGFβ-Signalkaskade und somit zu einer Unempfindlichkeit von Zellen gegenüber TGFβ1 (Zhou et al. 1998). Bei Defekten im *SMAD4*-Gen können zahlreichen Erkrankungen wie das Myhre-Syndrom (Le Goff et al. 2012), die juvenile Polyposis (Howe et al. 2004), Morbus Osler (Gallione et al. 2006) oder Pankreaskarzinome entstehen (Schutte et al. 1996, Rozenblum et al. 1997). Weiterhin wurden *SMAD4*-Mutationen in Patienten mit Kolonkarzinomen (Miyaki et al. 1999), Seminomen (Bouras et al. 2000), Magenkarzinomen (Powell et al. 1997) und Kopf/Halstumoren beobachtet (Qui et al. 2007).

Die drei auffälligsten Polymorphismen rs948588, rs948589 und rs17663887 wiesen untereinander eine Kopplung zwischen $r^2 = 0,88$ und 1,0 auf und waren bei Vorhandensein des Variantenallels mit einer vermehrten NPB-Induktion bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy assoziiert ($p < 0,01$). Die Zugabe von TGFβ1 hob diesen Effekt wieder auf, wobei TGFβ1 allein keinen Einfluss auf die Entstehung genomischer Schäden ausübte (Abbildung 33). Allesamt stellen die SNPs Intronvarianten dar, wobei lediglich rs17663887 bisher beschrieben wurden. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen der Variante und genetisch bedingter Hämochromatose untersucht, jedoch keine Assoziation nachgewiesen (Milet et al. 2007). Eine andere Studie befasste sich mit dem Risiko für die Entstehung von Magenkarzinomen und konnte für das Variantenallel von rs17663887

einen protektiven Effekt nachweisen (Wu et al. 2010). Dieses ging mit einer erhöhten SMAD4-Proteinexpression einher bzw. zeigte das Wildtypallel geringere SMAD4-Spiegel. Dass die SMAD4-Expression in Tumorgewebe, speziell Magenkarzinomen, zumeist deutlich niedriger ist, als im umliegenden Gewebe, wurde bereits nachgewiesen (Leng et al. 2009). Dabei waren die SMAD4-Level in fortgeschrittenen Magenkarzinomen um bis zu 75 % reduziert (Xiangming et al. 2001). Auch führt das Absinken der SMAD4-Expression zu einem Krankheitsprogress (Wang et al. 2007). Dies kann durch mutationsbedingte Transkriptionsabbrüche verursacht sein, bei denen verkürzte und damit funktionsunfähige Proteine entstehen (Powell et al. 1997).

Wu et al. stellten zudem die Vermutung auf, dass rs17663887 aus Intron 9 Einfluss auf Cis-Elemente ausübt (Wu et al. 2010). Dies äußert sich in einem veränderten Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors, der bei Verstärkung des Cis-Effektes eine schwächere Bindung und damit eine verminderte Proteinexpression bedingt und anders herum. Entsprechend der Ergebnisse müsste für rs17663887 ein Absinken des SMAD4-Spiegels angenommen werden, was jedoch der bisherigen Studienlage widerspricht. Inwieweit die TGF β 1-Gabe Einfluss auf die Expressionslevel von SMAD4 nimmt, bleibt fraglich. Zumal in meiner Analyse kein reiner TGF β 1-Effekt nachzuweisen war. Dies deckt sich mit vorangegangenen Ergebnissen aus dem Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen (Neumann 2012). Da jedoch ein kombinierter Effekt zu erkennen war (TGF β 1-Gabe 16 h vor Bestrahlung mit 3 Gy), könnte dies als potentiell therapeutischer Ansatz genutzt werden. Dabei wäre eine Injektion von TGF β 1 in gesundes, den Tumor umgebendes Gewebe im Vorfeld einer Radiotherapie denkbar, sofern das Variantenallel exprimiert wird. Der gleiche Ansatz wurde bereits in Zusammenhang mit *NBN*- und *XRCC1*-Polymorphismen diskutiert. Abermals würde diese Art der TGF β 1-Anwendung zum Schutz des gesunden Gewebes dienen.

5.11 *TGFBR1*

Das *TGFBR1*-Gen (*transforming growth factor beta receptor 1*) auf dem langen Arm von Chromosom 9 beinhaltet neun Exone, welche für ein 503 Aminosäuren langes Protein codieren. Dieses liegt in zwei Isoformen vor und bildet einen membranständigen Rezeptor, der eine Serin/Threonin Kinase Aktivität besitzt und an der TGF β -Singalkaskade beteiligt ist (Ebner et al. 1993). Ein Defekt im *TGFBR1*-Gen wird mit dem Loey-Dietz-Syndrom Typ 1A (Loeys et al. 2005) und 2A (Loeys et al. 2006) in Verbindung gebracht. Weiterhin prädisponieren Mutationen in *TGFBR1* für eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Plattenepitheliomen (Goudie et al. 1993).

Beim SNP rs11466445 führte das Vorhandensein des Variantenallels bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy zu einer verminderten MNI-Induktion (Abbildung 34, p = 0,04). Diese Strahlenresistenz

konnte unter TGFβ1-Zugabe noch leicht verstärkt werden ($p = 0,01$), war jedoch nach Bereinigung des Strahleneffektes und bei alleiniger TGFβ1-Anwendung nicht signifikant. Bei dem Polymorphismus rs11466445 handelt es sich um eine Deletionsvariante, welche einen Verlust von drei GCG-Triplets aufweist, die für drei aufeinander folgende Alanine innerhalb eines neun Alanine umfassenden Bereiches im 3'-UTR von Exon 1 codieren (Pasche et al. 1998). Der Polymorphismus am Übergang vom Signalpeptid zur Rezeptorsequenz wird auch als *TGFBRI*6A* bezeichnet und besitzt unter Kaukasiern eine Allelhäufigkeit von 10 %.

In der Literatur geht das Variantenallel mit einer abgeschwächten Signaltransduktion der inhibierenden Wachstumssignale von TGFβ1 einher (Chen et al. 1999), auch wenn keine Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität von TGFβ1 am Rezeptor oder dessen Halbwertszeit im Vergleich zum Wildtyp gefunden wurden (Pasche et al. 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ursache nicht im Rezeptor selbst zu suchen ist, sondern vielmehr bei der Signalübertragung liegt. Schließlich konnte bereits eine verringerte SMAD4 Signalweitergabe nach TGFβ1-Applikation bei rs11466445 beobachtet werden (Rosman et al. 2008). Dies kann wie im Kapitel 5.9 beschrieben zu einem Krankheitsprogress bei bestimmten Tumorerkrankungen führen. Auch wiesen Zellen, die das Variantenallel exprimierten bei TGFβ1-Gabe eine abgeschwächte Suppression von SMAD3 auf und reagierten mit einer erhöhten Apoptoseempfindlichkeit sensibler auf ionisierende Strahlung als Zellen mit Wildtypallel (Schirmer et al. 2009). Entsprechend meiner Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass eine erhöhte Apoptoserate bei diesen Zellen dazu führte, dass geschädigte LCLs durch den Zelluntergang nicht mehr als BN mit MNi oder NPB unter dem Mikroskop identifiziert werden konnten. Auch wäre es denkbar, dass rs11466445 wie in einer Studie von Dutt et al. nachgewiesen wurde mit einer geringeren genomischen Instabilität assoziiert ist. Dies äußert sich u.a. in einer verminderten Anzahl von DNA-Schäden (Dutt et al. 2008).

In MCF - 7 Brustkrebszellen führte *6A zu einem Wechsel von inhibierenden zu stimulierenden Wachstumssignalen (Rosman et al. 2007). Dies lässt die Annahme zu, dass der Polymorphismus einen Selektionsvorteil für Krebszellen darstellt und eine Einstufung als Krebsrisikoallel zulässig erscheint, wenn auch mit niedriger Penetranz (Kaklamani et al. 2003). Dabei scheint die Beteiligung der Variante am Tumorprogress vielmehr über Zellmigration und Invasion gesteuert zu sein. Denn die bei *TGFBRI*6A* im Vergleich zum Wildtyp beobachteten geringeren onkogenen Eigenschaften waren TGFβ1-unabhängig (Rosman et al. 2008). Auch deckt sich dies mit meinen Ergebnissen, bei denen TGFβ1 keinen Effekt auf die Entstehung von DNA-Schäden ausübte.

Die nicht eindeutigen experimentellen Daten stimmen mit Ergebnissen klinischer Studien überein, die für rs11466445 sowohl eine Assoziation des Variantenallels mit Mamma-, Ovarial- und kolorektalen Karzinomen (Kaklamani et al. 2003, Pasche et al. 2004, Pasche 2008) beschreiben als

auch diesen Zusammenhang widerlegen (Colleran et al. 2010, Baxter et al. 2002, Skoglund Lundin et al. 2009). Auch wurden Assoziationen mit Pankreas- (Kaklamani et al. 2004, Javle et al. 2013), Lungen- (You et al. 2007, Lei et al. 2009) oder Blasenkarzinomen (Castillejo et al. 2009, Liao et al. 2010) beschrieben sowie Assoziationen des Variantenallels mit einem späteren Krankheitsbeginn bei kolorektalen Karzinomen (Dutt et al. 2008).

Der mit *6A partiell gekoppelte SNP rs11568785 ($r^2 = 0,68$) wies, wenn auch marginal nicht signifikant ($p = 0,06$), unter der Behandlungsbedingung TGF β 1-Inkubation 16 h vor Bestrahlung mit 3 Gy bei Vorhandensein des Variantenallels weniger NPB auf (Abbildung 35). Die Variante aus Intron 5 ist nahe einer Spleiß-Akzeptorstelle lokalisiert. Durch den Polymorphismus modifizierte Spleiß-Signale, die zum Herausschneiden eines Exons führen (Passarge 2004), könnten die Proteinstruktur von TGF β R1 verändern und eine abgewandelte Funktionalität des Rezeptors nach sich ziehen. Dies kann sich wiederum wie bei rs11466445 durch Schirmer et al. bereits vermutet in einer Abschwächung der TGF β -Signaltransduktion äußern, wobei eine Einflussnahme von rs11568785 auf rs11466445 wahrscheinlich ist. Auch wiesen die Variantenallele beider SNPs eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber ionisierenden Strahlen auf, v.a. wenn sie gleichzeitig vorlagen (Schirmer et al. 2009) und waren mit einer verminderten allelischen Expression von *TGFBR1* assoziiert (Pasche et al. 2010). Bisher sind für rs11568785 keine klinischen Assoziationen belegt worden.

Da die in der Literatur beschriebene erhöhte Strahlensensibilität bei Vorliegen des Variantenallels bei meinen Ergebnissen für rs11568785 nicht nachgewiesen werden konnte und das geforderte Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht erreicht wurde, bedarf es weiterer Untersuchungen. Sollten sich meine mit einer erhöhten Strahlenresistenz einhergehenden Daten bestätigen lassen, wäre ein therapeutischer Einsatz von TGF β 1 wie zuvor bei *NBN*, *XRCC1* und *SMAD4* beschrieben zum Schutz gesunden Gewebes vor Anwendung einer Radiotherapie denkbar.

5.12 *TGFBR2*

Das Tumorsuppressorgen *TGFBR2* (*transforming growth factor beta receptor 2*) befindet auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 und besteht aus acht Exonen. Diese translatieren für ein 592 Aminosäuren langes Protein, welches in zwei Isoformen vorliegt. Der TGF β -Rezeptor 2 besitzt wie auch der TGF β -Rezeptor 1 eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität, die es ihm ermöglicht, Letzteren zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren. Daher ist der TGF β -Rezeptor 2 essentiell bei der Signaltransduktion von TGF β 1. Ein *TGFBR2*-Defekt wird mit HNPCC Typ 6 (Lu et al. 1998), dem Loeys-Dietz-Syndrom Typ 1B (Loeys et al. 2005) und 2B (Mizuguchi et al. 2004) und Ösophaguskarzinomen (Tanaka et al. 2000) in Verbindung gebracht.

In meinem Versuchsaufbau waren die Variantenallele von vier Polymorphismen (rs995435, rs3773636, rs1864615 und rs9858487) mit einer vermehrten NPB-Induktion bei 3 Gy-Bestrahlung assoziiert (Abbildung 36, $p = 0,006$ für rs995435 und $p = 0,003$ für rs9858487). Bei allen vier SNPs handelt es sich um Intronvarianten, wobei bisher lediglich rs995435 in der Literatur beschrieben wurde. Dabei wurde eine mögliche Assoziation des SNP mit Präeklampsie untersucht (Bell et al. 2013), konnte aber nicht bestätigt werden. Da nur eine geringe genetische Kopplung im *TGFBR2*-Gen vorliegt, könnten funktionell relevante Polymorphismen in diesem Gen fehlen. Mögliche Einflüsse der Varianten auf etwa die Kinaseaktivität des Rezeptors und damit verbunden eine herabgesetzte Phosphorylierung des TGF β -Rezeptors 1 sind genauso denkbar wie ein verändertes Bindungsverhalten des Liganden am Rezeptor und eine daraus resultierende gestörte Signalweitergabe der inhibitorischen Wachstumssignale.

Vorangegangenen Studien aus dem Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen zeigten keine signifikanten Assoziationen von *TGFBR2* in Bezug auf Zellvitalität oder Genexpressionsänderungen (Neumann 2012). Weiterhin zeigte die Zugabe von TGF β 1 zwischen Wildtyp- und Variantenallel keinen signifikanten Effekt auf die Induktion von DNA-Schäden.

5.13 *TGFBI*

TGFBI (*transforming growth factor beta 1*) ist auf dem langen Arm von Chromosom 19 lokalisiert und codiert für ein aus sieben Exonen bestehendes Protein von 390 Aminosäuren Länge. Dieses bindet als Ligand am TGF β -Rezeptor 2, setzt dadurch die TGF β Signalkaskade in Gang und reguliert als negativer Wachstumsfaktor u.a. Zellteilung und -differenzierung. Defekte im *TGFBI*-Gen werden als Modifikator der Zystischen Fibrose gehandelt (Dorfman et al. 2008) und mit dem Engelmann-Syndrom in Verbindung gebracht (Janssen et al. 2000). Weiterhin bestehen Zusammenhänge zwischen *TGFBI*-Gendefekten und Muskeldystrophien (Bernasconi et al. 1995), kardialen Fibrosen (Zeisberg et al. 2007), Nierenfibrosen (Border und Noble 1994), Sklerodermie (Dong et al. 2002), Marfan Syndrom (Habashi et al. 2006) und Tumorgenese (Derynck et al. 2001).

Bei keinem Polymorphismus im *TGFBI*-Gen fand sich in meiner Analyse eine signifikante Assoziation mit den Behandlungsbedingungen 5 ng/ml TGF β 1 und 5 ng/ml TGF β 1 16 h vor 3 Gy-Bestrahlung. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass gezeigt werden konnte, dass die externe Zufuhr von TGF β 1 zwar zu einer vermehrter Produktion von mRNA und dies wiederum zu einer vermehrten Bildung von TGF β 1-Protein führt (Flanders et al. 1995), jedoch diese Autoinduktion ebenfalls zu einer SMAD7-Expressionssteigerung (Neumann 2012) und über negative Feedback Mechanismen letztlich zu einer Hemmung des TGF β -Signalwegs führt (Kunzmann et al. 2003). Daher ist die Analyse endogener *TGFBI*-Varianten unter Zugabe exogenen TGF β 1 nicht sinnvoll.

Der Polymorphismus rs1800469 (-509C>T) aus der Promotorregion des *TGFBI*-Gens war in meiner Analyse bei Vorliegen des Variantenallels unter alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy mit einer erhöhten MNI-Induktion assoziiert (Abbildung 37, $p = 0,03$), war also deutlich strahlensensibler. Dem SNP wird nachgesagt, aufgrund des Basenaustausches zu einer Veränderung der YY1 (*yin yang 1*) Aktivierungssequenz zu führen (Hobbs et al. 1998). Die daraus resultierende Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 an der DNA mit einer höheren Affinität kann eine bis zu 30 % gesteigerte Promotoraktivität zur Folge haben (Silverman et al. 2004), die wiederum zu erhöhten TGF β 1-Plasmaspiegeln führen kann (Grainger et al. 1999, Eliopoulos et al. 2009). Eine Studie von Shah et al. verfolgt den Ansatz, dass nicht das Variantenallel eine vermehrte Transkription bedingt, sondern das Wildtypallel von rs1800469 durch die Bindung an AP1 (*activator protein 1*), einem Transkriptionsregulator, ein Herabregulieren der Transkription zur Folge hat (Shah et al. 2006). So führt das Vorkommen des Wildtypallels vielmehr zu einem Absinken des TGF β 1-Spiegels, als dass das Variantenallel erhöhte TGF β 1-Spiegel im umliegenden Gewebe bedingt.

Klinisch fanden sich Assoziationen des Variantenallels mit Mamma- (Dunning et al. 2003), Magen- (Li et al. 2012), Prostata- (Eward-Toland et al. 2004) und Lungenkarzinomen (Park et al. 2006). Dies wird zumeist auf die vermehrte transkriptionelle Aktivität zurückgeführt (Luedeking et al. 2000). Auch wurden Zusammenhänge des Polymorphismus mit Erkrankungen der Atemwege wie Zystische Fibrose (Collaco et al. 2008), COPD (Ito et al. 2008) und Asthma (Silverman et al. 2004) gefunden. Assoziationen mit Erkrankungen des Herzens, etwa Myokardinfarkt (Barsova et al. 2012) und KHK (Lu et al. 2012), des Verdauungstraktes (Schulte et al. 2001), des Gehirns (Peng et al. 2011) und des Knochenmarks (Mavroudi und Papadaki 2012, Eliopoulos et al. 2009) wurden ebenfalls beschrieben.

Die sehr vielfältige Datenlage zu rs1800469 zeigte aber auch fehlende Assoziationen mit derartigen Erkrankungen auf. So ließ sich kein Zusammenhang zwischen Vorkommen des Variantenallels und der Entstehung von Mamma- (Qi et al. 2010), Gallenblasen- (Vishnoi et al. 2008) Magen- (Guan et al. 2009) oder Prostatakarzinomen ausfindig machen (Kang et al. 2007). Weiterhin gab es keine Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Multipler Sklerose (Makarycheva et al. 2011), Osteoporose (Langdahl et al. 2008), Endometriose (van Kaam et al. 2007), COPD (Gong et al. 2011), systemischem Lupus erythematoses (Barreto et al. 2009) oder Erkrankungen der Herzens wie Vorhofflimmern (Zheng et al. 2013) und kardialen Ischämien (Wang X et al. 2009).

Entgegen den oben beschriebenen Befunden zeigten einige Untersuchungen auch einen entgegengesetzten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und diversen Erkrankungen. So sank bei Vorhandensein des Variantenallels das Risiko für die Erkrankung an einen Kolon-, Rektum- (Slattery et al. 2012), Nasopharynx- (Hu et al. 2012) oder Hepatozellulären Karzinom

(Yang et al. 2011). Gleiches galt für Mammakarzinome sowohl mit Östrogenrezeptor-negativem (Quan et al. 2014) als auch Östrogenrezeptor-positivem Status (Cox et al. 2007), Prostatakarzinome im fortgeschrittenen Stadium (Brand et al. 2008) und abdominelle Aortenaneurysmen (Ogata et al. 2005).

Auch wurde der Polymorphismus rs1800469 genauer auf seine Auswirkungen auf eine Radiotherapie hin untersucht. Dabei fand sich eine Assoziation des SNP mit strahleninduzierten Fibrosen (Andreassen et al. 2003). Dem Variantenallel konnte ein bis zu 15fach erhöhtes Fibrosisrisiko nach Radiotherapie nachgewiesen werden (Giotopoulos et al. 2007, Quarmby et al. 2003). Gleiches gilt für die Entstehung von radiogenen Ösophagitiden (Guerra et al. 2012) und Erythemen (Raabe et al. 2012). Die Betrachtung des Zusammenhangs zwischen rs1800469 und Strahlennebenwirkungen wie der radiogenen Pneumonitis (Niu et al. 2012), Hautfibrosen (Barnett et al. 2012) oder anderen dermalen Spätnebenwirkungen (Zhu et al. 2013) blieb in einigen Studien jedoch ergebnislos. In einer Analyse von Alsbeih et al. zeigte das Variantenallel sogar einen begünstigenden Effekt in Bezug auf die Strahlentoxizität und ging mit weniger Fibrosen einher (Alsbeih et al. 2013b). In einer vorangegangenen Untersuchung konnte für den SNP, wenn auch statistisch nicht-signifikant, ein verringertes Risiko für die Entstehung radiogener Pneumonitiden nachgewiesen werden (Yuan et al. 2009).

Einige Studien legten den Fokus auf das Wildtypallel von rs1800469. So war dieses bei Yuan et al. mit vermehrten Strahlennebenwirkungen bei Lungenkarzinomen assoziiert (Yuan et al. 2013). Aber auch erhöhte TGFβ1-Plasmaspiegel (Hu et al. 2012, Yuan et al. 2013) bzw. eine höhere Transkriptionsaktivität konnte bei Vorhandensein des Wildtypallels nachgewiesen werden (Wang et al. 2008). Allgemein resultieren erhöhte TGFβ1-Spiegel in einer Hemmung des Immunsystems, indem T-, B- und NK-Zellen inhibiert werden. Daraus kann eine gesteigerte Angiogenese und vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix resultieren (Derynck et al. 2001). Außerdem fördert TGFβ1 die Migration von Tumorzellen und führte so zu einer Begünstigung der Metastasierung (Maehara et al. 1999). Und obwohl TGFβ1 für seine wachstumshemmenden Eigenschaften bekannt ist, wirken sich diese lediglich initial hemmend auf das Tumorwachstum aus, begünstigen im Verlauf die Tumorausbreitung (Pardali und ten Dijke 2009) und führten bei Patienten mit einer verstärkten TGFβ1-Expression im Tumorgewebe zu einer schlechteren Prognose (Watanabe et al. 2001). Ob die Variante rs1800469 überhaupt zu einer Änderung der TGFβ1-Expressionslevel führt bleibt offen, zumal in vorausgegangenen Studien des Instituts für Klinische Pharmakologie keine Veränderungen diesbezüglich festgestellt werden konnten (Janke 2009).

5.14 Ausblick

TGF β 1 beeinflusst nachweislich die Wirksamkeit von Röntgenstrahlung auf LCLs bei Vorhandensein bestimmter Variantenallele. Diese Einflussnahme der Genpolymorphismen rückt v.a. in der personalisierten Medizin immer mehr in den Fokus. Fest steht, dass die Vielzahl von genetischen Variationen, die den individuellen Unterschied zwischen jedem Menschen ausmachen wie auch der Lebensstil und Umweltfaktoren erheblichen Einfluss auf die Funktionalität bestimmter Proteine ausüben. Um diese Einflussnahme therapeutisch zu nutzen, ist es wichtig, genaue Kenntnis besonders über die genetischen Variationen zu besitzen. Daher kann ein therapeutischer Einsatz nur nach vorheriger Bestimmung des genetischen Profils des Patienten erfolgen.

In meiner Analyse zeigten sich bei einigen SNPs sowohl unter alleiniger TGF β 1-Behandlung als auch bei einer kombinierten Bestrahlung mit 3 Gy vermehrte Raten an DNA-Schäden bei Vorhandensein des Variantenallels (rs20580 aus *LIG1*, rs1800734 aus *MLH1*). Dies kann im Tumorgewebe einen erhöhten Zelluntergang zur Folge haben und ein verbessertes Ansprechen der entarteten Zellen auf Röntgenstrahlung oder Zytostatika bedingen. Da in meinen Ergebnissen einige Polymorphismen bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy eine erhöhte Strahlenresistenz zeigten, die sich unter TGF β 1-Gabe umkehrte (rs2020911 und rs2710163 aus dem *MSH6*-Gen), wäre ein verbesserter Therapieerfolg auch bei Patienten denkbar, die bisher schlecht auf eine Radiotherapie ansprechen. Somit könnte die Gabe von TGF β 1 bei Patienten, die durch ihr genetisches Profil eine erhöhte Strahlensensibilität besitzen, eine Verringerung der Strahlen- oder Zytostatikadosis ermöglichen und bei Patienten mit einer erhöhten Strahlenresistenz den Erfolg einer Radiotherapie erhöhen. Dadurch würde sich nicht nur die Lebensqualität unter einer Tumorthherapie deutlich verbessern, auch ein verlängertes progressionsfreies Überleben wäre denkbar. Selbiges gilt für die Reduktion des Schweregrades von Akut- und Spätnebenwirkungen.

Zum anderen zeigten sich in meinen Ergebnissen einige Polymorphismen, die bei TGF β 1-Vorbehandlung eine erhöhte Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen erzeugten. Auch hier könnte eine therapeutische Anwendung denkbar werden, indem eine Applikation in gesundes, den Tumor umgebendes Gewebe erfolgt. In diesem Zusammenhang wäre eine Reduktion der Strahlenschäden durch TGF β 1 zu erreichen und die damit einhergehenden direkten Strahlennebenwirkungen würden abgepuffert werden.

Es bleibt zu überprüfen, inwieweit sich die einzelnen genetischen Varianten gegenseitig beeinflussen. Meine Analyse legte den Fokus auf die Betrachtung einzelner Polymorphismen, nicht auf ein mögliches Zusammenspiel mit sich verstärkenden oder auslöschenden Effekten, die durch gleichzeitiges Vorhandensein anderer SNPs erzeugt werden. Wir beobachteten zufällig eine additive

Wirkung von rs995435 und rs9858487 aus dem *TGFBR2*-Gen, jedoch konnte eine Prüfung aller 1771 SNPs miteinander aus Zeitgründen nicht erfolgen. Da die Weiterentwicklung der Analyse- und bioinformatischen Methoden das Untersuchen von Proben immer zeit- und kosteneffizienter ermöglicht (z.B. *next generation sequencing*), wird zukünftig eine weiträumige Prüfung möglich sein und sich in der personalisierten Medizin ein immer größer werdender Anwendungsbereich erschließen.

Da die Wirkungsweisen von TGF β 1 sehr komplex und zumeist noch nicht genau verstanden sind, bleibt zu prüfen, ob sich meine Beobachtungen auch auf andere Zelllinien übertragen lassen und weitere Kombinationen, beispielsweise mit Chemotherapeutika, Ansätze v.a. in der Tumorthherapie darstellen können.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Hypothesen geprüft werden, dass TGF β 1 zu einer Erhöhung der Strahlensensibilität lymphoblastoider Zellen (LCLs) führt und dass Polymorphismen in Genen des TGF β Signalwegs oder in Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, die Strahlenreaktion der LCLs beeinflusst.

Dazu wurden kommerziell erworbene LCLs verwendet und die dazugehörigen Genotypdaten der relevanten Gene der HapMap-Datenbank entnommen. Die Anzucht und Vorinkubation der Zellen erfolgte im Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen. In der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie wurden die LCLs mit Röntgenstrahlen behandelt, so dass vier Behandlungsbedingungen vorlagen: 3 Gy-Bestrahlung, Inkubation mit 5 ng/ml TGF β 1, eine kombinierte Behandlung (5 ng/ml TGF β 1 16 h vor Bestrahlung mit 3 Gy) und eine unbehandelte Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 28 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kam als Endpunkt der Analyse der Mikrokerntest zum Einsatz. Dabei können genomische Schäden mikroskopisch sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden bei 14 der 48 Zelllinien in einigen Wochen Abstand Replikate unter den gleichen Behandlungsbedingungen hergestellt. Am Ende der Analyse betrug die Anzahl der untersuchten Zelllinien $n = 60$. Die Auswirkungen von 1771 Genpolymorphismen aus 23 Kandidatengen auf die Anzahl der genomischen Schäden nach den unterschiedlichen Behandlungen wurden geprüft.

Die erste Hypothese wurde verifiziert, da sich insgesamt eine deutliche Zunahme an DNA-Schäden in Form von Kernplasmabrücken (NPB) und Mikrokernen (MNi) unter der TGF β 1-Behandlung zeigte. Zwischen den Vergleichsbehandlungsbedingungen 3 Gy ohne TGF β 1 und 3 Gy mit TGF β 1 war ein signifikanter Anstieg von NPB mit $p = 0,005$ bzw. von MNi mit $p = 0,04$ zu beobachten. Eine statistisch signifikante Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von $p \leq 0,05$ wurde durch die Behandlung von Replikaten überprüft und bei den NPB gefunden. Darum wurden hauptsächlich NPB zur Analyse des Einflusses der Genpolymorphismen herangezogen.

Bei den DNA-Reparaturgenen kam es bei der Mehrheit der untersuchten Gene zu keiner signifikanten Einflussnahme von TGF β 1 auf die Strahlensensibilität der LCLs. Jedoch trat beim Vorliegen von rs4986852 aus dem *BRCA1*-Gen nach Zugabe von TGF β 1 eine Zunahme der Strahlensensibilität der LCLs auf. Dabei kam es bereits bei alleiniger Bestrahlung zu einer vermehrten NPB-Formation, welche unter TGF β 1-Vorbehandlung noch gesteigert werden konnte ($p = 0,003$). Bei der in der Promotorregion des *MLH1*-Gens gelegenen Variante rs1800734 wurde

selbiger Effekt registriert, jedoch lag bei dieser Variante bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy zwischen Wildtyp und Variante keine veränderte Strahlensensibilität vor. Eine Zunahme der Strahlensensibilität beim Variantenallel zeigte sich erst bei der kombinierten Behandlungsbedingung ($p = 0,05$). LCLs mit den SNPs rs2020911 und rs2710163 aus dem *MSH6*-Gen wiesen bei alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy eine erhöhte Strahlenresistenz auf ($p = 0,009$ für rs2020911). Hier bewirkte die TGF β 1-Zugabe nicht nur eine Aufhebung, sondern gar eine Umkehr der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber ionisierenden Strahlen. Dadurch konnten bei Vorliegen des Variantenallels vermehrt genomische Schäden induziert werden ($p = 0,005$ für rs2020911). Im klinisch bedeutsamen Polymorphismus rs1799793 (Asp312Asn) aus dem *ERCC2*-Gen konnte ebenfalls eine Zunahme der Strahlensensibilität der LCLs unter TGF β 1-Behandlung beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu wiesen Träger der Variante rs25487 (Gln399Arg) aus dem *XRCC1*-Gen bei Vorkommen des Variantenallels unter TGF β 1-Vorinkubation eine reduzierte Strahlen-bedingte NPB-Induktion auf ($p = 0,02$). Hier zeigte sich weder ein alleiniger Bestrahlungs- noch TGF β 1-Effekt.

Bei den Genen des TGF β -Signalwegs zeigten sich folgende Ergebnisse: Für Polymorphismen aus *SMAD2*, *SMAD7* und *TGFBR2* ließen sich keine signifikanten Assoziationen mit TGF β 1 feststellen. Bei *SMAD3* wurden durch das Variantenallel von rs893473 vermehrt NPB induziert - sofern mit TGF β 1 vorbehandelt wurde - und führte zu einer erhöhten Strahlensensibilität. Der Polymorphismus rs12900401 zeigte hingegen einen gegenteiligen Effekt und führte unter TGF β 1-Vorbehandlung zu einer Zunahme der Strahlenresistenz bei Zellen, die das Variantenallel exprimierten. Für rs17663887 aus dem *SMAD4*-Gen, bei dem die LCLs mit dem Variantenallel gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Strahlensensibilität aufwiesen ($p = 0,005$), konnte die Zugabe von TGF β 1 eine Angleichung der Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen bewirken. TGF β 1 machte die Zellen dadurch relativ unempfindlich gegenüber Röntgenstrahlung (entsprechend Wildtypniveau). Ein gegenteiliger Effekt konnte bei der Deletionsvariante rs11466445 (*6A) aus dem *TGFBR1*-Gen beobachtet werden. Hier lag eine erhöhte Strahlenresistenz der LCLs mit Variantenallel vor ($p = 0,04$), die unter TGF β 1-Inkubation aufgehoben wurde. Hier sorgte die Zugabe von TGF β 1 für eine Sensibilisierung der Variante auf Wildtypniveau.

Insgesamt wurde also die als Zweite formulierte Hypothese einer Beeinflussung der Strahlenreaktion der LCLs durch Polymorphismen in ausgewählten Genen nur teilweise verifiziert. Variationen im *TGFBI*-Gen konnten aufgrund des exogen zugeführten TGF β 1 nicht im Zusammenhang mit endogenen *TGFBI*-Varianten betrachtet werden.

7. Anhang

Tabelle 8: Rohdatenblatt für die Auszählung des Mikrokerntests. Beispielhaft ist eine ausgezählte Zelllinie dargestellt.

Objektträger:	LCL 24	v. 25.02.09						
Probe	BN	BN + 1 MN	BN + 2 MNi	BN + 3 MNi	BN + NPB	Anteil NPB [%]		
Ko	1010	4	0	0	4	0,396		
TGFβ1	1002	3	0	0	4	0,399		
3Gy	1004	129	16	4	28	2,789		
3Gy + TGFβ1	1002	146	16	4	43	4,291		
	3 Kerne	3K + 1 MN	3K + 2MNi	3K + NPB	4 Kerne	4K+BoMN		
Ko	30	3	0	2	101	9		
TGFβ1	52	1	0	4	107	12		
3Gy	40	7	2	4	39	9		
3Gy + TGFβ1	45	11	3	4	32	9		
NDI 500 Zellen	1K	BN	3K	4K		Häufigkeit BN in 500		
Ko	254	225	4	14	1,553	0,453		
TGFβ1	256	229	3	11	1,537	0,459		
3Gy	428	74	2	3	1,172	0,146		
3Gy + TGFβ1	412	85	1	1	1,180	0,170		
NDCI 500 Zellen	1K	BN	3K	4K	Ap	Nek		
Ko	254	225	4	14	3	9		
TGFβ1	250	225	3	10	6	9		
3Gy	413	71	2	3	7	12		
3Gy + TGFβ1	396	81	1	1	13	11		
Anteil Ap [%]	Anteil Nek [%]		Anzahl MN in BN	Anzahl MN in 3K	Anzahl BN mit MN	Anzahl 3K mit MN		
0,589	1,768		4	3	4	3		
1,193	1,789		3	1	3	1		
1,378	2,362		173	11	149	9		
2,584	2,187		190	17	166	14		

8. Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA (2000): The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett* 159(1), 63-71
- Agalliu I, Kwon EM, Salinas CA, Koopmeiners JS, Ostrander EA, Stanford JL (2010): Genetic variations in DNA repair genes and prostate cancer risk: results from a population-based study. *Cancer Cause Control* 21(2), 289-300
- Al-Sukhni W, Rothenmund H, Eppel Borgida A, Zogopoulos G, O'Shea AM, Pollett A, Gallinger S (2008): Germline BRCA1 mutations predispose to pancreatic adenocarcinoma. *Hum Genet* 124, 271-78
- Allan JM, Shorto J, Adlard J, Bury J, Coggins R, George R, Katory M, Quirke P, Richman S, Scott D et al. (2008): MLH1 -93G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. *Int J Cancer* 123, 2456-59
- Alsbeih G, Al-Harbi N, Al-Hadyan K, El-Sebaie M, Al-Rajhi N (2010): Associations between normal tissue complications after radiotherapy and polymorphic variants in *TGFBI* and *XRCC1* genes. *Radiat Res* 173, 505-11
- Alsbeih G, Al-Harbi N, El-Sebaie M, Al-Badawi I (2013a): HPV prevalence and genetic predisposition to cervical cancer in Saudi Arabia. *Infect Agent Cancer* 8(1), 15
- Alsbeih G, El-Sebaie M, Al-Harbi N, Al-Hadyan K, Shoukri M, Al-Rajhi N (2013b): SNPs in genes implicated in radiation response are associated with radiotoxicity and evoke roles as predictive and prognostic biomarkers. *Radiat Oncol* 8, 125
- Alter BP, Rosenberg PS, Brody LC (2007): Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in *FANCD1/BRCA2*. *J Med Genet* 44, 1-9
- Anantharaman D, Samant TW, Sen S, Mahimkar MB (2011): Polymorphisms in tobacco and DNA repair genes modulate oral precancer and cancer risk. *Oral Oncology* 47, 866-72
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J (2003): Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 69(2), 127-35
- Antoine JL, Gerber GB, Léonard A, Richard F, Wambersie A (1981): Chromosome aberrations induced in patients treated with telecobalt therapy for mammary carcinoma. *Radiat Res* 86, 171-77
- Applebaum KM, Karagas MR, Hunter DJ, Catalano PJ, Byler SH, Morris S, Nelson HH (2007): Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, arsenic exposure, and non-melanoma skin cancer in New Hampshire. *Environ Health Perspect* 115(8), 1231-36
- Arnold M, Ellwanger DC, Hartsperger ML, Pfeufer A, Stümpflen V (2010): *Cis*-acting polymorphisms affect complex traits through modification of microRNA regulation pathways. *PloS One* 7(5), e36694
- Arnold N, Peper H, Bandick K, Kreikemeier M, Karow D, Teegen B, Jonat W (2002): Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatography B* 782, 99-104

- Arsura M, Panta GR, Bilyeu JD, Cavin LG, Sovak MA, Oliver AA, Factor V, Heuchel R, Mercurio F, Thorgeirsson SS et al. (2003): Transient activation of NF- κ B through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF- β 1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation. *Oncogene* 22, 412-25
- Artac M, Bozcuk H, Phlivan S, Akcan S, Pehlivan M, Sever T, Ozdogan M, Savas B (2010): The value of XPD and XRCC1 genotype polymorphisms to predict clinical outcome in metastatic colorectal carcinoma patients with irinotecan-based regimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 136, 803-09
- Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH (2003): Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 111, 1843-50
- Auclair J, Leroux D, Desseigne F, Lasset C, Saurin JC, Joly MO, Pinson S, Xu XL, Montmain G, Ruano E et al. (2007): Novel biallelic mutations in MSH6 and PMS2 genes: gene conversion as a likely cause of PMS2 gene inactivation. *Hum Mutat* 28(11), 1084-90
- Bachman KE, Park BH (2005): Duel nature of TGF- β signaling: tumor suppressor vs. tumor promotor. *Curr Opin Oncol* 17(1), 49-54
- Barnett GC, Elliott RM, Alsner J, Andreassen CN, Abdelhay O, Burnet NG, Chang-Claude J, Coles CE, Gutiérrez-Enríquez S, Fuentes-Raspall MJ et al. (2012): Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. *Radiother Oncol* 105(3), 289-95
- Barreto M, Ferreira RC, Lourenço L, Morales-Fontes MF, Santos E, Alves M, Carvalho C, Martins B, Andreia R, Viana JF et al. (2009): Low frequency of CD4⁺CD25⁺ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGF β gene variants. *BMC Immunol* 10, 5
- Barsova RM, Titov BV, Matveeva NA, Favorov AV, Sukhinina TS, Shahnovich RM, Ruda MI, Favorova OO (2012): Contribution of the TGFB1 gene to myocardial infarction susceptibility. *Acta Naturae*; 4(2): 74-79
- Bateson P (2002): William Bateson: a biologist ahead of his time. *J Genet* 81(2), 49-58
- Bau DT, Wu HC, Chiu CF, Lin CC, Hsu CM, Wang CL, Wang RF, Tsai FJ (2007): Association of XPD polymorphisms with prostate cancer in taiwanese patients. *Anticancer Res* 27, 2893-96
- Baxter SW, Choong DYH, Eccles DM, Campell IG (2002): Transforming growth factor β receptor 1 polyalanine polymorphism and exon 5 mutation analysis in breast and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 211-14
- Bearn AG (1996): Inborn errors of metabolism: Garrods legacy. *Mol Med*; 2(3): 269-71
- Beckwith JR (1970): Gene expression in bacteria and some concerns about the misuse of science. *Bacteriological Review* 34(3), 222-27
- Bell MJ, Roberts JM, Founds SA, Jeyabalan A, Terhorst L, Conley YP (2013): Variation in endoglin pathway genes is associated with preeclampsia: a case-control candidate gene association study. *BMC Pregnancy Childbirth* 13, 82
- Benhamou S, Sarasin A (2005): ERCC2/XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 161(1), 1-14
- Bentley DJ, Harrison C, Ketchen AM, Redhead NJ, Samuel K, Waterfall M, Ansell JD, Melton DW (2002): DNA ligase 1 null mouse cells show normal DNA repair activity but altered DNA

replication and reduced genome stability. *J Cell Sci* 115, 1551-61

Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, Conelio F, Morandi L, Mantegazza R (1995): Expression of transforming growth factor-beta-1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis: pathogenetic role of a fibrogenetic cytokine. *J Clin Invest* 96, 1137-44

Biason P, Hattinger CM, Innocenti F, Talamini R, Alberghini M, Scotlandi K, Zanusso C, Serra M, Toffoli G (2012): Nucleotide excision repair gene variants and associations with survival in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 12(6), 476-83

Böhm I, Schild H (2003): Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* 5(1), 2-14

Border WA, Noble NA (1994): Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331, 1286-92

Bouras M, Tabone E, Bertholon J, Sommer P, Bouvier , Droz JP, Benahmed M (2000): A novel *SMAD4* gene mutation in seminoma germ cell tumors. *Cancer Res* 60, 922-28

Boveri T (1902): Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verhandlungen der physikalisch-medizinischen Gesellschaft Würzburg* 35, 67-90

Brand TC, Bermejo C, Canby-Hagino E, Troyer DA, Baillargeon J, Thompson IM, Leach RJ, Naylor SL (2008): Association of polymorphisms in *TGFB1* and prostate cancer. *J Urol* 179(2), 754-58

Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC (2001): Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 22(4), 593-97

Campbell PT, Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Velicer CM, Caan B, Potter JD, Slattery ML (2009): Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. *Gut* 58(5), 661-67

Câmpean R: Genexpression im TGFB (Transforming Growth Factor Beta)-Signalweg in humanen Lymphozyten: Bedeutung genetischer Varianten für die Reaktion auf Röntgenstrahlung. Med Diss, Göttingen 2007

Carlson JG (1938): Mitotic behaviour of induced chromosomal fragments lacking spindle attachments in neuroblasts of the grasshopper. *Proc Natl Acad Sci USA* 24, 500-07

Carter SB (1967): Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 213, 261-64

Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC et al. (1994): Mutations in the *BRCA1* gene in families with early onset breast and ovarian cancer. *Nature Genet* 8, 387-93

Castillejo A, Rothman N, Murta-Nascimento C, Malats N, García-Closas M, Gómez-Martínez A, Lloreta J, Tardón A, Serra C, García-Closas R et al. (2009): *TGFB1* and *TGFBR1* polymorphic variants in relationship to bladder cancer risk and prognosis. *Int J Cancer* 124, 608-13

Chang CH, Wang RF, Tsai RY, Wu HC, Wang CH, Tsai CW, Chang CL, Tsou YA, Liu CS, Bau DT (2009): Significant association of XPD codon 312 single nucleotide polymorphism with bladder cancer susceptibility in Taiwan. *Anticancer Res* 29, 3903-08

Chang JS, Wrensch MR, Hansen HM, Sison JD, Aldrich MC, Quesenberry CP, Seldin MF, Kelsey KT, Wiencke JK (2009): Base excision repair genes and risk of lung cancer among San Francisco Bay Area Latinos and African-American. *Carcinogenesis* 30(1), 78-87

Chang JS, Wrensch MR, Hansen HM, Sison JD, Aldrich MC, Quesenberry CP, Seldin MF, Kelsey KT, Kittles RA, Silva G et al. (2008): Nucleotide excision repair genes and risk of lung cancer among San Francisco Bay Area Latinos and African American. *Int J Cancer* 123(9), 2095-2104

Chang-Claude J, Ambrosone CB, Lilla C, Kroop S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P et al. (2009): Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *Br J Cancer* 100(10), 1680-86

Chen H, Taylor NP, Sotamaa KM, Mutch DG, Powell MA, Schmidt AP, Feng S, Hampel HL, de la Chapelle A, Goodfellow PJ (2007): Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of *MLH1*. *Int J Cancer* 120, 1684-88

Chen T, de Vries EGE, Hollema H, Yegen HA, Vellucci VF, Strickler HD, Hildesheim A, Reiss M (1999): Structural alterations of transforming growth factor- β receptor genes in human cervical carcinoma. *Int J Cancer* 82, 43-51

Chen X, Jiang J, Shen H, Hu Z (2011): Genetic susceptibility of cervical cancer. *J Biomed Res* 25(3), 155-64

Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones DC, Chen PL, Lee WH (1996): BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle dependent manner. *Cancer Res* 56, 3168-72

Chuang SC, Agudo A, Ahrens W, Anantharaman D, Benhamou S, Boccia S, Chen C, Conway DI, Fabianova E, Hayes RB et al. (2011): Sequence variants and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *Front Oncol* 1, 13

Chung HH, Kim MK, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP (2006): *XRCC1* R399Q polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer. *Gynecol Oncol* 103, 1031-37

Cleas K, Poppe B, Coene I, de Paepe A, Messiaen L (2004): BRCA1 and BRCA2 germline mutation spectrum and frequencies in belgian breast/ovarian cancer families. *Br J Cancer* 90, 1244-51

Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, McDougal K, Blackman SM, Bowers A, Naughton K, Jennings J, Ellen J, Cutting GR (2008): Interactions between secondhand smoke and genes that effect cystic fibrosis lung disease. *JAMA* 299(4), 417-24

Colleran G, McInerney N, Rowan A, Barclay E, Jones AM, Curran C, Miller N, Kerin M, Tomlinson I, Sawyer E (2010): The TGFBR1*6A/9A polymorphism is not associated with differential risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 119, 437-42

Conrad DF, Jakobsson M, Coop G, Wen X, Wall JD, Rosenberg NA, Pritchard JK (2006): A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Genet* 38(11), 1251-60

Cox DG, Penney K, Guo Q, Hankinson SE, Hunter DJ (2007): TGFBR1 and TGFBR1 polymorphisms and breast cancer risk in the Nurses Health Study. *BMC Cancer* 7, 175

- Cremer T, Cremer C (1988): Centennial of Wilhelm Waldeyer's introduction of the term "chromosome" in 1888. *Cytogenet Cell Genet* 48(2), 65-67
- Cuneo MJ, London RE (2010): Oxidation state of the XRCC1 N-terminal domain regulates DNA polymerase β binding affinity. *PNAS* 107(15), 6805-10
- Curtin K, Samowitz WS, Wolff RK, Ulrich CM, Caan BJ, Potter JD, Slattery ML (2009): Assessing tumor mutations to gain insight into base excision repair sequence polymorphisms and smoking in colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(12), 3384-88
- Dahlbäck B (1997): Resistance to activated protein C caused by the factor V R⁵⁰⁶Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 78, 483-88
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001): TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 29, 117-29
- Desjardins S, Beauparlant JC, Labrie Y, Ouellette G, Durocher F, INHERIT BRCAAs (2009): Variations in the *NBN/NBS1* gene and the risk of breast cancer in non-*BRCA1/2* French Canadian families with high risk of breast cancer. *BMC Cancer* 9, 181
- Dong C, Zhu S, Wang T, Yoon W, Li Z, Alvarez RJ, ten Dijke P, White B, Wigley FM, Goldschmidt-Clermont PJ (2002): Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Nat Acad Sci* 99, 3908-13
- Dong J, Hu Z, Shu Y, Pan S, Wang Y, Hu L, Jiang Y, Dai J, Ma H, Jin G et al. (2012): Potentially functional polymorphisms in DNA repair genes and non-small-cell lung cancer survival: a pathway-based analysis. *Mol Carcinog* 51(7), 546-52
- Dong Y, Hakimi MA, Chen X, Kumaraswamy E, Cooch NS, Godwin AK, Shiekhattar (2003): Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalsome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell*; 12: 1087-99
- Dorfman R, Sandford A, Taylor C, Huang B, Frangolias D, Wang Y, Sang R, Pereira L, Sun L, Berthiaume Y et al. (2008): Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 118, 1040-49
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TDS, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey K (2000): Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21(5), 965-71
- Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, Luben RN, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V et al. (2003): A transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion *in vitro* and is associated with increased incidents of invasive breast cancer. *Cancer Res* 63, 2610-15
- Dutt SS, Chen N, Darbary HK, Swede H, Petrelli NJ, Stoler DL, Anderson GR (2008): Colorectal cancers in patients with the (9A/6A) polymorphism of TGFBR1 exhibit lesser inter-(simple sequence repeat) PCR genomic instability and present clinically at greater age. *Mutat Res* 645 (1-2), 27-32
- Easton DF, Ford D, Bishop DT (1995): Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast cancer linkage consortium. *Am J Hum Genet* 56(1), 265-71
- Ebner R, Chen RH, Shum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, Lopez AR, Derynck (1993): Cloning

- of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β binding to the type II receptor. *Science* 260, 1344-48
- Eliopoulos DG, Mavroudi I, Pontikoglou C, Ximeri M, Stavroulaki E, Pyrovolaki K, Velegraki M, Spanoudakis M, Goulielmos G, Papadaki HA (2009): The -509C/T polymorphism of transforming growth factor- β 1 is associated with increased risk for development of chronic idiopathic neutropenia. *Eur J Haematol* 83(6), 535-40
- Endlich B, Radford IR, Forrester HB, Dewey WC (2000) Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells. *Radiat Res* 153, 36-48
- Ewart-Toland A, Chan JM, Yuan J, Balmain A, Ma J (2004): A gain of function *TGFBI* polymorphism may be associated with late stage prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(4), 759-64
- Fackenthal JD, Olopade OI (2007): Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 7(12), 937-48
- Fard-Esfahani P, Fard-Esfahani M, Fayaz S, Ghanbarzadeh B, Saidi P, Mohabati R, Bidoki SK, Majdi M (2011): Associations of Arg194Trp, Arg280His and Arg399Gln polymorphisms in X-ray repair cross-complementing group 1 gene and risk of differentiated thyroid carcinoma in Iran. *Iran Biomed J* 15(3), 73-78
- Fenech M (2000): The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455, 81-95
- Fenech M (2007): Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104
- Fenech M, Morley AA (1985a): Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 147, 29-36
- Fenech M, Morley AA (1985b): Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 43(172-173), 233-46
- Fenech M, Morley AA (1986): Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo aging and low dose X-irradiation. *Mutat Res* 161, 193-98
- Figg WD, Chau CH, Madan RA, Gulley JL, Gao R, Sissung TM, Spencer S, Beatson M, Aragon-Ching J, Steinberg SM et al. (2013): Phase II study of satraplatin and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a pharmacogenetic assessment of outcome and toxicity. *Clin Genitourin Cancer* 11(3), 229-37
- Flanders KC (2004): Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85(2), 47-64
- Flanders KC, Holder MG, Winokur TS (1995): Autoinduction of mRNA and protein expression for transforming growth factor- β s in cultured cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 27(2), 805-12
- Flemming W (1878): Zur Kenntnis der Zelle und ihrer Theilungs-Erscheinungen. *Schriften des naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein* 3, 23-27
- Frappart PO, Lee Y, Lamont J, McKinnon PJ (2007): BRCA2 is required for neurogenesis and suppression of medulloblastoma. *EMBO Journal* 26, 2732-42
- Friedberg EC (1992): Xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome, helicases, and DNA repair: What's the relationship? *Cell* 71, 887-89

- Friedman LS, Ostermeyer A, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC (1994): Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature Genet* 8, 399-404
- Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TGW, Rushlow D, Progoda NL, Leedom TP, Ganguly A, Castells A, Ploos van Amstel JK, Westermann CJJ et al. (2006): *SMAD4* mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* 43, 793-97
- Giachino DF, Ghio P, Regazzoni S, Mandrile G, Novello S, Selvaggi G, Gregori D, DeMarchi M, Scagliotti GV (2007): Prospective assessment of XPD Lys751Gln and XRCC1 Arg399Gln single nucleotide polymorphisms in lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, 2876-81
- Giotopoulos G, Symonds RP, Foweraker K, Griffin M, Peat I, Osman A, Plumb M (2007): The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of teleangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br J Cancer* 96(6), 1001-07
- Giusti RM, Rutter JL, Duray PH, Freedman LS, Konichezky M, Fischer-Fischbein J, Greene MH, Maslansky B, Fischbein A, Gruber SB et al. (2003): A twofold increase in *BRCA* mutation related prostate cancer among Ashkenazi Israelis is not associated with distinctive histopathology. *Am J Genet* 40, 787-92
- Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazziere R, Noguera I, Rifkin DB (1997): TGF- β latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cell* 15(3), 190-97
- Goerz G, Merk H (1985): Porphyria cutanea tarda (PCT). *Z Hautkrankheiten* 60(1-2), 137-46
- Götze R: Biomarker für oxidativen Stress bei Entzündungsreaktionen: Bedeutung von Genpolymorphismen und Genexpression der NADPH-Oxidase unter pro- und anti-inflammatorischen Bedingungen. Med Diss, Göttingen 2013
- Gong Y, Fan L, Wan H, Shi Y, Shi G, Feng Y, Liu J, Ni L, Pan C, Zhang R (2011): Lack of association between the TGF- β 1 gene and development of COPD in Asians: a case-control study and meta-analysis. *Lung* 189, 213-23
- Goudie DR, Yuille MAR, Leversha MA, Furlong RA, Carter NP, Lush MJ, Affara NA, Ferguson-Smith MA (1993): Multiple self-healing squamous epitheliomata (ESS1) mapped to chromosome 9q22-q31 in families with common ancestry. *Nature Genet* 3, 165-69
- Gradia S, Acharya S, Fishel R (1997): The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 91, 995-1005
- 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 β 1. *Hum Mol Genet* 8(1), 93-97
- Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, Scott CE, Howe KL, Woodfine K, Spencer CCA et al. (2006): The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 441, 315-21
- Gressner AM, Weiskirchen R; Breitkopf K, Dooley S (2002): Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7, 793-807
- Griffin S, Branch P, Xu YZ, Karran P (1994): DNA mismatch binding and incision of modified guanine bases by extracts of mammalian cells: implications for tolerance to DNA methylation

damage. *Biochem* 33, 4787-93

Guan X, Zhao H, Niu J, Tang D, Ajani JA, Wei Q (2009): The VEGF -634G>C promoter polymorphism is associated with risk of gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 9, 77

Guerra JL, Gomez D, Wei Q, Liu Z, Wang LE, Yuan X, Zhuang Y, Komaki R, Liao Z (2012): Associations between single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor β 1 gene and risk of severe radiation esophagitis in patients with lung cancer. *Radiother Oncol* 105(3), 299-304

Gugatschka M, Dehchamani D, Wascher TC, Friedrich G, Renner W (2011): DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Exp Mol Pathol* 91(1), 331-34

Guo S, Li X, Gao M, Li Y, Song B, Niu W (2013): The relationship between XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms and lung cancer risk in northeastern chinese. *PLoS One* 8(2), e56213

Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Zhou W, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Neuberg DS, Christiani DC (2004): XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy: *J Clin Oncol* 22(13), 2594-2601

Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C et al. (2006): Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of marfan syndrome. *Science* 312, 117-21

Han J, Haiman C, Niu T, Guo Q, Cox DG, Willett WC, Hankinson SE, Hunter DJ (2009): Genetic variations in DNA repair genes and premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 115(3), 613-22

Hansen RD, Sørensen M, Tjønneland A, Overvad K, Wallin H, Raaschou-Nielsen O, Vogel M (2007): XPA A23G, XPC Ly939Gln, XPD Lys751Gln and XPD Asp312Asn polymorphisms, interactions with smoking, alcohol and dietary factors, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res* 619(1-2), 68-80

Harper PS (2006): The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. *Hum Genet* 119(1-2), 226-32

Hayashida T, Poncelet AC, Hubchak SC, Schnaper HW (1999): TGF- β 1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression. *Kidney Int* 56(5), 1710-20

Heddle JA (1973): A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18, 187-90

Hennies S (2010): Vergleich von Mikronukleus- und Chromosomenaberrationstechnik bei der Dokumentation zytogenetischer Schäden in neoadjuvant radio-chemotherapierten Rektumkarzinompatienten. *Medizinische Dissertation*

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPJ, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW et al. (1998): Incidence and functional consequence of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6870-75

Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K (2007): Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. *Int J Cancer* 121, 1643-58

Hneino M, François A, Buard V, Tarlet G, Abderrahmani R, Blirando K, Hoodless Pa, Benderitter M, Milliat F (2012): The TGF- β /Smad repressor TG-interacting factor 1 (TGIF1) plays a role in

- radiation-induced intestinal injury independently of a Smad signaling pathway. *PLoS One* 7(5), e35672
- Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L (1998): Interleukin-10 and transforming growth factor- β promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 1958-62
- Hosono S, Mastuo K, Ito H, Oze I, Hirose K, Watanabe M, Nakanishi T, Tajima K, Tanaka H (2013): Polymorphisms in base excision repair genes are associated with endometrial cancer risk among postmenopausal Japanese women. *Int J Gynecol Cancer* 23(9), 1561-68
- Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF, Ringold J, Larsen-Haidle J, Merg A, Mitros FA, Vaccaro CA, Petersen GM, Giardiello FM et al. (2004): The prevalence of *MADH4* and *BMPRIA* mutations in juvenile polyposis and absence of *BMPR2*, *BMPR1B*, and *ACVR1* mutations. *J Med Genet* 41, 484-91
- Howell WH (1890): The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *J Morphology* 4(1), 57-117
- Hu S, Zhou G, Zhang L, Jiang H, Xiao M (2012): The effects of functional polymorphisms in the TGF β 1 gene on nasopharyngeal carcinoma susceptibility. *Otolaryngol Head Neck Surg* 146(4), 579-84
- Hu Z, Wei Q, Wang X, Shen H (2004): DNA repair gene XPD polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Lung Cancer* 46, 1-10
- Huang RS, Duan S, Kistner EO, Hartford CM, Dolan WE (2008): Genetic variants associated with carboplatin-induced cytotoxicity in cell lines derived from Africans. *Mol Cancer Ther* 7(9), 3038-46
- Ito E, Yanagisawa Y, Iwahashi Y, Suzuki Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Sugano S, Yuasa Y, Maruyama K (1999): A core promoter and a frequent single-nucleotide-polymorphism of the mismatch repair gene *hMLH1*. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 488-94
- Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E, Katsuyama Y, Fujimoto K, Ota M (2008): The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with emphysema phenotype of COPD in Japanese. *Inter Med* 47, 1387-94
- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2005): DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106, 302-23
- Janke JH: Bedeutung genetischer Variabilität im TGF β -Signalweg für Gentranskription, Proteinbildung und Zellvitalität: Untersuchungen zur Wirkung therapeutischer Strahlendosis und des TGF β 1-Liganden. Med Diss, Göttingen 2009
- Janssen K, Gershoni-Baruch R, Guanabens N, Migone N, Ralston S, Bonduelle M, Lissens W, van Maldergem L, Vanhoenacker F, Verbruggen L et al. (2000): Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta-1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nature Genet* 26, 273-75
- Javle M, Li Y, Tan D, Dong X, Chang P, Kar S, Li D (2013): Biomarkers of TGF- β signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer. *PLoS One* 9(1), e85942
- Jiang L, Liang J, Jiang M, Yu X, Zheng J, Liu H, Wu D, Zhou Y (2010): Functional polymorphisms in the *NBS1* gene and acute lymphoblastic leukemia susceptibility in a Chinese population. *Eur J*

Johnson RT, Squires S (1992): The XPD complementation group: insights into xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy. *Mutat Res* 273(2), 97-118

Joshi AD, Corral R, Siegmund KD, Haile RW, Le Marchand L, Martínez ME, Ahnen DJ, Sandler RS, Lance P, Stern MC (2009): Red meat and poultry intake, polymorphisms in the nucleotide excision repair and mismatch repair pathways and colorectal cancer. *Carcinogenesis* 30(3), 472-79

Jung SW, Park NH, Shin JW, Park BR, Kim CJ, Lee JE, Shin ES, Kim J, Chung YH (2012): Polymorphisms of DNA repair genes in korean hepatocellular carcinoma patients with chronic hepatitis B: possible implications on survival. *J Hepatol* 57, 621-27

Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, Harth V, Rabstein S, Baisch C, Vollmert C, Illig T, Ko YD, Brüning T et al. (2004): ERCC2 genotypes and a corresponding haplotyp are linked with breast cancer risk in german population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 2059-64

Kaklamani V, 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): 3236-43

Kaklamani V, Baddi L, Rosman D, Liu J, Ellis N, Oddoux C, Ostrer H, Chen Y, Ashan H, Offit K et al. (2004): No major association between TGFBR1*6A and prostate cancer. *BMC Genet* 5, 28

Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB (2007): Lack of association of transforming growth factor- β 1 polymorphisms and haplotypes with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(6), 1303-05

Karahalil B, Bohr VA, Wilson DM (2012): Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair protein on cancer risk. *Hum Experimental Toxicol* 31(10), 981-1005

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravati A, Buchwald M, Tsui LC (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922), 1073-80

Kim BC, Kim HT, Park SH, Cha JS, Yufit T, Kim SJ, Falanga V (2003): Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF- β -signaling and decreases TGF- β Type II receptor expression. *J Cell Physiol* 195(3), 331-36

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- β 1-mediated T cell suppression. *Faseb J* 17(2), 194-202

Kweekel DM, Antonini NF, Nortier JWR, Punt CJA, Gelderblom H, Guchelaar HJ (2009): Explorative study to identify novel candidate genes related to oxaliplatin efficacy and toxicity using a DNA repair array. *Br J Cancer* 101(2), 357-62

Lainé JP, Mocquet V, Bonfanti M, Braun C, Egly JM, Brousset P (2007): Common XPD (ERCC2) polymorphisms have no measurable effect on nucleotide excision repair and basal transcription. *DNA Repair* 6, 1264-70

Lan HY (2011): Diverse role of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 7(7), 1056-67

Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, Trikalinos TA, Balcels S, Brandi ML, Scollen S, Lips

- P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B et al. (2008): Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study. *Bone* 42, 969-81
- Langston AA, Stanford JL, Wicklund KG, Thompson JD, Blazej RG, Ostrander EA (1996): Germline BRCA1 mutations in selected men with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 58(4), 881-85
- Larson JS, Tonkinson JL, Lai MT (1997): A BRCA1 mutant alters G₂-M cell cycle control in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 57, 3351-55
- Le Goff C, Mahaut C, Abhyankar A, Le Goff W, Serre V, Afenjar A, Destrée A, di Rocco M, Héron D, Jacquemont S et al. (2012): Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nature Genet* 44(1), 85-88
- Le Poole IC, Sarangarajan R, Zhao Y, Stennett LS, Brown TL, Sheth P, Miki T, Boissy RE (2001): 'VIT1', a novel gene associated with vitiligo. *Pigment Cell Res* 14(6), 475-84
- Lee YCA, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin DP, Papp J, Sinsheimer J, Cao W, Hashibe M, You NCY, Mao JT et al. (2008): A case-control study of the association of the polymorphisms and haplotypes of *DNA ligase I* with lung and upper-aerodigestive-tract cancer. *Int J Cancer* 112(7), 1630-38
- Lei Z, Liu RY, Zhao J, Liu Z, Jiang X, You W, Chen XC, Liu X, Zhang, Pasche B et al. (2009): TGFB1 haplotypes and risk on non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 69(17), 7046-52
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959): Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med* 143(11-12), 256-65
- Leng A, Liu T, He Y, Li Q, Zhang G (2009): Smad4/Smad7 balance: A role of tumorigenesis in gastric cancer. *Exp Mol Pathol* 87(1), 48-53
- Li K, Xia F, Zhang K, Mo A, Liu L (2012): Associations of TGF-B1-509C/T polymorphism with gastric cancer risk: a meta-analysis. *Ann Hum Genet* 77(1), 1-8
- Li S, Peng Q, Chen Y, You J, Chen Z, Deng Y, Lao X, Wu H, Qin X, Zeng Z (2013): DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 8(9), e73448
- Li WH, Sadler LA (1991): Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129, 513-23
- Liang X, Pfeiffer RM, Li WQ, Brossard M, Burke LS, Wheeler W, Calista D, Fargnoli MC, Ghiorzo P, Peris K et al. (2014): Association of genetic variants in *CDK6* and *XRCC1* with the risk of dysplastic nevi in melanoma-prone families. *J Invest Dermatol* 134(2), 481-87
- Liao RY, Mao C, Qiu LX, Ding H, Chen Q, Pan HF (2010): TGFB1*6A/9A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 13,662 cases and 14,147 controls: *Mol Biol Rep* 37, 3227-32
- Lin J, Pu X, Wang W, Matin S, Tannir NM, Wood CG, Wu X (2008): Case-control analysis of nucleotide excision repair pathway and the risk of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 20(11), 2112-19
- Liu Y, Scheurer ME, El-Zein R, Cao Y, Do KA, Gilbert M, Aldape KD, Wei Q, Etzel C, Bondy L (2009): Association and interactions between DNA repair gene polymorphisms and adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(1), 204-14

- Lo YL, Hsiao CF, Chang GC, Tsai YH, Su WC, Chen KY; Chen YM, Huang MS, Hsieh WS, Chen CJ et al. (2011): Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 72(3), 280-86
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N et al. (2005): A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nature Genet* 37(3), 275-81
- Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Calleaert BL, Thomas GH, Pannu H, de Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S et al. (2006): Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF- β receptor. *N Engl J Med* 355(8), 788-98
- Lombard DB, Guarente L (2000): Nijmegen Breakage syndrome disease protein MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res* 60, 2331-34
- Loveless A (1969): Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 223, 206-07
- Lu SL, Kawabata M, Imamura T, Akiyama Y, Nomizu T, Miyazono K, Yuasa Y (1998): HNPCC associated with germline mutation in the TGF-beta type II receptor gene. *Nature Genet* 19, 17-18
- Lu Y, Boer JMA, Barsova RM, Favorova O, Goel A, Müller M, Feskens EJM and the PROCARDIS CARDIoGRAM Consortium (2012): TGFBI genetic polymorphisms and coronary heart disease risk: a meta-analysis. *BMC Med Genet* 13, 39
- Luedeking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI (2000): Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor- β 1 gene and the risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet* 106, 565-69
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA (1999): XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B₁-DNA addukts and gycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 59, 2557-61
- Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA (2000): XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21(4), 551-55
- Lynch M (2010): Evolution of the mutation rate. *Trends Genet* 26(8), 345-52
- 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), 607-14
- Makarycheva OY, Tsareva EY, Sudomoina MA, Kulakova OG, Titov BV, Bykova OV, Gol'tsova NV, Kuzenkova LM, Boiko AN, Favorova OO (2011): Family analysis of linkage and association of HLA-DBR1, CTLA4, TGFB1, IL4, CCR5, RANTES, MMP9 and TIMP1 gene polymorphisms with Multiple Sclerosis. *Acta Naturae* 3(8), 85-92
- Mangold E, Pagenstecher C, Leister M, Mathiak M, Rütten A, Friedl W, Propping P, Ruzicka T, Kruse R (2004): A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of *msh2* mutation in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 41, 567-72
- Mao Y, Xu Y, Lin Y, Chen H, Wu J, Hu Z, Zhu Y, Xu X, Xie L (2013): Quantitive assessment of the associations between XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *World J Surg Oncol* 11, 58
- Massagué J, Gomis RR (2006): The logic of TGF β signaling. *FEBS Letters* 580(12), 2811-20

- Massagué J, Blain SW, Lo RS (2000): TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103(2), 295-309
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F (2004): Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 430, 226-31
- Mavroudi I, Papadaki HA (2012): Genetic associations in acquired immune-mediated bone marrow syndromes: insights in aplastic anemia and chronic idiopathic neutropenia. *Clin Dev Immunol* 2012, 123789
- Maxam AM, Gilbert W (1977): A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(2), 560-64
- McWilliams RR, Bamlet WR, Cunningham JM, Goode EL, de Andrade M, Boardman LA, Petersen GM (2008): Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Cancer Res* 68(15), 4928-35
- Mei J, Duan HX, Wang LL, Yang S, Lu JQ, Shi TY, Zhao Y (2014): XRCC1 polymorphisms and cervical cancer risk: an updated meta-analysis. *Tumour Biol* 35(2), 1221-31
- Mendel G (1866): Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn* 4, 3-47
- Milet J, Déhais V, Bourgain C, Louanolle M, 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, 799-807
- 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, 3098-3103
- Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H et al. (2004): Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nature Genet* 36, 855-60
- Moriel-Carretero M, Aguilera A (2010): Replication fork breakage and re-start: new insights into Rad3/XPD-associated deficiencies. *Cell Cycle* 9(15), 2958-62
- Moser J, Kool H, Giakzidis I, Caldecott K, Mullenders LHF, Fousteri MI (2007): Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase IIIa in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* 27(2), 311-23
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH (2001): Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci* 114, 4359-69
- Muller HJ (1927): Artificial transmutation of the gene. *Science* 66(1699), 84-87
- Mummery CL (2001): Transforming growth factor beta and mouse development. *Micros Res Tech* 52(4), 374-86
- Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE (2002): Evaluation of candidate genes *MAP2K4*, *MADH4*, *ACVR1B* and *BRCA2* in familial pancreatic cancer: deleterious *BRCA2* mutations in 17 %. *Cancer Res* 62, 3789-93
- Nakao M, Hosono S, Ito H, Watanabe M, Mizuno N, Sato S, Yatabe Y, Yamao K, Ueda R, Tajima K

- et al. (2012): Selected polymorphisms of base excision repair genes and pancreatic cancer risk in Japanese. *J Epidemiol* 22(6), 477-83
- Natarajan AT, Palitti F (2008): DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat Res* 657(1), 3-7
- Natarajan AT, Zwanenburg TSB (1982): Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat Res* 95(1), 1-6
- Neary GJ, Evans HJ, Tonkinson SM (1957): Mitotic delay induced by gamma radiation in broad bean root meristems. *Nature* 179(4566), 917-18
- Neary GJ, Evans HJ, Tonkinson SM, Williamson FS (1959): The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part III: Mitotic delay. *Int J Rad Biol* 1, 230-40
- Nelson HH, Kelsey KT, Mott LA, Karagas MR (2002): The *XRCC1* Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res* 62(1), 152-55
- Neumann M: Genetisch bedingte Variabilität der Expression von Genen des TGFβ-Signalwegs und deren Bedeutung für die Zellvitalität: Untersuchungen in T-Lymphozyten, immortalisierten B-Lymphozyten und Fibroblasten. Med Diss, Göttingen 2012
- Niu X, Li H, Chen Z, Liu Y, Kan M, Zhou D, Li Z, Ye X, Shen S, Lv C et al. (2012): A study of ethnic differences in TGFβ1 gene polymorphisms and effect on the risk of radiation pneumonitis in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 7(11), 1668-75
- Offit K, Levrán O, Mullaney B, Mah K, Nafa K, Batish SD, Diotti R, Schneider H, Deffenbaugh A, Scholl T et al. (2003): Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia. *J Natl Cancer Inst* 95(20), 1548-51
- Ogata T, Shibamura H, Tromp G, Sinha M, Goddard KA, Sakalihan N, Limet R, MacKean GL, Arthur C, Sueda T et al. (2005): Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 41(6), 1036-42
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD et al. (1994): Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263, 1625-29
- Pardali E, ten Dijke P (2009): Transforming growth factor-beta signaling and tumor angiogenesis. *Front Biosci* 14, 4848-61
- Park KH, Han SGL, Whang YM, Lee HJ, Yoo YD, Lee JW, Shin SW, Kim YH (2006): Single nucleotide polymorphisms of the *TGFBI* gene and lung cancer risk in a Korean population. *Cancer Genet Cytogenet* 169, 39-44
- Park SH, Lee GY, Jeon HS, Lee SJ, Kim KM, Jang SS, Kim CH, Lee WK, Kam S, Park RW et al. (2004): -93G→A polymorphism of *hMLH1* and risk of primary lung cancer. *Int J Cancer*; 112: 678-82
- Park SL, Bastani D, Goldstein BY, Chang SC, Cozen W, Cai L, Cordon-Cardo C, Ding B, Greenland S, He N et al. (2010): Associations between *NBS1* polymorphisms, haplotypes and smoking-related cancer. *Carcinogenesis* 31(7), 1264-71
- Pasche B (2008): Recent advances in breast cancer genetics. *Cancer Treat Res* 141, 1-10

- Pasche B, Luo Y, Rao PH, Nimer SD, Dmitrovsky E, Caron P, Luzzatto L, Offit K, Cordon-Cardo C, Renault B et al. (1998): Type I transforming growth factor β receptor maps to 9q22 and exhibits a polymorphism and a rare variant within a polyalanine tract. *Cancer Res* 58, 2727-32
- Pasche B, Kolachana P, Nafa K, Satagopan J, Chen YG, Lo RS, Brener D, Yang D, Kirstein L, Oddoux C et al. (1999): T β R-I(6A) is a candidate tumor susceptibility allele. *Cancer Res* 59, 5678-82
- Pasche B, Kaklamani V, Hou N, Young T, Rademaker A, Peterlongo P, Ellis N, Offit K, Caldes T, Reiss M et al. (2004): TGFBR1*6A and cancer: a meta-analysis of 12 case-control studies. *J Clin Oncol* 22(4), 756-58
- Pasche B, Wisinski KB, Sadim M, Kaklamani V, Pennison MJ, Zeng Q, Bellam N, Zimmerman J, Yi N, Zhang K et al. (2010): Constitutively decreased TGFBR1 allelic expression is a common finding in colorectal cancer and is associated with three TGFBR1 SNPs. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 57
- Passarge E: Taschenatlas der Genetik. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2004
- Peng Z, Zhan L, Chen S, Xu E (2011): Association of transforming growth factor- β 1 gene C-509T and T869C polymorphisms with arteriosclerotic cerebral infarction in the Chinese: a case-control study. *Lipids Health Dis* 10, 100
- Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ (2012): The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma* 2(1), 18-28
- Pfeufer A, Krawczak M (2013): Das "1000-Dollar-Genom". *Dtsch Arztebl* 110(49), 1744-45
- Pinzani M, Marra F (2001): Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21(3), 397-416
- Popanda O, Schattenberg T, Phong CT, Butkiewicz D, Risch A, Edler L, Kayser K, Dienemann H, Schulz V, Drings P et al. (2004): Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 25(12), 2433-41
- Powell SM, Harper JC, Hamilton SR, Robinson R, Cummings OW (1997): Inactivation of *Smad4* in gastric carcinomas, *Cancer Res* 57(19), 4221-24
- Qi X, Zhang F, Yang X, Fan L, Zhang Y, Chen L, Zhou Y, Chen X, Zhong L, Jiang J (2010): Transforming growth factor- β 1 polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis based on 27 case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 122(1), 273-79
- Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Gou Z, Shete S, Hedayati M, Grossman L, Mohrenweiser H, Wei Q (2002): Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPD and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* 23(2), 295-99
- Qiu W, Schönleben F, Li X, Su GH (2007): Disruption of transforming growth factor β -Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of *SMAD2* and *SMAD4*. *Cancer Letters* 245(1-2), 163-79
- Quan L, Gong Z, Yao S, Bandera EV, Zirpoli G, Hwang H, Roberts M, Ciupak G, Davis W, Sucheston L et al. (2014): Cytokine and cytokine receptor genes of the adaptive immune response are differentially associated with breast cancer risk in American women of African and European ancestry. *Int J Cancer* 134(6), 1408-21

- Quarmany S, Fakhoury H, Levine E, Barber J, Wylie J, Hajeer AH, West C, Stewart A, Magee B, Kumar S (2003): Associations 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), 137-43
- Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, Gamarra S, Manso L, Cortes-Funes H, Sanchez-Cespedes M (2006): DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J Clin Oncol* 24(26), 4333-39
- Raabe A, Derba K, Reuther S, Szymczak S, Borgmann K, Hoeller U, Ziegler A, Petersen C, Dikomey E (2012): Associations of single nucleotide polymorphisms in the genes *ATM*, *GSTP1*, *SOD2*, *TGFB1*, *XPD* and *XRCC1* with risk of severe erythema after breast conserving radiotherapy. *Radiat Oncol* 7, 65
- Radford IR, Murphy TK (1994): Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int J Radiat Biol* 65(2), 229-39
- Rajaraman P, Hutchinson A, Wichner S, Black PM, Fine HA, Loeffler JS, Selker RG, Shapiro WR, Rothman N, Linet MS et al. (2010): DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro-Oncology* 12(1), 37-48
- Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT (1988): Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutat Res* 207(3-4), 141-46.
- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S (2002): Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30(17), 3894-3900
- Raptis S, Mrkonjic M, Green RC, Pethe VV, Monga N, Chan YM, Daftary D, Dicks E, Younghusband BH, Parfrey PS et al. (2007): *MLH1* -93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. *J Nat Cancer Inst* 99(6), 463-74
- Reeves SG, Meldrum C, Groombridge C, Spigelman A, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ (2012): DNA repair gene polymorphisms and risk of early onset colorectal cancer in Lynch syndrome. *Cancer Epidemiol* 36(2), 183-89
- Regalado ES, Guo DC, Villamizar C, Avidan N, Gilchrist D, McGillivray B, Clarke L, Bernier F, Santos-Cortez RL, Leal SM et al. (2011): Exome sequencing identifies *SMAD3* mutations as a cause of familial thoracic aortic aneurysm and dissection with intracranial and other arterial aneurysms novelty and significance. *Circ Res* 109, 680-86
- Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D (2003): Quality and completeness of SNP databases. *Nature Genet* 33, 457-58
- Reid S, Renwick A, Seal S, Baskcomb L, Barfoot R, Jayatilake H, The Breast Cancer Susceptibility Collaboration, Pritchard-Jones K, Stratton MR, Ridolfi-Lüthy A et al. (2005): Biallelic *BRCA2* mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumor. *J Med Genet* 42, 147-51
- Ricciardone MD, Özçelik T, Cevher B, Özdağ H, Tuncer M, Gürgey A, Uzunalimoğlu Ö, Çetinkaya H, Tanyeli A, Erken E et al. (1999): Human *MLH1* deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res* 59, 290-93

- Risinger JI, Umar A, Boyd J, Berchuck A, Kunkel TA, Barrett JC (1996): Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. *Nature Genet* 14, 102-05
- Roberts AB, Piek E, Böttinger 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
- Roberts KE, Fallon MB, Krowka MJ, Brown RS, Trotter JF, Peter I, Tighiouart H, Knowles JA, Rabinowitz D, Benza RL et al. (2009): Genetic risk factors for portopulmonary hypertension in patients with advanced liver disease. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 835-42
- Roberts MR, Shields PG, Ambrosone CB, Nie J, Marian C, Krishnan SS, Goerlitz DS, Modali R, Seddon M, Lehman T et al (2011): Single-nucleotide polymorphism in DNA repair genes and associations with breast cancer risk in the web study. *Carcinogenesis* 32(8), 1223-30
- Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID (1999): The molecular and cellular basis of radiosensitivity: Implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Investigation* 17(1), 56-72
- Rosman DS, Kaklamani V, Pasche B (2007): New insights into breast cancer genetics and impact on patient management. *Curr Treat Options Oncol* 8(1), 61-73
- Rosman DS, Phukan S, Huang CC, Pasche B (2008): TGFBR1*6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation. *Cancer Res* 68(5), 1319-28
- Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ et al. (1997): Tumor-suppressive pathways an pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57, 1731-34
- Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS (2004): DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 23-29
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PPM, Smith M (1977): Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265(5596), 687-95
- Santibanez Koref M, Wilson V, Cartwright N, Cunnington MS, Mathers JC, Bishop DT, Curtis A, Dunlop MG, Burn J (2010): MLH1 differential allelic expression in mutation carriers and controls. *Ann Hum Genet* 74(6), 479-88
- Santonocito C, Scapaticci M, Penitente R, Paradisi A, Capizzi R, Lanza-Silveri S, Ficarra S, Landi F, Zuppi C, Capoluongo E (2012): Polymorphisms in base excision DNA repair genes and associations with melanoma risk in a pilot study on Central-South Italian population. *Clin Chim Acta* 413(19-20), 1519-24
- Savas S, Ozcelik H (2005): Phosphorylation states of cell cycle and DNA repair proteins can be altered by the nsSNPs. *BMC Cancer* 5, 107
- Sax K (1941): Behaviour of X-ray-induced chromosomal aberrations in allium root tips. *Genetics* 26, 418-25
- Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzani M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JH, Egly JM (1994): The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH

transcription factor. *EMBO J* 13(10), 2388-29

Schildkraut JM, Iversen ES, Wilson MA, Clyde MA, Moorman PG, Palmieri RT, Whitaker R, Bentley RC, Marks JR, Berchuck A (2010): Association between DNA damage response and repair and risk of invasive serous ovarian cancer. *PLoS One* 5(4), e10061

Schirmer MA, Hoffmann AO, Campean R, Janke JH, Zidek LM, Hoffmann M, Kruse M, Sehr D, Tzvetkov MV, Rave-Fränk M et al. (2009): Bioinformatic and functional analysis of TGFBR1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 19(4), 249-59

Schirmer MA, Brockmüller J, Rave-Fränk M, Virsic P, Wilken B, Kühnle E, Campean R, Hoffmann AO, Müller K, Götze RG et al. (2011): A putatively functional haplotype in the gene encoding transforming growth factor beta-1 as a potential biomarker for radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 79(3), 866-74

Schmid W (1975): The micronucleus test. *Mutat Res* 31, 9-15

Schmierer B, Hill CS (2007): TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12), 970-82

Schulte CMS, Goebell H, Röher HD, Schulte KM (2001): C-509T polymorphism in the *TGFBI* gene promoter: impact on Crohn's disease susceptibility and clinical course. *Immunogenet* 53, 178-82

Schuster N, Kriegelstein K (2002): Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 307, 1-14

Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H et al. (1996): *DPC4* gene in various tumor types. *Cancer Res* 56, 2527-30

Sears DA, Udden MM (2012): Howell-Jolly bodies: a brief historical review. *Am J Med Sci* 343(5), 407-09

Seedhouse C, Bainton R, Lewis M, Harding A, Russell N, Das-Gupta E (2002): The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related myeloblastic leukemia. *Blood* 100, 3761-66

Sehl ME, Langer LR, Papp JC, Kwan L, Seldon JL, Arellano G, Reiss J, Reed EF, Dandekar S, Korin Y et al. (2009): Associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in double strand DNA repair pathway genes and familial breast cancer. *Clin Cancer Res* 15(6), 2192-2203

Seker H, Butkiewicz D, Bowman ED, Rusin M, Hedayati M, Grossman L, Harris CC (2001): Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res* 61, 7430-34

Senn HJ, Drings P, Glaus A, Jungi WF, Pralle HB, Sauer R, Schlag PM: Checkliste Onkologie: 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2001

Shah R, Hurley CK, Posch PE (2006): A molecular mechanism for the differential regulation of TGF- β 1 expression due to the common SNP -509C-T (c. -1347C>T). *Hum Genet* 120(4), 461-69

Shen H, Spitz MR, Qiao Y, Zheng Y, Hong WK, Wei Q (2002): Polymorphism of DNA ligase I and risk of lung cancer – a case-control analysis. *Lung Cancer* 36, 243-47

Shi Y, Massagué L (2003): Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus.

Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, Faffe DS, Shikanai T, Raby BA, Weiss ST et al. (2004): Transforming growth factor- β_1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 214-19

Skoglund Lundin J, Vandrovцова J, Song B, Zhou X, Zelada-Hedman M, Werelius B, Houlston RS, Lindblom A (2009): TGFBR1 variants TGFBR1(*)6A and Tint7G24A are not associated with an increased familial colorectal cancer risk. *Br J Cancer* 100(10), 1674-79

Slager HG, van Inzen W, Freund E, van den Eijnden-Van Raaij AJ, Mummery CL (1993): Transforming growth factor- beta in early mouse embryo: implications of the regulation of muscle formation and implantation. *Dev Genet* 14(3), 212-24

Slattery ML, Lundgreen A, Wolff RK, Herrick JS, Caan BJ (2012): Genetic variation in the TGF- β -signaling pathway, lifestyle factors and risk of colon or rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 55(5), 532-40

Song H, Ramus SJ, Quaye L, di Cioccio RA, Tyrer J, Lomas E, Shadforth D, Hogdall E, Hogdall C, McGuire V et al. (2006): Common variants in mismatch repair genes and risk of invasive ovarian cancer. *Carcinogenesis* 27(11), 2235-42

Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser, Wei Q (2001): Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 61, 1354-57

Srivastava K, Srivastava A, Kumar A, Mittal B (2011): Gallbladder cancer predisposition: a multigenetic approach to DNA-repair, apoptotic and inflammatory pathway genes. *PloS One* 6(1), e16449

Srivastava A, Srivastava K, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B (2009): Single-nucleotide polymorphisms of DNA repair genes *OGG1* and *XRCC1*: association with gallbladder cancer in North Indian population. *Ann Surg Oncol* 16, 1695-1703

Srivastava K, Srivastava A, Mittal B (2010): Polymorphisms in ERCC2, MSH2, and OGG1 DNA repair genes and gallbladder cancer risk in a population of Northern India. *Cancer* 116(13), 3160-69

Stern MC, Lin J, Figueroa JD, Kelsey KT, Kiltie AE, Yuan JM, Matullo G, Fletcher T, Benhamou S, Taylor JA et al. (2009): Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: findings from the International Consortium of Bladder Cancer. *Cancer Res* 69(17), 6857-64

Strittmatter WJ, Roses AD (1996): Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 19, 53-77

Sung P, Higgins D, Prakash L, Prakash S (1988): Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *EMBO J* 7(10), 3263-69

Sutton WS (1903): The chromosomes in heredity. *Biological Bulletin Woods Hole* 4, 231-51

Tanaka S, Mori M, Mafune K, Ohno S, Sugimachi K (2000): A dominant negative mutation of transforming growth factor-beta receptor type II gene in microsatellite stable oesophageal carcinoma. *Brit J Cancer* 82, 1557-60

Tang D, Cho S, Rundle A, Chen S, Phillips D, Zhou J, Hsu Y, Schnabel F, Estabrook A, Perera FP

- (2002): Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 75, 159-66
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, van Heems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E et al. (2002): Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 420(6911), 93-98
- Taylor RM, Thistlethwaite A, Caldecott KW (2002): Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22(8), 2556-63
- Tesli M, Athanasiu L, Mattingsdal M, Kähler AK, Gustafsson O, Andreassen BK, Werge T, Mors O, Mellerup E, Koefoed P et al. (2007): Association analysis of *PALP2* and *BRCA2* in bipolar disorder and schizophrenia in a scandinavian case-control sample. *Am J Med Genet Part B* 153B(7), 1276-82
- The 1000 Genomes Project Consortium (2012): An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56-65
- The Breast Cancer Consortium (2006): Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst* 98(19), 1382-96
- The International HapMap Consortium (2003): The International HapMap Project. *Nature* 426(6968), 789-96
- The International HapMap Consortium (2005): A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320
- The International HapMap Consortium (2010): Integrating common and rare genetic variation in diverse human population. *Nature* 467, 52-58
- Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT (1995): Decreased expression of *BRCA1* accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nature Genet* 9(4), 444-50
- Tonin PN, Mes-Masson AM, Futreal PA, Morgan K, Mahon M, Foulkes WD, Cole DEC, Provencher D, Ghadirian P, Narod SA (1998): Founder *BRCA1* and *BRCA2* mutations in french canadian breast and ovarian cancer families. *Am J Med Genet* 63, 1341-51
- Toyokuni H, Maruo A, Suzuki K, Watanabe M (2009): The contribution of radiation-induced large deletion of the genome to chromosomal instability. *Radiat Res* 171(2), 198-203
- Tucker SL, Li M, Xu T, Gomez D, Yuan X, Yu J, Liu Z, Yin M, Guan X, Wang LE et al. (2013): Incorporating single nucleotide polymorphisms into the lyman model to improve prediction of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 85(1), 251-57
- van der Schans GP, Paterson MC, Cross WG (1983): DNA strand break and rejoining in cultured human fibroblasts exposed to fast neutrons or gamma rays. *Int J Radiat Biol* 44(1), 75-85
- van der Straaten T, Kweekel D, Tiller M, Bogaartz J, Guchelaar HJ (2006): Multiplex pyrosequencing in two polymorphisms in DNA repair gene XRCC1. *J Mol Diagn* 8(4), 444-48
- van Kaam KJ, Romano A, Dunselman GA, Groothuis PG (2007): Transforming growth factor β 1 gene polymorphism -509C/T in deep infiltrating endometriosis. *Reprod Sci* 14(4), 367-73
- Varon R, Reis A, Henze G, Graf von Einsiedel H, Sperling K, Seeger K (2001): Mutations in the

- Nijmegen Breakage syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res* 61(9), 3570-72
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ et al. (1998): Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen Breakage syndrome. *Cell* 93(3), 467-76
- Venakatachalam P, Paul SFD, Mohankumar MN, Prabhu BK, Gajendiran N, Kathiresan A, Jeevanram RK (1999): Higher frequency of dicentric and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Mutat Res* 425(1), 1-8
- Vischer E, Chargaff E (1948): The separation and characterization of purines in minute amounts of nucleic acid hydrolyses. *J Biol Chem* 176, 703-14
- Vishnoi M, Pandey SN, Modi DR, Kumar A, Mittal B (2008): Genetic susceptibility of epidermal growth factor +61A>G and transforming growth factor β 1 -509C>T gene polymorphisms with gallbladder cancer. *Human Immunol* 69(6), 360-67
- von Dungern E, Hirszfeld L (1910): Über Vererbung gruppenspezifischer Strukturen des Blutes. *Z Immun Forsch Exper Ther* 6, 284-92
- von Gersdorff G, Susztak K, Rezvani F, Bitzer M, Liang D, Böttingen EP (2000): Smad3 and Smad4 mediate transcriptional activation of the human Smad7 promoter by transforming growth factor β . *J Biol Chem* 275(15), 11320-26
- Vral A, Fenech M, Thierens H (2011): The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis* 26(1), 11-17
- Wagner JE, Tolar J, Levran O, Scholl T, Deffenbaugh A, Satagopan J, Ben-Porat L, Mah K, Batish SD, Kutler DI et al. (2004): Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood* 103, 3226-29
- Walker FO (2007): Huntington's disease. *Lancet* 369, 218-28
- Wang B, Hurov K, Hofmann K, Elledge SJ (2009): NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes Dev* 23, 729-39
- Wang H, Zhao YP, Gao CF, Ji Q, Gressner AM, Yang ZX, Weiskirchen R (2008): Transforming growth factor beta 1 gene variants increase transcription and are associated with liver cirrhosis in Chinese. *Cytokine* 43(1), 20-25
- Wang LH, Kim SH, Lee JH, Choi YL, Kim YC, Park TS, Hong YC, Wu CF, Shin YK (2007): Inactivation of SMAD4 tumor suppressor gene during gastric carcinoma progression. *Clin Cancer Res* 13(1), 102-10
- Wang X, Cheng S, Brophy VH, Ehrlich HA, Mannhalter C, Berger K, Lalouschek W, Browner WS, Shi Y, Ringelstein EB et al. (2009): A meta-analysis of candidate gene polymorphisms and ischemic stroke in six study populations: association of lymphotoxin-alpha in non-hypertensive patients. *Stroke* 40(3), 683-95
- 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
- Watson JD, Crick FH (1953): Molecular structure of nucleic acid: A structure for deoxyribose

nucleic acids. *Nature* 171(4356), 737-38

Webster ADB, Barnes DE, Arlett CF, Lehmann AR, Lindahl T (1992): Growth retardation and immunodeficiency in a patient with mutations in the DNA ligase 1 gene. *Lancet* 339, 1508-09

Welsh PL, King MC (2001): BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10(7), 705-13

Weller M, Wick W, Platten M (2001): Role of TGF- β in oncogenesis. *Microsc Res Tech* 52(4), 353

Whiffin N, Broderick P, Lubbe SJ, Pittman AM, Penegar S, Chandler I, Houlston R (2011): MLH1-93G>A is a risk factor for MSI colorectal cancer. *Carcinogenesis* 32(8), 1157-61

Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlewaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott (2001): XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 104, 107-17

Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S et al. (1999): Familial endometrial cancer in female carriers of *MSH6* mutations. *Nature Genet* 23, 142-44

Worrillow LJ, Smith AG, Scott K, Andersson M, Ashcroft AJ, Dores GM, Glimelius B, Holowaty E, Jackson GH, Jones GL et al. (2008): Polymorphic *MLH1* and risk of cancer after methylating chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *J Med Genet* 45, 142-46

Wrana JL (2000): Regulation of Smad activity. *Cell* 100, 189-92

Wu DM, Zhu HX, Zhao QH, Zhang ZZ, Wang SZ, Wang ML, Dong WD, Tan M, Zhang ZD (2010): Genetic variations in the *SMAD4* gene and gastric cancer susceptibility. *World J Gastroenterol* 16(44), 5635-41

Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Ishigami S, Tanabe G, Baba M, Kuroshima K, Aikou T (2001): Preserved Smad4 expression in the transforming growth factor β signaling pathway is a favorable prognostic factor in patients with advanced gastric cancer. *Clin Cancer Res* 7, 277-82

Yang L, Li Y, Cheng M, Huang D, Zheng J, Liu B, Ling X, Li Q, Zhang X, Ji W et al. (2012): A functional polymorphism at microRNA-629-binding site in the 3'-untranslated region of *NBS1* gene confers an increased risk of lung cancer in southern and eastern Chinese population. *Carcinogenesis* 33(2), 338-47

Yang Y, Qiu XQ, Yu HP, Zeng XY, Bei CH (2011): TNF- α -863 polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 3(3), 513-18

Yin G, Morita M, Ohnaka K, Toyomura K, Hamajima N, Mizoue T, Ueki T, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y et al. (2012): Genetic polymorphisms of XRCC1, alcohol consumption, and the risk of colorectal cancer in Japan. *J Epidemiol* 22(1), 64-71

Yin M, Liao Z, Liu Z, Wang LE, Gomez D, Komaki R, Wei Q (2011): Functional polymorphisms of base excision repair genes XRCC1 and APEX1 predict risk of radiation pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81(3), e67-73

Yoon HH, Catalano PJ, Murphey KM, Skaar TC, Philips S, Powell M, Montgomery EA, Hafez MJ, Offer SM, Liu G et al. (2011): Genetic variation in DNA-repair pathways and response to radiochemotherapy in esophageal adenocarcinoma: a retrospective cohort study of the Eastern

Cooperative Oncology Group. *BMC Cancer* 11, 176

You W, Liu Z, Zhao J, Zheng M, Zheng SY, Liu X, Zhang HT (2007): No association between TGFBR1*6A and lung cancer. *J Thorac Oncol* 2(7), 657-59

Yu H, Zhao H, Wang LE, Liu Z, Li D, Wei Q (2012): Correlation between base -excision repair gene polymorphisms and levels of in-vitro BPDE-induced DNA adducts in cultured peripheral blood lymphocytes. *PloS One* 7(7), e40131

Yuan S, Ellingrod VL, Schipper M, Stringer KA, Cai X, Hayman JA, Yu J, Lawrence TS, Kong FM (2013): Genetic variations in TGF β 1, tPA and ACE and radiation-induced thoracic toxicities in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 8(2), 208-13

Yuan X, Liao Z, Liu Z, Wang LE, Tucker SL, Mao L, Wang XS, Martel M, Komaki R, Cox JD et al. (2009): Single nucleotide polymorphism at rs1982073:T869C of the TGF β 1 gene is associated with the risk of radiations pneumonitis in patients with non-small cell lung cancer treated with definitive radiotherapy. *J Clin Oncol* 27(20), 3370-78

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB et al. (2007): Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Med* 13(8), 952-61

Zhang J, Zhang X, Dhakal IB, Gross M, Kablubar FF, Anderson KE (2011): Sequence variants in antioxidant defense and DNA repair genes, dietary antioxidants, and pancreatic cancer risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2(3), 236-44

Zhang Y, Feng XH, Wu RY, Derynck R (1996): Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors for the TGF- β response. *Nature* 383(6596), 168-72

Zhao H, Wang LE, Li D, Chamberlain RM, Sturgis EM, Wei Q (2008): Genotypes and haplotypes of ERCC1 and ERCC2/XDP genes predict levels of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts in cultured primary lymphocytes from healthy individuals: a genotype-phenotype correlation analysis. *Carcinogenesis* 29(8), 1560-66

Zheng W, Yan C, Wang X, Luo Z, Chen F, Yang Y, Liu D, Gai X, Hou J, Huang M (2013): The TGF β 1 functional polymorphism rs1800469 and susceptibility to atrial fibrillation in two Chinese Han populations. *PloS ONE* 8(12), e83033

Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH (1999): Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285(5428), 747-50

Zhong Z, Tsukada S, Rehman H, Parson CJ, Theruvath TP, Rippe RA, Brenner DA, Lemasters JJ (2010): Inhibition of transforming growth factor- β /Smad signaling improves regeneration of small-for-size rat liver grafts. *Liver Transpl* 16(2), 181-90

Zhou S, Buckhaults P, Zawel L, Bunz F, Riggins G, Dai JL, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Targeted deletion of *Smad4* shows it is required for transforming growth factor β and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5), 2412-16

Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC (2002): Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res* 62(5), 1377-81

Zhu ML, Wang M, Shi TY, Li QX, Xi P, Xia KQ, Zheng L, Wei QY (2013): No associations between *TGFBI* polymorphisms and late radiotherapy toxicity: a meta-analysis. *PLoS ONE* 8(10), e76964

Zipprich J, Terry MB, Brandt-Rauf P, Freyer GA, Liao Y, Agrawal M, Gurvich I, Senie R, Santella RM (2010): XRCC1 polymorphisms and breast cancer risk from the New York site of the breast cancer family registry: a family-based case-control study. *J Carcinog* 9, 4