

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
des Onkologischen Zentrums
Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey

Einfluss der TGF β 1-Gen- und Proteinexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maria-Elisabeth Metzke aus Halle/Saale

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.12.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. A. Raabe

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. K. Borgmann

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. C. Petersen

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung und Arbeitshypothese	6
2. Einleitung	8
2.1. Einfluss der individuellen Strahlenempfindlichkeit auf Akut- und Spät- komplikationen nach Strahlentherapie	8
2.1.1. Zelluläre Strahlenwirkung	8
2.1.2. Nebenwirkungen nach Strahlentherapie und individuelle Strahlen- empfindlichkeit.....	10
2.1.3. Methoden zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit	11
2.1.4. Einfluss der zellulären Strahlenempfindlichkeit auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit	13
2.2. Einfluss von TGF β 1 auf die zelluläre und individuelle Strahlenempfind- lichkeit.....	14
2.2.1. TGF β 1	14
2.2.1.1. TGF β 1-Signaltransduktion.....	15
2.2.1.2. TGF β 1 und seine Funktionen	15
2.2.2. TGF β 1 und die individuelle und zelluläre Strahlenempfindlichkeit.....	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Methoden.....	19
3.1.1. Zellkultur	19
3.1.2. Kolonietest.....	19
3.1.3. Bestimmung der Dosiseffekt-Beziehung mittels Kolonietest.....	20
3.1.4. γ H2AX-Foci Immunfluoreszenz-Färbung.....	21
3.1.4.1. Immunhistochemischer Nachweis von G2-Zellen mittels CENP-F....	21
3.1.4.2. 53BP1-Foci Immunfluoreszenz-Färbung	22
3.1.5. Zellzyklusanalyse mittels FACS.....	22
3.1.6. Bestimmung der TGF β 1-Proteinkonzentration mittels ELISA.....	22
3.1.7. RNA-Isolation	23
3.1.8. RNA-Konzentrationsbestimmung	23
3.1.8. Reverse Transkription	24
3.1.9. Real-Time-PCR	24
3.1.8. Statistische Auswertung	24
3.1.8.1. Standardabweichung und Standardfehler.....	24

	4
3.1.8.2. Poissonverteilung.....	25
3.1.8.3. Variationskoeffizient.....	25
3.1.8.4. Bestimmung statistischer Signifikanz.....	25
3.2. Material	26
3.2.1. Chemikalien.....	26
3.2.2. Lösungen und Puffer	27
3.2.3. Geräte und Hilfsmittel.....	28
4. Ergebnisse	30
4.1. Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit der Fibroblastenzell- linien	30
4.1.1. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Kolonie- bildungsassay.....	30
4.2.2.1. Zellzyklusbestimmung mittels FACS.....	33
4.2.2. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels residueller DNA-Doppelstrangbrüche	35
4.2.2.1. Ausschluss von S-Phase-Zellen mittels CENP-F-Nachweis	35
4.2.2.2. Ausschluss von nicht-reparaturassoziierten γ H2AX-Foci mittels Kokalisation mit 53BP1	37
4.2.2.3. Nachweis residueller γ H2AX-Foci nach Bestrahlung	38
4.2.2.4. Vergleich von Überlebensrate und residuellen γ H2AX-Foci als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit.....	43
4.2.3. Bestimmung der basalen TGF β 1-Proteinkonzentration.....	44
4.2.4. TGF β 1-Proteinexpression und zelluläre Strahlenempfindlichkeit in vitro..	45
4.2.5. Einfluss der basalen TGFB1-Genexpression auf die zelluläre Strahlen- empfindlichkeit humaner Fibroblasten.....	47
4.2.6. Einfluss der TGFB1-Rezeptor-Genexpression auf die zelluläre Strahlen- empfindlichkeit humaner Fibroblasten	50
5. Diskussion	53
5.1. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Kolonie- bildungsassay	54
5.1.1. Zellzyklusanalyse mittels FACS.....	55
5.1.2. Dosis-Effekt-Kurven.....	55

5.1.3. Klonogenes Überleben als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit: individuelle Unterschiede der SF6 der verschiedenen Fibroblastenzelllinien	57
5.2. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels residueller DNA-Doppelstrangbrüche	60
5.2.1. Einfluss der Zellzyklusphase auf den Nachweis residueller Doppelstrangbrüche: Vergleich der Focizahlen zwischen G2-Zellen und G1-Zellen	60
5.2.2. Kollokalisierung von 53BP1-Foci mit γ H2AX-Foci	61
5.2.3. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels γ H2AX-Foci-Färbung	62
5.3. Überlebensrate und residuelle γ H2AX-Foci als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit – ein Vergleich beider Methoden	64
5.4. Einfluss der TGF β 1-Proteinexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten.....	65
5.5. Einfluss der TGFB1-Genexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten	67
6. Ausblick.....	69
7. Zusammenfassung.....	70
8. Abkürzungsverzeichnis	72
9. Danksagung	73
10. Lebenslauf.....	74
11. Eidesstattliche Versicherung	75
12. Anhang	76
12.1. Versuchsprotokolle.....	76
13. Literaturverzeichnis.....	85

1. Fragestellung und Arbeitshypothese

Die Strahlentherapie ist bei vielen Tumorerkrankungen ein wichtiger Bestandteil des therapeutischen Konzeptes. Die applizierte Gesamtdosis wird dabei vor allem durch die unvermeidbare Bestrahlung von Normalgewebe und den damit häufig verbundenen akuten und späten Normalgewebereaktionen limitiert. Selbst bei identischen Therapieschemata werden erhebliche individuelle Unterschiede in der Häufigkeit und Intensität der späten Normalgewebereaktionen beobachtet, welche derzeit im Wesentlichen auf Unterschiede der individuellen Strahlenempfindlichkeit zurückgeführt werden (Tucker et al. 1992). Da diese nachweislich im hohen Maß durch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit determiniert wird (Borgmann et al. 2008), ergibt sich die Frage nach den Faktoren, welche die zelluläre und damit individuelle Strahlenempfindlichkeit beeinflussen.

An der Ausprägung klinischer Nebenwirkungen sind neben physikalischen Faktoren der Bestrahlung auch genetische und physiologische Faktoren beteiligt. Dabei wirken zahlreiche Proteine und Zytokine auf die Prozessierung strahleninduzierter DNA-Schäden, aus denen letztendlich das Ausmaß der Zell-, Gewebe- bzw. Organschädigung resultiert. In diesem Zusammenhang wird dem Zytokin TGF β 1 (Transforming growth factor beta1) große Bedeutung zugemessen. Es ist an der Ausprägung strahleninduzierter Normalgewebeschäden beteiligt, wobei bislang ungeklärt ist, ob TGF β 1 primär die zelluläre Strahlenempfindlichkeit beeinflusst oder ob die Effekte über die nachgeschalteten Signalwege vermittelt werden. Ein direkter Effekt von TGF β 1 auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit würde zu einer Assoziation mit der Proteinkonzentration bzw. Genexpression führen.

Um die Frage zu klären, ob die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von der TGF β 1-Protein- bzw. Genexpression abhängig ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Fibroblastenzelllinien hinsichtlich ihrer zellulären Strahlenempfindlichkeit charakterisiert und der Zusammenhang mit der basalen TGF β 1-Gen- bzw. Proteinexpression untersucht.

Es wurden 17 humane Fibroblastenzelllinien untersucht, um folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Wie groß sind die individuellen Unterschiede von humanen Fibroblasten in Kultur bezüglich ihrer

- zellulären Strahlenempfindlichkeit?
- TGF β 1-Proteinkonzentration?
- TGFB1-Genexpression?

2. Besteht ein Zusammenhang zwischen zellulärer Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten und *in vitro* und ihrer basalen

- TGF β 1-Proteinkonzentration?
- TGFB1-Genexpression?
- TGFB1-Rezeptor 1 und 2 Genexpression?

Darüber hinaus wurden folgende methodische Aspekte geprüft:

- Sind residuelle Doppelstrangbrüche als Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten geeignet?
- Wird das Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises residueller Doppelstrangbrüche maßgeblich beeinflusst
 - von der Wahl des nachgewiesenen reparaturassoziierten Proteins?
 - durch den Ausschluss zellzyklusabhängiger Einflüsse auf den immunhistochemischen Nachweis DNA-Reparatur-assoziiierter Proteine?

2. Einleitung

Die Therapie von malignen Tumoren besteht derzeit aus den drei Komponenten Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Bei allen Therapieoptionen wird die Strategie verfolgt, alle (kurativer Ansatz) oder wenigstens möglichst viele (palliativer Ansatz) Tumorzellen zu zerstören, um ein erneutes bzw. weiteres Wachstum des Tumors zu verhindern. Bei allen drei Therapieverfahren kommt es in unterschiedlicher Art und unterschiedlichem Ausmaß zur Schädigung von gesundem Gewebe. Bei der Strahlentherapie kann es durch die unumgängliche Bestrahlung von Normalgewebe zur Gewebeschädigung kommen.

In der Strahlentherapie ist die Bestrahlung des Normalgewebes mit den daraus resultierenden akuten und späten Normalgewebereaktionen in der Regel der dosislimitierende Faktor. Es ist bekannt, dass die Strahlenempfindlichkeit der Patienten in Bezug auf die Normalgewebereaktion auch bei identischen Therapieschemata zum Teil erheblich variiert (Tucker et al. 1992). Dabei sind die Ursachen dieser individuellen Unterschiede derzeit nicht hinreichend geklärt. Neben der Möglichkeit, dass genetische Faktoren eine Rolle spielen (Borgmann et al. 2007), wird derzeit auch der Einfluss von bestimmten Zytokinen und deren unterschiedliche Expression als mögliche Ursache für Unterschiede in der individuellen Strahlenempfindlichkeit diskutiert (Okunieff et al. 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass mit Hilfe der zellulären Strahlenempfindlichkeit Aussagen über die individuelle Strahlenempfindlichkeit getroffen werden können, sodass auch über die Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit eine Abschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit möglich ist (Borgmann et al. 2008).

2.1. Einfluss der individuellen Strahlenempfindlichkeit auf Akut- und Spät-komplikationen nach Strahlentherapie

2.1.1. Zelluläre Strahlenwirkung

Bereits seit langer Zeit ist bekannt, dass strahleninduzierte Zellschäden vor allem auf eine Schädigung der DNA zurückzuführen sind. Bereits vor fast 40 Jahren konnte nachgewiesen werden, dass bei Bestrahlung des Zellkerns mit extrem kurz reichender α -Partikelstrahlung von Polonium der Zelltod bereits bei deutlich

geringeren Strahlendosen eintritt als bei einer Bestrahlung des Zytoplasmas (Munro 1970).

Ionisierende Strahlung kann die DNA direkt oder indirekt beschädigen. Bei der direkten Schädigung erfolgen die Absorption der Energie und die nachfolgende Schädigung im gleichen Molekül. Bei der indirekten Schädigung entsteht durch die ionisierende Strahlung zunächst ein Radikal, welches dann über eine Radikalkettenreaktion ein anderes Molekül schädigt. Diese Vorgänge können an der DNA unterschiedliche Schädigungen hervorrufen:

- Einzelstrangbrüche: Ein Strang des DNA-Moleküls ist unterbrochen.
- Doppelstrangbrüche: Beide Stränge sind in unmittelbarer Nähe unterbrochen.
- Basenschäden: Strukturveränderung einer Base.
- Gehäufte Läsionen: Dabei gibt es mehrere Schäden in unmittelbarer Nähe zueinander, sodass unterschiedliche Kombinationsformen bei der Reparatur möglich sind.
- DNA-Protein-Verbindungen: Kovalente Bindungen zwischen einem Kernprotein und der DNA.

Im Falle einer solchen Schädigung verfügt die Zelle über verschiedene Reparaturmechanismen. Unreparierte oder falsch reparierte Doppelstrangbrüche werden als Hauptursachen für die biologische Wirkung ionisierender Strahlung verstanden (Foray et al. 1997). Die vorherrschende Reparaturform bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist das Non Homologous End-Joining, bei dem die DNA-Enden nach Entfernung der geschädigten Nukleotide durch Reparaturenzyme wieder zusammengefügt werden.

In Bezug auf strahlungsbedingte Zellschädigung werden aber auch andere Prozesse diskutiert. So konnte nachgewiesen werden, dass ionisierende Strahlung einen Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion hat (Martinou et al. 2011).

2.1.2. Nebenwirkungen nach Strahlentherapie und individuelle Strahlenempfindlichkeit

Im Rahmen der Strahlentherapie kommt es neben der Bestrahlung des Tumorgewebes unvermeidlich auch zur Bestrahlung von gesundem Normalgewebe. Wird dabei die Toleranzdosis des betroffenen Gewebes überschritten, sind Normalgewebereaktionen die Folge.

Diese Normalgewebereaktionen lassen sich in akute und späte Normalgewebereaktionen unterteilen. Die akuten Normalgewebereaktionen treten unmittelbar, in der Regel während oder nach der mehrwöchigen Therapie, auf und klingen innerhalb einiger Monate wieder ab. Sie treten typischerweise in Geweben mit einer hohen Zellumsatzrate wie z.B. den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes (z.B. Mucositis) oder dem Knochenmark auf.

Bei den späten Normalgewebereaktionen handelt es sich um irreversible Schäden, die mit einer Latenz von mehreren Monaten bis Jahren nach der Strahlentherapie auftreten. Sie sind im Gegensatz zu den akuten Normalgewebereaktionen in der Regel progredient. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Lungenfibrose, die Knochenmarkinsuffizienz und das Strahlenulkus.

Das Risiko für Normalgewebereaktionen wird durch patientenbezogene und behandlungsabhängige Faktoren (Delanian and Lefaix 2004) sowie durch die individuelle Strahlenempfindlichkeit beeinflusst. Zu den patientenabhängigen Faktoren gehören beispielsweise Vorerkrankungen wie Diabetes, Hypertonie (Chon and Loeffler 2002) oder eine eingeschränkte Lungenfunktion (Inoue et al. 2001). Möglicherweise spielt auch die Tumorlokalisation eine Rolle (Yamada et al. 1998).

Zu den behandlungsabhängigen Faktoren gehören unter anderem das Fraktionierungsschema und die Größe des bestrahlten Volumens (Rancati et al. 2003). In Bezug auf die behandlungsabhängigen Faktoren konnte die Bestrahlung von Normalgewebe vor allem durch optimierte Lagerung und Fixierung während der Bestrahlung, die Anwendung mehrerer Strahlenfelder und die Verbesserung der Fraktionierungsschemata in den letzten Jahren erheblich reduziert werden (Garden 2001; Kosaka et al. 2010).

Trotz dieser Verbesserungen kommt es nach wie vor gelegentlich zu erheblichen Nebenwirkungen. Selbst bei identischen Therapieschemata und homogenen

Patientenkollektiven können große Unterschiede bezüglich der späten Normalgewebereaktionen zwischen den einzelnen Patienten auftreten (Tucker et al. 1992). Diese Unterschiede werden unter anderem auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Patienten zurückgeführt (Andreassen et al. 2002; Borgmann et al. 2002). Die genauen Ursachen und die daraus resultierenden Möglichkeiten zur Prädiktion der individuellen Strahlenempfindlichkeit sind derzeit noch nicht hinreichend erforscht. Derzeit gibt es unter anderem folgende Ansätze zur Prädiktion der individuellen Strahlenempfindlichkeit:

1.: Die Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit. Im Rahmen einzelner Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der zellulären und der individuellen Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden (Borgmann et al. 2008). Dabei wiesen Patientinnen mit einer höheren zellulären Strahlenempfindlichkeit auch ein höheres Risiko für späte Normalgewebereaktionen auf.

2.: Die Bestimmung der Expression bestimmter Zytokine, vor allem TGF β 1, TNF α , IL-6 und IL-1, als Surrogatmarker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit (Okunieff et al. 2008).

3.: Die Bestimmung des Genotyps zur Klärung möglicher genetischer Ursachen der individuellen Strahlenempfindlichkeit durch den Einfluss von Polymorphismen einzelner Nukleotide (SNP's) in bestimmten Genen wie z.B. im TGFB1-Gen (Andreassen et al. 2003; de Ruyck et al. 2005; Zschenker et al. 2010).

2.1.3. Methoden zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit

Zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit gibt es mehrere Methoden, z.B. den Mikronukleus-Test, den Comet-Assay, verschiedene Techniken der Chromosomenanalyse, den Koloniebildungstest und den Nachweis residueller Doppelstrangbrüche mittels immunhistochemischem Nachweis reparaturassoziierter Proteine wie z.B. γ H2AX. Die Prinzipien dieser Methode beruhen entweder auf einem Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen (γ H2AX-Foci-Färbung und Comet-Assay) oder den daraus resultierenden Chromosomenaberrationen (Mikronukleus-Test und Chromosomenanalysen) bzw. der Akkumulation verschiedener Strahlenschäden (Koloniebildungstest) als Maß für die letalen oder subletalen DNA-Schäden nach Bestrahlung. Von besonderem Interesse für die Fragestellung dieser Arbeit sind der

Koloniebildungstest, die γ H2AX-Foci-Färbung und die Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit mittels Chromosomenaberrationen.

Als Goldstandard zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit gilt der Koloniebildungstest. Das Prinzip beruht darauf, dass Zellen die nach der Bestrahlung einen irreparablen DNA-Schaden erlitten haben, nicht mehr teilungsfähig und damit auch nicht mehr zur Bildung von Kolonien fähig sind. Die bestrahlten Zellen bilden je nach Grad der Schädigung bei der gleichen initial eingesetzten Zellzahl unterschiedlich viele Kolonien aus.

Für Fibroblasten ist es bei dieser Untersuchungsmethode zusätzlich von Interesse, dass für die Untersuchungen konfluente, d.h. nicht proliferierende Zellen verwendet werden. Dikomey und Kollegen haben bereits vor einigen Jahren den Einfluss konfluenter, bzw. nicht konfluenter Zellen auf die Ergebnisse der Untersuchungen zur zellulären Strahlenempfindlichkeit untersucht (Dikomey and Brammer 2000) und gezeigt, dass sich die Konfluenz der Zellen auf das Ergebnis auswirkt.

Die Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit mittels Kolonietest kann jedoch nur für adhärent wachsende Zellen angewandt werden, die prinzipiell zur Koloniebildung fähig sind. Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von sich in Suspension befindenden Zellen wie Lymphozyten kann durch diesen Test nicht überprüft werden.

Die Bestimmung der Strahlensensibilität von Lymphozyten ist über den Nachweis von Chromosomenaberrationen möglich. Durch eine Bestrahlung werden Doppelstrangbrüche induziert, welche letztlich zu Chromosomenaberrationen führen. Die Zellen werden anschließend durch Stimulantien wie Phytohämagglutinin zur Zellteilung angeregt. Zum Nachweis der Chromosomenveränderungen werden die Zellen in der Metaphase durch Zugabe des Spindelgiftes Colchicin arretiert. Anschließend werden Chromosomenpräparate hergestellt und z.B. die acentrischen Chromosomenfragmente pro Zellkern quantifiziert.

Eine neuere Methode zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit ist die γ H2AX-Foci-Färbung (Kuo and Yang 2008; Mah et al. 2010). Durch Bestrahlung der Zellen kommt es zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese bedeuten den größtmöglichen Schaden für die Zelle, weil sie zum Verlust ganzer Chromosomentele während der Mitose führen können. DNA-Doppelstrangbrüche bewirken schon nach kurzer Zeit eine Phosphorylierung des Histons H2AX, wodurch die DNA-Reparatur eingeleitet wird. Dabei wird das c-terminale Serin des Histons

H2A phosphoryliert, welches mit Hilfe von Antikörpern markiert werden kann. Durch einen zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper können diese DNA-Doppelstrangbrüche dann unter dem Fluoreszenzmikroskop als Foci ausgezählt und die DNA-Doppelstrangbrüche quantifiziert werden.

Die Anzahl der γ H2AX-Foci ist kurze Zeit nach der Bestrahlung am höchsten, fällt dann etwa 6-8 Stunden stark ab und erreicht nach ca. 18 Stunden ihr Minimum (Mahrhofer et al. 2006). Dabei korrelieren ausschließlich die residuellen, d.h. nach Ablauf der Reparaturzeit von mindestens acht Stunden verbleibenden, Doppelstrangbrüche mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit (Banath et al. 2004; Löbrich et al. 2005; Olive et al. 2008; Rube et al. 2008b), während initiale Doppelstrangbrüche diese Korrelation nicht zeigen. Dies wird u.a. von Franken et al. (2011) in einer Untersuchung dokumentiert, in denen die Koloniebildungsrate nach Bestrahlung mit hochenergetischen α -Teilchen im Vergleich zu γ -Bestrahlung extrem verringert war, die Anzahl initialer Doppelstrangbrüche demgegenüber aber keinerlei Veränderung aufwies.

Ein wesentlicher Vorteil der γ H2AX-Foci-Färbung gegenüber der Chromosomenanalyse und dem Koloniebildung-Assay ist die zeit- und arbeitssparende Methodik. γ H2AX-Foci werden daher nicht nur als Indikator für die Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit erforscht, sondern auch als Maß für radioaktive Strahlenexposition (Asaithamby and Chen 2009; Rothkamm et al. 2007).

γ H2AX-Foci treten nicht ausschließlich im Zusammenhang mit DNA-Doppelstrangbrüchen auf, sondern auch physiologisch im Verlauf des Zellzyklus. Deshalb wird häufig die 53BP1-Gegenfärbung angewendet, um den Anteil der tatsächlich Doppelstrangbruch-assoziierten Foci zu bestimmen. 53BP1 lagert sich infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen an das den Bruch umgebende Chromatin an (Huyen et al. 2004) und kann ebenfalls mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt werden.

2.1.4. Einfluss der zellulären Strahlenempfindlichkeit auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit

Die Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit und ihr Einfluss auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Am häufigsten werden Lymphozyten für die Bestimmung der individuellen und zellulären Strahlenempfindlichkeit verwendet, da sie im Gegensatz zu den meisten soliden Geweben mit geringem Risiko für den Patienten zu gewinnen sind.

Für die akuten Normalgewebereaktionen belegen mehrere Studien einen Zusammenhang mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten (Barber et al. 2000; Borgmann et al. 2008; Popanda et al. 2003). Bezüglich des Zusammenhangs zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten und späten Normalgewebereaktionen ist die Datenlage hingegen widersprüchlich. Es gibt sowohl Studien, welche eine Assoziation zwischen beiden Parametern nachweisen (Barber et al. 2000; Bordon et al. 2010; Hoeller et al. 2003) als auch solche, die diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Lopez et al. 2005; Olive et al. 2008).

An Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, dass es offensichtlich auch bei diesem Zelltyp einen Zusammenhang zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und akuten bzw. späten Normalgewebereaktionen gibt (Burnet et al. 1994; Dikomey and Brammer 2000). Allerdings ist hier die Datenlage nicht so ergiebig wie bei den Lymphozyten. Der Zusammenhang zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit von Fibroblastenkulturen und der individuellen Strahlenempfindlichkeit wird zum Teil kontrovers diskutiert. So zeigten Borgmann et al. (2002) für Lymphozyten eine Korrelation zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und den späten Normalgewebereaktionen, konnten dies in derselben Studie für Fibroblasten jedoch nicht nachweisen.

2.2. Einfluss von TGF β 1 auf die zelluläre und individuelle Strahlenempfindlichkeit

2.2.1. TGF β 1

Bei der Suche nach Biomarkern zur Prädiktion der individuellen Strahlenempfindlichkeit ist eine Reihe von Zytokinen von besonderem Interesse. Die derzeit am häufigsten in diesem Zusammenhang untersuchten Zytokine sind TGF β 1, IL-1, IL-6 und TNF α . Bei TGF β 1 handelt es sich um ein Zytokin, welches im menschlichen Organismus vielfältige Funktionen wahrnimmt. Für die Strahlentherapie ist es besonders aufgrund seines Einflusses auf Fibrose,

Immunregulation, Apoptose und Kanzerogenese von Interesse (Prud'homme 2007; Rahimi and Leof 2007).

2.2.1.1. TGF β 1-Signaltransduktion

Vom „Transforming Growth Factor-beta“ sind derzeit drei Subtypen bekannt: TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3. Für die Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit ist besonders TGF β 1 von Interesse. TGF β 1 ist ein 390 Aminosäuren langes Peptid, welches prinzipiell von fast allen Zelltypen exprimiert werden kann. Vorzugsweise wird es durch die Zellen des Immunsystems und Fibroblasten freigesetzt.

TGF β 1 wird zunächst als Vorläuferpeptid exprimiert und bindet anschließend an den so genannten „Small Latent complex“ (LAP), in dem es vorerst in inaktiver Form vorliegt. Erst nach Abspaltung vom LAP wird es aktiviert. Während *in vitro* die Aktivierung von TGF β 1 durch einen sauren pH-Wert möglich ist (Hyytiäinen et al. 2004), sind die Mechanismen *in vivo* noch nicht vollständig erforscht. Diskutiert wird z.B. die Aktivierung mittels Proteolyse durch Plasmin (Godar et al. 1999). Allerdings können auch andere Moleküle wie Thrombospondin 1 (TSP1) und $\alpha_v\beta_6$ Integrin an den LAP-TGF β 1-Komplex binden und diesen aktivieren (Munger et al. 1999; Schultz-Cherry et al. 1994).

Alle drei TGF β 1-Subtypen binden an denselben Rezeptor, welcher aus drei Untereinheiten besteht: RI, RII und RIII. RIII bindet das aktivierte TGF β 1 und rekrutiert TGF β 1 zu RII, welcher dann die RI-Untereinheit aktiviert. RI phosphoryliert wiederum SMAD (homolog zum Drosophilaprotein „mothers against decapentaplegic“ (MAD) und „Caenorhabditis elegans“ (SMA)) 2 und 3, welche gemeinsam mit SMAD 4 in den Zellkern wandern, an die DNA binden und dort die Transkription nachgeschalteter Gene regulieren. Durch diesen Komplex können mehrere hundert Gene reguliert werden (Rubstov and Rudensky 2007). Das Protein SMAD 7 bindet am Ende der Signalkaskade an RI/II, inaktiviert dieses dadurch und es kommt so zur Inhibition des TGF β 1-Pathways.

2.2.1.2. TGF β 1 und seine Funktionen

Für TGF β 1 sind im menschlichen Organismus vielfältigste Funktionen bekannt, die jedoch im Folgenden nur im Zusammenhang mit der Strahlensensibilität beschrieben werden sollen. TGF β 1 hat einen wesentlichen Einfluss auf die Zellproliferation und

Zelldifferenzierung. Es kann die Induktion des Zellarrests bewirken (Massague and Gomis 2006). Dies geschieht über TGF β 1 nur in der G1-Phase durch die Hochregulation von CDK-Inhibitoren (CDK=Cyclinabhängige Kinase). Im Zusammenhang mit der Regulation des Zellwachstums konnte auch ein Einfluss von TGF β 1 auf die Induktion der Apoptose, beispielweise über eine Induktion des TGF β -inducible early response genes (TIEG1), nachgewiesen werden (Siegel and Massague 2003). Um den genauen Zusammenhang zu verstehen, bedarf es allerdings noch weiterer Forschung.

Besonders interessant für die Strahlentherapie ist der Einfluss von TGF β 1 auf die Fibrose, da es sich dabei um eine häufige und für die Patienten besonders belastende Nebenwirkung der Strahlentherapie handelt. So haben einige Studien gezeigt, dass isolierte Fibroblasten nach der Zugabe von TGF β 1 vermehrt proliferieren (Khalil et al. 2005; Strutz et al. 2001). Darüber hinaus bewirkt TGF β 1 eine Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten, welche wiederum vermehrt in Lungenanteilen mit Fibrose aufzufinden sind (Phan 2002). Studien haben gezeigt, dass TGF β 1 eines der wichtigsten, wenn nicht sogar das wichtigste pro-fibrotische Zytokin ist (Flanders 2004). TGF β 1-Antikörper werden bereits erfolgreich als wirksames Mittel eingesetzt, um strahlen- oder chemotherapieinduzierter Fibrose vorzubeugen (Anscher et al. 2008; George et al. 1999; Puthawala et al. 2008).

Eine weitere entscheidende Funktion von TGF β 1 besteht in der Modulation des Immunsystems: Bereits 1986 konnte nachgewiesen werden, dass TGF β 1 von aktivierten T-Zellen produziert wird und dass es die Proliferation von T-Zellen inhibiert (Kehrl et al. 1986). Der immunmodulierende Einfluss von TGF β 1 beschränkt sich jedoch nicht nur auf die T-Zellen, sondern betrifft auch große Teile des zellulären Immunsystems (Wahl 2007). Darüber hinaus fungiert TGF β 1 auch als chemotaktischer Faktor für die Immunzellen, welcher zu einer sehr schnellen Ansammlung von Makrophagen, Granulozyten und anderer Zellen am Ort einer Entzündung führen kann (Wahl et al. 1987).

Des Weiteren ist TGF β 1 an der Kanzerogenese beteiligt, wobei es in den Anfangsstadien antiproliferativ auf die Tumorzellen wirkt, später aber die Metastasierung begünstigt (Jakowlew 2006). Viele Tumoren weisen mutierte oder

inaktivierte TGF β 1-RII-Rezeptoren oder andere Veränderungen in der TGF β 1-Signalkaskade auf (Stover et al. 2007).

2.2.2. TGF β 1 und die individuelle und zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Dass Zytokine bei Strahlenschäden eine entscheidende Rolle spielen, wurde bereits vor über 20 Jahren von Rubin et al. erstmalig beschrieben (Rubin et al. 1986). Bereits kurze Zeit später wurden erhöhte TGF β 1-Plasmakonzentrationen bei Brustkrebspatientinnen nachgewiesen, welche nach einer Hochdosis-Chemotherapie vor Knochenmarktransplantation eine Lungen- und Leberfibrose entwickelten (Anscher et al. 1993).

Bei transgenen Mäusen mit einer TGF β 1-Überexpression zeigte sich, dass die erhöhte Plasmakonzentration von TGF β 1 nach Bestrahlung mit einer deutlich erhöhten Mortalität der Tiere einher geht (Vodovotz et al. 2000). Diese Unterschiede wurden bereits bei relativ geringen Dosen (2 Gy) deutlich. Darüber hinaus wiesen diese Mäuse nach der Bestrahlung niedrigere Hämatokritwerte sowie niedrigere Lymphozyten- und Thrombozytenzahlen auf.

Vergleichbare Ergebnisse zeigen Untersuchungen auf zellulärer Ebene: Fibroblasten von TGF β 1-Knockout-Mäusen wiesen eine erheblich geringere TGF β 1-Expression auf. Nach Bestrahlung wiesen die Fibroblasten der TGF β 1-Knock-out-Mäuse eine höhere Überlebensrate als der Wildtyp auf. Sobald das TGF β 1 jedoch im Versuch wieder zugefügt wurde, konnte kein Unterschied der Strahlenempfindlichkeit der Fibroblasten zwischen TGF β 1-Knock-out-Mäusen und Mäusen mit dem Wildtyp beobachtet werden (von Pfeil et al. 2002).

In klinischen Studien wurde Vergleichbares beobachtet: So geht ein erhöhter TGF β 1-Plasmaspiegel während der Strahlentherapie mit einer erhöhten Rate an Lungenschäden nach der Strahlentherapie einher (Zhao 2009). In Verbindung mit der mittleren Lungendosis (MLD) konnten so die für die Ausbildung von Lungenschäden besonders gefährdeten Patienten identifiziert werden. Zusätzlich konnte in neueren Studien eine Assoziation zwischen bestimmten TGF β 1-Polymorphismen und der TGF β 1-Expression bzw. der zellulären Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden (Schirmer et al. 2011).

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Anwendung von TGF β 1-Antikörpern zur Prävention von Strahlenschäden. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Ratten nach der Anwendung von TGF β 1-Antikörpern nach Bestrahlung weniger Entzündungen und eine geringere Expression und Aktivierung von TGF β 1 zeigen (Anscher et al. 2006; Anscher et al. 2008).

Bei Patienten scheint die Höhe des basalen TGF β 1-Plasmalevels vor allem genetisch determiniert zu sein (Pantsulaia et al. 2004). Dies betrifft auch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, was Borgmann et al. (2007) für ein Kollektiv von eineiigen Zwillingen nachweisen konnten. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Assoziation von individueller Strahlenempfindlichkeit und genetischen Varianten (SNPs) im TGFB1-Gen (Andreassen et al. 2005; Andreassen et al. 2003; Zschenker et al. 2010).

Weniger gut untersucht ist hingegen der Einfluss der TGF β 1-Rezeptoren RI und RII auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit. Vor Kurzem konnte der Einfluss des TGF β 1-Rezeptors 2 auf die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose nachgewiesen werden (Li et al. 2011). Aus diesem Grund ist es von Interesse, in der vorliegenden Arbeit neben dem Einfluss der TGF β 1-Genexpression auch den Einfluss der TGF β 1-Rezeptorgenexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1. Methoden

Im folgenden Kapitel werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden grundsätzlich beschrieben. Eine ausführlichere Darstellung der Methoden ist im Anhang in Form der Protokolle beigefügt.

3.1.1. Zellkultur

Die verwendeten Fibroblastenzelllinien wurden aus operativ entfernten Vorhautproben etabliert. Bei 12 der insgesamt 17 analysierten Zelllinien handelte es sich um im Rahmen einer Fimosebehandlung entfernte Vorhäute und bei sechs Zelllinien um die Dermis von einer Patientin bzw. fünf Patienten im Alter von 53 bis 65 Jahren. Nach Entnahme im OP wurden im Labor der Klinik für Dermatologie Zellkulturen in DMEM (10% FCS) mit 10% CO² etabliert und kryokonserviert. Für die Untersuchungen wurden die aufgetauten Zellen in DMEM-Medium mit 10% FCS aufgenommen und bei 37°C mit 10% CO² in T75-Zellkulturflaschen kultiviert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht war. Die Zelllinien wurden über maximal 15 Passagen kultiviert.

3.1.2. Kolonietest

Für den Kolonietest wurden jeweils $1,5 \times 10^5$ Zellen in eine T25-Zellkulturflasche gegeben und 5-6 Tage bei 37°C und 10% CO² inkubiert, bis die Zellen konfluent wuchsen. Eine Flasche wurde anschließend mit 6 Gy bestrahlt. Die andere Flasche diente als unbestrahlte Kontrolle. Bei den Dosis-Effekt-Kurven wurde zusätzlich jeweils eine Flasche mit 2, 4 und 8 Gy bestrahlt. Nach 24 Stunden wurde der Kolonietest angesetzt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und anschließend eine Verdünnungsreihe angesetzt, um eine Zellzahl von 1000 Zellen (unbestrahlte Zellen) bzw. 10000 Zellen (bestrahlte Zellen) pro ml zu erhalten. Danach wurden entsprechend zwischen 300 und 5000 Zellen in Zellkulturflaschen angesetzt. Pro Zellzahl wurden drei Kulturflaschen angesetzt (technische Dreifachbestimmung). Die Flaschen wurden ca. 14 Tage bei 37°C mit 10% CO² im Brutschrank in Zellkulturmedium inkubiert. Die Kolonien wurden anschließend mit

70% Ethanol fixiert, mit 0,1% Kristallviolettlösung gefärbt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Auswertung erfolgte manuell (Leuchttisch, Zählhilfe). Bei der Zählung wurden nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen berücksichtigt. Für jede Zelllinie wurden mindestens drei Kolonietests (biologische Dreifachbestimmung) durchgeführt. Die Angehrate (engl.: plating efficiency (PE)) wurde wie folgt ermittelt: (Anzahl Kolonien/eingegebene Zellen) x100. Für die Anzahl der Kolonien wurde der Mittelwert der Kolonien aus der technischen Dreifachbestimmung verwendet. Anschließend wurde die mittlere PE aus der PE der unterschiedlichen Zellzahlen pro Dosispunkt ermittelt. Die Bestimmung der SF6 erfolgte durch folgende Formel: $SF_6 = \frac{MW \text{ Kolonien } 0 \text{ Gy}}{MW \text{ Kolonien } 6 \text{ Gy}}$.

3.1.3. Bestimmung der Dosiseffekt-Beziehung mittels Kolonietest

Bei der mathematischen Beschreibung von Zellüberlebenskurven hat sich das linear-quadratische Modell (LQ-Model) bewährt (Kellerer and Rossi 1972). Dieses Modell ist dazu geeignet, den Schulterbereich von Überlebenskurven und somit den Verlauf nach klinisch relevanten Dosen von etwa 1 bis 5 Gy zu beschreiben. Das Zellüberleben wird dabei wie folgt beschrieben:

$$SF = SF_0 \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

wobei SF die Überlebensfraktion, SF_0 die Angehrate der unbehandelten Zellen, D die applizierte Dosis und α (Einheit Gy^{-1}) und β (Einheit Gy^{-2}) zell- bzw. gewebsspezifische Komponenten sind. Die lineare Komponente ($-\alpha D$) beschreibt die Anfangsneigung der Überlebenskurve, wobei die Krümmung der Kurve von der quadratischen Komponente ($-\beta D^2$) beschrieben wird.

Die dosisabhängige Reduktion der Koloniebildungsrate wurde mittels der „delayed plating“ Methode bestimmt, indem mittels Kolonietest die Koloniebildungsrate 24 Stunden nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 0 und 8 Gy bestimmt wurde. Die Zellkulturen für die Dosis-Effekt-Kurve wurden nach dem oben für den Kolonietest genannten Schema angesetzt. Lediglich die Anzahl der Dosispunkte und die jeweils ausgesäten Zellzahlen unterschieden sich von denen des Kolonietests. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach den gleichen Richtlinien wie beim Kolonietest.

3.1.4. γ H2AX-Foci Immunfluoreszenz-Färbung

Kommt es infolge von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen zu einer Phosphorylierung des Histons H2AX an Ser139, dann führt das als erster Schritt der DNA-Reparatur zu einer Konformationsänderung des Histons. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Detektion des veränderten Histons mit Hilfe eines Antikörpers. Die gebildeten Foci werden mit Hilfe eines weiteren fluoreszenzmarkierten Antikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und können ausgewertet werden, wobei jeder Focus einem Doppelstrangbruch entspricht (Sedelnikowa et al. 2002).

Für die Detektion der γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz wurden 5×10^4 Zellen auf Objektträgern (Becton Dickinson) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C mit 10% CO² inkubiert. Nach ca. 6 Tagen wurden die konfluenten Zellen mit 0 Gy (Kontrolle), 1 Gy und 6 Gy bestrahlt und nach 24 Stunden fixiert und gefärbt.

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Zeiss Mikroskop (Imager 2) bei 600-facher Vergrößerung (Filter: Zeiss BP 450/490). Es wurden die Foci in jeweils 100 Zellkernen gezählt. Dabei wurden nur Zellen mit gleicher Morphologie und Größe berücksichtigt. Es wurde für jede Zelllinie eine biologische Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.1.4.1. Immunhistochemischer Nachweis von G2-Zellen mittels CENP-F

Um die Zellen in der G2-Phase von der Foci-Zählung auszuschließen, wurde die CENP-F-Gegenfärbung angewendet. Für die G2-Gegenfärbung wurde der CENP-F-Antikörper (Fa. Lifespan Bioscience) gemeinsam mit dem γ H2AX-Antikörper auf den Zellen inkubiert. Der fluorescein-gelabelte sekundäre Antikörper wurde gemeinsam mit dem AlexaFluor®-Antikörper für die CENP-F-Färbung auf die Objektträger gegeben. Die Färbung wurde in Analogie zur γ H2AX-Foci Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Die CENP-F-Färbung führt zu einer Gelbfärbung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Filter: BP 546-12). Die Zellen in G2-Phase des Zellzyklus wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt bzw. separat ausgezählt, um die Zählungen mit den CENP-F-negativen Zellkernen zu vergleichen.

3.1.4.2. 53BP1-Foci Immunfluoreszenz-Färbung

Zusätzlich zu der γ H2AX-Färbung wurde bei fünf Zelllinien eine 53BP1-Antikörper-Färbung durchgeführt. Der 53BP1-Antikörper wurde gemeinsam mit dem γ H2AX-Antikörper auf die Zellen gegeben, wobei der fluorescein-gelabelte sekundäre Antikörper beibehalten wurde. Bei der Auswertung wurden die γ H2AX-Foci und die 53BP1-Foci pro Zelle bestimmt.

3.1.5. Zellzyklusanalyse mittels FACS

Zur Überprüfung der Übereinstimmung zwischen Konfluenz und Zellzyklus wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) durchgeführt. Dafür wurden sowohl die Zellen verwendet, die nicht für den Kolonietest eingesetzt wurden, als auch die Zellen, welche nach der Aufbereitung des Mediums für den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) übrigblieben. Die Zellen wurden zentrifugiert, das Pellet mehrfach in PBS gewaschen und anschließend in 70% Ethanol fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -20°C gelagert. Für die Messung im FACS wurde das Ethanol entfernt und die Zellen mit Propidiumjodid angefärbt. Anschließend erfolgte die Zellzyklusanalyse im FACS (BD Biosciences, FACSCalibur™).

3.1.6. Bestimmung der TGF β 1-Proteinkonzentration mittels ELISA

Für den Enzym-linked-immunosorbent-Assay (ELISA) (Fa. Quantikine) wurden die Zellen in Zellkulturplatten (sechs Vertiefungen) für 5-6 Tage im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde danach von den unbestrahlten Zellen abgenommen, zentrifugiert und 1 ml bis zur weiteren Verwendung bei -80°C asserviert. Die Zellen in den Vertiefungen wurden trypsiniert und die Zellzahl im Coulter (Beckmann Z2) bestimmt.

Für den ELISA wurden die Proben durch 1 M HCl aktiviert und nach 10 Min durch NaOH wieder inaktiviert. Parallel wurde mit der TGF β 1-Standardlösung des Herstellers eine Eichkurve erstellt, bei der Konzentrationen zwischen 0 und 2000 pg/ml eingestellt wurden. Sowohl die Proben als auch die Eichlösung wurden danach entsprechend des Protokolls des Herstellers verwendet. Für die Auswertung wurde mit Hilfe der vorher ermittelten Zellzahlen die TGF β 1-Konzentration pro Zelle bestimmt.

3.1.7. RNA-Isolation

Für die Real-Time-PCR wurden die Zellen in Six-Well-Zellkulturplatten bei 37°C mit 10% CO² inkubiert, bis die Zellen konfluent wuchsen. Die RNA wurde anschließend mit Hilfe der Trizol-Fällung (TriFast®, Fa. Peqlab) isoliert. Durch hinzufügen von Chloroform und Zentrifugation bei 4°C erfolgte eine Trennung der verschiedenen Phasen. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA danach mit Isopropanol ausgefällt. Anschließend wurde die RNA mehrfach mit Ethanol gewaschen. Die isolierte RNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 30 µl destilliertem RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3.1.8. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und die Überprüfung der Reinheit der isolierten RNA erfolgten mit Hilfe des UV-Photometers. Das Maß für die Strahlungsabsorption (Extinktion) errechnet sich nach dem Lambert-Beersche Gesetz. Die Extinktion entspricht:

$$E = -\lg\left(\frac{I_D}{I_0}\right) = \lg\left(\frac{I_0}{I_D}\right)$$

Für die Parameter der Extinktion ergibt sich daher Folgendes:

$E = \varepsilon * c * d$	ε = molarer Extinktionskoeffizient + Stoffkonstante C = Stoffmengenkonzentration D = Schichtdicke
---------------------------	---

Die gemessene Absorption der Probe bei 260 nm (A 260) ergibt daher die Konzentration der RNA. Eine zweite Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Diese misst die Verunreinigung der Probe durch enthaltene Proteine. Somit gibt der Quotient aus den beiden Extinktionen bei 260 nm bzw. 280 nm eine qualitative Aussage über die Reinheit der verwendeten RNA. Der A260/280-Quotient sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Dies stellt sicher, dass es bei weiteren Untersuchungen der Proben zu keinen Interaktionen mit verbliebenen Proteinen kommt. Die gewonnenen RNA-Proben wurden anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung asserviert.

3.1.8. Reverse Transkription

Da bei der Real-Time-PCR Taq-Polymerase zur Amplifikation verwendet wird, ist die Reverse Transkription der isolierten RNA zu komplementärer DNA (cDNA) notwendig. Für die reverse Transkription wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Fa. Applied Biosystems) verwendet und nach den Vorgaben des Herstellers verfahren. Die cDNA wurde anschließend bei 4°C aufbewahrt und innerhalb einer Woche verbraucht.

3.1.9. Real-Time-PCR

Für die Real-Time PCR wurde der „TaqMan Gene Expression Master Mix“ und der „TaqMan Gene Expression Assay“ von Applied Biosystems verwendet. Die Reagenzien wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers verarbeitet. Die Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von RNA. Diese beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Jeder PCR-Zyklus ist dabei folgendermaßen aufgebaut: Zuerst folgt die Denaturierung der cDNA bei 95 °C. Anschließend wird die Temperatur primerspezifisch auf 60 °C abgesenkt. Das Senken der Temperatur ermöglicht den Primern und der Sonde, sich an die DNA-Stränge anzulagern (Annealing). Zum Schluss erfolgt ebenfalls bei 60 °C die die Synthese des komplementären Stranges (Elongation). Für die Expressionsanalysen wurden die Primer-Sonden-Kombinationen (Assay on Demand) von Applied Biosystems verwendet. Als endogene Kontrolle wurde 18s RNA verwendet. Für die Auswertung wurde mit Hilfe dieser endogenen Kontrolle der ΔC_t -Wert berechnet. Die Unterschiede in Bezug auf die Genexpression zwischen den verschiedenen Zelllinien wurden als ΔC_t -Wert dargestellt.

3.1.8. Statistische Auswertung

3.1.8.1. Standardabweichung und Standardfehler

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgt, indem die Summe der quadrierten Abweichungen durch die Anzahl der Freiheitsgrade (n-1) geteilt wird. Als n ist dabei die Anzahl der Messungen definiert. Die Varianz S^2 wird wie folgt berechnet:

$$S^2 = 1/n-1 \sum (X_i - \bar{X})^2$$

wobei \bar{X}_i dem arithmetischen Mittel und X den einzelnen Messwerten entspricht.

Um die Streuung in der gleichen Einheit wie die Originaldaten angeben zu können, wird die Quadratwurzel der Varianz ermittelt, sodass man die Standardabweichung S nach der Formel

$$S = \sqrt{S^2}$$

erhält.

Der Standardfehler S_x wird durch Division von Standardabweichung und Anzahl an Messdaten ermittelt:

$$S_x = S / \sqrt{n}$$

3.1.8.2. Poissonverteilung

Die Poissonverteilung beschreibt das Auftreten von Ereignissen mit relativ kleinen Wahrscheinlichkeiten in großen Stichproben:

$$P(X = k) = \lambda^k / k! \cdot e^{-\lambda}$$

(λ = Erwartungswert der Poissonverteilung, $\lambda = n \cdot p$ (p = Wahrscheinlichkeit), k = Binominalkoeffizient).

3.1.8.3. Variationskoeffizient

Als Maß der Variationsbreite wurde der Variationskoeffizient VK als Quotient der Standardabweichung (σ) und Mittelwert (\bar{x}) wie folgt für jede Zelllinie berechnet:

$$VK = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Der Variationskoeffizient wird im weiteren Verlauf in % angegeben.

3.1.8.4. Bestimmung statistischer Signifikanz

Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software Graphpad Prism 4.0 durchgeführt und alle p -Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

3.2. Material

3.2.1. Chemikalien

Chemikalie/Substanz/Reagenz/Kit	Hersteller
53BP1-Antikörper	Novus Biologicals
AlexaFluor Antikörper®: 594 monoclonal Antibody, goat anti-mouse IgG (H+L), 2 mg/ml	AlexaFluor
BSA pH 7.0	Serva
CENP-F Antikörper, rabbit 1:750	Lifespan Bioscience
Chemikalien reverse Transkription: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Choroform reinst ≥99,0%	Merck
Dapi	Sigma
Dapi-Antifade, H-1000	Vector Laboratories
DMEM-Medium	Gibco
ELISA-Set: Quantikine®, Human TGF-beta1 Immunoassay	R&D Biosystems
Ethanol reinst ≥99,9%	Merck
Ethanol 99%, vergällt mit 1% Methylethylketon	Walter CMP
FCS, FBS superior	Biochrom AG, Berlin
CENP-F Sekundärantikörper: anti-rabbit IgG (1:50), Fluorescein linked whole antibody	GE-Healthcare
Foraldehyd 37%	Merck
Gene Expression Assay: HS00998133_ml TGFB1	Applied Biosystems
Gene Expression Mix: TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
H ₂ O dest. sterile, distilled water, DNase/RNase free, #10977-035	Gibco

Isopropanol, 99%	Merck, Darmstadt
Kristallviolett: Certistain®	Merck
L-Glutamin 200mM	Gibco
Phenolisothiozyanat: RNAPure™	peqGold
Pre Developed Assay Reagents: Human 18s rRNA (20x), Human HPRT (20x)	Applied Biosystems
Tris-EDTA: Tris-Borate-EDTA Buffer, for Gel Electrophoresis	Sigma, St. Louis
Triton-X 100	Serva
0,05% Trypsin, #25300-054	Gibco
Tween® 20, Sigma-Ultra,	Sigma Aldrich
γH2AX-Antikörper: Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, mouse monoclonal IgG1, 200 µg/200 µl	Millipore

3.2.2. Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung / Bestandteile
TE-Puffer	10 g Tris-Borate-EDTA Buffer, 990 ml dest. Wasser
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,27 g KH ₂ PO ₂ , 1,78 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
Kulturmedium	DMEM+10% FCS, 2% L-Glutamine, #10938-025
Fixierlösung	946 ml PBS, 54 ml Formaldehyd (37%)
Permeabilisierungslösung	1000 ml PBS, 2 ml Triton X
Blockierungslösung	1000 ml PBS, 30 g BSA
Lösung γH2AX-Antikörper	990 µl PBS+1% BSA+0,5% Tween (Waschlösung I), 10 µl γH2AX-Antikörper, ggf. 1,37 µl CENP-F Antikörper

Waschlösung I	1000 ml PBS+1% BSA, 5 ml Tween (0,5%)
Lösung Antikörper AlexaFluor®	600 µl PBS+1% BSA+0,5% Tween (Waschlösung I), 1 µl AlexaFluor® Antikörper, 3 µl Dapi, ggf. 20 µl fluoresceingelabelter Antikörper
Waschlösung II	1000 ml PBS, 5 ml Tween
Kristallviolettlösung	1000 ml dest. Wasser, 1 g Kristallviolett

3.2.3. Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Hersteller, Gerätetyp
Automatikpipette für Real-Time PCR	Eppendorf , Multipette® Xstream
Brutschrank	Sanyo, inCu safe
FACS	BD Biosciences, FACSCalibur™
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Imaging 2 Filter: <ul style="list-style-type: none"> - BP546-12 (blau, für CENP-F) - BP450-490 (rot, für γH2AX-Foci) - BP365-12 (DAPI) - TBP400/495/570, FT410/505/584, TBP460/530/610 (Mischfilter)
Invertmikroskop	Axiovert, 40 CFL
Photometer	Eppendorf, Biophotometer
Röntgenröhre	Gulmay, Medical RS225
Sterilbank	Heraeus, Hera safe
Thermocycler	Applied Biosystems, HT Fast Real-Time PCR-System
Zellzähler	Beckmann, Coulter Z2

Zentrifuge für 96-Well-Platten	Heraeus, Multifuge 3 L
Zentrifuge für Eppis	Beckmann, Microfuge® R Centrifuge
Zentrifuge für Falcons	Heraeus, Megafuge 1.0.R
75 cm ² Zellkulturflaschen	Sarstedt
25 cm ² Zellkulturflaschen	Sarstedt

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit der Fibroblastenzelllinien

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der untersuchten Fibroblastenzelllinien wurde sowohl mittels Koloniebildungsassay als auch mittels Nachweis residueller DNA-Doppelstrangbrüche bestimmt. Zur Vermeidung von Zellzykluseffekten wurden alle Experimente an konfluenten Zellen durchgeführt.

4.1.1. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Koloniebildungsassay

Mit Hilfe des Koloniebildungsassay wurde der Anteil klonogener Zellen nach *in vitro* Bestrahlung bestimmt. In Abbildung 1 sind die Dosis-Effekt-Kurven von 14 der untersuchten 17 Zelllinien einzeln dargestellt (Panel A bis O). Dabei wurden für fünf Dosispunkte (0, 2, 4, 6, 8 Gy) die Überlebensraten bestimmt. Aufgetragen ist jeweils die Überlebensrate in Abhängigkeit von der applizierten Dosis sowie die linear-quadratische Anpassung an die Datenpunkte. Generell nimmt die Überlebensrate mit der Dosis ab, wobei die Güte der linear-quadratischen Anpassung durch ein r^2 von 0,90 bis 1,00 charakterisiert wird. Zum Vergleich der Unterschiede im klonogenen Überleben der einzelnen Zelllinien sind in Panel O die Dosis-Effekt-Kurven aller untersuchten Fibroblasten zusammengefasst dargestellt. Während im Bereich geringer Dosen die Unterschiede in der zellulären Inaktivierung zwischen den einzelnen Zelllinien relativ gering ausfallen, sind diese bei Dosen von mehr als 4 Gy deutlich ausgeprägter. So liegt der Anteil klonogener Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy zwischen 0,28 und 0,76, während die Überlebensrate nach 8 Gy mit Werten von 0,001 bis 0,096 um fast zwei Dekaden variiert. Insgesamt wurden für 14 der 17 Zelllinien Dosis-Effekt-Kurven angefertigt.

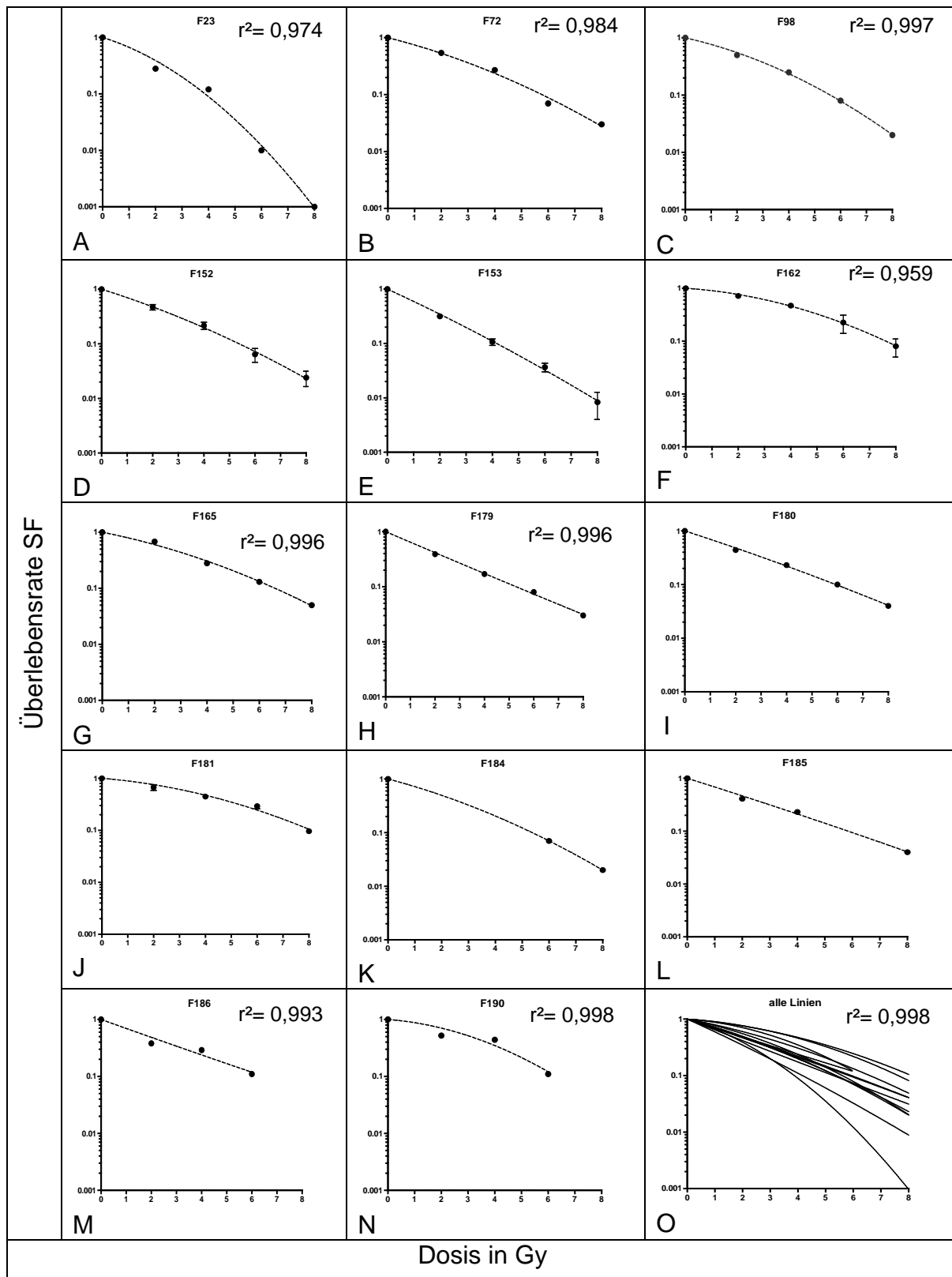


Abb. 1: Überlebensrate als Funktion der Dosis für 14 der untersuchten Fibroblastenzelllinien. Panel A-O zeigen die mittels Kolonietest ermittelten Überlebensraten, sowie die linear-quadratische Anpassung der Daten (gestrichelte Linie). Vereinzelt fehlen aufgrund von Infektionen der Zellkulturen einzelne Dosispunkte, daher sind einige Kurven nicht vollständig.

$$r^2 = 0,969$$

$$r^2 = 1,000$$

$$r^2 = 0,993$$

Zur Darstellung der Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurde für jede Zelllinie die Überlebensrate nach 6 Gy (SF6) bestimmt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 2 für alle 17 Zelllinien dargestellt. Aufgetragen sind für jede Zelllinie die in unabhängigen Experimenten ermittelte SF6, der Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (SD). Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. In einigen Fällen liegen der Bestimmung der mittleren SF6 zehn Experimente zugrunde (z.B. F152). Die mittlere SF6 variiert zwischen 0,03 für die Zelllinie F23 bzw. 0,21 für die Zelllinie F181. Die SF6 weist somit eine Variationsbreite von einer Dekade auf, wobei bei den genannten Zelllinien große Unterschiede in der Standardabweichung auffallen. Bei anderen Zelllinien, wie der Zelllinie F186, ist die Standardabweichung hingegen sehr gering. Die Einzelwerte der SF6 liegen in diesem Fall zwischen 0,09 und 0,11. Dagegen ist die Streuung der einzelnen Messwerte für die Zelllinie F181 mit Werten zwischen 0,11 und 0,38 deutlich ausgeprägter. Der Variationskoeffizient (CV) als relatives Maß der Standardabweichung beträgt für diese Zelllinien 12,0 % (F186) bzw. 67,7 % (F132).

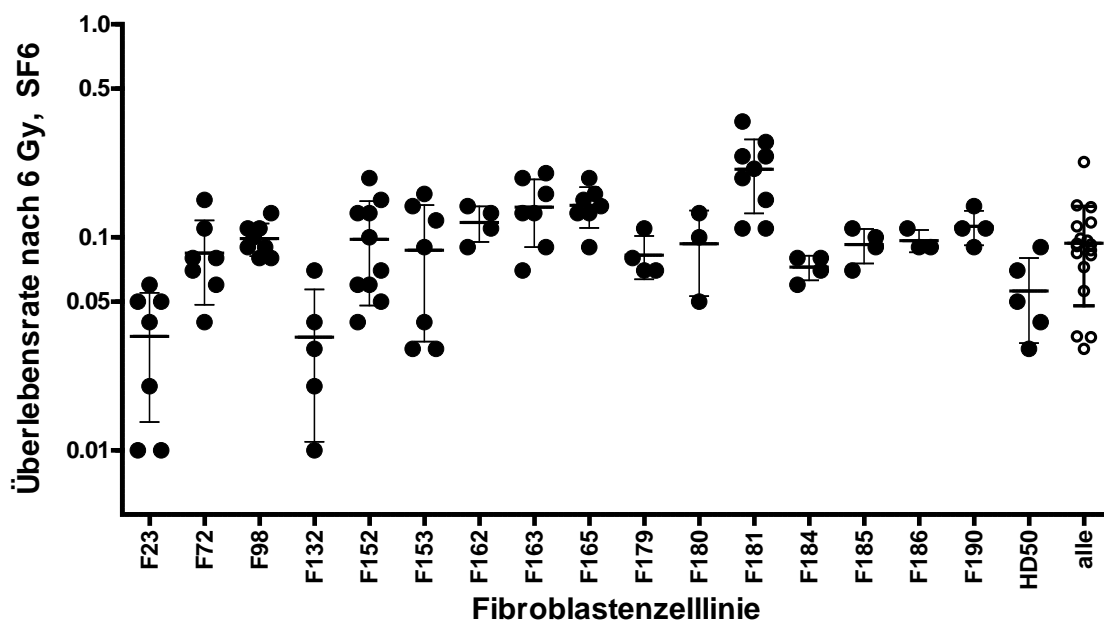


Abb. 2: Dargestellt ist die durchschnittliche Überlebensrate aller untersuchten Fibroblastenzelllinien nach 6 Gy in Mehrfachbestimmung, sowie die Ergebnisse der einzelnen Messungen.

In Tabelle 1 sind die mittleren SF6-Werte, die Standardabweichung (SD) und die Variationskoeffizienten (CV) der einzelnen Zelllinien sowie die Durchschnittswerte aller Zelllinien dargestellt.

Zelllinie	n	mittlere SF6	SD	CV (%)
F23	7	0,03	0,02	60,4
F72	7	0,08	0,04	42,7
F98	8	0,10	0,02	17,5
F132	5	0,03	0,02	67,7
F152	11	0,09	0,05	51,1
F153	7	0,09	0,05	62,8
F162	4	0,12	0,02	18,9
F163	7	0,14	0,05	35,0
F165	7	0,14	0,03	21,8
F179	4	0,08	0,02	23,0
F180	3	0,09	0,02	43,3
F181	10	0,23	0,1	38,0
F184	4	0,07	0,01	13,2
F185	4	0,09	0,02	18,5
F186	3	0,10	0,01	12,0
F190	4	0,11	0,02	18,3
HD50	5	0,06	0,02	43,0
alle	17	0,09	0,04	49,1

Tab. 1: Abgebildet sind die mittleren SF6-Werte, die Standardabweichung (SD) sowie der Variationskoeffizient der verschiedenen Zelllinien. Zusätzlich sind in der letzten Zeile die ermittelten Durchschnittswerte für alle Zelllinien abgebildet.

Für alle 17 Fibroblastenzelllinien wurde eine mittlere SF6 von 0,09 (SD: 0,04) bei einem CV von 49,1 % bestimmt. Bei einzelnen Zelllinien wie z.B. F23, F132, F152 und F153 schwanken die Einzelwerte der SF6 deutlich stärker. Die Variationskoeffizienten für diese Zelllinien betragen 60,4%, 67,7%, 51,1% bzw. 62,8%. Aufgrund dieser hohen intraindividuellen Schwankungen der Messwerte wurden diese Zellen von der weiteren Auswertung bezüglich der Koloniebildung nach Bestrahlung ausgeschlossen.

4.2.2.1. Zellzyklusbestimmung mittels FACS

Für die Experimente wurden ausschließlich Zellen in Konfluenz verwendet. Die Konfluenz wurde mittels lichtmikroskopischer Bewertung der Zellkultur festgestellt. Parallel zu den Kolonietests wurde die Zellzyklusverteilung im FACS quantifiziert.

Abbildung 3 zeigt exemplarisch ein DNA-Histogramm konfluenter Fibroblasten. Aufgetragen ist die Anzahl der Zellen gegen deren DNA-Gehalt. Nicht proliferierende

Zellen zeichnen sich durch einen einfachen DNA-Gehalt aus und bilden den so genannten G1-Peak, während Zellen in der G2-Phase den doppelten DNA-Gehalt aufweisen und als G2-Zellen einen zweiten Peak bilden. In dem in Abbildung 3 dargestellten Beispiel befinden sich mit 93,7% nahezu alle Zellen in der G1-Phase.

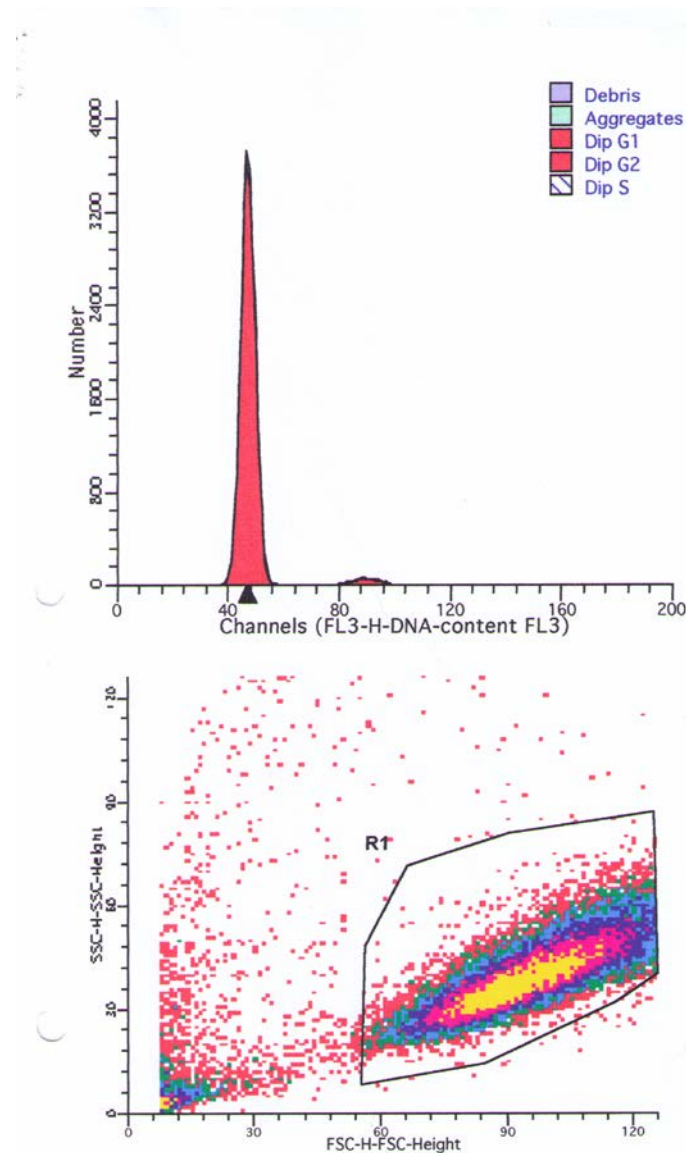


Abb. 3: DNA-Histogramm konfluente Fibroblasten (Zelllinie Hd50). Dargestellt ist die Anzahl der Zellen als Funktion ihres DNA-Gehaltes. Nicht proliferierende Zellen haben einen einfachen DNA-Gehalt, während Zellen in der G2-Phase einen doppelten DNA-Gehalt aufweisen.

Abbildung 4 stellt für die Gesamtheit der untersuchten Experimente ($n = 220$) den Anteil der Zellen in der G1-Phase dar. Der Mittelwert von 95,1 % bei einer Standardabweichung von 2,1 % dokumentiert eine hohe Konstanz bei der Verwendung nicht-proliferativ aktiver Zellpopulationen.

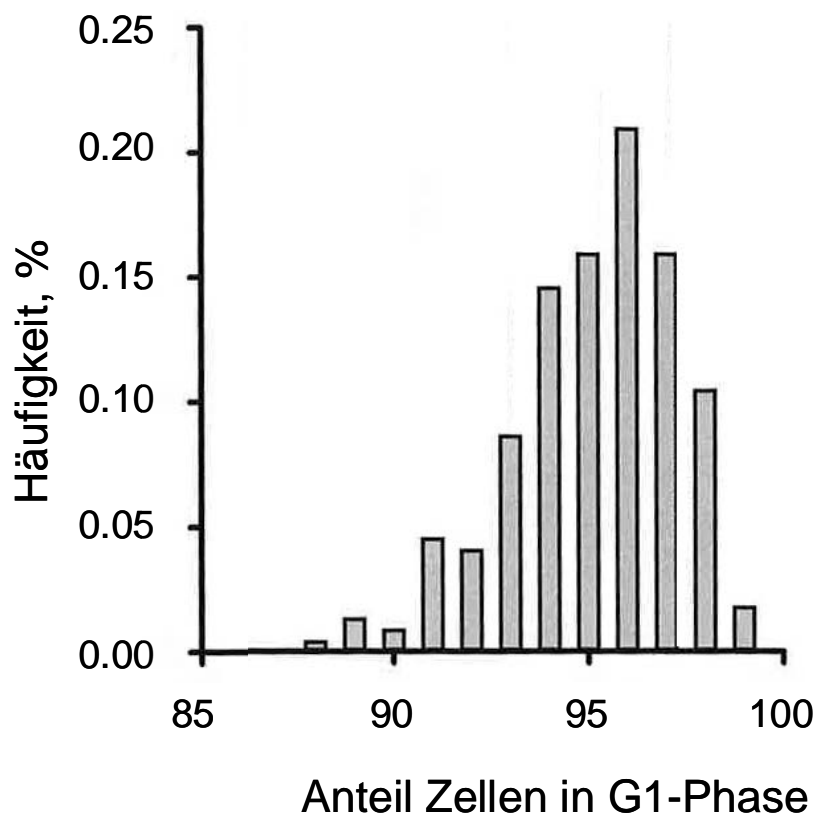


Abb. 4: Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase in Prozent in den untersuchten Zellkulturen.

4.2.2. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels residueller DNA-Doppelstrangbrüche

Als weiterer Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurde die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche bestimmt. Dies erfolgte durch immunhistochemischen Nachweis von γ H2AX-Foci jeweils 24 Stunden nach Bestrahlung. Zum Ausschluss von Zellzykluseffekten wurden spezifisch S- bzw. G2-Phasezellen mittels CENP-F angefärbt und diese von der mikroskopischen Auswertung ausgeschlossen. Zur weiteren Kontrolle wurde exemplarisch an fünf Zelllinien die Kolokalisation mit dem zellzyklusunabhängigen Reparaturprotein 53BP1 bestimmt.

4.2.2.1. Ausschluss von S-Phase-Zellen mittels CENP-F-Nachweis

Aufgrund der Tatsache, dass γ H2AX-Foci nicht nur im Zusammenhang mit DNA-Doppelstrangbrüchen, sondern auch in der S-Phase bzw. G2-Phase vermehrt

auftreten können, galt es sicherzustellen, dass ausschließlich doppelstrangbruchassoziierte γ H2AX-Foci ausgewertet werden. Bei der Auszählung der γ H2AX-Foci wurden deshalb S- bzw. G2-Phasezellen von der Auswertung ausgeschlossen. Dies wurde durch den immunhistochemischen Nachweis des S- und G2-Phase spezifischen Proteins CENP-F und den Ausschluss der CENP-F-positiven Zellkerne bei der Auszählung erreicht. In einer separaten Analyse wurde für einen Teil der Präparate die Anzahl der γ H2AX-Foci der CENP-F positiven Zellkerne bestimmt.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch jeweils eine CENP-F-positive und eine CENP-F-negative Zelle. Dabei ist zu erkennen, dass die CENP-F-positive Zelle im Fluoreszenzmikroskop gelb erscheint. Dadurch wird eine Unterscheidung von CENP-F-positiven und CENP-F-negativen Zellen ermöglicht.

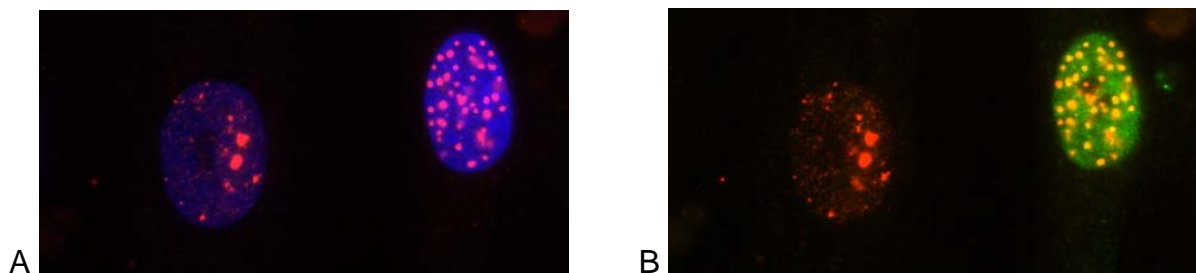


Abb. 5: Dargestellt sind exemplarisch zwei Zellkerne. Bei der rechten Zelle handelt es sich um eine CENP-F-positive Zelle, bei der linken um eine CENP-F-negative Zelle.

Abbildung 6 zeigt den Vergleich der Anzahl der γ H2AX-Foci von CENP-F-positiven bzw. CENP-F-negativen Zellkernen. Insgesamt wurden 7384 CENP-F-negative und 322 CENP-F-positive Zellkerne aller Zelllinien nach Bestrahlung mit 6 Gy ausgezählt. Die mittlere Anzahl an γ H2AX-Foci beträgt bei den CENP-F-negativen Zellkernen 8,16 Foci (SE=0,06). CENP-F-positive Zellkerne weisen dagegen im Mittel mit 22,5 (SE 0,6) deutlich mehr γ H2AX-Foci auf als CENP-F negative Zellen.

Die Verteilung der Foci reicht bei den CENP-F-positiven Zellen von 0 bis 48 Foci und bei den CENP-F-negativen von 0 bis 49 Foci pro Zellkern. Somit treten auch bei den CENP-F-negativen Zellen gelegentlich sehr viele γ H2AX-Foci auf, allerdings wesentlich seltener als bei den CENP-F positiven Zellen. Während die Anzahl der γ H2AX-Foci pro CENP-F-negativer Zelle wie erwartet einer Poissonverteilung folgt (M=8,16, SE 0,06), ist dies bei den CENP-F positiven Zellen nicht der Fall. Es deuten

sich drei Maxima bei etwa 10, 22 und 33 γ H2AX-Foci pro Zellkern an. Auf eine Anpassung der Daten wurde in diesem Fall verzichtet.

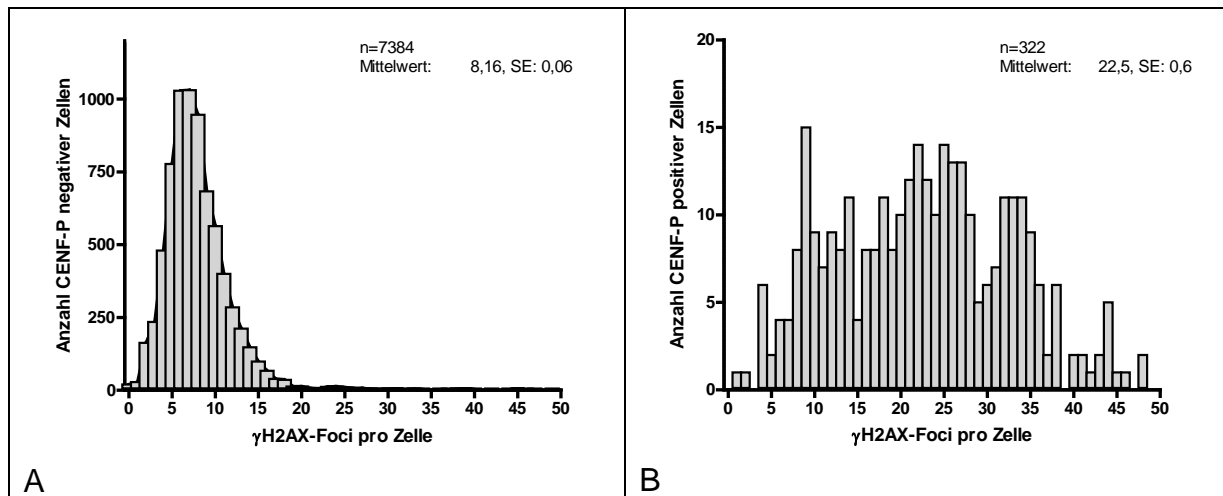


Abb. 6: Histogramm aller mit 6 Gy bestrahlten Zellen. Links sind die CENP-F-negativen, rechts die CENP-F-positiven Zellen dargestellt.

4.2.2.2. Ausschluss von nicht-reparaturassoziierten γ H2AX-Foci mittels Kolo-kalisation mit 53BP1

In Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen finden neben der Phosphorylierung des H2AX-Proteins eine Reihe weiterer typischer Umwandlungen bzw. Verlagerungen von Proteinen statt, die an der Prozessierung des DNA-Schadens beteiligt sind. Als weiteres Protein ist 53BP1 an der Prozessierung des Doppelstrangbruchs beteiligt. Es kann mittels geeigneter Antikörper dargestellt werden. Um die Frage zu klären, ob für das verwendete zelluläre System der Nachweis von γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci zu gleichwertigen Ergebnissen führt oder ob eventuell residuelle Doppelstrangbrüche in konfluenten Fibroblasten durch die verschiedenen reparaturassoziierten Proteine unterschiedlich quantifiziert werden, wurde exemplarisch an fünf Zelllinien der Nachweis von γ H2AX und 53BP1 in Kolo-kalisation durchgeführt. Dazu wurden nach Bestrahlung mit 0 Gy, 1 Gy und 6 Gy die Zellen mit beiden Antikörpern gefärbt und von jeweils 100 Zellkernen die Anzahl an γ H2AX- bzw. 53BP1-Foci ausgezählt. Abbildung 7 zeigt das morphologische Bild eines Fibroblastenzellkerns 24 Stunden nach Bestrahlung mit 6 Gy. Im mittleren Teil der Abbildung ist die Akkumulation von γ H2AX in insgesamt 8 Foci zu erkennen, der rechte Teil der Abbildung zeigt die grüne Fluoreszenz der selben Zelle und verdeutlicht, dass eine Akkumulation des γ H2AX-Antikörpers in der Regel von der des 53BP1-Antikörpers begleitet wird.

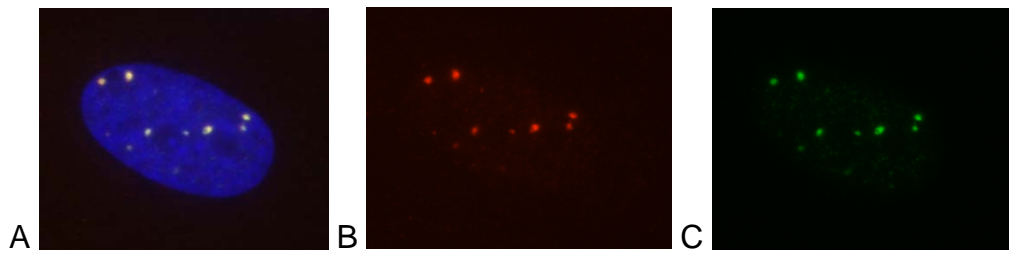


Abb. 7: γ H2AX-Foci (B) und 53BP1-Foci (C) einer Zelle.

Zur Quantifizierung dieser Koloalisation wird in Abbildung 8 die Anzahl an γ H2AX-Foci gegen die Anzahl an 53BP1-Foci aufgetragen. Es zeigt sich eine nahezu ideale lineare Korrelation mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2=0,999$ ($p=<0,0001$).

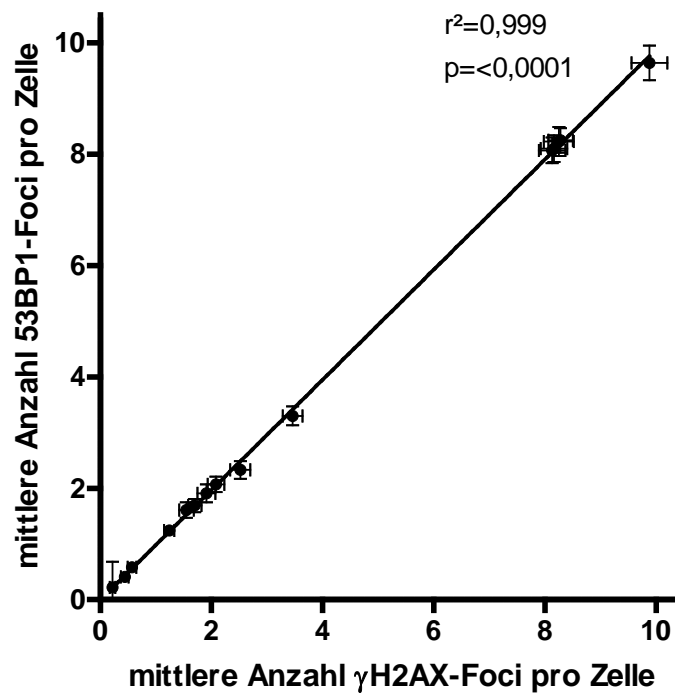


Abb. 8: Korrelation der mittleren Anzahl an γ H2AX-Foci und 53BP1-Foci für 5 Zelllinien nach 0, 1 und 6 Gy.

4.2.2.3. Nachweis residueller γ H2AX-Foci nach Bestrahlung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit der Fibroblasten mittels residueller γ H2AX-Foci dargestellt.

Abbildung 9 vergleicht exemplarisch das mikroskopische Bild zweier bestrahlter (links) sowie zweier unbestrahlter Zellen (rechts). Während unbestrahlte Zellen nur vereinzelt spontane γ H2AX-Foci aufweisen, lässt sich nach Bestrahlung die Akkumulation des phosphorylierten H2AX in Form distinkter Foci beobachten. In dem dargestellten Beispiel lassen sich 9 bzw. 11 γ H2AX-Foci auszählen.

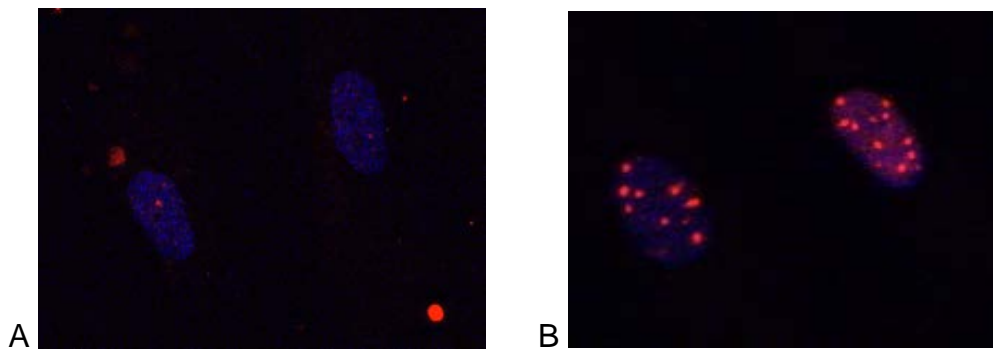


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis von γ H2AX in unbestrahlten Fibroblasten (A), sowie 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 6 Gy (B).

Abbildung 10 zeigt am Beispiel der Zelllinie F162 die Anzahl residueller γ H2AX-Foci nach 0 Gy (A) bzw. 6 Gy (B). Die Ergebnisse sind in Form eines Histogramms als Anzahl der Foci pro Zellkern dargestellt. Unbehandelte Zellen können in geringem Ausmaß spontane γ H2AX-Foci aufweisen, in diesem Fall 0,28 Foci pro Zelle (SE: 0,03). Nach Bestrahlung nimmt die Anzahl residueller γ H2AX-Foci deutlich zu, in dem dargestellten Beispiel sind dies bis zu 49 Foci pro Zelle. Die Häufigkeitsverteilung folgt dabei wie erwartet einer Poisson-Verteilung. Für den Vergleich der residuellen γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy wird im weiteren der numerische Mittelwert der Verteilung jeder Zelllinie nach Korrektur durch die jeweilige Anzahl spontaner γ H2AX-Foci verwendet. Im dargestellten Beispiel sind dies $8,78 - 0,28 = 8,5$ Foci (SE 0,40).

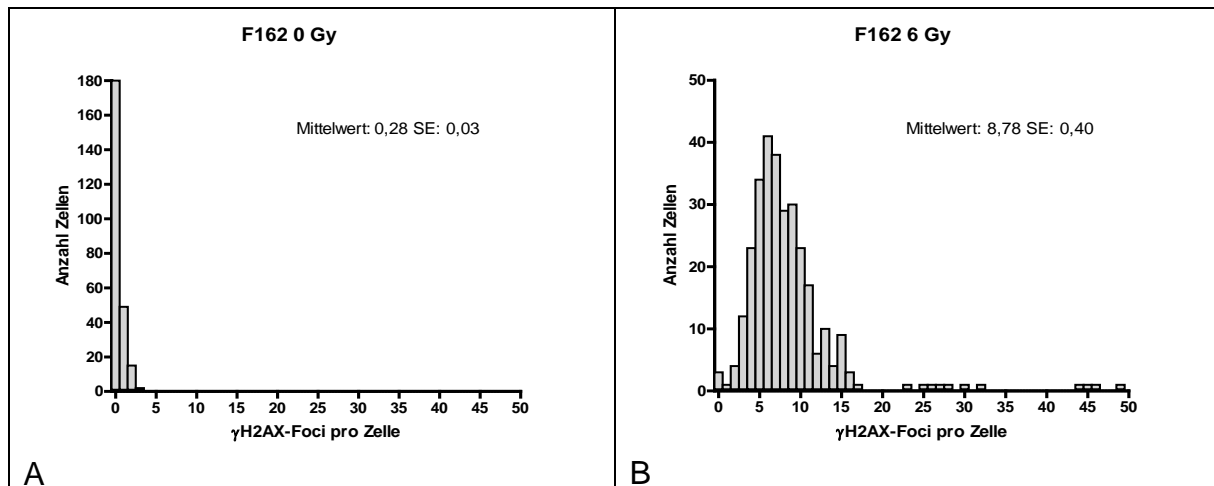


Abb. 10: Beispiel für ein γ H2AX-Foci Histogramm der Zelllinie F162. Rechts ist die mit 6 Gy bestrahlte Probe, links die unbestrahlte Kontrolle abgebildet. Aufgetragen ist die Anzahl der γ H2AX-Foci gegen die Anzahl der Zellen.

In Abbildung 11 ist für einen Teil der untersuchten Zelllinien die dosisabhängige Zunahme residueller γ H2AX-Foci dargestellt. Insgesamt wurde für 14 der 17 Zelllinien die mittlere Anzahl residueller DSB im Dosisbereich zwischen 0 Gy und 8 Gy bestimmt. Die unbestrahlte Probe wurde identisch zu den bestrahlten Proben behandelt. Vereinzelt konnte aufgrund von Infektionen ein Präparat nicht ausgewertet werden. So konnte für die Zelllinie F180 die Anzahl der Foci pro Zellkern nach Bestrahlung mit 4 Gy nicht bestimmt werden. Nach Bestrahlung mit 8 Gy werden maximale Mittelwerte von 14,42 pro Zellkern nachgewiesen. In allen Fällen lassen sich die Datenpunkte mittels linearer Regression beschreiben, wobei Regressionskoeffizienten von 0,95 bis 0,99 erreicht werden. Zur Veranschaulichung der individuellen Unterschiede sind in Panel O die Regressionsgeraden aller Zelllinien zusammengefasst dargestellt.

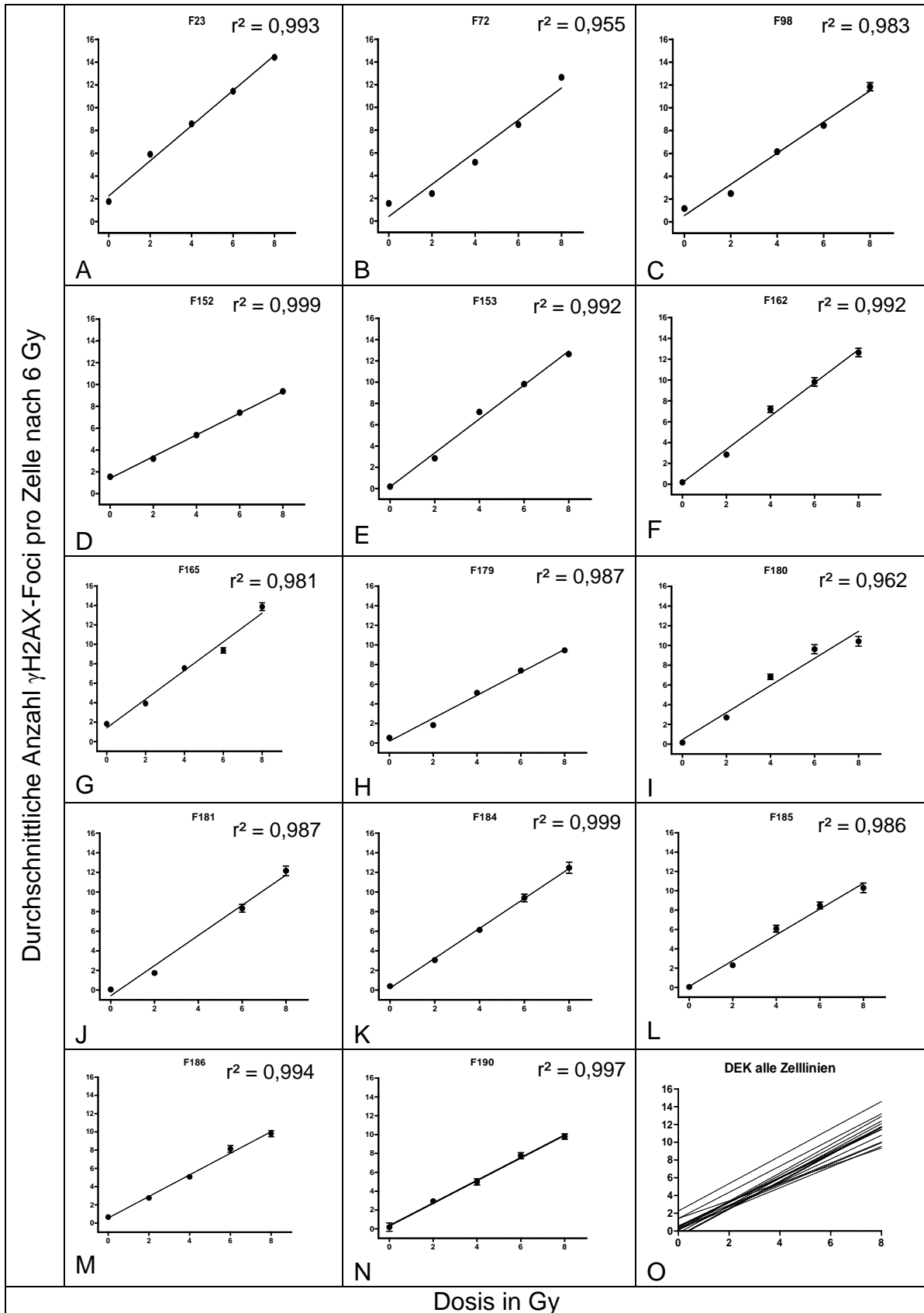


Abb. 11: Anzahl der residuellen DSB als Funktion der Dosis für 14 der untersuchten Fibroblastenlinien. Panel A – O zeigen die Mittelwerte + SE an γ H2AX-Foci, sowie die Anpassung der Daten mittels linearer Regression (Linie).

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse aller Zelllinien aus Abbildung 11 zusammengefasst. Pro Dosispunkt wird der Mittelwert aller Zelllinien dargestellt. Dieser nimmt von 2,89 (SE=0,06) nach 2 Gy über 6,15 (SE=0,08) nach 4 Gy bis zu 8,57 (SE=0,09) nach 6 Gy zu. Mit einem Regressionskoeffizienten von 0,997 besteht eine nahezu ideale lineare Korrelation ($p < 0,0001$).

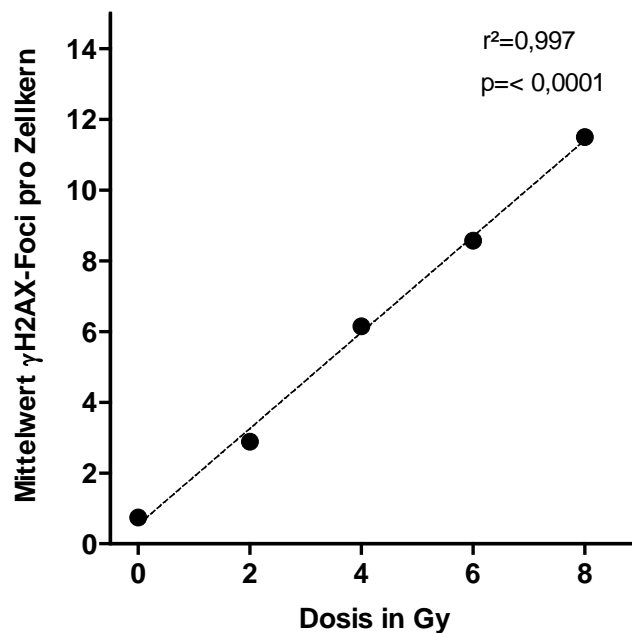


Abb. 12: Zusammenfassende Darstellung der in Abbildung 11 dargestellten Daten. Pro Dosispunkt ist jeweils der Mittelwert aller Zelllinien dargestellt.

Während Abbildung 12 den generellen Anstieg an residuellen γ H2AX-Foci mit der Dosis für alle Fibroblastenzelllinien dokumentiert, wird in Abbildung 13 für jede untersuchte Zelllinie der Mittelwert residueller γ H2AX-Foci nach 6 Gy dargestellt. Die Bestimmung erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten. Es wurden Werte von minimal 6,15 Foci (SE=0,15) für die Zelllinie F132 bis maximal 9,35 Foci (SE=0,20) für die Zelllinie HD50 bestimmt. Es sei darauf hingewiesen, dass die Zelllinien F23, F132, F152 und F153, welche bezüglich des klonogenen Überlebens große intraindividuelle Schwankungen zeigten (Tab 1), keine auffällig hohen Schwankungen bezüglich residueller γ H2AX-Foci aufweisen.

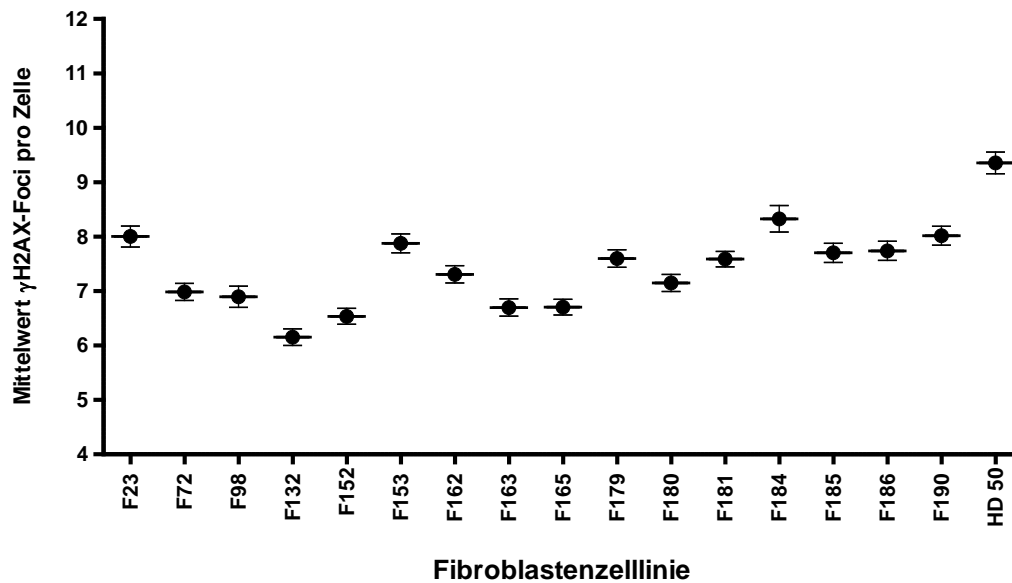


Abb. 13: Residuelle γ H2AX-Foci aller untersuchten Fibroblastenzelllinien nach 6 Gy. Abgebildet ist für jede Zelllinie der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2.4. Vergleich von Überlebensrate und residuellen γ H2AX-Foci als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit

Zur Beantwortung der Frage, ob die beiden Endpunkte SF6 und γ H2AX-Foci gleichwertige Ergebnisse liefern, wurden im Folgenden die Ergebnisse der beiden experimentellen Methoden zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit verglichen. Abbildung 14 zeigt den Mittelwert residueller γ H2AX-Foci in Abhängigkeit der Überlebensrate jeweils nach Bestrahlung mit 6 Gy (SF6) sowie eine mittels linearer Regression ermittelten Anpassung an die Daten. Für die Auswertung wurden 13 Zelllinien berücksichtigt (siehe Tabelle 1). Es zeigt sich eine deutliche Korrelation beider Parameter: Geringe Überlebensraten sind mit hohen Mittelwerten residueller γ H2AX-Foci korreliert und vice versa. Die Güte der Korrelation wird durch einen Korrelationskoeffizienten von 0,431 deutlich und erreicht mit einem p-Wert von 0,015 statistische Signifikanz.

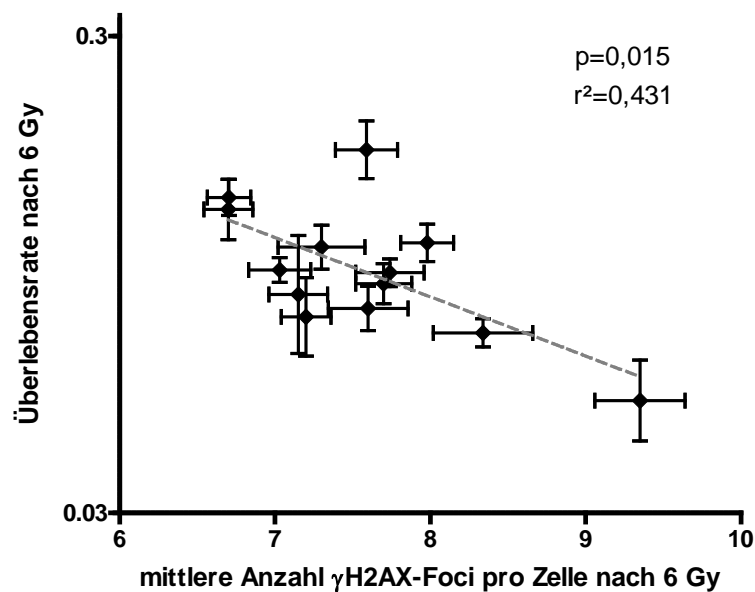


Abb. 14: Korrelation der beiden zur Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit verwendeten Parameter. Aufgetragen ist die Überlebensrate nach 6 Gy in Abhängigkeit von der mittleren Anzahl an γ H2AX-Foci nach 6 Gy. Aufgetragen ist für jede Zelllinie der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.2.3. Bestimmung der basalen TGF β 1-Proteinkonzentration

Die basale TGF β 1-Proteinexpression wurde mittels ELISA im Medium unbestrahlter Zellkulturen bestimmt. Dies erfolgte pro Zelllinie in biologischer Dreifachbestimmung von jeweils zwei Passagen. Zusätzlich wurde eine technische Doppelbestimmung durchgeführt. Lediglich bei einer Passage der Zelllinie F132 erfolgte eine Einfachbestimmung. Die TGF β 1-Konzentration im Medium wurde anhand der entsprechenden Zellzahl der individuellen Probe normiert und wird als TGF β 1-Konzentration in pg pro 10^6 Zellen angegeben.

Abbildung 15 zeigt die ermittelte TGF β 1-Konzentration im Medium für die verschiedenen Zelllinien in pg pro 10^6 Zellen. Dabei sind erhebliche Unterschiede zwischen den Zelllinien zu erkennen. Die höchste TGF β 1-Expression weist die Zelllinie F72 mit 25,35 pg/ 10^6 (SE=7,31) Zellen auf. Die geringste TGF β 1-Expression zeigte die Zelllinie F184 mit Werten von 5,10 pg/ 10^6 Zellen (SE=0,33). Einige Zelllinien, wie z.B. F72 und F162, weisen große Streuungen der einzelnen Messwerte auf. Die Werte variieren zum Teil um eine Dekade.

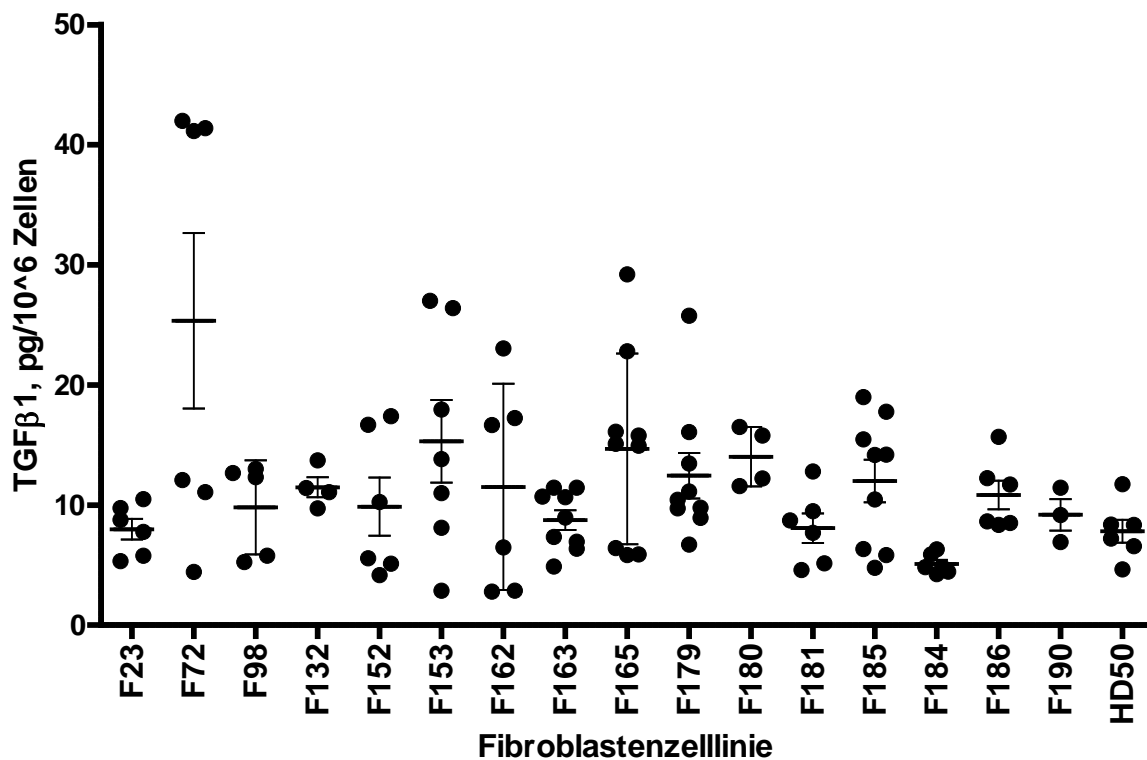


Abb. 15: Abgebildet ist die TGFβ1-Proteinkonzentration im Medium der untersuchten Zelllinien. Die Bestimmung erfolgte mittels ELISA in technischer und biologischer Mehrfachbestimmung.

4.2.4. TGFβ1-Proteinexpression und zelluläre Strahlenempfindlichkeit in vitro

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von der basalen TGFβ1-Proteinkonzentration in vitro beeinflusst wird, wurden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Überlebensrate nach 6 Gy mit denen der TGFβ1-Proteinexpression assoziiert (Abbildung 16). Für die Auswertung wurden 13 Zelllinien berücksichtigt (siehe Tabelle 1). Beide Parameter zeigen sich bei einem Regressionskoeffizient von $<0,0001$ voneinander unabhängig ($p=0,992$).

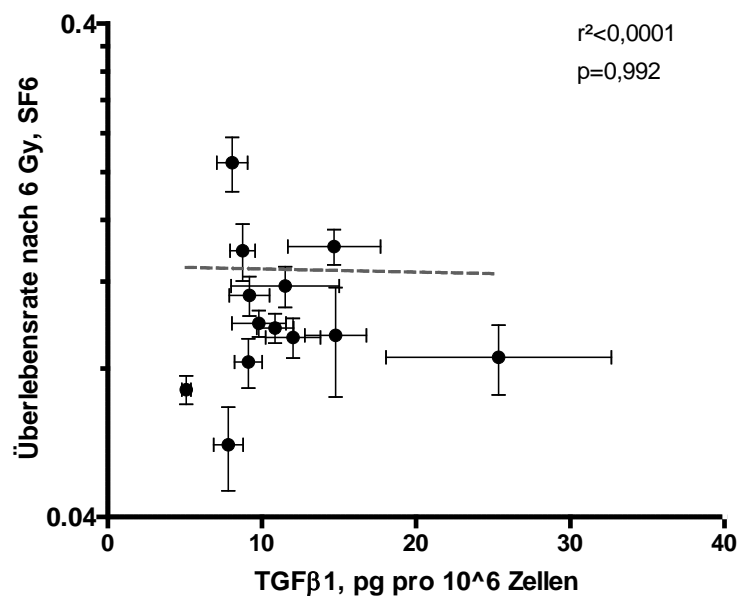


Abb. 16: Die basale TGFβ1-Proteinexpression in pg pro 10⁶ Zellen als Funktion der Überlebensrate nach 6 Gy, sowie die Regressionsgerade. In die Auswertung wurden 13 der 17 Zelllinien einbezogen (Siehe Tab. 1).

Ein entsprechendes Ergebnis zeigt Abbildung 17, in welcher als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit die mittlere Anzahl residueller γH2AX-Foci als Funktion der TGFβ1-Proteinkonzentration aufgetragen ist. Für die Auswertung wurden alle 17 Zelllinien berücksichtigt, da für die vier in 4.1.1. genannten Zelllinien die bei der Bestimmung der SF6 aufgetretenen Schwankungen bei der Bestimmung der γH2AX-Foci nicht zu beobachten waren. Analog zu Abbildung 16 besteht auch hier keine statistisch signifikante Korrelation beider Parameter ($r^2=0,299$; $p=0,179$).

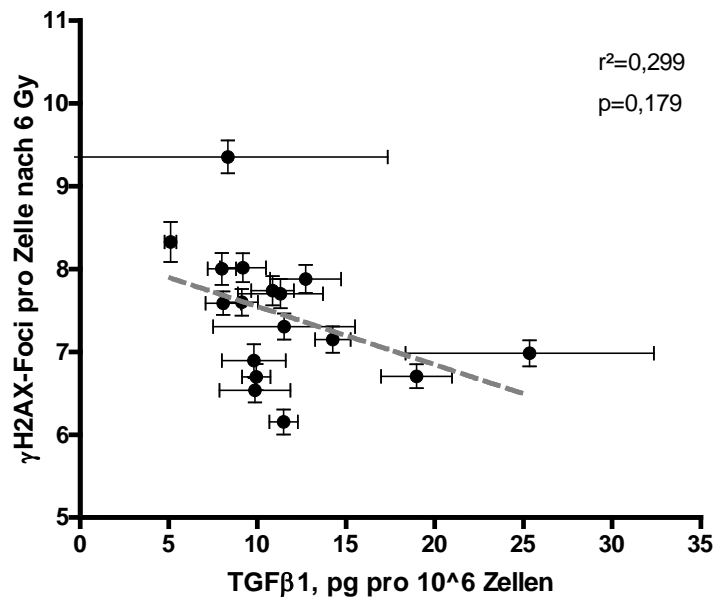


Abb. 17: Die basale TGFβ1-Proteinexpression als Funktion der residuellen γH2AX-Foci nach 6 Gy. Den Ergebnissen liegen sowohl technische als auch biologische Mehrfachbestimmungen zugrunde.

4.2.5. Einfluss der basalen TGFB1-Genexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten.

Die TGFB1-Genexpression wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR für alle 17 Zelllinien in biologischer Doppelbestimmung und technischer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die zur Auswertung verwendeten Ct-Werte wurden anhand des linearen Anstiegs der Amplifikationskurve bestimmt. Zusätzlich wurde jeweils der korrespondierende Ct-Wert einer biologischen Kontrolle (18S) zur Korrektur herangezogen. Der resultierende Wert wird als ΔCt angegeben und drückt den Unterschied der Genexpression zwischen den verschiedenen Zelllinien aus.

Abbildung 18 zeigt die TGFB1-Genexpression der untersuchten 17 Zelllinien. Die ΔCt -Werte schwanken zwischen 13,53 bei der Zelllinie F179 und 14,90 für die Zelllinie HD50.

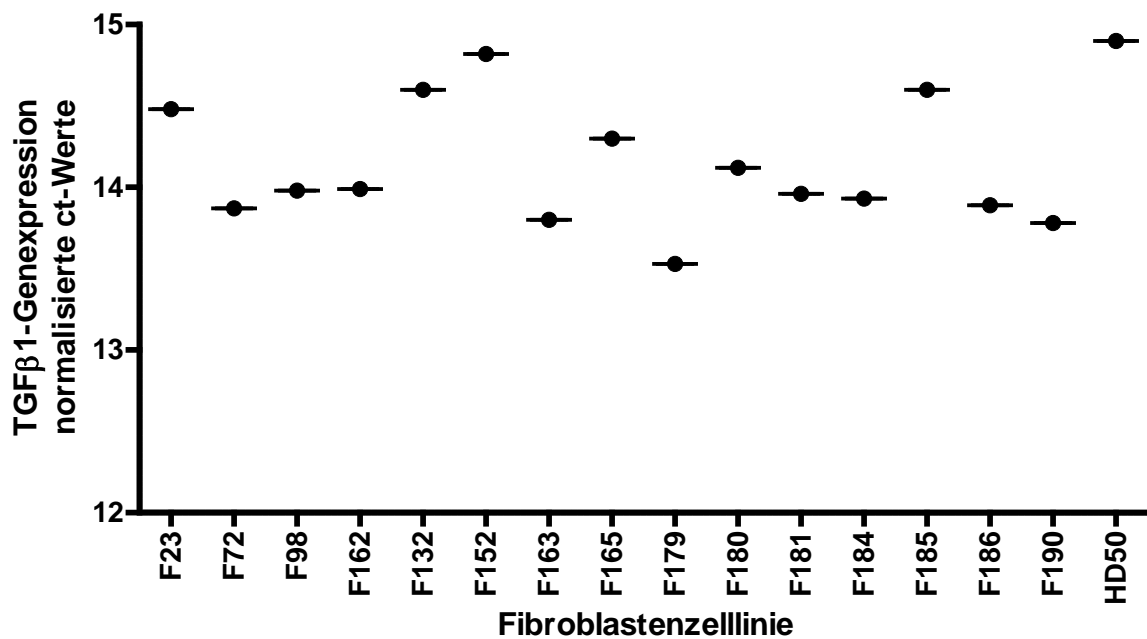


Abb. 18: TGFβ1-Genexpression der untersuchten Zelllinien. Die Werte wurden gegen eine biologische Kontrolle (18S) normalisiert. Die Genexpression wurde an Zellen unbestrahlter Zellkulturen bestimmt.

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen TGFβ1-Genexpression und zellulärer Strahlenempfindlichkeit untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt, in welcher die TGFβ1-Genexpression als Funktion der Überlebensrate nach 6 Gy abgebildet ist. In die Auswertung wurden 13 Zelllinien (siehe Tabelle 1) einbezogen. Die Daten wurden mittels linearer Regression angepasst. Es zeigt sich eine geringfügige Abnahme der Überlebensrate mit zunehmender TGFβ1-Genexpression. Diese ist jedoch mit einem Regressionskoeffizienten von 0,055 bei einem p-Wert von 0,443 statistisch nicht signifikant.

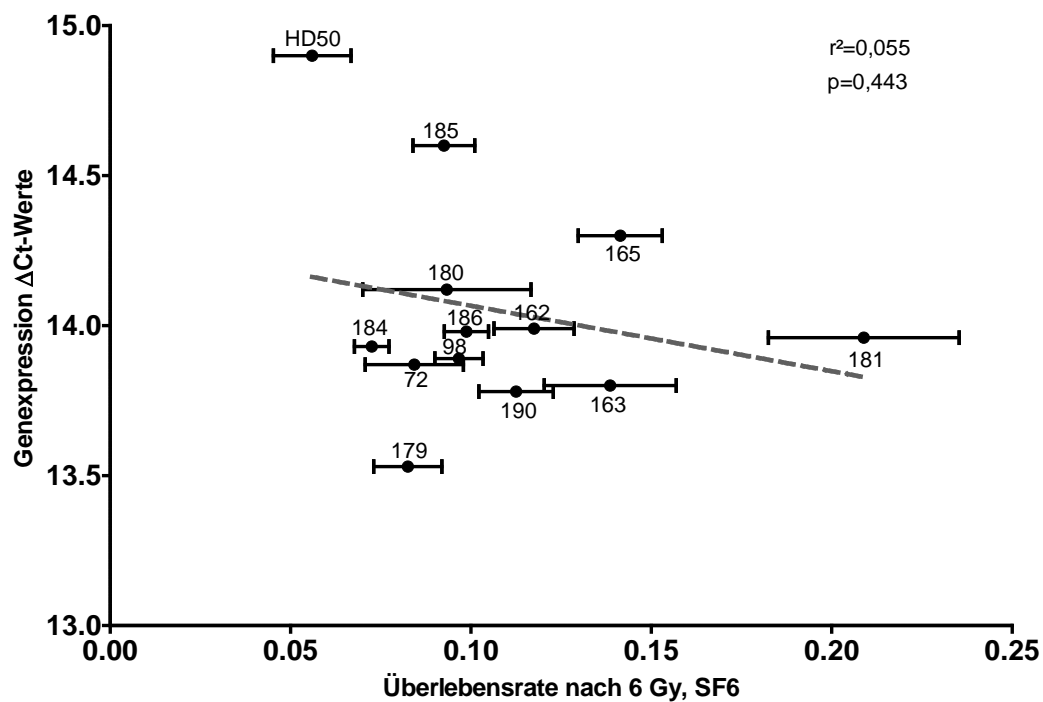


Abb. 19: Abgebildet ist die TGFB1-Genexpression als Funktion der Überlebensrate nach 6 Gy für 13 der untersuchten Zelllinien. Die Genexpression ist in Form des Δ Ct-Wertes abgebildet.

In Ergänzung zur Überlebensrate wurde als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit die Anzahl residueller γ H2AX-Foci bestimmt. Abbildung 20 zeigt analog zu Abbildung 19 die mittlere Anzahl residueller γ H2AX-Foci als Funktion der TGFB1-Genexpression. Wie schon für den Endpunkt der Überlebensrate nach 6 Gy besteht auch in diesem Fall bei einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,008$ keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Genexpression und zellulärer Strahlenempfindlichkeit ($p=0,729$).

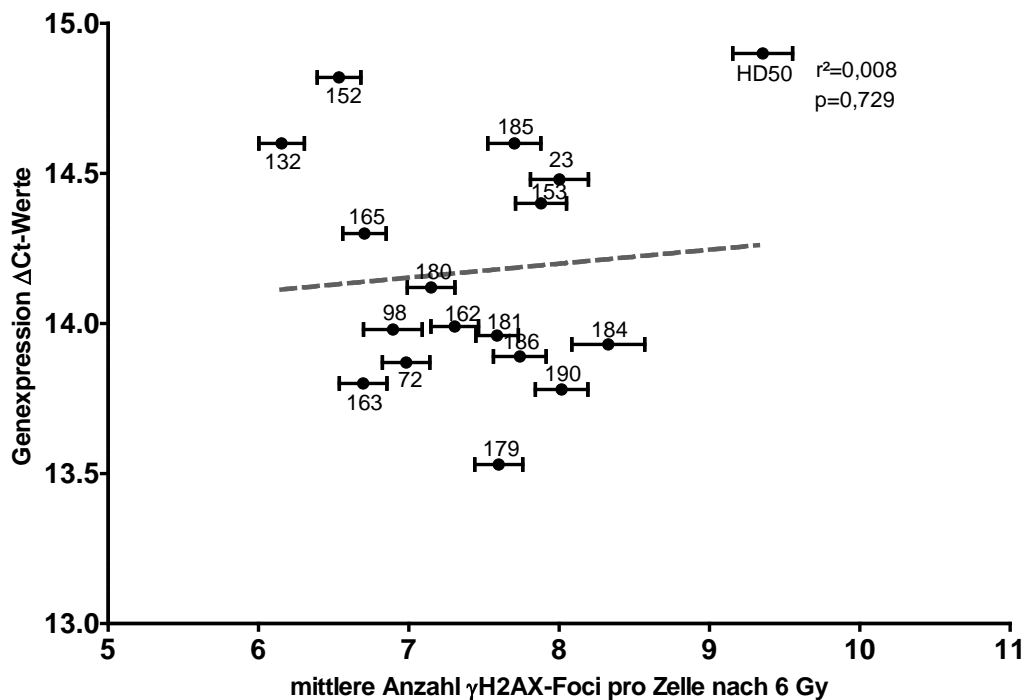


Abb. 20: Dargestellt ist die TGFB1-Genexpression als Funktion der residuellen γ H2AX-Foci nach 6 Gy. Es wurden alle 17 Zelllinien in die Auswertung mit einbezogen.

4.2.6. Einfluss der TGFB1-Rezeptor-Genexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten

Zur Klärung der Frage, ob neben dem TGF β 1-Protein auch der TGF β 1-Signalweg an der individuellen Ausprägung der zellulären Strahlenempfindlichkeit beteiligt ist, wurde der Zusammenhang zwischen SF6 bzw. residuellen γ H2AX-Foci und der Genexpression der an der Vermittlung des TGF β 1-Signal beteiligten Rezeptoren TGFBR1 und TGFBR2 untersucht. Es wurde jeweils eine biologische Doppelbestimmung und technische Dreifachbestimmung durchgeführt. Vier der insgesamt 17 Zelllinien wurden bezüglich der Überlebensrate von der Analyse ausgeschlossen (siehe Tabelle 1).

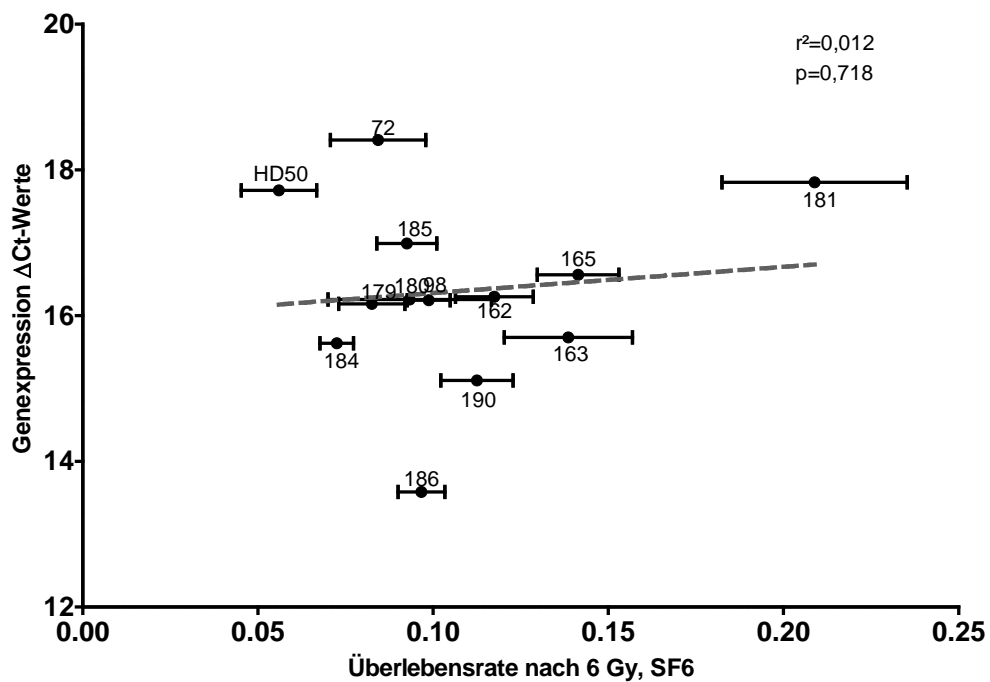


Abb. 21: TGFB1-Rezeptor 1-Genexpression als Funktion der Überlebensrate nach 6 Gy für die untersuchten Zelllinien. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte auch hier an unbestrahlten Fibroblasten mittels Real-Time-PCR.

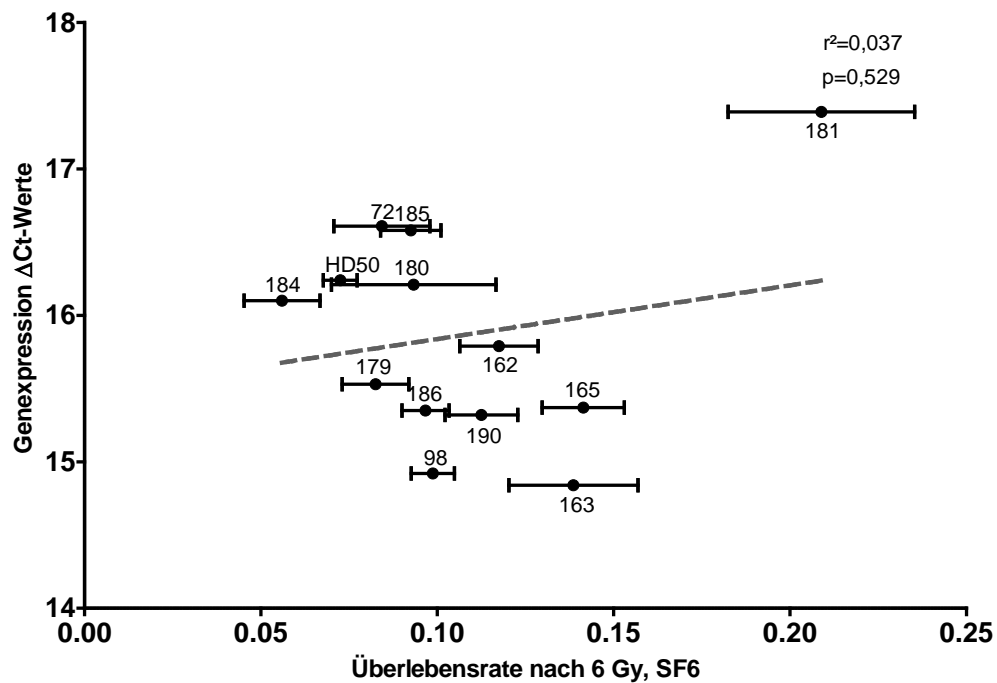


Abb. 22: TGFB1-Rezeptor 2-Genexpression als Funktion der Überlebensrate nach 6 Gy. Abgebildet sind 13 der 17 Zelllinien.

Die Ergebnisse sind in Abbildungen 21 bis 24 dargestellt. In keinem Fall ist ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Endpunkten nachzuweisen.

Die Korrelationskoeffizienten betragen 0,012 für die Assoziation von Rezeptor 1 bzw. 0,037 für Rezeptor 2 mit der Überlebensrate nach 6 Gy ($p=0,718$ bzw. $0,529$) und $<0,001$ bzw. $0,031$ für die Assoziation der Rezeptoren mit den residuellen γ H2AX-Foci ($p=0,972$ bzw. $0,500$).

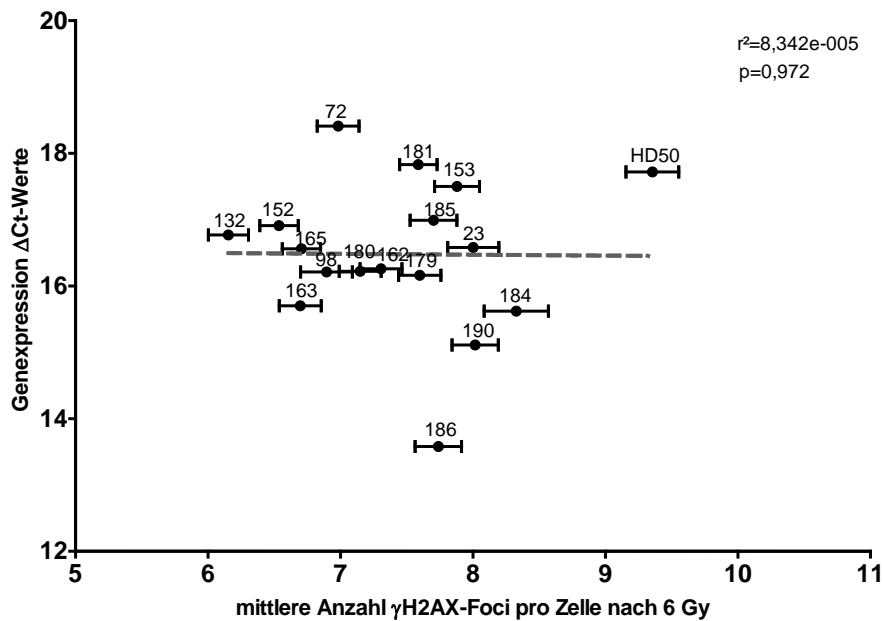


Abb. 23: TGFBR1-Rezeptor 1-Genexpression als Funktion der mittleren Anzahl residueller γ H2AX-Foci nach 6 Gy.

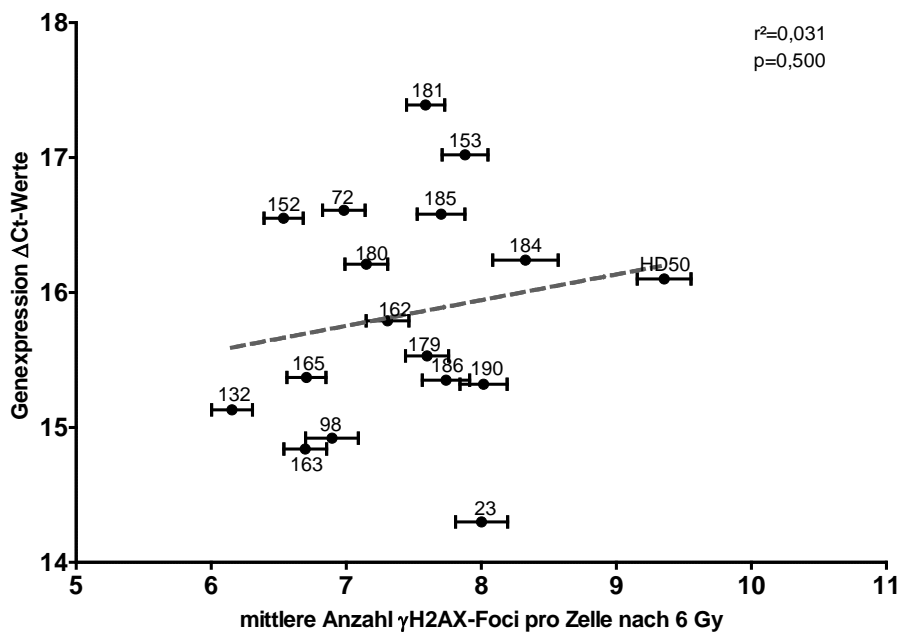


Abb. 24: TGFBR2-Rezeptor 2-Genexpression als Funktion der mittleren Anzahl residueller γ H2AX-Foci nach 6 Gy für alle 17 untersuchten Zelllinien.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht u.a. den Zusammenhang zwischen der basalen Gen- bzw. der Proteinexpression des Zytokins TGF β 1 und der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit von humanen Fibroblasten.

Das verwendete experimentelle System ermöglicht die systematische Untersuchung der Assoziation von TGF β 1-Gen- bzw. Proteinexpression und der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit. Dies wird ermöglicht durch die Kombination etablierter Verfahren wie z.B. dem Koloniebildungstest zur Quantifizierung des zellulären Überlebens *in vitro* und kommerziell verfügbaren Assays zur quantitativen Bestimmung von Protein mittels ELISA bzw. der Genexpression mittels Real-Time-PCR.

Die als Testzellen verwendeten Fibroblasten zeichnen sich *in vitro* durch Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit aus, welche die Variationen der individuellen Strahlenempfindlichkeit widerspiegeln. In Kultur sezernieren die Zellen das Protein TGF β 1, welches im Zellkulturmedium nachgewiesen werden kann. Es muss davon ausgegangen werden, dass die resultierende Proteinkonzentration *in vitro* sowohl von der Genexpression als auch von der Proteinsyntheseleistung der untersuchten Zelllinie determiniert wird. Somit sind das gewählte experimentelle System und die definierten Endpunkte optimal zur Untersuchung der Fragestellung geeignet.

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden bestimmt: neben dem als Goldstandard geltenden Verfahren des Koloniebildungstests, welcher die strahleninduzierte Reduktion der zellulären Klonogenität quantifiziert, wurden mit Hilfe der γ H2AX-Foci-Färbung residuelle Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung bestimmt.

Neben dem Vorhandensein des TGF β 1-Proteins ist für den biologischen Effekt auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit auch der Ablauf der entsprechenden Signalkaskade essentiell. Daher wurde neben der Quantifizierung der TGF β 1-Genexpression bzw. der TGF β 1-Proteinkonzentration auch die Genexpression der TGF β 1-Rezeptoren 1 und 2 als initiale Komponenten der Signalkaskade quantifiziert.

Im Folgenden sollen zunächst die methodischen Aspekte der Arbeit, die gewählten Methoden und Endpunkte diskutiert werden und abschließend die Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs von zellulärer Strahlenempfindlichkeit und TGF β 1-/R1-/R2-Protein- bzw. Genexpression diskutiert werden.

5.1. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Koloniebildungsassay

Bereits vor einigen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass Fibroblasten unterschiedlicher Individuen sich hinsichtlich ihrer zellulären Strahlenempfindlichkeit unterscheiden (Geara et al. 1992a; Little et al. 1988; Nagasawa and Little 1988) und dass diese Unterschiede aufgrund der Korrelation der *in vitro* Strahlenempfindlichkeit mit späten Normalgewebereaktionen (Burnet et al. 1994; Geara et al. 1992b) klinisch relevant sind. Somit besteht großes Interesse an der Identifikation derjenigen Faktoren, welche die Strahlenempfindlichkeit eines Individuums determinieren. Ziel ist es, diese als potentielle Marker für die Prädiktion von Normalgewebereaktionen nach Strahlentherapie verwenden zu können. Aufgrund des nachgewiesenen Zusammenhangs zwischen zellulärer und klinischer Strahlenempfindlichkeit (Borgmann et al. 2008; Burnet et al. 1994; Hoeller et al. 2003) wurde im Rahmen der vorliegenden Experimente die zelluläre Strahlenempfindlichkeit mittels Koloniebildungsassay bestimmt. Zusätzlich wurde überprüft, inwieweit die Methode des immunhistochemischen Nachweises residueller Doppelstrangbrüche als Surrogatmarker der zellulären Strahlenempfindlichkeit geeignet ist. Zur Sicherstellung einer höchstmöglichen Qualität der Ergebnisse wurden dabei folgende methodischen Anforderungen berücksichtigt:

1. Beschränkung der Auswertung auf konfluente, d.h. nicht proliferativ aktive Fibroblasten. Dies wurde durch die Verwendung ausschließlich konfluenter Zellkulturen erreicht. Die Konfluenz wurde mittels Zellzyklusanalyse bestätigt. Darüber hinaus wurden Zellen in der G2-Phase von der mikroskopischen Auswertung mittels geeigneter Antikörperfärbung ausgeschlossen.
2. Bestimmung der Überlebensrate nicht nur nach einer einzelnen Testdosis, sondern über einen Dosisbereich von bis zu acht Gy in Form kompletter Dosis-Effekt-Kurven. Diese liefern neben Informationen zur Überlebensrate nach 6 Gy auch Informationen über den gesamten Verlauf der Dosis-Effekt-

Kurve. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der strahlenbiologisch relevanten Parameter α und β unter Verwendung des linear-quadratischen Modells.

3. Vergleich der zum Nachweis residueller Doppelstrangbrüche verwendeten Antikörper gegen die Proteine γ H2AX bzw. 53BP1.

5.1.1. Zellzyklusanalyse mittels FACS

Zur Gewährleistung, dass die untersuchten Zellen möglichst wenig proliferativ aktiv sind, wurden im experimentellen Ablauf die Fibroblasten zunächst in Konfluenz gebracht, d.h. vor der Bestrahlung solange in Zellkultur gehalten, bis durch Kontaktinhibition der Zellen deren Proliferation verhindert wird. Das Ausmaß der Konfluenz wurde zunächst lichtmikroskopisch durch Einschätzung der Zelldichte bestimmt und mittels flusszytometrischer Bestimmung verifiziert, indem der Anteil der Zellen in der G1-Phase quantifiziert wurde. Dieser war bei einem Mittelwert von 95.1% (SD: 2.1) konstant hoch. Somit kann ein störender Einfluss von proliferierenden Zellen auf das Ergebnis der Koloniebildungsrate ausgeschlossen werden.

5.1.2. Dosis-Effekt-Kurven

Wie die Ergebnisse in Abbildung 1 zeigen, lässt sich in allen Fällen die Abnahme der Überlebensrate mit der Dosis linear-quadratisch anpassen. Mit Regressionskoeffizienten zwischen 0,90 und 1,00 wurde dabei eine außerordentlich hohe Güte an Übereinstimmung zwischen den Datenpunkten und der mathematischen Anpassung erreicht. Im Vergleich zu früheren Arbeiten (Borgmann et al. 2004; Dikomey et al. 2000) ist festzustellen, dass generell der linear-quadratische Verlauf der Dosis-Effekt-Beziehungen bestätigt wird. Es bestehen jedoch Unterschiede bezüglich der Form der Dosis-Effekt-Kurve: Einige Zelllinien zeigen eine nahezu exponentiell verlaufende Dosis-Effekt-Kurve (Abb. 1 Panel: A). Andere Dosis-Effekt-Kurven zeichnen sich durch eine geringe Krümmung aus. Diese wird in dem linear-quadratischen Formalismus durch die quadratische β -Komponente beschrieben, die für die 14 Zelllinien in dem Bereich von 0,001 bis 0,05 Gy² liegt.

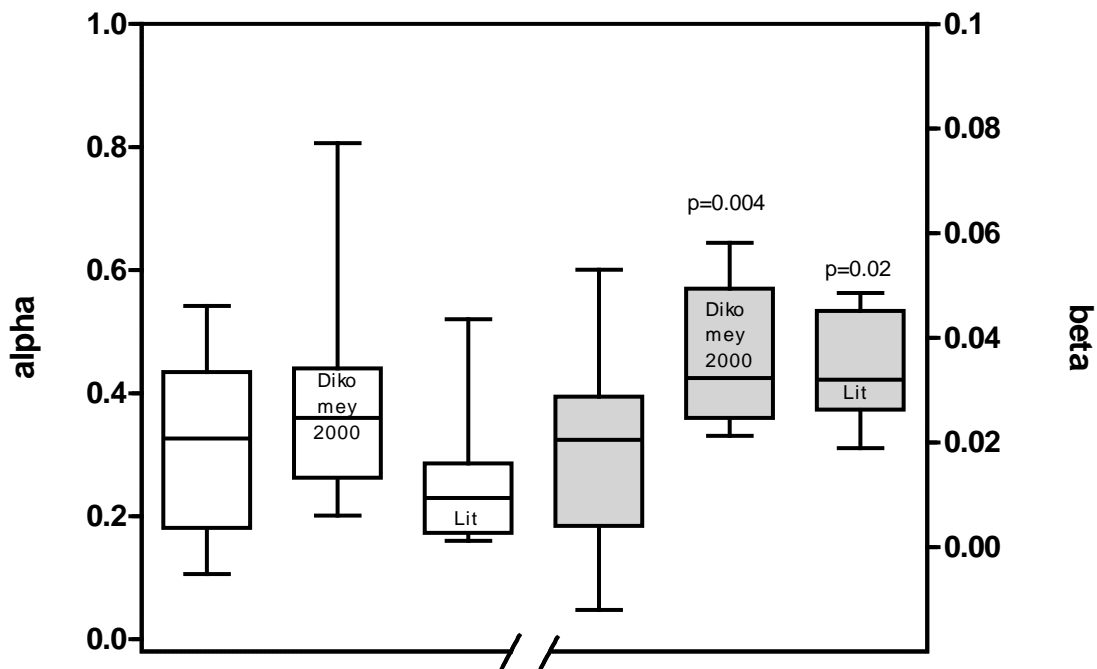


Abb. 25: Vergleich der α - und β -Werte der Experimente mit Ergebnissen von Dikomey et al. und Werten aus der Literatur.

In Abbildung 25 werden die α - (weiße Balken) und β -Werte (graue Balken) der eigenen Untersuchung mit früheren Daten der Arbeitsgruppe (Dikomey et al. 2000) und Werten aus der Literatur (Alsbeih et al. 1995; Deschavanne et al. 1980; Malaise et al. 1989; Raaphorst and Feeley 1990) gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt eine relativ gute Übereinstimmung der α -Komponente, während die quadratische β -Komponente in der vorliegenden Arbeit statistisch signifikant verringert ($p=0,02$ bzw. $0,004$) ist. Ob es sich dabei um einen Zufallsbefund handelt und somit um ein Charakteristikum des untersuchten Spenderkollektiv, oder ob diese Beobachtung auf biologisch-funktionellen Unterschieden in der Erholungskapazität der Zellen beruht, kann gegenwärtig nicht abschließend geklärt werden. Es muss auch berücksichtigt werden, dass die Bestimmung der quadratischen Komponente besonders bei Dosis-Effekt-Kurven mit überwiegend linearer Komponente relativ unsicher ist, da diese insbesondere vom Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve im Bereich hoher Dosen bestimmt wird, welche methodisch mit einem größeren Fehler behaftet sind.

5.1.3. Klonogenes Überleben als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit: individuelle Unterschiede der SF6 der verschiedenen Fibroblastenzelllinien

Bei der Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels Kolonietest hat sich die Überlebensrate nach 6 Gy (SF6) als optimaler Parameter etabliert. Sie ermöglicht einerseits den Einsatz einer Strahlendosis die hoch genug ist, um individuelle Unterschiede bezüglich der zellulären Strahlenempfindlichkeit darzustellen. Andererseits nimmt mit weiter steigender Dosis auch der Fehler der einzelnen Messungen zu, sodass sich der Einsatz höherer Dosen als ungünstig erwiesen hat. Die SF6 vereint daher den Vorteil einer hohen Strahlendosis mit dem eines relativ kleinen Standardfehlers.

Betrachtet man die Überlebensraten der untersuchten Zelllinien, so variiert die SF6 innerhalb einer Dekade zwischen 0,06 und 0,23. Der Vergleich dieser Werte mit denen aus der Literatur ergibt zum einen, dass die im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Fibroblastenzelllinien im Vergleich zu früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine statistisch signifikante erhöhte SF6 aufweist ($p=0,0003$). Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 26 graphisch dargestellt. Diese verdeutlicht die Zunahme der mittleren Überlebensrate der untersuchten Zelllinien von 0,03 auf 0,09 im Vergleich zu denen von Dikomey et al. im Jahr 2000 publizierten Werten.

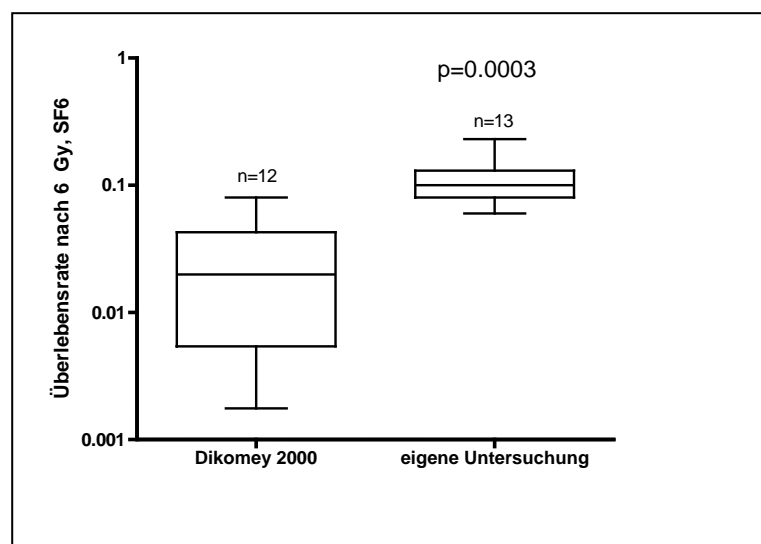


Abb. 26: SF6 humaner Fibroblasten in vitro: Vergleich der eigenen Ergebnisse mit früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Die verwendeten Fibroblastenzelllinien zeichnen sich durch eine signifikante Verringerung der zellulären Strahlenempfindlichkeit aus ($p=0,0003$; paired t-test).

Weitere Vergleichswerte liegen in der Literatur nicht vor. Dies liegt unter anderem daran, dass in der Vergangenheit die SF2 als Parameter als Standard galt, da diese der klinisch verwendeten Dosis pro Fraktion entspricht. Sie wurde daher als klinisch relevanter Endpunkt definiert ohne zu berücksichtigen, dass erst bei genügend hohen Gesamtdosen individuelle Unterschiede der zellulären Strahlenempfindlichkeit ausreichend aufgelöst werden können (Borgmann 2008). Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeiten ein. Die beobachtete Veränderung der Strahlenempfindlichkeit lässt sich nicht anhand biologischer bzw. physiologischer Einflüsse erklären. Es finden sich auch keine entsprechenden Hinweise in der Literatur. Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung verschiedener Bestrahlungsanlagen und geringfügige Abweichungen in der Dosimetrie bei der Erarbeitung der verschiedenen Datensätze.

Die Reduktion der Strahlenempfindlichkeit ist mit der bereits erwähnten statistisch signifikanten Verringerung der α -Komponente des zellulären Strahlenschadens (Abb. 25) in Einklang, da diese die lineare Anfangsneigung der Dosis-Effekt-Kurve beschreibt. Dieser liegen so genannte Ein-Treffer-Ereignisse zugrunde, welche von Erholungsprozessen nicht beeinflusst werden.

Darüber hinaus sind die individuellen Unterschiede innerhalb der untersuchten Fibroblastenzelllinien in der vorliegenden Arbeit nur gering ausgeprägt. So werden in der Literatur Variationskoeffizienten von 67,2% bzw. 112,1% (Dikomey et al. 2000; Fertil et al. 1988) berichtet, während der CV der eigenen Untersuchung deutlich geringer ist. Die Verringerung der Variabilität lässt sich nicht auf mögliche Unterschiede der verwendeten Methoden zurückführen, da alle Versuche jeweils an konfluenten Fibroblasten mit der Methode des „delayed plating“ durchgeführt wurden. Eine mögliche Ursache für die beobachteten Differenzen könnten jedoch Unterschiede bezüglich des untersuchten Spenderkollektivs sein: So wurden für die vorliegenden Versuche Fibroblasten aus Vorhäuten von gesunden Normal Spendern verwendet. In der oben erwähnten Arbeit von Dikomey et al. wurden hingegen Fibroblasten von Brustkrebspatientinnen verwendet. Diese Spenderinnen könnten zu einem gewissen Anteil eine genetische Veranlagung für Brustkrebs aufweisen. Die Kollektive unterscheiden sich somit nicht nur hinsichtlich des Alters und Geschlechts der Spender, sondern möglicherweise auch bezüglich krankheitsassoziierter

genetischer Parameter. Denn ca. 5-10 % der Brustkrebserkrankungen bei Frauen beruhen auf einer genetischen Disposition in Form einer pathogenen Mutation im *BRCA1*-Gen, im *BRCA2*-Gen oder in anderen prädisponierenden Genen (Rippberger et al. 2009). Es ist aufgrund der Häufigkeit von *BRCA*-Mutationen bei Brustkrebspatientinnen nicht auszuschließen, dass sich auch in dem von Dikomey et al. untersuchten Kollektiv *BRCA*-Mutationsträgerinnen befanden. Da viele der für Brustkrebs prädisponierenden Gene auch an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Eyfjord and Bodvarsdottir 2005; Turner et al. 2005), wäre ein Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit und deren Parameter möglich und könnte zumindest teilweise die erhöhte Variabilität bezüglich der zellulären Strahlenempfindlichkeit im Kollektiv von Dikomey et al. (2000) erklären. Letztendlich können die Ursachen für die beobachteten Unterschiede nicht abschließend geklärt werden.

Für die weitere Bewertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass für die Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels des Kolonietests mindestens drei unabhängige Bestimmungen der SF6 durchgeführt wurden. Bei einzelnen Zelllinien sind aufgrund von sehr unterschiedlichen Messwerten bis zu zehn Einzelbestimmungen erfolgt. Trotz der hohen Anzahl an durchgeführten Experimenten war es nicht bei allen Zelllinien möglich, die SF6 reproduzierbar zu bestimmen, was sich in den hohen Variationskoeffizienten einzelner Zelllinien widerspiegelt. Dieser überschreitet im Fall der Zelllinien F23, F132, F152 und F153 den für alle Zelllinien ermittelten durchschnittlichen Variationskoeffizienten deutlich. Damit ist die Variation innerhalb dieser Zelllinien größer als die Variation zwischen den einzelnen Zelllinien und wird möglicherweise in besonderem Maße von anderen Parametern als der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit beeinflusst. Das machte einen Ausschluss der SF6-Werte dieser Zelllinien von der weiteren Auswertung nötig.

5.2. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels residueller DNA-Doppelstrangbrüche

5.2.1. Einfluss der Zellzyklusphase auf den Nachweis residueller Doppelstrangbrüche: Vergleich der Focizahlen zwischen G2-Zellen und G1-Zellen

Bei der Bestimmung der γ H2AX-Foci von Fibroblasten fällt in den Histogrammen wiederholt auf, dass vereinzelte Zellekerne sehr viele Foci aufweisen und dadurch den Durchschnittswert wesentlich beeinflussen. Bei diesen Zellen handelt es sich überwiegend um Zellen in der G2- bzw. der S-Phase (Costes et al. 2009). Damit diese das Ergebnis nicht verfälschen, wurde im Rahmen der γ H2AX-Foci-Färbung zusätzlich die CENP-F-Gegenfärbung angewandt. Das CENP-F-Protein wird in der späten S- und während der G2-Phase exprimiert. Somit ermöglicht der immunhistochemische Nachweis von CENP-F die Detektion von Zellen in diesen Phasen des Zellzyklus. Der Vergleich der Focizahlen von CENP-F-positiven und negativen Zellen (Abbildung 4.6) zeigt, dass die CENP-F-positiven Zellen in der späten S- bzw. G2-Phase mit durchschnittlich 22,5 Foci/Zelle (SE=0,6) deutlich mehr Foci aufweisen als Zellen in G0- und G1-Phase mit durchschnittlich 8,16 (SE=0,06) Foci. Solche Zellen müssen von der Auswertung ausgeschlossen werden, da es sich bei diesen 'Foci' nicht um den Nachweis strahleninduzierter Doppelstrangbrüche handelt, sondern offensichtlich um replikationsassoziierte DNA-Konfigurationen, an welche der Antikörper bindet. Der Befund, dass die Häufigkeit dieser Ereignisse nicht einer Poissonverteilung folgt (Abbildung 6 rechts) unterstützt diese Hypothese, wie auch Untersuchungen, wonach eine Ausbildung von γ H2AX-Foci unabhängig von der DNA-Reparatur möglich ist. So wird in der Literatur beispielsweise eine Abhängigkeit vom Zellzyklus beschrieben (McManus and Hendzel 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Zellen in der G2-Phase nach Bestrahlung höhere Focizahlen aufweisen als Zellen in G1-Phase (Löbrich et al. 2010). Ein möglicher Grund für die beobachteten höheren Focizahlen ist der erhöhte DNA-Gehalt von Zellen in der S- und G2-Phase. Zusätzlich kommt es wie erwähnt während der S-Phase zur Bildung von offenen Replikationsgabeln, an welche der γ H2AX-Antikörper ebenfalls binden kann (Löbrich et al. 2010). Die beobachteten Zellzykluseffekte im γ H2AX-Nachweis sind somit durch Prozesse der Transkription während der S-Phase und durch die Zunahme des DNA-Gehalts bedingt.

Die Ergebnisse zeigen allerdings auch, dass selbst nach der getrennten Auswertung unter den CENP-F-negativen Zellen vereinzelt sehr hohe Focizahlen auftreten. Es ist daher zu vermuten, dass es noch weitere Subpopulationen gibt, die eine stark erhöhte Anzahl an Foci nach Bestrahlung aufweisen. Eine mögliche Zellpopulation mit vermehrter Focibildung könnten Zellen in der frühen S-Phase sein, welche mit Hilfe der CENP-F-Färbung nicht erfasst werden.

Der Einfluss der verbliebenen Zellen mit hohen Focizahlen auf den Mittelwert von 100 ausgezählten Zellkernen einer konfluenten Zellpopulation ist relativ gering, sodass insgesamt die Daten von diesen Effekten nicht beeinflusst werden. Generell wäre die Verwendung des Mittelwertes M der Poissonverteilung eine mögliche Alternative, z.B. im Falle einer proliferativ aktiven Zellpopulation mit einem höheren Anteil an Zellen mit replikationsassoziierten 'Foci'.

5.2.2. Kolokalisation von 53BP1-Foci mit γ H2AX-Foci

Um sicher zu stellen, dass die beobachteten γ H2AX-Foci ausschließlich mit Doppelstrangbrüchen assoziiert sind, wurde exemplarisch die Kolokalisation mit 53BP1 untersucht. Bei 53BP1 handelt es sich um ein Protein, welches nach DNA-Doppelstrangbrüchen an das den Bruch umgebende Chromatin bindet (Huyen et al. 2004). Dies erfolgt mit Hilfe einer Domäne des Proteins, welche an das an einem Lysinrest demethylierte Histon H4 bindet. Darüber hinaus wird 53BP1 eine wichtige Rolle bei der Zellzyklusregulation zugeschrieben. Eine Kolokalisation von 53BP1 mit γ H2AX Foci wird, insbesondere für nicht proliferativ aktive Zellen, von einer Reihe von Autoren beschrieben (Groesser et al. 2011; Rube et al. 2008a). Dennoch werden in der Mehrzahl der Arbeiten residuelle Doppelstrangbrüche mittels γ H2AX-Antikörpern nachgewiesen. Die in der Literatur beschriebene Kolokalisation konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden: die in Abbildung 7 und 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass 53BP1 und γ H2AX-Foci in gleicher Anzahl in den Zellen zu finden sind. Zusätzlich zeigt Abbildung 7 exemplarisch, dass die ausgewerteten 53BP1-Foci mit den γ H2AX-Foci größtenteils kolokalisiert sind. Aufgrund dieser Quantifizierungen und der Kolokalisation von 53BP1- und γ H2AX-Foci kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den ausgewerteten γ H2AX-Foci fast ausschließlich um DNA-doppelstrangbruchassoziierte Foci handelt. Durch diese

Ergebnisse wird es im Rahmen zukünftiger Untersuchungen möglich sein, zwischen den Antikörpern gegen 53BP1 und γ H2AX wählen zu können und somit die Flexibilität in der Auswahl von Kombinationen von Antikörpern und Sekundärantikörpern zu erhöhen, ohne die Qualität der Ergebnisse zu beeinflussen.

5.2.3. Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit mittels γ H2AX-Foci-Färbung

Als zweite Methode zur Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit wurde neben dem Koloniebildungstest der Nachweis residueller Doppelstrangbrüche mittels γ H2AX-Färbung angewendet. Somit konnte die Strahlenempfindlichkeit der Fibroblastenzelllinien mit den zwei unabhängigen Endpunkten der Überlebensrate sowie der mittleren Anzahl residueller γ H2AX-Foci nach Bestrahlung quantifiziert werden.

Während die mittels Koloniebildungs-Assay ermittelten Dosis-Effekt-Kurven den für die zelluläre Strahlenwirkung typischen linear-quadratischen Verlauf zeigen, nimmt die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche linear mit der Dosis zu. Dieses gilt sowohl für die Dosis-Effekt-Kurven der einzelnen Zelllinien (Abbildung 11), als auch für die gemittelten Daten aller Zelllinien (Abbildung 12). Ein Korrelationskoeffizient, der durchgehend über 0,95 liegt, dokumentiert die Güte der Übereinstimmung der Datenwerte mit der mathematischen Anpassung. Auch hier ist - wie bei den Werten der SF6 - die Tendenz zu erkennen, dass mit zunehmender Dosis die Unterschiede zwischen den Zelllinien in Bezug auf die Focizahlen größer werden.

Eine lineare Zunahme der Foci mit der Dosis wird auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet, sowohl für residuelle als auch für initiale γ H2AX-Foci bei Fibroblasten und bei Tumorzelllinien (Andrievski and Wilkins 2009; Banath et al. 2004; Beels et al. 2010; Golfier et al. 2009; Löbrich et al. 2005; Macphail et al. 2003). Lediglich die Arbeit von Markova et al. (2007) zeigt einen nicht-linearen Anstieg der Foci mit der Dosis nach 12 Stunden Reparaturzeit. Nach 24 Stunden wurde jedoch ebenfalls ein linearer Anstieg bei den untersuchten Fibroblasten beobachtet. Auch wenn in diesen Studien zum Teil wesentlich kürzere Reparaturzeiten verwendet wurden, ist die Linearität der resultierenden Dosis-Effekt-Beziehungen insofern überraschend, da generell nach dem linear-quadratischen Modell der zellulären Strahlenwirkung ein linear-quadratischer Verlauf zu erwarten wäre, wie dies auch im Falle der mittels

Koloniebildungsassay ermittelten Daten (Abbildung 1) der Fall ist. Über die Ursache dieses Widerspruchs zwischen der linearen und linear-quadratischen Korrelation lässt sich gegenwärtig nur spekulieren. Die Methode der numerischen Bestimmung residueller Foci hat den Nachteil, dass bei sehr hohen Dosen und entsprechend hohen Foci-Anzahlen diese konfluieren und nicht mehr getrennt ausgezählt werden können. Dies würde zu einem fälschlich niedrigen Wert an Foci im Bereich hoher Dosen führen. Das wäre aber ebenfalls mit einem Abflachen der linearen Zunahme von Foci im Bereich hoher Dosen verbunden, einem Effekt der an den vorliegenden Daten nicht nachvollzogen werden kann. Ein linear-quadratischer Verlauf ist durch die Ausprägung einer Schulter im Niedrigdosis-Bereich verbunden. Obwohl einige individuelle Dosis-Effekt-Kurven (z.B. Abb. 11 B) die Tendenz einer Schulter zeigen, ist dies nicht in der Zusammenfassung aller Daten der Fall (Abbildung 12). Diese Beobachtung und die Bestätigung der linearen Dosis-Effekt-Beziehung in der Literatur (s.o.) muss dahingehend interpretiert werden, dass im Gegensatz zum Endpunkt des klonogenen Überlebens die Anzahl residueller Doppelstrangbrüche linear mit der Dosis ansteigt, auch wenn dieser Endpunkt der residuellen DNA-Schäden unter Verwendung anderer Methoden wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese oder dem Nachweis letaler Chromosomenaberrationen wie erwartet dem linear-quadratischen Verlauf folgt (Borgmann et al. 2004; Borgmann et al. 2002; Dikomey et al. 2000). Möglicherweise handelt es sich um ein Methoden-assoziiertes Phänomen, welches die Akkumulation Reparatur-assoziiierter Proteine und deren numerische und räumliche Verteilung im Bereich hoher Dosen beeinflusst. Dies würde bedeuten, dass auch im Bereich hoher Dosen ein Focus nicht mehr einem, sondern mehreren Doppelstrangbrüchen entspricht, wie dies bereits für den Bereich niedrigerer Dosen nachgewiesen wurde (Sedelnikowa et al. 2002).

Analog zur Bestimmung der SF6 wurde die Anzahl der γ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit 6 Gy für alle 17 Zelllinien bestimmt. Im Gegensatz zur SF6, bei der die Variationskoeffizienten einiger Zelllinien den durchschnittlichen Variationskoeffizienten aller Zelllinien deutlich überschritten, ist kein vergleichbarer Effekt bezüglich des Nachweises residueller Doppelstrangbrüche erkennbar. Aus diesem Grund konnten bei Korrelationen mit den γ H2AX-Foci alle 17 untersuchten Zelllinien berücksichtigt werden.

Die Zelllinien weisen - wie auch bei der Untersuchung der SF6 beobachtet - interindividuelle Unterschiede in Bezug auf ihre Strahlenempfindlichkeit auf. Die nachgewiesenen Unterschiede zwischen den Zelllinien sind jedoch als gering zu bewerten. Die intraindividuelle Varianz der Werte ist dabei geringer ausgeprägt als bei der Bestimmung der SF6. Die Ergebnisse zeigen somit, dass der Nachweis residueller Doppelstrangbrüche mittels γ H2AX-Foci-Färbung zur Bestimmung der zellulären der Strahlenempfindlichkeit verwendet werden kann.

5.3. Überlebensrate und residuelle γ H2AX-Foci als Parameter der zellulären Strahlenempfindlichkeit – ein Vergleich beider Methoden

Zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurden im Rahmen der Experimente mit dem Kolonietest und der γ H2AX-Foci-Färbung zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit verwendet. Wenn beide Methoden gleichwertig zur Quantifizierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit geeignet sind, müssten die Ergebnisse eine Korrelation zeigen. Diese Korrelation konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abbildung 14). Es zeigte sich, dass eine niedrige SF6 generell mit einer hohen Anzahl von γ H2AX-Foci einhergeht und vice versa. Die Korrelation erreichte mit einem p-Wert von 0,015 statistische Signifikanz. Dabei ist anzumerken, dass die Korrelation in besonderem Maß von dem Messwert einer Zelllinie (F181) gestört wird. Diese Zelllinie zeichnete sich durch eine relativ hohe intraindividuelle Variabilität der SF6 Werte aus. Sie konnte aber von der Auswertung nicht ausgeschlossen werden, da diese unter dem als Grenzwert für den Ausschluss definierten interindividuellen Variabilität lag. Ein Ausschluss dieses als grenzwertigen Ausreißer zu bewerten Datenpunktes würde die Korrelation und Signifikanz erheblich verbessern: Der Korrelationskoeffizient nähme auf 0,644 zu und der p-Wert auf 0,002 ab.

Generell belegen diese Ergebnisse, dass zur Bestimmung residueller Doppelstrangbrüche die Methode des immunhistochemischen Nachweises von γ H2AX-Foci sehr gut geeignet ist und den als Goldstandard geltenden Kolonietest als Methode ersetzen kann. Diese Ergebnisse werden von Menegakis et al. (2009) bestätigt, die für FaDu und SKX-Tumorzellen ebenfalls eine statistisch signifikante Korrelation von γ H2AX-Foci und Überlebensrate berichten. Wenn man berücksichtigt, dass die zelluläre Strahlenempfindlichkeit mit der individuellen

Strahlenempfindlichkeit von Patienten korreliert (Burnet et al. 1994; Geara et al. 1992b), dann ist davon auszugehen, dass mit Hilfe der Quantifizierung der γ H2AX-Foci die Bestimmung der individuellen Strahlenempfindlichkeit möglich ist. Dieses ist von großem klinischen Interesse, da diese Methode direkt an Zellen des Patienten durchgeführt werden kann, ohne die zeit- und arbeitsintensiven Methoden der Zellkultur etablieren zu müssen. Eine Möglichkeit der Realisation dieser Methode für die klinische Anwendung besteht in der Etablierung an humanen Lymphozyten, da diese als Testzellen in der klinischen Praxis ohne großen Aufwand zur Verfügung stehen. Lymphozyten haben im Gegensatz zu den verwendeten Fibroblasten den Nachteil, dass sie wesentlich kleiner sind und zudem nicht proliferieren. Sie können somit nicht als adhärenente Zellen auf Objektträgern kultiviert werden. Lymphozyten können aber, beispielsweise durch Zentrifugation, nach der Isolation aus dem peripheren Blut auf Objektträger aufgetragen und anschließend mittels γ H2AX-Foci-Färbung angefärbt werden (Löbrich et al. 2005; Rothkamm et al. 2007). Somit ist mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht, dass diese Methode prinzipiell gut zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit geeignet ist. Es sollte insbesondere unter Berücksichtigung des linearen Verlaufs der Dosis-Effekt-Beziehung eine Verwendung der Methode an Lymphozyten möglich sein. Zukünftige Projekte werden sich diesbezüglich mit der Optimierung der Auswertung von Lymphozytenpräparaten beschäftigen.

5.4. Einfluss der TGF β 1-Proteinexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen TGF β 1-Proteinexpression und der zellulären Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten untersucht werden. Zur Bestimmung der TGF β 1-Proteinexpression wurde der TGF β 1-Gehalt im Zellkulturmedium aller 17 Zelllinien mittels ELISA bestimmt und auf die Expression pro 10^6 Zellen umgerechnet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt und weisen zum Teil große Schwankungen zwischen den einzelnen Messergebnissen auf. Die hohen Schwankungen erschweren die Überprüfung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der zellulären Strahlenempfindlichkeit und der TGF β 1-Expression der Fibroblasten.

Pantsulaia et al. konnten *in vivo* nachweisen, dass neben genetischen Faktoren auch Umwelteinflüsse für individuelle Unterschiede bezüglich des TGF β 1-Plasmalevels verantwortlich sind (Pantsulaia et al. 2004). Darüber hinaus könnte es auch durch Fehler bei anderen Arbeitsschritten, wie z.B. bei der Bestimmung der Zellzahl, zu Unsicherheiten gekommen sein.

Betrachtet man die SF6 in Abhängigkeit von der TGF β 1-Expression (Abb. 16), so lässt sich kein Zusammenhang zwischen der SF6 und der TGF β 1-Proteinexpression nachweisen. Bei der Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der SF6 und der TGF β 1-Proteinexpression wurden die Zelllinien F23, F132, F152 und F153 nicht für die Auswertung herangezogen, da diese Zelllinien einen außerordentlich hohen Variationskoeffizienten aufwiesen.

Darüber hinaus zeigt auch die Anzahl der γ H2AX-Foci keinen Zusammenhang mit der TGF β 1-Expression (Abbildung 17). In diesem Fall wurden alle 17 Zelllinien berücksichtigt, da bei der Bestimmung der γ H2AX-Foci die Schwankungen deutlich geringer waren als bei der Bestimmung der SF6 und daher von einer zuverlässigen Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit auszugehen war.

Diese Ergebnisse widersprechen in gewisser Hinsicht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Vodovotz et al. 2000; von Pfeil et al. 2002). Diese konnten bei TGF β 1-Knockout-Mäusen bzw. deren Zellen neben der zu erwartenden niedrigeren TGF β 1-Proteinexpression auch eine geringere individuelle und zelluläre Strahlenempfindlichkeit nachweisen. Es ist jedoch anzumerken, dass in diesen Fällen nicht die intraindividuellen Unterschiede in der TGF β 1-Proteinexpression des Wildtyps gemessen wurden. Stattdessen wurden TGF β 1-Knockout-Mäuse bzw. deren Fibroblasten mit dem Wildtyp verglichen. Da homozygote TGF β 1-Knock-out Mutanten als Feten versterben, kommen diese in normalen Populationen nicht vor. Daher stellt sich die Frage, ob die in normalen Populationen vorkommenden interindividuellen Unterschiede in der TGF β 1-Proteinexpression zwischen Individuen überhaupt groß genug sind, um Effekte der TGF β 1-Expression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit nachweisen zu können.

In der Arbeit von Pfeil et al. (2002) wurden dem Medium der Fibroblasten von den Knock-out-Mäusen und den Wildtyp-Tieren zusätzlich unterschiedlich hohe Mengen an TGF β 1 zugesetzt. Dabei zeigte sich, dass es beim Zusatz von 0,5 ng zu einer

Strahlensensibilisierung der Zellen kam. Diese war bei den Knock-out-Mutanten deutlicher als beim Wildtyp. Überraschenderweise führte eine weitere Erhöhung der zugegebenen TGF β 1-Menge auf 1,0 bzw. 10 ng jedoch zu keiner wesentlichen weiteren Strahlensensibilisierung. Diese Ergebnisse weisen auf einen Schwellenwert der TGF β 1-Konzentration hin, dessen Überschreiten zu einer Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit führt. Bei einer weiteren Erhöhung der TGF β 1-Konzentration scheint es allerdings zu keiner weiteren Strahlensensibilisierung zu kommen. Da die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von TGF β 1 pro Milliliter im Bereich von 500 ng bis 2000 ng liegen, wäre es möglich, dass aufgrund der Überschreitung dieser Schwelle keine Unterschiede in Bezug auf die Strahlensensibilität mehr nachzuweisen sind. Die TGF β 1-Konzentration im verwendeten Medium würde diese Schwellenkonzentration bereits um ein vielfaches überschreiten. Insofern wäre es zu überlegen, weitere Versuche in TGF β 1-freiem Medium durchzuführen.

5.5. Einfluss der TGFB1-Genexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten

Bereits seit Längerem ist bekannt, dass die Bestrahlung von Zellen zu einer erhöhten Genexpression von TGFB1 führt (Martin et al. 1997). Um die TGFB1-Genexpression als möglichen Prädiktor für die individuelle Strahlenempfindlichkeit nutzen zu können, muss geklärt werden, ob bereits im unbestrahlten Zustand vorhandene Unterschiede in der TGFB1-Genexpression der Zellen einen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit haben. Neben der Proteinexpression sollte daher als zweiter Aspekt auch der Einfluss der TGFB1-Genexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen keinen Zusammenhang zwischen der Überlebensrate nach 6 Gy und der TGFB1-Genexpression (Abbildung 19) ($p=0,443$). Zusätzlich wurde die Genexpression der TGFB1-Rezeptoren RI und RII bestimmt und mit der Überlebensrate nach 6 Gy korreliert. Die Ergebnisse geben ebenfalls keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen beiden Parametern (RI $p=0,718$; RII $p=0,529$). Auch zwischen der TGFB1-Genexpression bzw. der Expression der beiden Rezeptoren RI und RII und der Anzahl der γ H2AX-Foci konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

Es konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass sich die TGFB1-Genexpression in den Zellen infolge von Bestrahlung erhöht (Boerma et al. 2003; Martin et al. 1997). Dabei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der basalen TGFB1-Genexpression und der zellulären Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden. Obwohl kein direkter Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit gezeigt wurde, konnten andere Studien zeigen, dass bei Brustkrebspatientinnen mit strahleninduzierter Gewebefibrose eine veränderte Genexpression von Proteinen des TGF β 1-Pathways vorliegt (Landmark-Hoyvik et al. 2011). Dies deutet darauf hin, dass es zwar keinen direkten Zusammenhang zwischen der TGFB1-Genexpression und der zellulären Strahlenempfindlichkeit gibt, aber der TGF β 1-Pathway mit seinen beteiligten Proteinen generell im Zusammenhang mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit steht. Anzumerken ist allerdings, dass in diesem Zusammenhang nicht die individuelle zelluläre Strahlenempfindlichkeit gemessen wurde, sondern eine Charakterisierung anhand der klinischen Nebenwirkungen erfolgte. Außerdem erfolgte die Gewinnung des Materials erst nach Abschluss der Strahlentherapie.

6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern vielfältige neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. So ergibt sich aus der Erkenntnis, dass der Kolonietest und die γ H2AX-Foci-Färbung gleichwertige Ergebnisse liefern, die Möglichkeit diese Methode im klinischen Alltag zur Prädiktion der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu nutzen. Dies setzt die Auswertung großer Probenzahlen voraus, was eine Automatisierung der Zählung von γ H2AX-Foci nötig macht. Zukünftige Projekte werden sich daher mit der Optimierung der automatisierten Auswertung von Lymphozytenpräparaten beschäftigen müssen.

Da in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der basalen TGFB1-Gen- und Proteinexpression und der zellulären Strahlenempfindlichkeit dokumentiert werden konnte, stellt sich die Frage, ob andere Proteine aus den TGF β 1-Signalkaskaden an der Modulation der zellulären Strahlenempfindlichkeit beteiligt sind. Dies gilt es im Rahmen weiterer Untersuchungen zu klären.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten durch die Expression des TGFB1-Gens (Transforming-growth-factor beta) bzw. die Expression des resultierenden Proteins sowie der Genexpression der TGFB1-Rezeptoren R1 und R2 beeinflusst wird. Dazu wurde die Strahlenempfindlichkeit von 17 Fibroblastenzelllinien zum einen mittels des Kolonietests und zum anderen mittels Bestimmung der nach Strahlenexposition verbleibenden DNA-Doppelstrangbrüche untersucht. Die residuellen DNA-Doppelstrangbrüche wurden mit der γ H2AX-Foci-Färbung als indirekter Parameter der Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen. Die Methode der γ H2AX-Foci-Färbung wurde ergänzt durch eine Kombination mit der CENP-F-Gegenfärbung, um Zellen in der S- oder G2-Phase von der Analyse ausschließen zu können, da diese zellzyklusspezifisch eine erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci aufweisen und das Ergebnis verfälschen könnten. Des Weiteren wurde durch die Zellzyklusanalyse mittels FACSscan geprüft und bewiesen, dass sich die zu untersuchenden Fibroblastenkulturen in der Plateauphase mit einem ausreichenden Anteil von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus befanden. Die Messung der TGFB1-Genexpression erfolgte mittels Real-Time-PCR und der Nachweis der TGF β 1-Proteinexpression mittels ELISA.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten in der G2-Phase (CENP-F-positive Zellen) nach Strahlenexposition eine deutlich höhere Anzahl an residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen aufweisen und durch eine separate Auswertung von Zellen in der G1-Phase eine Verfälschung der Messergebnisse vermieden werden kann. Durch die 53BP1-Gegenfärbung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es sich bei den ausgewerteten γ H2AX-Foci tatsächlich um DNA-Doppelstrangbruch-assoziierte Ereignisse handelt.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die mittels Kolonietest bestimmte zelluläre Strahlenempfindlichkeit humaner Fibroblasten mit der mittels γ H2AX-Foci-Färbung bestimmten Zahl der verbleibenden Doppelstrangbrüche korreliert. Damit konnte für Fibroblasten bewiesen werden, dass die Zahl der

residuellen γ H2AX-Foci als Surrogatmarker für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit geeignet ist.

Der Vergleich der zellulären Strahlenempfindlichkeit mit der TGFB1-Genexpression bzw. der TGF β 1-Proteinexpression zeigte keine signifikante Korrelation. Auch beim Vergleich der zellulären Strahlenempfindlichkeit mit der Genexpression der TGFB1-Rezeptoren R1 und R2 konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Somit konnte belegt werden, dass die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von humanen Fibroblasten nicht durch die TGF β 1-Gen- und Proteinexpression bzw. den davon abhängenden Rezeptoren R1 und R2 bestimmt wird.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	Bovine serum albumine
DEK	Dosis-Effekt-Kurve
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
Gy	Gray
M	Mol
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
OT	Objektträger
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pg	Picogramm
RT	Raumtemperatur
SF6	surviving fraction nach 6 Gray
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TGF β 1	Transforming growth factor beta1

9. Danksagung

Hiermit danke ich Frau PD Dr. Annette Raabe für die Vergabe des Themas und die geduldige Betreuung meiner Doktorarbeit. Herrn Professor E. Dikomey danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut zu promovieren und alle Facilities großzügig nutzen zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt Maria Omniczynsky für die Einarbeitung in die Zellkultur, die Bestrahlungen und die verschiedensten Färbetechniken. Bei Herrn Dr. Sebastian Reuter möchte ich mich für die Einarbeitung in die Real-Time-PCR und die Betreuung bedanken. Nicht zuletzt gilt mein Dank dem freundlichen, engagierten und hilfsbereiten Team des Labors für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie, insbesondere Frau PD Dr. Kerstin Borgmann, Dr. Jarob Saker, Marcel Ambrecht und Britta Riepen.

10. Lebenslauf

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

12. Anhang

12.1. Versuchsprotokolle

Kolonietest

Material:

- Trypsin, Medium, PBS (alles auf RT vorwärmen)
- 5 Falcon-Tubes (15ml)
- 12 T25-Flaschen

Durchführung:

- Zellkulturflasche mit 6 Gy bestrahlen (zweite Flasche dient als unbestrahlte Kontrolle)
- 24 Stunden bei 37°C mit 10% CO² inkubieren
- Kolonietest ansetzen
- Medium absaugen
jeweils 2 ml PBS auf die T25-Flaschen geben und kurz spülen
- PBS absaugen
- 2 ml Trypsin hinzugeben und bis auf einen kleinen Rest unmittelbar wieder absaugen
- wenn die Zellen sich unter dem Invertmikroskop sichtbar ablösen, 2 ml Medium hinzugeben
- Zellzahl im Coulter bei 13-30 µm bestimmen
- Verdünnungsreihe ansetzen (1x3 und 1x2 Falcons), dazu im ersten Falcon-Röhrchen die Zellsuspension soweit mit Medium verdünnen, dass man eine Konzentration von 100000 Zellen/ml erhält
- in das zweite Falcon-Röhrchen 4,5 ml Medium füllen und 0,5 ml Zellsuspension aus dem ersten Falcon hinzufügen, sodass man eine Verdünnung von 1:10 erhält
- bei der unbestrahlten Probe das Ganze mit einem dritten Falcon wiederholen, sodass man eine Zellzahl von 10²/ml erhält
- bei der unbestrahlten Probe in drei T25-Flaschen jeweils 300 bzw. 500 Zellen geben
- bei den mit 6 Gy bestrahlten Zellen drei mal 3000 bzw. 5000 Zellen in einer T25-Flasche ansetzen
- Zellen 14 Tage bei 37°C mit 10% CO² inkubieren

- mit 2 ml PBS spülen
- mit 2 ml Ethanol (70%) für 10 Min fixieren
- Ethanol abgießen und Flaschen trocknen lassen
- ca. 4 ml Kristallviolettlösung auf jede Flasche geben und 5 Min einwirken lassen
- Lösung abgießen und Flasche mehrmals mit Leitungswasser spülen
- über Nacht trocknen lassen

Dosis-Effekt-Kurven

Material:

- Trypsin, Medium, PBS (alles auf RT vorwärmen)
- 13 Falcon-Tubes (15 ml)
- 30 T25-Zellkulturflaschen

Durchführung:

- je eine Zellkulturflasche mit 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, bzw. 8 Gy bestrahlen und für weitere 24 Stunden bei 37°C mit 10% CO² inkubieren (eine weitere Flasche dient als unbestrahlte Kontrolle)
- Medium absaugen
- jeweils 2 ml PBS auf die T25-Flaschen geben und kurz waschen
- PBS absaugen und 2 ml Trypsin hinzugeben und bis auf einen kleinen Rest unmittelbar wieder absaugen
- wenn die Zellen sich unter dem Invertmikroskop sichtbar ablösen, 2 ml Medium hingeben
- Zellzahl im Coulter bei 13-30 µm bestimmen
- Verdünnungsreihe ansetzen (3x3 und 2x2 Falcons), im ersten Falcon-Röhrchen die Zellsuspension soweit mit Medium verdünnen, dass man eine Konzentration von 100.000 Zellen/ml erhält
- die mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlten Zellen bis auf 100 Zellen/ml verdünnen, die mit 6 Gy und 8 Gy bestrahlten Zellen nur bis auf 1000 Zellen/ml verdünnen (dazu 0,5 ml aus dem vorangegangenen Falcon in das nächste geben und mit 4,5 ml Medium verdünnen)
- folgende Zellzahlen in jeweils drei Zellkulturflaschen gegeben:
 - 0 Gy: 300/500 Zellen
 - 2 Gy: 500/800 Zellen
 - 4 Gy: 800/2000 Zellen
 - 6 Gy: 2000/4000 Zellen

- 8 Gy: 4000/8000 Zellen
- 14 Tage bei 37°C mit 10% CO² inkubieren
 - mit 2 ml PBS spülen
 - mit 2 ml Ethanol (70%) für 10 Min fixieren
 - Ethanol abgießen und Flaschen trocknen lassen
 - ca. 4 ml Kristallviolettlösung auf jede Flasche geben
 - 5 Min einwirken lassen
 - Lösung abgießen und Flasche mehrmals mit Leitungswasser spülen
 - über Nacht trocknen lassen

γH2AX-Foci-Färbung

Material:

- Fixierungslösung, Permeabilisierungslösung, Blockierungslösung
- PBS+1% BSA
- Waschlösung I/II
- 1xPBS
- γH2AX-Antikörper, Fluorescein gelabelter AK, Dapi, Dapi-Antifade

Durchführung:

- Bestrahlen der Objektträger mit 1 Gy und 6 Gy (ein OT dient als unbestrahlte Kontrolle)
- 24 Stunden bei 37°C mit 10% CO² inkubieren
- Medium entfernen
- Glasaufsatz der OT entfernen
- kurz in PBS spülen
- 15 Min in Fixierungslösung inkubieren
- 3x10 Min in PBS waschen (leicht umschwenken)
- Falls die Objektträger jetzt nicht mehr weiter bearbeitet werden sollen: Lagerung bei -20°C
- 5 Min auf Eis in Permeabilisierungslösung
- kurz in 1xPBS+1% BSA spülen
- eine Stunde bei RT in Blockierungslösung (leicht umschwenken)
- Feuchtkammer vorbereiten

- γ H2AX-Antikörper: 50 μ l der vorbereiteten Lösung auf die Objektträger geben (vorher gut abtropfen lassen)
- mit Plastikfolie abdecken
- eine Stunde bei RT inkubieren
- dreimal mit Waschlösung I waschen (leicht umschwenken)
- ab jetzt Arbeitsplatz abdunkeln!
- γ H2AX-Sekundärantikörper: 50 μ l der vorbereiteten Lösung auf die OT geben
- mit Plastikfolie abdecken
- eine Stunde bei RT in der Feuchtkammer inkubieren
- 4x10 Min mit Waschlösung II waschen
- 15 μ l Vectashield for Fluorescence pro Objektträger
- Objektträger mit Deckgläschen abdecken
- zwischen Trockenblockpapier unter Druck trocknen
- Ränder des Deckgläschens mit Nagellack fixieren
- Lagerung im Kühlschrank (4°C) bis zur Auswertung

Zellzyklusanalyse mit FACS

Material:

- 1xPBS steril
- 1 Falcon-Röhrchen
- Ethanol 70%

Durchführung:

- Zellen für die Zellzyklusanalyse in Falcon-Röhrchen überführen
- bei 1100U/Min zentrifugieren
- Überstand abgießen
- 5 ml PBS hinzugeben
- Zellen resuspendieren
- bei 1100U/Min zentrifugieren
- Überstand abgießen
- mit 5 ml PBS auffüllen
- erneut zentrifugieren
- Zellen in 1 ml PBS resuspendieren
- unter ständigem Schütteln (auf Vortexer) mit Pasteurpipette die

Zelllösung in Ethanol tropfen

- bei – 20°C bis zur weiteren Bearbeitung lagern
- Zellen bei 1500 U/Min für 5 Min zentrifugieren
- Ethanol abgießen
- in 2 ml PBS resuspendieren
- für 4 Min bei 1000 U/Min zentrifugieren
- Überstand abgießen
- 0,5 ml Propidiumiodid-Farbstoff hinzugeben
- nach 20 Min im FACS messen

ELISA

Material:

- ELISA-Set: R&D Biosystems, Quantikine®, Human TGF-beta1 Immunoassay

Vorbereitung:

- Waschpuffer: auf RT vorwärmen und ggf. Kristalle durch mischen auflösen
- 25 ml Waschpufferkonzentrat mit 600 ml destilliertem Wasser mischen
- Calibrator Diluent RD5-53 (1x): 20 ml des Konzentrats mit 60 ml destilliertem Wasser mischen
- Substratlösung: die Farbreagenzien A und B sollten 15 Min vor Gebrauch gemischt werden (vor Licht schützen) 100 µl Lösung pro Well
- TGF-beta1-Standard (2000pg/ml): 200 µl in ein Eppi mit 200 µl Calibrator Diluent RD5-53 (1x) geben
- aus diesem Gefäß wieder 200 µl entnehmen und in einem weiteren Gefäß wieder mit 200 µl Calibrator Diluent mischen
- viermal wiederholen, bis zu Konzentration von 31,2 pg/ml

Durchführung:

- alle Reagenzien Vorbereiten (s.o.)
- Proben aktivieren:
- zu 100 µl Medium 20 µl 1 M HCl geben
- mischen
- 10 Min bei RT inkubieren
- Proben mit 20 µl NaOH 0,5 M neutralisieren
- gut mischen

- unmittelbar verwenden
- Folie von Platte entfernen
- 50 µl Assay Diluent RD1-21 in jedes Well pipettieren
- 50 µl Standard, Kontrolle oder aktivierte Probe in jedes Well
- Platte vorsichtig schütteln zum mischen
- mit Klebefolie abdecken
- zwei Stunden bei RT inkubieren
- Platte entleeren
- jedes Well viermal mit 400 µl Waschpuffer waschen
- 100 µl TGF-beta1 Conjugate in jedes Well pipettieren
- Platte mit Klebefolie verschließen
- Für 2 Stunden bei RT inkubieren
- jedes Well erneut viermal mit 400 µl Waschpuffer waschen
- 100 µl Substratlösung in jedes Well füllen
- 30 Min bei RT inkubieren (vor Licht schützen)
- 100 µl Stopplösung in jedes Well pipettieren
- Platte innerhalb der nächsten 30 Min bei 450 nm messen

RNA-Isolation mit PeqGold

Material:

- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol (70%)

Durchführung:

- 500 µl PeqGOLD in jedes Well
- 2 Min bei RT inkubieren
- Lösung in ein neues Eppi überführen
- 5 Min bei RT inkubieren
- 0,2 ml Chloroform je Milliliter PeqGOLD zur Probe geben
- 15 Sek umschwenken
- 5-10 Min bei RT inkubieren
- Probe bei 12000xg und 4°C für 5 Min zentrifugieren

- die obere Phase mit einer Pasteurpipette abnehmen
- in ein neues Eppi überführen
- 0,5 ml Isopropanol je Milliliter PeqGOLD zu der Probe geben
- gut mischen
- 5-10 Min bei RT inkubieren
- 5 Min bei 12000xg und 4°C zentrifugieren
- den Isopropanolüberstand vorsichtig abziehen/abgießen
- mit 500 µl 70%igem Ethanol vortexen
- zentrifugieren (5 Min, 7500xg, 4°C)
- Ethanol vorsichtig abgießen
- erneut 500 µl Ethanol hinzugeben und zentrifugieren
- Ethanol abgießen
- RNA-Pellet an der Luft trocknen lassen
- 30 µl Wasser hinzugeben
- bis zur weiteren Verwendung bei -80°C lagern

Reverse Transkription

Material:

- High Capacity cDNA ReverseTranscription Kit, Applied Biosystems
- destilliertes Wasser, DNase/RNase frei
- 96-Well Platte
- Folie

Durchführung:

- alle Materialien werden auf Eis gelagert
- 1000 ng RNA mit Wasser verdünnen zu einem Gesamtvolumen von 15 µl
- Real-Time Master Mix pipettieren:

Chemikalie / Reagenz	Volumen (µl)
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x Random Primers	2,0
MultiScribe™ reverse Transcriptase	1,0
nucleasefreies Wasser	4,2

gesamt pro Reaktion	10,0
---------------------	------

- 10 µl RNA-Lösung in jedes Well pipettieren
- 10 µl Real-Time Master Mix pro Well hinzugeben
- Platte mit Folie abdecken
- Platte zentrifugieren
- Platte auf Eis lagern
- Thermocycler wie gefolgt einstellen:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit	10 Min	120 Min	5 Sek	Rest der Zeit

- Reaktionsvolumen auf 20 µl einstellen
- Platte in den Thermocycler legen
- Lauf starten
- nach Ende des Laufs Platte bei 4°C bzw. -20°C lagern

Real-Time PCR

Material:

- TaqMan Gene Expression Master Mix (2x)
- TaqMan Gene Expression Assay (20x)
- Dest. Wasser DNase/RNase frei
- 96-well-Platte
- Folie zum abdecken

Durchführung:

- Reaktionsansatz vorbereiten:

Bestandteil	Volumen (µl)
TaqMan Gene Expression Master Mix	10,0
TaqMan Gene Expression Assay	1,0
H ² O	7,0

Gesamtvolumen pro Ansatz	18,0
---------------------------------	-------------

- in jedes Well 18 µl des Reaktionsansatzes geben
- jeweils 2 µl der RNA-Lösung dazu geben
- Platte mit Folie abdecken
- Platte zentrifugieren
- Thermocycler wie gefolgt einstellen (für 20 µl)

Schritt	Temperatur °C	Zeit	Zyklen
UDG Inkubation	50	2 Min	HOLD
AmpliAq Gold®, UP Enzyme Activaton	95	5 Min	HOLD
Denaturierung	95	15 Sek	40
Anneal	60	1 Min	

- Gerät starten

13. Literaturverzeichnis

- Alsbeih, G., B. Fertil, C. Badie and E. P. Malaise (1995). "The beta component of human cell survival curves and its relationship with split dose recovery." Int J Radiat Biol. **67**(4): 453-60.
- Andreassen, C. N., J. Alsner and J. Overgaard (2002). "Does variability in normal tissue reactions have a genetic basis - where and how to look for it?" Radiotherapy and Oncology **64**: 131-40.
- Andreassen, C. N., J. Alsner, J. Overgaard, J. Haviland, R. Owen, J. Homewood, J. Bliss and J. R. Yarnold (2005). "TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications after radiotherapy for early breast cancer." Radiotherapy and Oncology **75**(1): 18-21.
- Andreassen, C. N., J. Alsner, M. Overgaard and J. Overgaard (2003). "Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes." Radiotherapy and Oncology **69**(2): 127-35.
- Andrievski, A. and R. C. Wilkins (2009). "The response of -H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures." Int J Radiat Biol. **85**(4): 369-376.
- Anscher, M. S., W. P. Peters, H. Reisenbichler, W. P. Petros and R. L. Jirtle (1993). "Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer." N Engl J Med **328**(22): 1592-1598.
- Anscher, M. S., B. Thrasher, Z. N. Rabbani, B. Teicher and Z. Vujaskovic (2006). "Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **65**(3): 876-81.
- Anscher, M. S., B. Thrasher, L. Zgonjanin, Z. N. Rabbani, M. J. Corbley, K. Fu, L. Sun, W.-C. Lee, L. E. Ling and Z. Vujaskovic (2008). "Small molecular inhibitor of transforming growth factor- β protects against development of radiation-induced lung injury." 2008 **71**(3): 829-837.
- Asaithamby, A. and J. C. Chen (2009). "Cellular response to DNA double-strand breaks after low-dose γ -irradiation." Nucleic Acids Research **37**(12): 3912-3923.
- Banath, J. P., S. H. Macphail and P. L. Olive (2004). "Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines." Cancer Research **64**(19): 7144-9.
- Barber, J. B. P., W. Burrill, A. R. Spreadborough, E. Levine, C. Warren, A. E. Kiltie, S. A. Roberts and D. Scott (2000). "Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer." Radiotherapy and Oncology **55**: 179-186.
- Beels, L., J. Werbroutck and H. Thierns (2010). "Dose response and repair kinetics of gammaH2AX-Foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and γ -radiation." Int. J. Radiat. Biol. **86**(9): 760-768.
- Boerma, M., C. I. Schulte-Bart, L. E. Wedekind, H. Beekhuisen and J. EWondergem (2003). "Effects of multiple doses of ionizing radiation on cytokine expression in rat and human cells." Int J Radiat Biol. **79**(11): 889-96.
- Bordon, E., L. A. Henriques-Hernandez, P. C. Lara, A. Ruiz, B. Pinar, C. Rodriguez-Gallego and M. Lloret (2010). "Prediction of clinical toxicity in locally advanced

- head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes." Radiation Oncology in press.
- Borgmann, K., M. Dede, A. Wrona, I. Brammer, J. Overgaard and E. Dikomey (2004). "For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **58**(2): 445-52.
- Borgmann, K., D. Haerberle, T. Doerk, A. Busjahn, G. Stephan and E. Dikomey (2007). "Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes." Radiotherapy and Oncology **83**(2): 196-202.
- Borgmann, K., U. Hoeller, S. Nowack, M. Bernhard, B. Röper, S. Brackrock, C. Petersen, S. Szymczak, A. Ziegler, P. Freyer, W. Alberti and E. Dikomey (2008). "Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol. Phys. **71**(1): 256-264.
- Borgmann, K., B. Röper, R. A. El-Awady, S. Brackrock, M. Bigalke, T. Dörk, W. Alberti, E. Dikomey and J. Dahm-Daphi (2002). "Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosomal aberrations." Radiotherapy and Oncology **64**: 141-152.
- Burnet, N. G., J. Nyman, I. Turesson, R. Wurm, J. R. Yarnold and J. H. Peacock (1994). "The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide basis for individualising radiotherapy schedules." Radiotherapy and Oncology **33**(228-238): 228.
- Chon, B. H. and J. S. Loeffler (2002). "The effect of nonmalignant systemic disease on tolerance to radiation therapy." The Oncologist **7**: 136-143.
- Costes, S. V., I. Chiolo, J. M. Pluth, M. H. Barcellos-Hoff and B. Jakob (2009). "Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization." Mutation Research **704**: 78-87.
- de Ruyck, K., M. van Eijkeren, K. Claes, R. Marthier, A. de Paepe, A. Vral, L. de Ridder and H. Thierens (2005). "Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro radiosensitivity in lymphocytes." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **62**(4): 1140-9.
- Delanian, S. and J.-L. Lefaix (2004). "The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway." Radiotherapy and Oncology **73**: 119-131.
- Deschavanne, P. J., B. Fertil, E. P. Malaise and B. Lachet (1980). "Radiosensitivity and repair of radiation damage in human HF19 fibroblasts." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. **38**(2): 167-77.
- Dikomey, E. and I. Brammer (2000). "Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for two different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line." Int J Radiat Biol. **76**(6): 773-81.
- Dikomey, E., I. Brammer, J. Johansen, S. M. Bentzen and J. Overgaard (2000). "Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients." Int J Radiat Oncol Biol. Phys. **46**(2): 481-490.

- Eyford, J. E. and S. K. Bodvarsdottir (2005). "Genomic instability and cancer: networks involved in response to DNA damage." Mutation Research **592**(1-2): 18-28.
- Fertil, B., P. J. Deschavanne, D. Debieu and E. P. Malaise (1988). "Correlation between PLD repair capacity and the survival curve of human fibroblasts in exponential growth phase: analysis in terms of several parameters." Radiat Res. **116**(1): 74-88.
- Flanders, K. C. (2004). "Smad3 as a mediator of the fibrotic response." Int J Exp Pathol. **85**(2): 47-64.
- Foray, N., C. F. Arlett and E. P. Malaise (1997). "Radiation-induced DNA double-strand breaks and the radiosensitivity of human cells: a closer look." Biochimie **79**(9): 567-75.
- Franken, N., R. ten Cate, P. Krawzyck, J. Stap, J. Haveman, J. Aten and G. Barendsen (2011). "Comparison of RBE values of high-LET alpha-particles for the induction of DNA-DSB's, chromosome aberrations and cell reproductive death." Radiation Oncology **8**(6): 64.
- Garden, A. S. (2001). "Altered fractionation for head and neck cancer." Oncology **15**(10): 1339-41.
- Geara, F., L. Peters, K. Ang, J. Wike, S. Sivon, R. Guttenberger, D. Callender, E. Malaise and W. Brock (1992a). "Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation." Cancer Research **52**(22): 6348-52.
- Geara, F. B., L. J. Peters, K. K. Ang, J. L. Wike and W. A. Brock (1992b). "Radiosensitivity measurement of keratinocytes and fibroblasts from radiotherapy patients." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **24**(2): 287-93.
- George, J., D. Roulot, V. E. Koteliansky and D. M. Bissell (1999). "In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis." Proc Natl Acad Sci USA **96**(22): 12719-24.
- Godar, S., V. Horejsi, U. H. Weidle, B. R. Binder, C. Hansmann and H. Stockinger (1999). "M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1." Eur J Immunol. **29**(3): 1004-13.
- Golfier, S., G. Jost, H. Pietsch, P. Lengsfeld, E. Schupp, E. Schmid and M. Voth (2009). "Dicentric chromosomes and γ -H2AX foci formation in lymphocytes of human blood samples exposed a CT scanner: a direct comparison of dose response relationships." Radiation Protection Dosimetry **134**(1): 55-61.
- Groesser, T., H. Chang, G. Fontenay, J. C. Chen, S. V. Costes, M. H. Barcellos-Hoff, B. Parvin and B. Rydberg (2011). "Persistence of gamma-H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to gamma-rays or iron ions." Int. J. Radiat. Biol. **87**(7): 1-15.
- Hoeller, U., K. Borgmann, M. Bonacker, A. Kuhlmeier, A. Bajrovic, H. Jung, W. Alberti and E. Dikomey (2003). "Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer." Radiotherapy and Oncology **69**: 137-144
- Huyen, Y., O. Zgheib, R. A. Ditullio, V. G. Gorgoulis, P. Zachatos, T. J. Petty, E. A. Sheston, H. S. Mellert, E. S. Stavridi and T. D. Halazonetis (2004). "Methylated lysine 70 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." Nature **432**(7015): 406-11.

- Hyytiäinen, M., C. Penttinen and J. Keski-Oja (2004). "Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation." Crit Rev Clin Lab Sci **41**(3): 233-64.
- Inoue, A., M. Sekine, M. Sumi, K. Tokuyue and N. Saijo (2001). "Radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study of risk factors and the long-term prognosis." Int J Radiat Oncol Biol. Phy. **49**(3): 649-655.
- Jakowlew, S. B. (2006). "Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis." Cancer Metastasis Rev. **25**(3): 435-57.
- Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." J Exp Med. **163**(5): 1037-50.
- Kellerer, A. M. and H. H. Rossi (1972). "Dependence of RBE on neutron dose." Br J Radiol. **45**(536): 626.
- Khalil, N., Y. D. Xu, R. O'Connor and V. Duronio (2005). "Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK." J Biol Chem. **280**(52): 43000-9.
- Kosaka, Y., Y. Okuno, Y. Tagawa, N. Ueki, K. Itoh, S. Shinohara and M. Kikuchi (2010). "Osteoradionecrosis of the cervical vertebrae in patients irradiated for head and neck cancers." Jpn J Radiol. **28**(5): 388-94.
- Kuo, L. J. and L.-X. Yang (2008). "γ-H2AX - A novel biomarker for DNA double-strand breaks." In vivo **22**: 305-310.
- Landmark-Hoyvik, H., V. Dumeaux, K. V. Reinertsen, H. Edvardsen, S. D. Fossa and A. L. Borresen-Dale (2011). "Blood gene expression profiling of breast cancer survivors experiencing fibrosis." International Journal Radiation Oncology Biology Physics **79**(3): 875-883.
- Li, M., M. S. Krishnaveni, C. Li, B. Zhou, Y. Xing, A. Banfalvi, A. Li, V. Lombardi, O. Akbari, Z. Borok and P. Minoo (2011). "Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis." J Clin Invest **121**(1): 277-87.
- Little, J., J. Nove, L. Strong and W. Nichols (1988). "Survival of human diploid skin fibroblasts from normal individuals after X-irradiation." Int J Radiat Biol. **54**(6): 899-910.
- Löbrich, M., N. Rief, M. Kühne, M. Heckmann, J. Fleckstein, C. Rube and M. Uder (2005). "In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations." Proc Natl Acad Sci USA **102**(25): 8984-9.
- Löbrich, M., A. Shibata, A. Beucher, A. Fischer, M. Ensminger, A. A. Goodarzi, O. Barton and P. A. Jeggo (2010). "γH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair." Cell Cycle **9**: 662-669.
- Lopez, E., R. Guerrero, M. I. Nunez, R. del Moral, M. Villalobos, J. Martinez-Galan, M. T. Valenzuela, J. A. Munoz-Gamez, F. J. Oliver, D. Martin-Oliva and J. M. Ruiz de Almodovar (2005). "Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes." Breast Cancer Research **7**: 690-698.
- Macphail, S. H., J. P. Banath, T. Y. Yu, E. H. Chu, H. Lambur and P. L. Olive (2003). "Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays." Int J Radiat Biol. **79**(5): 351-8.

- Mah, L. J., A. El-Osta and T. C. Karagiannis (2010). "gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair." Leukemia **24**(4): 679-86.
- Mahrhofer, H., S. Bürger, U. Oppitz, M. Flentje and C. Djuzenova (2006). "Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **64**(2): 573-580.
- Malaise, E. P., P. J. Deschavanne and B. Fertil (1989). "The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells." Int J Radiat Biol. **56**(5): 597-604.
- Markova, E., N. Schultz and I. Y. Belyaev (2007). "Kinetics and dose-response of residual 53BP1/γH2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **83**(5): 319-329.
- Martin, M., M. C. Vozenin, N. Gault, F. Crechet, C. M. Pfarr and J.-L. Lefaix (1997). "Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation." Oncogene **15**(8): 981-9.
- Martinou, M., I. Giannopoulou, G. Malatara, A. Argyriou, H. P. Kalofonos and D. Kardamakis (2011). "Ionizing radiation affects epidermal growth factor receptor signalling and metalloproteinase secretion in glioma cells." Cancer Genomics Proteomics **8**(1): 33-8.
- Massague, J. and R. R. Gomis (2006). "The logic of TGFβ signalling." FEBS Lett. **580**(12): 2811-20.
- McManus, K. J. and M. J. Hendzel (2005). "ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells." Mol Biol Cell. **16**(10): 5013-25.
- Menegakis, A., A. Yaromina, W. Eicheler, A. Dörfler, B. Beuthien-Baumann, H. D. Thames, M. Baumann and K. M. (2009). "Prediction of clonogenic cell survival curves based on the number of residual DNA double strand breaks measured by γH2AX staining." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **85**(11): 1032-1041.
- Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffith, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M. A. Matthay, D. B. Rifkin and D. Sheppard (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell Cycle **96**(3): 319-28.
- Munro, T. (1970). "The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chinese hamster fibroblasts." Radiat Res. **42**(3): 451-70.
- Nagasawa, H. and J. B. Little (1988). "Radiosensitivities of ten apparently normal human diploid fibroblasts strains to cell killing, G2-phase chromosomal aberrations, and cell cycle delay." Cancer Research **48**(16): 4535-8.
- Okunieff, P., Y. Chen, D. J. Maguire and A. K. Huser (2008). "Molecular markers of radiation related normal tissue toxicity." Cancer Metastasis Rev. **27**(3): 363-374.
- Olive, P. L., J. P. Banath and M. Keyes (2008). "Residual γH2AX after irradiation of human blood lymphocytes and monocytes in vitro and its relation to late effects after prostate brachytherapy." Radiotherapy and Oncology **86**: 336-346.
- Pantsulaia, I., S. Trofimov, L. Kalichman, E. Kobylansky and G. Liyshits (2004). "The contribution of familial resemblance to variation in circulatory levels of tissue inhibitors of metalloproteinases and transforming growth factor-β1." Calcified Tissue International **74**: 47-54.

- Phan, S. H. (2002). "The myofibroblast in pulmonary fibrosis." Chest. **122**: 286S-289S.
- Popanda, O., R. Ebbeler, D. Twardella, I. Helmbold, F. Gotzes, P. Schmezer, H. W. Thielmann, D. von Fournier, W. Haase, M. L. Sautter-Bihl, F. Wenz, H. Bartsch and J. Chang-Claude (2003). "Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions after radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol. Phy. **55**(5): 1216-1225.
- Prud'homme, G. J. (2007). "Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations." Laboratory Investigation **87**: 1077-1091.
- Puthawala, K., N. Hadjiangelis, S. C. Jacoby, E. Bayongan, Z. Zhao, Z. Yang, M. L. Devitt, G. S. Horan, P. H. Weinreb, M. E. Lukashev, S. M. Violette, K. S. Grant, C. Colarossi, S. C. Formenti and J. S. Munger (2008). "Inhibition of intergin $\alpha(v)\beta_6$, an activator of latent transforming growth factor- β , prevents radiation-induced lung fibrosis. ." Am J Respir Crit Care Med. **117**(1): 82-90.
- Raaphorst, G. P. and M. M. Feeley (1990). "Comparison of recovery from potentially lethal damage after exposure to hyperthermia and radiation." Radiat Res. **121**(1): 107-10.
- Rahimi, R. A. and E. B. Leof (2007). "TGF- β signalling: A tale of two responses." Journal of Cellular Biochemistry **102**: 593-608.
- Rancati, T., G. L. Ceresoli, G. Gagliardi, S. Schipani and G. M. Cattaneo (2003). "Factors predicting radiation pneumonitis in lung cancer studies: a retrospective study." Radiotherapy and Oncology **67**(3): 275-83.
- Ripperger, T., D. Gadzicki, A. Meindl and B. Schleglberger (2009). "Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling." Eur J Hum Genet **17**(6): 722-31.
- Rothkamm, K., S. Balroop, J. Shekhdar, P. Fernie and V. Goh (2007). "Leucocyte DNA damage after multi-detector row CT: A quantitative biomaker of low-level radioation exposure." Radiology **242**(1): 244-251.
- Rübe, C., S. Grudzenski, M. Kühne, X. Dong, N. Rief, M. Löbrich, A. Raabe and C. Rübe (2008a). "DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissue analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing." Clin Cancer Res **14**(20): 6546-55.
- Rübe, C., S. Grudzenski, M. Kühne, X. Dong, N. Rief, M. Löbrich and C. Rübe (2008b). "DNA Double-Strand Break Repair of Blood Lymphocytes and Normal Tissues Analysed in a Preclinical Mouse Model: Implications for Radiosensitivity Testing." Clin Cancer Res **14**(20): 6546-6555.
- Rubin, P., J. N. Finkelstein, D. W. Siemann, D. L. Shapiro, P. van Houtte and D. P. Penney (1986). "Predictive biochemical assays for late radiation effects." Int J Radiat Oncol Biol Phy. **17**(3): 553-558.
- Rubstov, Y. P. and A. Y. Rudensky (2007). "TGF β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity." Nat Rev Immunol. **7**(6): 443-53.
- Schirmer, M. A., J. Brockmüller, M. Rave-Fränk, P. Virsik, B. Wilken, E. Kühnle, R. Campean, A. O. Hoffmann, K. Müller, R. G. Goetze, M. Neumann, J. H. Janke, F. Nasser, H. A. Wolff, B. M. Ghadimi, H. Schmidberger, C. F. Hess, H. Christiansen and A. Hille (2011). "A putatively functional haplotype in the gene encoding transforming growth factor β -1 as a potential biomarker for radiosensitivity." Int J Radiat Oncol Biol Phy. **79**(3): 866-74.

- Schultz-Cherry, S., S. Ribeiro, L. Gentry and J. E. Murphy-Ullrich (1994). "Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system." J Biol Chem. **269**(43): 26775-82.
- Sedelnikowa, O., E. P. Rogakou, I. G. Panyutin and W. M. Bonner (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." Radiat Res. **158**(4): 486-92.
- Siegel, P. M. and J. Massague (2003). "Cytostatic and apoptotic actions of TGFbeta in homeostasis and cancer." Nat Rev Cancer **3**(11): 807-21.
- Stover, D. G., B. Bierie and H. L. Moses (2007). "A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment." J Cell Biochem. **101**(4): 851-61.
- Strutz, F., M. Zeisberg, A. Renziehausen, B. Raschke, B. V., C. van Kooten and G. Müller (2001). "TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF2)." Kidney Int. **59**(2): 579-92.
- Tucker, S. L., I. Turesson and H. D. Thames (1992). "Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin." Eur J Cancer **28A**(11): 1783-91.
- Turner, N., A. Tutt and A. Ashworth (2005). "Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours." Curr Opin Pharmacol. **5**(4): 388-93.
- Vodovotz, Y., M. S. Lucia, A.-M. DeLucca, J. B. Mitchell and J. B. Kopp (2000). "Reduced hematopoietic function and enhanced radiosensitivity of transforming growth factor- β 1 transgenic mice." Int. J. Cancer **90**: 13-21.
- von Pfeil, A., L. Hakenjos, C. Herskind, K. Dittmann, M. Weller and H. P. Rodemann (2002). "Irradiated homozygous TGF- β 1 knockout fibroblasts show enhanced clonogenic survival as compared with TGF- β 1 wild-type fibroblasts." Int. J. Radiat. Biol. **78**(5): 331-339.
- Wahl, S. M. (2007). "Transforming growth factor beta: innately bipolar." Curr Opin Immunol. **19**(1): 55-62.
- Wahl, S. M., D. A. Hunt, L. M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, A. B. Roberts and M. B. Sporn (1987). "Transforming growth factor beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production." Proc Natl Acad Sci USA **84**(16): 5788-92.
- Yamada, M., S. Kudoh, K. Hirata, T. Nakajima and J. Yoshikawa (1998). "Risk factors of pneumonitis following chemoradiotherapy for lung cancer." European Journal of Cancer **34**(1): 71-75.
- Zhao (2009). "Elevation of plasma TGFbeta-1 during radiation therapy predicts radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **74**: 1385–1390.
- Zschenker, O., A. Raabe, I. K. Boeckelmann, S. Borstelmann, S. Szymczak, S. Wellek, D. Rades, U. Hoeller, A. Ziegler, E. Dikomey and K. Borgmann (2010). "Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD, and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity." Radiotherapy and Oncology.