

Lehrstuhl für Strahlentherapie und medizinische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

**Strahleninduzierte Genexpression
in L 929-Zellen**

Christian G. A. Ruf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. Abend
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 07.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis	<u>Seite</u>
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Verzeichnis der Gene	V
1 Einleitung	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Zelltodesformen	3
2.1.1 Apoptose und Nekrose	3
2.1.1.1 Definition und Morphologie	3
2.1.1.2 Ursachen	5
2.1.1.3 Aufgaben der Apoptose (teleologische Betrachtungsweise)	5
2.1.1.4 Signaltransduktion	6
2.1.1.5 Apoptose-Nekrose-Kontinuum	7
2.1.2 Mikrokern-Bildung	8
2.1.2.1 Definition und Morphologie	8
2.1.2.2 Entstehung	8
2.1.2.3 Funktion der Mikrokernbildung	9
2.1.2.4 Signaltransduktion	10
2.1.2.5 Nachweisverfahren	10
2.1.2.6 Prozesse, die zur MN-Bildung bzw. zur Apoptose führen im Vergleich	11
2.2 Genexpressionsarray	11
2.2.1 Das Prinzip des Atlas TM Mouse 1.2 Array (Clontech)	12
3 Material und Methoden	14
3.1 Versuchsdesign und Vorarbeiten	14
3.2 Auswertung	15
3.2.1 Digitalisierung	15
3.2.2 Normalisierung	16
3.2.3 Anpassen der Auswertungsmaske an die Hybridisierungssignale	17
3.2.4 Bearbeitung der Rohdaten	19
3.2.5 Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität	22

3.2.6	Selektion geeigneter Gene	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Auswahl geeigneter Autoradiografien und Digitalisierung	26
4.2	Auswertung	28
4.2.1	Einstellung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Methode	28
4.2.2	Differentiell exprimierte Gene nach Bestrahlung	32
4.2.2.1	Unterteilung der differentiell exprimierten Gene gegen Zeit und Strahlendosis	32
4.2.2.1.1	72 differentiell exprimierte Gene	32
4.2.2.1.2	Selektion der sieben, für die biologische Dosimetrie geeignetsten Gene	35
4.2.2.2	Unterteilung der differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit von ihrer Hauptfunktion	40
5	Diskussion	49
5.1	Methodik	49
5.1.1	Genexpressionsarray	49
5.1.2	Hybridisierung und Autoradiographie	49
5.1.3	Atlas Image 2.01 Software	50
5.1.4	Einstellung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode	51
5.1.5	Normalisierung	52
5.1.6	Reproduzierbarkeit der durchgeführten Experimente	53
5.2	Genexpression - Differentiell exprimierte Gene nach Bestrahlung	54
5.2.1	Strahleninduzierte differentielle Genexpression bei unterschiedlichen Zellreihen	58
5.2.2	Differentielle Genexpression bei unterschiedlichen Stressoren und Zelllinien	63
5.2.2.1	Differentielle Genexpression bei der Zelllinie L929 und unterschiedlichen Stressoren	67
5.2.2.2	Strahleninduzierte differentielle Genexpression der 52 Gene in anderen Zelllinien	67
5.2.2.3	Chemotherapeutika-induzierte differentielle Genexpression der 52 Gene in anderen Zellreihen	69
5.3	Mikrokernbildung	72
5.3.1	Einfluss der differentiell exprimierten, Apoptose regulierenden Gene auf die Mikrokernbildung	72
5.3.2	Mikrokernbildung bei unterschiedlichen Zellreihen und Stressoren	73

6. Zusammenfassung	75
7. Literaturverzeichnis	77
8. Anhang	96
Danksagung	111
Lebenslauf	112

Verzeichnis der Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca	Karzinom
CB-Test	Zytokinese-blockierender-Cytochalasin-B-Mikrokern-Test
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	dots per inch
et al.	und andere (et altera)
Fa.	Firma
Gy	Gray
h	Stunde(n)
IR	ionisierende Strahlung
kb	Kilobase(n)
MAA	Summe mikrokernhaltiger, apoptotischer und abnormaler Zellen
min	Minute(n)
MN	Mikrokern(e)
mRNA	messenger RNA
p.r.	nach Strahlenexposition (post radiationem)
PCR, RT-PCR	Polymerasekettenreaktion, Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RTQ-PCR	Real-Time-Quantitative PCR
S.	Seite
SAR	Scaffold Attachment Region
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of Mean)
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

Verzeichnis der Gene/cDNA-Spezies:

Offizielles Symbol und Genname der 72 differentiell exprimierten Gene

Offizielles Symbol	Genname
Refbp2	RNA and export factor binding protein 1
Evx-1	even skipped homeotic gene 1 homolog
Tcf12	transcription factor 12
Atf4	activating transcription factor 4
Hmgn1	high mobility group nucleosomal binding domain 1
Zfx	zinc finger protein X-linked
Ccng1	cyclin G1
Ccna2	cyclin A2
Ccnb1	cyclin B1
Ccne1	cyclin E1
Nek3	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 3
Gmn	geminin
Ctnd2	catenin delta 2
Cdh1	cadherin 1
Ctnna1	catenin alpha 1
Sema5a	semaphorin 5A
Dag1	dystroglycan 1
Sema5b	semaphorin 5B
Ttf1	transcription termination factor 1
Elk3	ELK3, member of ETS oncogene family
Jun	Jun oncogene
Jund1	Jun proto-oncogene related gene d1
Fosl2	fos-like antigen 2
Myc	myelocytomatosis oncogene
Vil2	villin 2
Hsp110	heat shock protein
Hsp90ab1	heat shock protein 1, beta
Hspa5	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1
Sqstm1	sequestosome 1
Pdia4	calcium binding protein, intestinal
Prnp	prion protein
Rpsa	laminin receptor 1 (ribosomal protein SA)
Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
Fas	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
Bax	Bcl2-associated X protein
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3
Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
Clu	clusterin
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
Dynl1	dynein, cytoplasmic, light chain 1
Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1
Csf2ra	colony stimulating factor 2 receptor, alpha
Ryk	receptor-like tyrosine kinase
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4
Fgf7	fibroblast growth factor 7
Vegfa	vascular endothelial growth factor A

Offizielles Symbol	Genname
Rxra	retinoid X receptor alpha
Map2k4	mitogen activated protein kinase kinase 4
Map3k3	mitogen activated protein kinase kinase kinase 3
Ppm1a	protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform
Rab2	RAB2, member RAS oncogene family
Cdc42	cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)
Cacybp	calcyclin binding protein
Calm1	calmodulin 1
Zyx	zyxin
Ctsl	cathepsin L
App	amyloid beta (A4) precursor protein
Cst3	cystatin C
Cfl1	cofilin 1, non-muscle
Sdc3	syndecan 3
Col6a1	procollagen, type VI, alpha 1
Fn1	fibronectin 1
Myl6	myosin light chain, alkali, nonmuscle
Rag1ap1	recombination activating gene 1 gene activation
Pcna	proliferating cell nuclear antigen
Rad23b	RAD23b homolog (S. cerevisiae)
Rad21	ribosomal protein S11
Ssrp1	structure specific recognition protein 1
Pten	phosphatase and tensin homolog

1 Einleitung

Vor über 100 Jahren wurden von Wilhelm Konrad Röntgen die nach ihm benannten Röntgenstrahlen entdeckt. Die diagnostische und therapeutische Bedeutung dieser Strahlen wurde schnell erkannt und setzte sich in der Medizin immer mehr durch. Die Strahlentherapie ist ein fester Bestandteil der modernen Medizin und spielt eine wichtige Rolle z.B. in der Behandlung von Tumorerkrankungen. Ziel der Strahlentherapie ist es idealerweise eine Tumorerkrankung herbeizuführen. Die Strahlen schädigen dabei nicht nur die DNA sondern auch andere Zellbestandteile. Die Reaktion der Zelle, den Schaden zu reparieren oder den Zelltod einzuleiten, hängt von dem geschädigten Zellorganell, dem Ausmaß des Schadens und der Zellart ab.

Kurz nach der Entdeckung der Röntgenstrahlen wurden auch deren Nebenwirkungen erkannt. Die Nebenwirkungen reichten von der Irritation der Organe bis zu Verbrennungen oder der Entwicklung von Tumoren. In den letzten Jahren ist die Nebenwirkungsrate z.B. durch neuere Therapiemethoden und bessere Abschirmung deutlich reduziert worden. Eine Individualisierung der Strahlentherapie könnte die Nebenwirkungsrate weiter senken ohne den Therapieerfolg zu minimieren. Ziel der radiobiologischen Forschung ist es, biologische Parameter zu finden, die strahleninduzierte Zellschäden früh erkennen. Damit wäre eine Abschätzung der individuellen Strahlenempfindlichkeit möglich und eine Individualisierung der Therapie durchführbar.

Ein anderes Einsatzgebiet der biologischen Parameter kann die biologische Dosimetrie bei Strahlenunfällen sein. Um das Ausmaß von Strahlenunfällen einschätzen zu können, ist neben dem individuellen Strahlenschaden eine Bestimmung der Dosis, aber auch der Zeitpunkt des Strahlenunfalls von Interesse. Hierbei können biologische Parameter wie die differentielle Genexpression bestimmter Gene eine wichtige Rolle spielen.

Ziel ist es, Gene zu finden, die Strahlenschäden frühzeitig aufzeigen. Durch die Bestimmung der differentiellen Genexpression dieser Gene kann viel früher eine Aussage über den Strahlenschaden gemacht werden als nach Betrachtung der morphologischen Veränderungen, da diese erst später auftreten.

In der Literatur sind verschiedene Zelltodesformen beschrieben. Bei Apoptose, Mikrokernbildung und anderen Zelltodesformen handelt es sich wahrscheinlich um eine

aktive Form der Selbstzerstörung. Die Zelltodesform korreliert, unabhängig von der verwendeten Zellart, mit dem strahleninduzierten Zellschaden (Abend 2000, S.249).

Diese aktiven Formen der Selbstzerstörung werden über die Genexpression geregelt. Über die differentielle Genexpression nach Einwirkung eines Stressors können Schlüsselgene im Prozess des aktiven Zelltodes identifiziert und durch weitere Untersuchungen ihre genaue Funktion analysiert werden.

Die folgende Arbeit hat die differentielle Genexpression an der Zelllinie L929 untersucht. Dabei handelt es sich um Mäusefibroblasten, die nach Bestrahlung den Zelltod durch Mikrokernbildung durchlaufen.

Die Bestimmung der differentiellen Genexpression als potentieller biologischer Parameter zur Bestimmung des Strahlenschadens war die Hauptfragestellung, die mit dieser Arbeit untersucht werden sollte. Die Ergebnisse wären zur Optimierung der Strahlentherapie geeignet und könnten als biologische Dosimetrie nach Strahlenunfällen angewendet werden.

Des Weiteren wurde die differentielle Genexpression in Bezug auf Schlüsselgene betrachtet, die bei der aktiven Zelltodesform Mikrokernbildung eine Rolle spielen.

2 Stand des Wissens

2.1 Zelltodesformen

Die Meinung über Zelltodesformen in der Literatur hat sich im Laufe der letzten Jahre gewandelt. Zunächst wurde Apoptose als aktiver Prozess der Selbstzerstörung erkannt, der von der Zelle durch verschiedene Mechanismen eingeschaltet werden kann. Später veröffentlichte Modelle zeigten, dass es zwei aktive Zelltodesformen gibt. Die Zelle könnte entweder durch Apoptose oder durch Nekrose zugrunde gehen. Zwischen den beiden Zelltodesformen zeigten sich Übergangsformen, so dass das Modell des Apoptose-Nekrose-Kontinuums beschrieben wurde. Melino et al. fanden beispielsweise im Jahre 2000 (S.1001) das Stickstoffmonoxid (NO) als „Umschalter“ von der Apoptose zur Nekrose. Neuerdings wird diskutiert, ob die Zelle über bereits für Apoptose und Nekroseformen definierte Signaltransduktionswege auch an anderen Formen des Zelltodes beteiligt sein könnte (Abend 2003, S.931). Hierzu gehört zum Beispiel die Mikrokernbildung, die Zelltodesart der Mäusefibroblasten (L929) nach Strahlenexposition, aber auch terminale Differenzierung, Multikernbildung und Pulverisation. Welche Zelltodesform durchlaufen wird ist z.B. abhängig vom Zelltyp, der Art und der Intensität des Auslösers (Abend 2003, S.935). Im Folgenden sind die Definition und Morphologie sowie die Aufgaben der Apoptose, der Nekrose und der Mikrokernbildung als wichtigste Zelltodesformen beschrieben.

2.1.1 Apoptose und Nekrose

2.1.1.1 Definition und Morphologie

Die **Apoptose** stellt eine aktive Form des Zelltodes dar. Der aktive Zelltod, der von der Zelle selbst ausgelöst wird, wurde zuerst bei der Apoptose gefunden. Folgende charakteristische morphologische und biochemische Zellveränderungen liegen dem Vorgang zugrunde:

Es findet eine Zellschrumpfung und eine DNA-Kondensation entlang der Kernmembran statt. Das Zytoplasma bildet typische Ausstülpungen aus. Dieser Vorgang wird als Knospung bzw.

„budding“ bezeichnet. Bedingt durch Abschnürung kommt es zur Entstehung von sogenannten „apoptotischen Körperchen“. Hierbei handelt es sich um kleine, mit einer intakten Zellmembran versehene Strukturen. Sie treten in Folge einer Fragmentierung der Zelle und des Zellkerns auf. Letztendlich wird mittels freigesetzten Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängigen, intrazellulären Endonukleasen die DNA durch internukleosomale Spaltung abgebaut. Dadurch, dass Endonukleasen nicht hinter jedem Nukleosom spalten, entstehen DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen. Die Länge beträgt ca. 200 Basenpaare (DNA-Fragmente zwischen zwei Makrosomen) und ein Vielfaches davon. Die DNA-Bruchstücke unterschiedlicher Länge wandern in der Gelelektrophorese unterschiedlich weit, so dass sie wie Sprossen einer Leiter erscheinen, die so genannte DNA-Leiter. Die Degeneration der DNA ist ein mehrstufiger Prozess, der von etwa 1000 Kilobasenpaaren bis zu 200 Basenpaaren reicht (Walker *et al.* 1995, S.97).

Der Vorgang ruft keine Entzündungsreaktionen hervor, da die Membranintegrität der Zellen dabei weitgehend erhalten bleibt. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Dapi (4,6-Diamidino-2-phenylindol), das den Zellkern anfärbt, lässt sich die Chromatinkondensation fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.

Heute besteht die Tendenz, Apoptose als Sammelbegriff für verschiedene Zelltodesformen wie z.B. Nekrobiose, Onkose, individueller Zelltod, programmierter Zelltod, Koagulationsnekrose, terminale Differenzierung und Interphase-Zelltod zu benutzen (Abend 2003, S.927). Das führt immer wieder zu ungenauen Bezeichnungen verschiedener Zelltodesformen.

Im Gegensatz zur Apoptose wird die **Nekrose** als vorwiegend passiver Prozess mit katabolischem und degenerativem Charakter angesehen. Die Nekrose wurde bislang als ein extern induzierter Zelltod betrachtet und wurde nicht, wie die Apoptose, im Sinne eines durch die Zelle induzierten Zelltodes verstanden. Für die Nekrose sind folgende morphologische Veränderungen kennzeichnend:

Das Anschwellen der Zelle, die Chromatinauflockerung und die Ruptur von Zellorganellen gehören zu den charakteristischen Veränderungen. Durch freigesetzte Enzyme folgt eine lysosomale Autodigestion mit lokalem Gewebsuntergang, auch der benachbarten Zellen. Im Gegensatz zur Apoptose finden sich dabei oft überschießende Entzündungsreaktionen. Letztlich kommt es bei nekrotischen Prozessen zu einer randomisierten Spaltung der DNA, die sich gelelektrophoretisch als Schmier darstellt und nicht wie bei der Apoptose als eine DNA-Leiter. Im Endstadium werden bei der Nekrose Zellfragmente (Pyknosen) gefunden.

2.1.1.2 Ursachen

Stressoren unterschiedlichster Art kommen als mögliche Auslöser für **Apoptose** infrage. Dazu gehören beispielsweise: ionisierende Strahlung, chemische Substanzen, Verarmung an Wachstumsfaktoren oder Hormonen und Virusinfektionen (Bohm et al. 2006, S.264). Die Empfindlichkeit und damit die Apoptoserate einzelner Zelllinien zeigen zum Teil beträchtliche Unterschiede. Die oben genannten Stressoren können zelltypspezifisch Apoptose auslösen.

Dagegen stellt die **Nekrose** oft einen Vorgang externer, toxischer Genese dar. Als Auslöser kommen vor allem Verbrennungen oder die Einwirkung ätzender Chemikalien in Frage. Es hat sich aber herausgestellt, dass nicht nur der Auslöser, sondern auch die Konzentration des Agens Einfluss auf die Zelltodesform nimmt. So können bestimmte Stoffe in niedriger Konzentration eine Apoptose auslösen, höher konzentriert durch sofortige Zerstörung der Zellmembran die Nekrose einleiten und damit der Zelle keine Zeit mehr lassen, den Weg des „Selbstmordes“ mittels Apoptose zu beschreiten (Hirsch et al. 1997, S.1573, Wertz und Hanley 1996, S.359). Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Nekrose häufig eine Gruppe von benachbarten Zellen betrifft, wohingegen durch Apoptose selektiv einzelne Zellen zugrunde gehen.

2.1.1.3 Aufgaben der Apoptose (teleologische Betrachtungsweise)

Die **Apoptose** als Zelltodesform kann dem Organismus, nach dem jetzigen Verständnis, in mehrerer Hinsicht dienen:

- Sie schützt vor der Weitergabe geschädigter DNA.
- Im Rahmen der Onkogenese kann sie die Vermehrung von transformierten Zellen verhindern.
- Sie wirkt der Weitergabe viraler DNA, die sich in eine Zelle eingeschleust hat, entgegen (Ashwell et al. 1994, S.147, Isaacs 1994, S.82).
- Der „programmierte Zelltod“, oft analog mit dem Begriff Apoptose verwendet, beschrieb ursprünglich die Modellierung dreidimensionaler Strukturen (z.B. Gehirn, Nase) im Rahmen der Embryonalentwicklung.
- Sie hält die Homöostase in ausdifferenzierten Geweben als Gegenspieler zur Mitose aufrecht (Kerr et al. 1972, S. 239).

2.1.1.4 Signaltransduktion

Die **Apoptose** stellt einen Mehrstufenprozess dar. Sie besteht aus: Initiationsphase, Integrationsphase und Exekutionsphase. Die Apoptose wird durch Signaltransduktionsmoleküle vermittelt (Schwartz und Osborne 1993, S. 582, Vaux 1993, S. 786).

Die Initiation der Apoptose kann über verschiedene Wege stattfinden. Zum einen kann über Rezeptoren (Fas-, TNF-, und TRAIL-Rezeptor), die über eine „Todesdomäne“ verfügen, das Apoptoseprogramm induziert werden (Dragovich et al. 1998, S.3207). Zum anderen kann die Freisetzung von Lipidspaltprodukten, den Ceramiden als Bestandteile des Sphingomyelinstoffwechsels (Obeid et al. 1993, S.1769, Sawai et al. 1995, S.27326) durch die Sphingomyelinase Apoptose initialisieren. Die Sphingomyelinase wird durch ionisierende Strahlen induziert. Eine weitere Wirkung der ionisierenden Strahlung ist es, durch DNA Defekte oder Hochregulation des Tumorsuppressorgens p53 (Fukunaga-Johnson et al. 1995, S. 1761, Goetz und Montenahr 1995, S.1129, Lee und Bernstein 1995, S.149, Strasser et al. 1994, S.329) die Apoptose zu initialisieren. Die beschriebenen Wege lösen pro-apoptotische Signale aus.

In der Integrationsphase findet die Verarbeitung von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Signalen statt. Verschiedenste Signale z.B. von Mitgliedern der Bcl₂-Familie (Hockenbery et al. 1993, S.241 und Hockenbery 1995, S.16) werden integriert. BAX beispielsweise kann durch die Aktivierung von Caspasen mit Hilfe von Cytochrom C und durch Beeinflussung der Apoptose-Aktivator Aktivität die Apoptose induzieren. BCL-2 hingegen ist ein Protein der Bcl-2 Familie mit anti-apoptotischer Wirkung. Nach Integration dieser verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Signale wird Apoptose aktiviert oder inaktiviert.

In der Exekutionsphase wird über die Aktivierung von Caspasen wie Interleukine-1 β converting enzyme (ICE) (Kuida et al. 1995, S.2000, Thornberry und Lazebnik 1998, S.1312) der Abbau der Zelle in Gang gesetzt. Caspasen spielen beim geordneten Zelluntergang eine zentrale Rolle (Salvesen *et al.* 1997, S.443).

Weiterhin wurde für viele andere Gene eine Beteiligung an der Apoptose nachgewiesen. Dazu gehören beispielsweise das Protoonkogen c-myc (Kerr et al. 1994, S.2013, Wagner 1993, S.2432), die Transkriptionsfaktoren E2F-1 (Shan et al. 1994, S.8166), NF_κB (Mohan et al. 1994, S.97, Granville et al. 1998, S.893). Ebenso regulieren unter anderem die Protein-Kinase C und A (PKC, PKA) (Fuks et al. 1995, S.12, Ojeda et al. 1995, S.389) apoptotische

Prozesse. Auch Zytokine und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, SCF und NGF sind an der Apoptoseregulation beteiligt (Demirci und Li 2004, S.123, Letai 2006, S.729).

Daneben sind auch strahleninduzierte Sauerstoffradikale, sogenannte „reactive oxygen intermediates“ (ROI), als Mediatoren für Apoptose nachgewiesen worden (Buttke und Sandstrom 1994, S.7, Slater et al. 1995, S.59).

Diese Auflistung gibt nur einen Einblick in den aktuellen Stand der Forschung und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Neuerdings wurde auch für die **Nekrose** eine Assoziation mit spezifischen Signaltransduktionswegen entdeckt. Ein Caspase-unabhängiger Signaltransduktionsweg, der über Rezeptoren mit „Todesdomäne“ zur Nekrose führt, wurde in verschiedenen *in vitro*-Modellen nachgewiesen (Denecker et al. 2001, S.356). In weiteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Nekrose in Abhängigkeit von der Höhe des durch Cisplatin verursachten Zellschadens entweder direkt oder als Folge eines unvollständig ablaufenden Apoptoseprogramms induziert werden kann (Gonzalez et al. 2001, S.657).

2.1.1.5 Apoptose-Nekrose-Kontinuum

Kerr und Mitarbeiter untersuchten 1972 ischämisch bedingte Leberschäden. Sie fanden neben der Nekrose eine zweite, unbekanntere Zelltodesform, die sie als Apoptose bezeichneten. Sie benutzten die oben genannten charakteristischen morphologischen Veränderungen, um diese „neue“ Zelltodesform zu definieren. Durch die deutlichen morphologischen Unterschiede beider Zelltodesarten wurden diese als gegensätzliche betrachtet. Mittlerweile weicht sich diese anfänglich postulierte strikte Trennung auf. Neuere Untersuchungen weisen auch bei verschiedenen Nekroseformen eine aktive Beteiligung der Zelle und spezifische Signaltransduktionswege (s.o.) nach. Collins et al. (1992, S.451) fanden auch bei nekrotischen Prozessen Hinweise für eine DNA-Leiter und entdeckten Apoptose auch ohne erkennbare, geordnete DNA-Spaltung. Deshalb werden von manchen Autoren (Columbano 1995, S.181, King und Cidlowski 1995, S.175) Nekrose und Apoptose auch als Endpunkte eines zunächst gemeinsam beschrittenen Weges betrachtet.

Aktuell wird ein „Apoptose-Nekrose-Zelltod-Kontinuum“ (Martin 2001, S.455) diskutiert: Dabei wurde eine Aufweichung der Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose diskutiert. In neuesten Veröffentlichungen werden, wie am Anfang des Kapitels beschrieben, die

Apoptose und die Nekrose als zwei von vielen möglichen aktiven Zelltodesformen angenommen. Die Beteiligung von Signaltransduktionsmechanismen der Apoptose und Nekrose, die eine aktive Zelltodesform auszeichnen, werden auch bei der Mikrokernbildung beschrieben (Abend 2003, S.931). Die Aussagen, Apoptose sei der „Selbstmord“ und Nekrose der „Mord“ einer Zelle bilden angesichts aktueller Forschungsergebnisse die Biologie nicht richtig ab und sollten zugunsten des Apoptose-Nekrose-Kontinuums verlassen werden.

2.1.2 Mikrokern-Bildung

Schon vor über 100 Jahren entdeckten und beschrieben Howell (1891, S.57) und Jolly (1907, S.133) Mikrokerne (MN). Deshalb wurden sie anfangs nach ihren Entdeckern Howell-Jolly-Körperchen genannt. Nach Exposition von Röntgenstrahlung beispielsweise treten sie in manchen Zellen (z.B. L929) auf. Evans und seine Mitarbeiter versuchten deshalb MN als Indikatoren für strahleninduzierte Zellschäden einzusetzen (Übersicht bei Heddle et al. 1983).

2.1.2.1 Definition und Morphologie

Bei MN handelt es sich um mit einer Kernmembran versehene Chromatinfragmente. Sie stellen sich als kleine Kerne im Zytoplasma der Zelle dar und können ganze Chromosomen oder, nach Strahlenexposition typischerweise, azentrische Chromosomenfragmente (Heddle et al. 1983, S.61) beinhalten. Die Form der Körperchen ist rund bis oval. Die Größe schwankt erheblich und kann bis zu einem Drittel des Hauptkerns ausmachen. Entsprechend dem Zellkern weisen sie eine Doppelmembran mit Kernmatrix und Kernporen auf (Müller und Streffer 1994, S.4). Sie sind zur RNA- wie auch mRNA-Synthese befähigt (Kato und Sandberg 1968, S.165).

2.1.2.2 Entstehung

Die Entstehung der MN wird gemeinhin als passiver Prozess betrachtet.

MN können dabei auf verschiedenen Wegen entstehen:

- **Azentrische Chromosomenfragmente**, die weder eine Zentromerregion noch eine Kinetochorstruktur aufweisen, bieten dem Spindelapparat während der Mitose keinen Ansatzpunkt und können aus diesem Grund nicht in den neu entstehenden Tochterkern eingeschleust werden. Sie entstehen nach dem Einwirken ionisierender Strahlung und chemischer Substanzen (Hayashi et al. 1984, S.129, Heddle und Carrano 1977, S.63, Pincu et al. 1984, S.61 und 1985, S.423). Ursache ihrer Entstehung sind DNA-Doppelstrangbrüche (Obe et al. 1982, Natarajan et al. 1986, S.231).
- **Multizentrische Chromosomen** besitzen mehr als ein Kinetochor, so dass die Spindelfasern beider Zellpole am Chromosom ansetzen und dieses somit nicht in den Tochterkern eingebracht werden kann.
- **Chromosomen mit geschädigten Kinetochoren** können ebenfalls nicht in den Tochterkern inkorporiert werden, da sie nicht mehr als Ansatzpunkte für die Spindelfasern dienen können (Brenner et al. 1980, S.139).
- Auch eine **Schädigung des Spindelapparates** durch Spindelgifte wie Colcemid oder Vincristin kann die Bildung von MN zur Folge haben (Maier und Schmid 1976, S.325, Chai et al. 1985, S.13).

Über verschiedene Techniken wurde nachgewiesen, dass durch ionisierende Strahlung induzierte MN vorwiegend azentrische Chromosomenfragmente beinhalten (Viaggi et al. 1987, S.367, Salassidis et al. 1992, S.1).

2.1.2.3 Funktion der Mikrokernbildung

Die Funktion der Mikrokernbildung ist noch nicht vollständig geklärt. Sie könnte der Separation beschädigter oder nicht benötigter Erbinformation dienen. Diese Vermutung wird bestätigt durch das Wissen, dass physiologischer Weise das inaktivierte (nicht benötigte) X-Chromosom in Mikrokernen aufbewahrt und archiviert wird (Tucker *et al.* 1996, S.471).

Aus der Mikrokernbildung resultiert eine eingeschränkte Funktionalität und eine aufgehobene Klonogenität der Zelle. Es könnte sich um ein ökonomisch sinnvolles Verfahren im Umgang mit nicht reparablen Zellschäden, die aber mit dem Leben vereinbar sind, handeln. Leicht beschädigte Zellen werden an der Vermehrung und damit der Organismus an der Verbreitung falscher Erbinformation gehindert. Die beschädigten Zellen müssen, im Gegensatz zur Apoptose, nicht innerhalb weniger Stunden ersetzt werden.

2.1.2.4 Signaltransduktion

Apoptose induzierende Signaltransduktionsmoleküle sind nach neuesten Untersuchungen auch an der Entstehung von MN nach Einwirkung ionisierender Strahlung beteiligt. Die MN-Bildung wird durch Ceramide, Topoisomerase II und Endonukleasen verstärkt, durch PKC dagegen wird sie gehemmt. Diese Ergebnisse weisen auf einen aktiven, von der Zelle selbst gesteuerten Prozess bei der Bildung von MN zumindest in L929-Zellen hin (Abend et al. 1999, S.1567, Abend 2001, S.88).

2.1.2.5 Nachweisverfahren

Der MN Nachweis ist von der Proliferation des bestrahlten Gewebes abhängig, da MN frühestens nach Durchlaufen der ersten Mitose erkannt werden.

Unter Verwendung des „**Zytokinese-blockierende-Cytochalasin-B-Test**“ (**CB-Test**) nach Fenech und Morley (1985, S.233) können Zellen, die vor der Mitose stehen von solchen, die die Mitose bereits durchlaufen haben, unterschieden werden. Bei dem Verfahren werden als Endpunkt die binukleären Zellen mit und ohne Mikrokernen gezählt. Tetranukleäre Zellen sind Ausdruck der zweiten Teilung nach CB-Gabe und werden nicht gezählt.

Die MN-Bildung nach ionisierender Strahlung folgt einem typischen zeitlichen Verlauf. Dabei kommt es zunächst zu einem deutlichen Anstieg der MN-Frequenz. Verantwortlich dafür sind Zellen, welche die Mitose bereits durchlaufen haben, da erst nach der Mitose die strahleninduzierte Fragmentation der DNA sichtbar wird. Gegen die Zeit p.r. nimmt die MN-Frequenz scheinbar ab. Das hängt damit zusammen, dass MN-haltige Zellen ihre Klonogenität verloren haben. Nur Zellen, die keine MN bilden, sind weiterhin zur Proliferation fähig. Dadurch nimmt relativ betrachtet die Anzahl MN-haltiger Zellen ab.

Mithilfe des „**Maximum Yield**“-MN-Assay (Almassy et al. 1987, S.241) wird die MN-Bildung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung ermittelt. Die maximale MN-Frequenz korreliert mit der Strahlendosis und der Klonogenität der untersuchten Zelllinie.

Der Maximum Yield-Assay erfasst die Proliferation der Zellen unschärfer als der CB-Test. Nach ionisierender Bestrahlung treten die Zellen jedoch in einen G2-Block ein, was zu einer Kumulation und damit zu einer Teilsynchronisierung dieser Zellen führt. Nachdem der G2-Block aufgehoben ist, durchlaufen die Zellen die Mitose, woraufhin die MN-haltigen Zellen, die durch den G2-Block zurückgehalten wurden, sichtbar werden.

Mit steigender Strahlendosis nimmt auch die Dauer des G2-Blocks zu, wodurch das Maximum der MN-haltigen Zellen später auftritt. Aus diesem Grund ist es nötig, die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen.

2.1.2.6 Prozesse, die zur MN-Bildung bzw. zur Apoptose führen im Vergleich

Der Zusammenhang zwischen Mikrokernbildung und Apoptose ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Es bestehen Hinweise auf Gemeinsamkeiten beider Prozesse. So zeigt sich bei den ersten Schritten der Apoptose, der Einfluss der Scaffold Attachment Region (SAR) auf die Bildung von großen DNA-Fragmenten (Walker et al. 1995, S.97). Das Gleiche wurde für die Mikrokernbildung nachgewiesen (Abend et al. 1999, S.1567). Andererseits wurde der weitere DNA-Abbau auf internukleosomaler Ebene nur bei der Apoptose nachgewiesen (Abend et al. 1999). Daher könnte die Mikrokernbildung mit der frühen Phase der Apoptose gleichgesetzt werden. Andererseits können beide Prozesse als voneinander unabhängig betrachtet werden, vorausgesetzt, sie benutzen für bestimmte Prozesse und Aktivitäten die gleichen genetischen Programme.

2.2 Genexpressionsarray

Mit bisherigen technischen Möglichkeiten wie z.B. der RT-PCR oder des Northern Blot konnten nur wenige Gene gleichzeitig untersucht werden. Einen Überblick über eine Vielzahl von Genen zu bekommen wäre mit diesen Methoden sehr zeit-, material- und personalaufwendig. Um die differentielle Genexpression vieler hundert Gene zu bestimmen, eignet sich dagegen der Genexpressionsarray. Er bietet die Möglichkeit, mehrere Tausend Gene bzw. das gesamte Genom gleichzeitig zu untersuchen. Es existieren beispielsweise „cDNA-Microarrays“, die über 5000 Gene (Wang et al. 1999, S.101) oder auch 11000 Gene (Voehringer et al. 2000, S.2680) erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene mittels eines Genexpressionsarrays der Firma Clontech untersucht. Ein Array enthält eine bestimmte Anzahl auf einer Nylonmembran fixierter cDNA-Spezies, an die komplementäre freie cDNA aus einer Probe hybridisieren kann. Die cDNA-Spezies sind auf einer Unterlage, in diesem Fall Nylon, fixiert. Durch dieses Verfahren lässt sich eine große Anzahl an Genen gleichzeitig untersuchen. Das Verfahren ermöglicht ein Screening nach Änderungen der differentiellen

Genexpression, da aus dem gesamten Genom die differentielle Genexpression einzelner Gene ermittelt werden kann.

Der in dieser Arbeit benutzte Array der Firma Clontech untersucht fast 1200 unter besonders starker Transkriptionskontrolle stehende Gene. Unter diesen Genen befinden sich neun Haushaltsgene („Housekeeping Genes“), wie beispielsweise Ubiquitin und Phospholipase A2. Dabei handelt es sich um Gene, deren Genprodukte ständig benötigt werden, weshalb sie in praktisch allen Zellen des Organismus auf fast gleichbleibendem Niveau exprimiert werden. Ihre konstante Expression ist idealerweise unabhängig vom Einfluss eines Stressors. Aus diesem Grund dienen sie dem Atlas Array als Hybridisierungsstandard und können zur Normalisierung beim Vergleich zweier Proben herangezogen werden. Die übrigen ausgewählten Gene sind solche, deren Transkripte Schlüsselrollen in verschiedenen biologischen Prozessen zugeschrieben werden.

Sie sind in sechs Gruppen zusammengefasst:

- Onkogene, Tumorsuppressoren und Zellzyklusregulatoren
- Gene für die Widerstandsfähigkeit der Zelle, Ionenkanäle und Ionentransport, Intrazelluläre Signaltransduktions-Molekül-Modulatoren und Effektoren
- Gene mit Beteiligung an der Apoptose, DNA-Synthese, -Reparatur und -Rekombination
- Transkriptionsfaktoren und DNA-bindende Proteine
- Rezeptoren, Zelloberflächenantigene und Zelladhäsionsmoleküle
- Zytoskelettbildende-Proteine, Gene für die Zellbeweglichkeit und Proteinauf- und -abbau, Zell-Zell-Kommunikationsmoleküle: Wachstumsfaktoren, Chemokine, Interleukine, Interferone, Hormone und ihre Rezeptoren sowie Rezeptoren für Neurotransmitter.

2.2.1 Das Prinzip des Atlas™ Mouse 1.2 Array (Clontech)

Nach der Isolation der Gesamt-RNA mithilfe eines kommerziellen, auf Silica-Basis beruhenden Kits, wird mittels „magnetic beads“ die mRNA (1-5 % der Gesamt-RNA) von der Gesamt-RNA separiert. Anschließend erfolgt durch Zugabe eines speziellen Primercocktails, der mehrere hundert Primer enthält, und weiteren Reagenzien die Synthese einer der mRNA komplementären copy-DNA (cDNA). Während dieses Schrittes werden mit ^{32}P versehene Nukleotide in die cDNA eingebaut. Die darüber radioaktiv markierte cDNA wird unter hohen Stringenzbedingungen auf eine vom Hersteller vorgefertigte Nylonmembran hybridisiert. Auf

dieser Membran befinden sich immobilisierte cDNA-Fragmente solcher Gene, die unter besonders strikter Transkriptionskontrolle stehen. Die Nukleotidsequenz und Funktion der immobilisierten cDNA-Spezies sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Jeder Auftragungsort der cDNAs auf der Membran ist durch ein Koordinatensystem eindeutig gekennzeichnet. Nach der Hybridisierung der radioaktiv markierten cDNA-Probe mit den komplementären, immobilisierten cDNA-Spezies der Nylonmembran und anschließender Sichtbarmachung durch Autoradiografie entstehen je nach Anzahl der Kopien punktförmige Schwärzungen unterschiedlicher Größe und Intensität. Diese korrelieren linear mit der Anzahl der entsprechenden mRNA-Spezies der Proben.

Mithilfe einer Bildanalyse-Software (Atlas Image 2.01, Clontech) können die Schwärzungen in Grauwerte einer vorgegebenen Skala konvertiert und aufgrund der definierten Position auf der Membran einem bestimmten Gen eindeutig zugeordnet werden. Die Software erlaubt ferner den Vergleich der Hybridisierungsergebnisse zweier Membranen. Somit kann anhand der unterschiedlichen Hybridisierungsmuster der zu untersuchenden bestrahlten Probe und der korrespondierenden Kontrolle die Genexpression semiquantitativ erfasst werden.

In der Literatur ist bereits eine Beeinflussung der Genexpression mehrerer Gene durch ionisierende Strahlung für verschiedene Zelllinien beschrieben worden. Von besonderem Interesse dabei ist der Vergleich mit den in dieser Arbeit gefundenen strahleninduzierten Genen und die Identifikation bisher unbekannter strahleninduzierter Gene. Entsprechende Ergebnisse sind im Diskussionsteil der Arbeit, in Kapitel 5.2 zu finden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsdesign und Vorarbeiten

Alle *in vitro* Versuche wurden an der Zelllinie L929 durchgeführt. Es handelte sich dabei um Mäusefibroblasten, deren isolierte RNA für die Versuche genutzt wurde.

Die in Zellkultur wachsenden Zellen wurden mit 2 oder 6 Gy bei einer Dosisleistung von 1Gy/min (240kV/13mA) bei Raumtemperatur mit einer Röntgenröhre (Fa. Seifert, Ahrensburg, Deutschland) bestrahlt. Außerdem gehörte zu jedem Versuch ein unbestrahlter Ansatz (0 Gy), der während der Bestrahlungszeiten bei Raumtemperatur gelagert wurde, um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Zu den Zeitpunkten 20 min, 12, 24, 36, 48 und 72 h wurde jeweils aus einem Teil der bestrahlten und der unbestrahlten Zellen die Gesamt-RNA isoliert.

Nach einigen Zwischenschritten mit Isolation der mRNA und deren Umschreibung in radioaktiv markierte cDNA folgte die Hybridisierung der cDNA auf eine Nylonmembran. Auf dieser Nylonmembran befanden sich 1176 verschiedene, punktförmig aufgetragene, immobilisierte cDNA Spezies. Sie dienten als Bindungsstellen für die radioaktiv markierten, komplementären cDNA Spezies aus den Proben.

Auf der Membran befanden sich 6 Gruppen à 196 immobilisierte cDNA Spezies, die Informationen für folgende biologische Funktionen enthielten:

- Gruppe A: Onkogene, Tumor Supressorgene und Zellzyklus-Regulatoren
- Gruppe B: Gene für die Widerstandsfähigkeit der Zelle, Ionenkanäle und Ionentransport, intrazelluläre Signaltransduktions-Molekül-Modulatoren und -Effektoren
- Gruppe C: Apoptose, DNA-Synthese, -Reparatur und -Rekombination
- Gruppe D: Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindungsproteine
- Gruppe E: Rezeptoren, Zellhüllenantigene und Zelladhäsionsverhalten
- Gruppe F: Zell-Zell Kommunikation, Zytoskelett, die Zellbeweglichkeit und Proteinauf- und -abbau.

Nach dem Entfernen der ungebundenen Proben cDNA wurden auf den Membranen Röntgenfilme über bis zu 14 Tage, teilweise mit Verstärkerfolie, exponiert. Je nach

Kopienanzahl der gebundenen radioaktiv markierten cDNA Spezies der Proben entstanden unterschiedlich starke punktförmige Schwärzungen auf dem Röntgenfilm.

Dadurch, dass mehrere Röntgenfilme nacheinander von jeder Membran belichtet wurden, entstanden verschieden stark geschwärzte Röntgenfilme (Autoradiografien) von derselben Membran. Die belichteten Röntgenfilme waren nach Entwicklung ein Abbild der Membranen und die Vorlage für die Auswertung.

Von den benutzten Membranen wurde die gebundene Proben-cDNA durch einen speziellen Waschvorgang gelöst und die Membran wieder verwendet.

Jeder Versuch wurde in gleicher Anordnung ein zweites Mal durchgeführt.

Von über 200 belichteten Röntgenfilmen wurde eine Auswahl von 48 unterschiedlichen Autoradiografien anhand der Qualität (Artefakt frei) und der Normalisierung (s.u.), getroffen. Die Auswertung dieser Autoradiografien fand im Rahmen dieser Doktorarbeit statt.

3.2 Auswertung

Die Auswertung bestand in der Digitalisierung der Autoradiografien, der Bearbeitung der digitalisierten Folien, der Gewinnung von Rohdaten, der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität des Verfahrens, der Bestimmung der differentiellen Genexpression und der Selektion geeigneter strahleninduzierter Gene.

3.2.1 Digitalisierung

Zuerst wurden die Autoradiografien mit Hilfe eines Scanners (Hewlett Packard) und einer Scannersoftware (Precision Scan Pro, Hewlett Packard) mit 200 dpi als Graustufenbild eingescannt. Die Belichtungsanpassung wurde nach den Vorgaben des Programms automatisch durchgeführt. Die Umwandlung in ein Tiff-Dateiformat und Speicherung der Bilder als Graustufenbild in einer Tiff-Datei erfolgte anschließend mittels eines üblichen Grafikprogramms (Photo de Lux 1.0, Adobe).

3.2.2 Normalisierung

Die Normalisierung war notwendig, um neben methodischen Aspekten auch Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen auf Genexpressionsebene zu erzeugen. Die Normalisierung kann auf zwei Wegen erfolgen: Die erste Möglichkeit besteht im Vergleich der Expression eines oder mehrerer Gene, die immer und möglichst homogen exprimiert werden. Dabei handelt es sich um die so genannten „Haushaltsgene“ der Arrays, z.B. Ubiquitin, die durch Bestrahlung keine Intensitätsänderung zeigen. Nachteil der Methode ist, dass die Normalisierung der Autoradiografien von einem oder zumindest wenigen Genen abhängig ist. Sollte im Laufe des Versuchs z.B. eine Fehlhybridisierung oder eine Regulation durch den Stressor bei einem dieser Gene auftreten, wäre die Normalisierung unbrauchbar.

Die zweite und sicherere, aber aufwendigere Möglichkeit für die Normalisierung ist es, die Gesamtgenexpression der Autoradiografien zu bestimmen. In der Arbeit von Staßen et al. (2003, S.322) wurde gezeigt, dass es für die Ergebnisse unerheblich ist welches der beiden Normalisierungsverfahren angewandt wird.

Für die Auswertung des Versuchs wurde die Normalisierung mit Hilfe der Gesamtgenexpression gewählt. Das Vorgehen zur Normalisierung ist im Folgenden beschrieben: Zuerst wurden die digitalisierten Folien mittels einer Bildbearbeitungssoftware (KS 400, Zeis) nachbearbeitet, um Artefakte auszuschalten, die im Rahmen der Präparation und Belichtung der Autoradiografien entstanden waren. Danach wurde die Gesamtgenexpression bestimmt. Hierbei wurde jedem Pixel der einzelnen Hybridisierungsprodukte ein Grauwert zwischen 0 (weiß) und 255 (schwarz) zugeordnet. Die aufsummierten Grauwerte der einzelnen Pixel eines Hybridisierungsproduktes ergaben den Summengrauwert des Hybridisierungsproduktes. Die Summe aller Summengrauwerte einer Autoradiografie ergab die Gesamtgenexpression. Das Verhältnis der Gesamtgenexpressionen der zu vergleichenden Autoradiografien ergab den Normalisierungsfaktor. Von jeder Membran standen, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, Autoradiografien mit unterschiedlicher Belichtungszeit zur Verfügung. Für den Vergleich zweier Versuche wurden die Autoradiografien herangezogen, die eine möglichst ähnliche Gesamtgenexpression hatten.

3.2.3 Anpassen der Auswertungsmaske an die Hybridisierungssignale

Jede der zu bearbeitenden Autoradiografien wurde einzeln mit einer Spezialsoftware (Atlas Image 2.01, Clontech) bearbeitet. Die Abbildung 3.1 zeigt ein Beispiel, wie eine bearbeitete Autoradiografie aussieht und veranschaulicht das beschriebene Vorgehen: Die Auswertungsmaske der Software enthielt 1187 kreisrunde Messbereiche, die entsprechend den cDNA Bindungsstellen der Membran angeordnet waren. 1176 dieser kreisrunden Messbereiche entsprachen den 1176 cDNA Bindungsstellen der auszuwertenden Gene. Jedes der sieben „Haushaltsgene“ wurde ebenfalls von einem kreisrunden Messbereich erfasst. An jeder Ecke befand sich eine punktförmige Schwärzung, welche die Ausrichtung der Auswertungsmaske an die Autoradiografie ermöglichte. Die Auswertungsmaske der Software musste zunächst mit den einzelnen Hybridisierungsprodukten der Autoradiografie so in Übereinstimmung gebracht werden, dass je ein kreisrunder Messbereich genau seinem Hybridisierungsprodukt zugeordnet wurde. Der kreisrunde Messbereich der Software musste das Hybridisierungsprodukt der Autoradiografie möglichst vollständig erfassen (Alignment). Jeder der kreisrunden Messbereiche hatte eine Raumkoordinate, die seine Position auf der Auswertungsmaske angab. Durch die Zuordnung der kreisrunden Messbereiche zu den Hybridisierungsprodukten bekam auch jedes Hybridisierungsprodukt diese Raumkoordinate, die während der gesamten Auswertung dieses Gen codierte. Die Raumkoordinate setzte sich aus einem Großbuchstaben (A-F) der die Gruppe angab, einer Zahl (1-14), welche die horizontale Position beschrieb und einem Kleinbuchstaben (a-n), der die vertikale Position beschrieb, zusammen. Die Raumkoordinate B08d beispielsweise beschrieb das Gen, das sich in der zweiten Gruppe, als achttes Gen von links und viertes von oben befand. Die Software maß innerhalb des kreisrunden Messbereichs die einzelnen Pixel und ordnete jedem Pixel einen Grauwert zwischen 0 (weiß) und 255 (schwarz) zu.

Die Summe der Grauwerte der einzelnen Pixel ergab für jedes der 1176 Hybridisierungsprodukte einen Summen-Grauwert (Σ Grauwerte). Der Summengrauwert lag im Bereich zwischen 0 und 60.000. Je höher der Summengrauwert desto stärker die Ausprägung des Hybridisierungsprodukts. Von dem Summengrauwert wurde der Grauwert, der dem Hintergrund entsprach (Hintergrundgrauwert), abgezogen, was den hintergrundbereinigten Summengrauwert ergab.

Zur Bestimmung des Hintergrundgrauwertes wurde die „Default External Methode“ der Software angewandt. Dabei wurde die mittlere Intensität der Flächen des Arrays gemessen, in

denen keine Hybridisierung stattfand. In der Abbildung 3.1 sind es die umrahmten Flächen. Dieser Hintergrundgrauwert wurde von dem Programm automatisch bestimmt.

Neben der Anpassung des Messbereichs an die hintergrundbereinigten Hybridisierungsprodukte war es erforderlich auch solche Hybridisierungsprodukte zu berücksichtigen, die in ihrer Größe den Messbereich überschritten. Teilweise reichten die Hybridisierungsprodukte, durch ihre große Ausbreitung, in benachbarte kreisrunde Messbereiche und wurden von diesen fälschlicherweise gemessen. In den betroffenen Messbereichen war keine Auswertung möglich. Um diese Bereiche von der Auswertung auszuschließen wurde der Hintergrund auf den Summengrauwert hochgesetzt, um hintergrundbereinigte Summengrauwerte einer nicht stattgefundenen Genexpression zu erreichen. Artefakte, die nicht im Vorfeld entfernt werden konnten und in den Messbereich der Software fielen, mussten auf die gleiche Weise ausgeglichen werden.

Während des Bearbeitens mittels der Auswertungssoftware wurden die Hybridisierungsprodukte der digitalisierten Autoradiografien mit den Hybridisierungsprodukten auf den Röntgenfilmen verglichen, um die exakte Zuordnung der Hybridisierungsprodukte zu ihren adäquaten Raumkoordinaten sicherzustellen und Fehler der Zuordnung durch die Software auszuschließen.

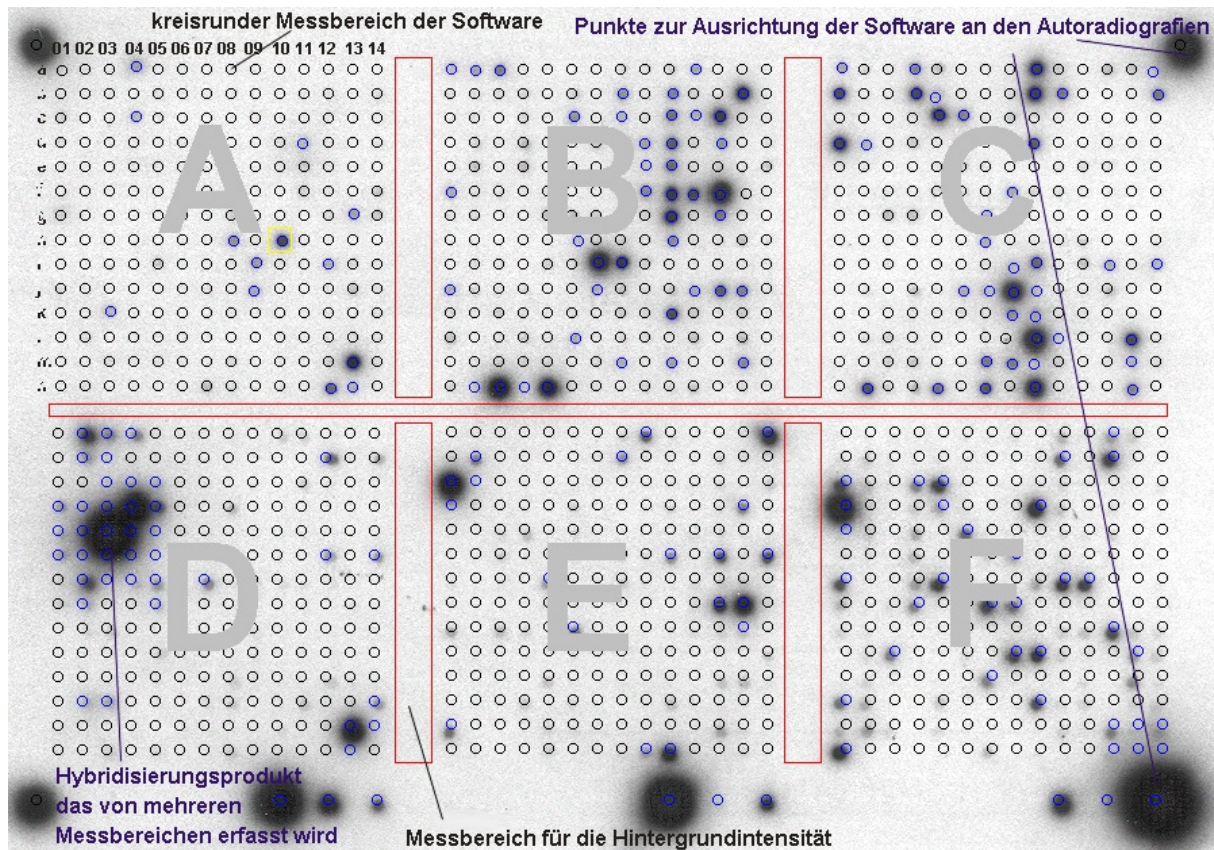


Abb. 3.1 Beispiel einer bearbeiteten Autoradiografie (Atlas Image 2.01, Clontech). In den oberen drei Feldern ist eine gute Ausrichtung der Messbereiche an die Hybridisierungsprodukte, in den unteren drei Feldern eine schlechte Ausrichtung dargestellt. Im unteren linken Feld ist ein Hybridisierungsprodukt gezeigt, das fälschlich von mehreren kreisrunden Messbereichen erfasst wird. Der Hintergrundgrauwert wurde im eingerahmten Bereich von der Software gemessen. Die Raumkoordinate der Gene setzt sich aus den Großbuchstaben (A-F) für die 6 Gruppen, den Kleinbuchstaben (a-n) für die Horizontale und den Zahlen (01-14) für die vertikale Zuordnung zusammen (Siehe Feld A oben links).

3.2.4 Bearbeitung der Rohdaten

Eine weitere Funktion der Atlas Image Software bestand in der Möglichkeit, zwei bearbeitete Autoradiografien miteinander zu vergleichen.

Dies war zum einen für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität und zum anderen für die Berechnung der strahleninduzierten differentiellen Genexpression nötig. Dabei erstellte die Software eine wie in Abbildung 3.2 gezeigte Tabelle (Tabular Report), die in 1176 Zeilen jedes Gen darstellt. In den neun Spalten werden für jedes Gen die Koordinate auf der Softwareschablone, der errechnete Summengrauwert (Intensity), der Hintergrundgrauwert (Background) und der hintergrundbereinigte Summengrauwert (Adjusted Intensity) für jede der beiden Autoradiografien dargestellt. Außerdem wurden das

Verhältnis der Folien zueinander und die Differenz der beiden hintergrundbereinigten Summengrauwerte aufgeführt.

Coordinate	Intensity_1	Background_1	Adj.Intensity_1	Intensity_2	Background_2	Adj.Intensity_2	Ratio	Difference
A01a	8032	5888	2144	2892	1024	1868	Not calculated	-276
A01b	6604	5888	716	1460	1024	436	Not calculated	-280
A01c	6688	5888	800	1792	1024	768	Not calculated	-32
A01d	6372	5888	484	964	1024	0	Not calculated	-484
A01e	5772	5888	0	932	1024	0	Not calculated	0
A01f	6248	5888	360	1568	1024	544	Not calculated	184
A01g	7240	5888	1352	1796	1024	772	Not calculated	-580
A01h	5968	5888	80	1892	1024	868	Not calculated	788
A01i	5672	5888	0	1452	1024	428	Not calculated	428
A01j	6480	5888	592	1600	1024	576	Not calculated	-16
A01k	6124	5888	236	1580	1024	556	Not calculated	320
A01l	5916	5888	28	1780	1024	756	Not calculated	728
A01m	6100	5888	212	836	1024	0	Not calculated	-212

Abb. 3.2 Auszug aus der Tabelle, die beim Vergleich zweier Autoradiografien von der Atlas Image 2.01 Software erstellt wurde.

Wie ersichtlich, war die Ermittlung der differentiellen Genexpression in der Regel mit dieser Software nicht möglich. Zur weiteren Bearbeitung der Rohdaten wurde die Tabelle deshalb in die MS Excel Software übertragen. Mit Hilfe eines selbst programmierten Makros (Tabelle 3.1) konnten zwei Autoradiografien miteinander verglichen und für jedes Gen die differentielle Genexpression errechnet werden. Dabei wurde von den zwei ausgewählten Autoradiografien jedes der 1176 Gene in einer Zeile dargestellt.

Das Makro setzte sich aus vier Teilen zusammen:

Teil 1: Parameter einstellen

Teil 2: Berechnungsergebnisse

Teil 3: Genauere Angaben zu den Berechnungsergebnissen

Teil 4: Einzelauflistung aller Gene

In Teil 1 (Parameter einstellen) wurden die zur Berechnung nötigen Parameter manuell eingegeben. Dazu gehörten der Normalisierungsfaktor (Zeile 1, Spalte F), die Höhe der berücksichtigten differentiellen Genexpression (Zeile 1, Spalte I) und der Schwellenwert (Abgrenzung spezifischer von unspezifischen Signalen) (Zeile 1, Spalte L). Die Notwendigkeit und Einstellung des Schwellenwerts und der Höhe der berücksichtigten differentiellen Genexpression wird in Kapitel 3.2.5 erläutert. Nach der Eingabe der Voreinstellungen wurden die Raumkoordinaten der Gene (ab Zeile 18, Spalte D) und die hintergrundbereinigten Summengrauwerte der Autoradiografien 1 bzw. 2 (ab Zeile 18, Spalten E und F) aus der vorherigen Tabelle in Teil 4 (Einzelauflistung aller Gene) des Makros übertragen. Der Normalisierungsfaktor (Abgleich der Gesamtgenexpression aller Gene zweier zu vergleichender Arrays) wurde im Vorfeld so berechnet, dass er zur

Normalisierung der Versuche nur mit den hintergrundbereinigten Summengrauwerten aus Versuch 2 multipliziert werden musste (ab Zeile 18, Spalte G). Hintergrundbereinigte Summengrauwerte nach Normalisierung (hintergrundbereinigte und normalisierte Summengrauwerte) der Versuche 1 und 2 wurden nun an den Schwellenwert angepasst, das heißt: Die hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte oberhalb des Schwellenwertes blieben unverändert, die unterhalb des Schwellenwertes wurden auf den Schwellenwert gesetzt (ab Zeile 18, Spalte H und I). Von dem Makro wurde dann die Höhe der differentiellen Genexpression anhand der hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte nach Anpassung an den Schwellenwert von Versuch 1 und 2 berechnet (ab Zeile 18, Spalte J). Nach Abschluss der Berechnungen zeigte das Makro die Ergebnisse in Teil 2 (Berechnungsergebnisse) an. Genauere Angaben wie z.B. die Raumkoordinate oder berechnete Zahlenwerte konnten im Teil 3 (Genauere Angaben zu den Berechnungsergebnissen) abgelesen werden. Lag eine Herunter- oder Hochregulation mit einer differentiellen Genexpression größer der berücksichtigten differentiellen Genexpression vor, dann wurden die Höhe der differentiellen Genexpression dieser Gene (Zeilen 7-10, Spalte E oder F) mit ihrer dazugehörige Raumkoordinate (Zeilen 7-10, Spalte D) in einer Zeile dargestellt.

Nach der Analyse der differentiellen Genexpression wurde von der Software die Anzahl der exprimierten Gene bestimmt. Dabei handelt es sich um solche Gene, deren hintergrundbereinigte und normalisierte Summengrauwerte über dem Schwellenwert lagen und eine differentielle Genexpression über der zuvor berücksichtigten differentiellen Genexpression aufwiesen. Die Raumkoordinaten dieser Gene und ihr hintergrundbereinigter und normalisierter Summengrauwert wurden dargestellt (Zeilen 7-15, Spalte H und I) und die Anzahl bestimmt (Zeile 3, Spalte K).

In den Zeilen 18 bis 23 der Tabelle 3.1 sind beispielhaft die auftretenden Möglichkeiten bei dem Vergleich nach Festlegung des Schwellenwertes auf 10.000 und der berücksichtigten differentiellen Genexpression auf 2,5 gezeigt.

Häufig lagen die hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte des Gens auf beiden Autoradiografien unterhalb des Schwellenwertes (Zeile 18). Beide hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte entsprachen dem Schwellenwert. Damit betrug die Höhe der differentiellen Genexpression 1.

Eine andere Möglichkeit bestand darin, dass die hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte des Gens auf beiden Autoradiografien oberhalb des Schwellenwertes lagen, aber die Höhe der differentiellen Genexpression nur gering war (Zeile 19).

Lagen die hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte eines Gens bei einer Autoradiografie unterhalb des Schwellenwertes (10.000) und bei der anderen oberhalb 25.000 handelte es sich um eine berücksichtigte differentielle Genexpression und um eine Hoch- bzw. Herunterregulation (Zeile 20 und 23).

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, dass die hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte einer Autoradiografie unterhalb des Schwellenwertes und die der anderen zwischen Schwellenwert und 25.000 lagen. Es bestand eine Differenz bei der Genexpression, die aber unterhalb der berücksichtigten differentiellen Genexpression lag (Zeile 21 und 22).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Teil 1: Parameter einstellen:			Normalisierungsfaktor:		0,94	Höhe der berücksichtigten differentiellen Genexpression:		2,5	Schwellenwert:		10.000
2												
3	Teil 2: Berechnungsergebnisse:			Anzahl der Gene mit berücksichtigter diff. Genexpr.:			4	Anzahl der Gene > Schwellenwert:			9	
4												
5	Teil 3: Genauere Angaben zu den Berechnungsergebnissen:			Gene mit berücksichtigter differentieller Genexpression			Gene > Schwellenwert					
6				Raum- koordinate	Runter- regulierte Gene	Hoch- regulierte Gene		Raum- koordinate	norm.+korr. Summen- grauwert			
7				A01f	2,86			B07i	44394			
8				A01c		2,77		B12f	43906			
9				A10h		2,59		C13n	34276			
10				F08j	3,33			F09d	33697			
11								A01f	28556			
12								A01c	27705			
13								A01d	14212			
14								A01b	13274			
15								A01e	10728			
16												
17	Teil 4: Einzelaufistung aller Gene:			Raum- koordinate	korrigierter Summen- grauwert Versuch 1	korrigierter Summen- grauwert Versuch 2	korr.Summen- grauwert Vers.2 nach Normalisierung	Versuch 1 mit Schwellen- wert 10.000	Versuch 2 mit Schwellen- wert 10.000	Höhe der differen- tiellen Genex- pression		
18				A01a	2144	1868	1756	10000	10000	1,00		
19				A01b	12131	14121	13274	12131	13274	1,09		
20				A01c	800	29473	27705	10000	27705	2,77		
21				A01d	14212	868	816	14212	10000	0,70		
22				A01e	0	11413	10728	10000	10728	1,07		
23				A01f	28556	544	511	28556	10000	0,35		

Tabelle 3.1 Beispielhafter Auszug aus dem MS Excel Makro zur Weiterbearbeitung der Rohdaten und dem Vergleich zweier Autoradiografien für Reproduzierbarkeit und Selektion differentiell exprimierter Gene.

3.2.5 Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität

Die Berechnung der differentiellen Genexpression lief in zwei Schritten ab. Zum einen wurde der hintergrundbereinigte Summengrauwert berechnet (1), zum anderen wurde die differentielle Genexpression als Quotient aus den hintergrundbereinigten und normalisierten

Summengrauwerten der bestrahlten gegen die korrespondierenden Hybridsierungsprodukte der Kontrollen gebildet (2).

- (1) Der hintergrundbereinigte Summengrauwert ist der Summengrauwert abzüglich des Hintergrundgrauwertes.
- (2) Die differentielle Genexpression ist der hintergrundbereinigte und normalisierte Summengrauwert von Versuch 1 geteilt durch den normalisierten und hintergrundbereinigten Summengrauwert von Versuch 2.

Es kam vor, dass der Summengrauwert kleiner war als der Hintergrundgrauwert, sodass der hintergrundbereinigte Summengrauwert einen negativen Wert annahm. Die differentielle Genexpression konnte dann von der Software nicht berechnet werden (Beispiel 1).

Beispiel 1:

- (1) Berechnung der hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte:

Versuch 1: $5100 = 6300$ (normalisierter Summengrauwert) – 1200 (Hintergrundgrauwert)

Versuch 2: $-10 = 1190$ (normalisierter Summengrauwert) – 1200 (Hintergrundgrauwert)

- (2) Berechnung der differentiellen Genexpression:

$5100 : -10 = \mathbf{undefiniert}$

Eine andere Möglichkeit bestand darin, dass der Summengrauwert bei der einen Autoradiografie geringfügig oberhalb des unspezifischen Signals, bei der anderen nur geringfügig höher lag. Dabei konnten differentielle Genexpressionen entstehen, die deutlich über dem linearen dynamischen Bereichs der Methode von 10 lagen (Beispiel 2).

Beispiel 2:

- (1) Berechnung der hintergrundbereinigten und normalisierten Summengrauwerte:

Versuch 1: $3000 = 4200$ (normalisierter Summengrauwert)– 1200 (Hintergrundgrauwert)

Versuch 2: $10 = 1210$ (normalisierter Summengrauwert) – 1200 (Hintergrundgrauwert)

- (2) Berechnung der differentiellen Genexpression:

$3000 : 10 = \mathbf{300}$

Wurde jeder Pixel innerhalb des kreisrunden Messbereichs der Software mit seinem Maximalwert von 255 erfasst, lag der Summengrauwert bei ca. 60.000 Einheiten. 10 Einheiten entsprachen folglich weniger als 0,02% des maximalen Summengrauwertes. Kleine Veränderungen bei den Summengrauwerten konnten einerseits zu einer nicht berechenbaren oder andererseits zu einer zu hohen differentiellen Genexpression führen.

Diese Beispiele warfen die Frage auf, wie die unspezifischen von den spezifischen Signalen abzugrenzen seien, um solche Fehler zu vermeiden. Die Lösung bestand in dem Vergleich zweier, unter gleichen Bedingungen abgelaufenen Experimente, zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität.

Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Versuche hingen von zwei Faktoren ab: Zum einen musste ein Schwellenwert für die hintergrundbereinigten, normalisierten Summengrauwerte bestimmt werden, dessen spezifische Signalintensität sich deutlich von den unspezifischen Signalen abhob. Zum anderen musste die Höhe der berücksichtigten differentiellen Genexpression festgelegt werden, von der eine Expression erwartet wurde, die die Ungenauigkeit des Verfahrens berücksichtigt. Sie wurde als berücksichtigte differentielle Genexpression bezeichnet. Die Art der Auswertung ermöglichte es, die Reproduzierbarkeit unter verschiedenen Schwellenwerten und berücksichtigten differentiellen Genexpressionen zu bestimmen (Tabelle 3.2).

Setzte man den Schwellenwert niedrig und die differentielle Genexpression auf Werte nahe 1 stieg die Sensitivität des Versuchs, es kamen viele Gene zur Auswertung. Gleichzeitig sank aber die Reproduzierbarkeit. Ziel war es, eine Reproduzierbarkeit von $\geq 95\%$, im Verhältnis zu der Anzahl exprimierter Gene, zu erreichen.

In den Tabellen (Beispieltabelle 3.2) war die Bestrahlungszeit und die Strahlendosis angegeben (Spalte A und B). In dem linken der beiden Tabellenteile sind die Ergebnisse aus den Versuchen dargestellt, bei denen der Schwellenwert auf 1.000 gesetzt wurde. Die Ergebnisse in dem rechten Tabellenteil entstanden bei einem Schwellenwert von 10.000. Jeder der Tabellenteile war in drei Spalten unterteilt, die jeweils eine andere berücksichtigte differentielle Genexpression (>2 , $>2,5$ oder >5) als Berechnungsgrundlage hatte.

In der oberen Tabelle ist die Anzahl der exprimierten Gene enthalten (Spalte C), die als Berechnungsgrundlage dienten. In der unteren Tabelle ist die Anzahl der Gene, deren differentielle Genexpression höher war als die berücksichtigte differentielle Genexpression, im Verhältnis zu allen 1176 Genen wiedergegeben. Die letzte Spalte enthält die jeweiligen Normalisierungsfaktoren der miteinander verglichenen Autoradiografien. Die Mittelwerte der Daten jeder Spalte wurden berechnet und in der vorletzten Zeile aufgeführt. Die Reproduzierbarkeit (letzte Zeile) ergibt sich aus der Differenz zwischen dem Mittelwert und 100.

Reproduzierbarkeit:**Bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene (aus zwei unterschiedlichen Versuchen)**

		Schwellenwert: 1.000				Schwellenwert: 10.000				Normalisierung
		Anzahl exprim. Gene	Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			Anzahl exprim. Gene	Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			
Zeit	Dosis		>2	>2,5	>5		>2	>2,5	>5	
20 min	0 Gy	626	35	23	6	111	7	5	0	0,95
	2 Gy	318	32	45	11	61	11	6	0	1,26
12 h	0 Gy	1173	60	29	1	110	17	2	0	0,75
	2 Gy	662	12	4	0	165	1	0	0	0,7
Mittelwert in %		232	35	25	4	37	9	3	0	0,92
Reproduzierbarkeit (%)			65	75	96		91	97	100	

Anzahl exprimierte Gene = 100%

Bezogen auf alle 1176 Gene (aus zwei unterschiedlichen Versuchen)

		Schwellenwert: 1.000				Schwellenwert: 10.000				Normalisierung
		Bezugszahl	Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			Bezugszahl	Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			
Zeit	Dosis		>2	>2,5	>5		>2	>2,5	>5	
20 min	0 Gy	1176	19	12	3	1176	1	1	0	0,95
	2 Gy	1176	9	12	3	1176	1	1	0	1,26
12 h	0 Gy	1176	59	29	1	1176	2	1	0	0,75
	2 Gy	1176	7	3	0	1176	0	2	0	0,7
Mittelwert in %		1176	23	14	2	1176	1	1	0	0,92
Reproduzierbarkeit (%)			77	86	98		99	99	100	

Anzahl aller Gene (1176) = 100%

Tabelle 3.2 Ausschnitt aus einer Tabelle zur Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität unter verschiedenen Parametern. Dargestellt sind hier nur die Ergebnisse für die Autoradiografien 20 min und 12 h p.r. mit 2 Gy bzw. unbestrahlt (0 Gy). Im oberen Teil wird eine Berechnung mit der Anzahl exprimierter Gene, im unteren Teil eine Berechnung mit allen 1176 Genen dargestellt. Die Reproduzierbarkeit (%) ergibt sich als Differenz zwischen 100% und dem Mittelwert (%).

3.2.6 Selektion geeigneter Gene

Zur Bestimmung der strahleninduzierten Genexpression wurde der mit 2 Gy und der mit 6 Gy bestrahlte Ansatz jeweils mit dem unbestrahlten verglichen. Die Genexpression der Probe (bestrahlt) wurde dabei als ein Mehrfaches der Expression der Kontrolle (unbestrahlt) ausgedrückt. Eine differentielle Genexpression > 1 stellte eine Hochregulation und differentielle Genexpressionen < 1 eine Herunterregulation gegenüber der Kontrolle dar. Die Berechnungen der differentiellen Genexpression wurden mit dem, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, ermittelten Schwellenwert und der Höhe der berücksichtigten differentiellen Genexpression durchgeführt. Gene, die bei diesen Einstellungen eine Hoch- oder Herunterregulation aufwiesen, wurden als geeignet betrachtet und weiter ausgewertet.

Die selektierten Gene und stichprobenartig auch andere Gene wurden auf den beiden Originalautoradiografien überprüft, um Verwechslungen, Fehler beim Erfassen, Auswerten oder der Weiterbearbeitung der Rohdaten auszuschließen.

Es erfolgte ebenfalls eine tabellarische Darstellung wie bei der Reproduzierbarkeit beschrieben und gezeigt.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl geeigneter Autoradiografien und Digitalisierung

Aus über 200 Autoradiografien wurden nach den folgenden Kriterien für jeden Versuch eine, insgesamt 48 Autoradiografien, ausgewählt und ausgewertet.

- Die punktförmigen Hybridisierungsprodukte sollten nicht zu groß sein, um eine Überstrahlung benachbarter Gene zu vermeiden.
- Die Hybridisierungsprodukte, vor allem der schwächer exprimierten Gene, sollten aber deutlich erkennbar sein.
- Der Unterschied in der Gesamtgenexpression sollte bei den zu vergleichenden Membranen möglichst gering sein.
- Die Membranen sollten möglichst artefaktfrei sein.

Die Abbildung 4.1 zeigt zur Veranschaulichung eine für die Auswertung gut geeignete Autoradiografie.

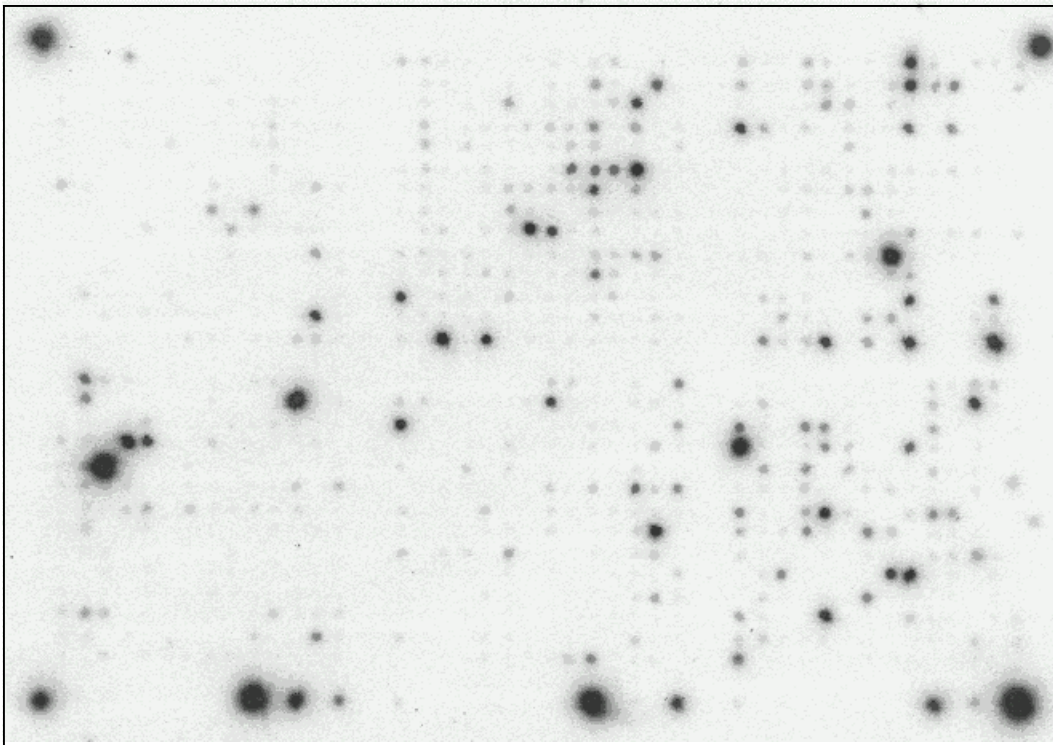


Abb. 4.1 Autoradiographie der Hybridisierungsergebnisse einer cDNA-Probe. Die Probe wurde auf eine Nylonmembran hybridisiert, die mit immobilisierten cDNA-Spezies bestückt ist. Die unterschiedlichen Graustufen der punktförmigen Hybridisierungsprodukte korrelieren mit der Anzahl entsprechender mRNA-/cDNA-Kopien der Probe.

Die Abbildung 4.2 zeigt eine für die Auswertung ungeeignete Autoradiografie. Den Abb. 8.1 bis 8.4 des Anhangs sind die weiteren Autoradiografien der zur Auswertung selektionierten Proben zu entnehmen.

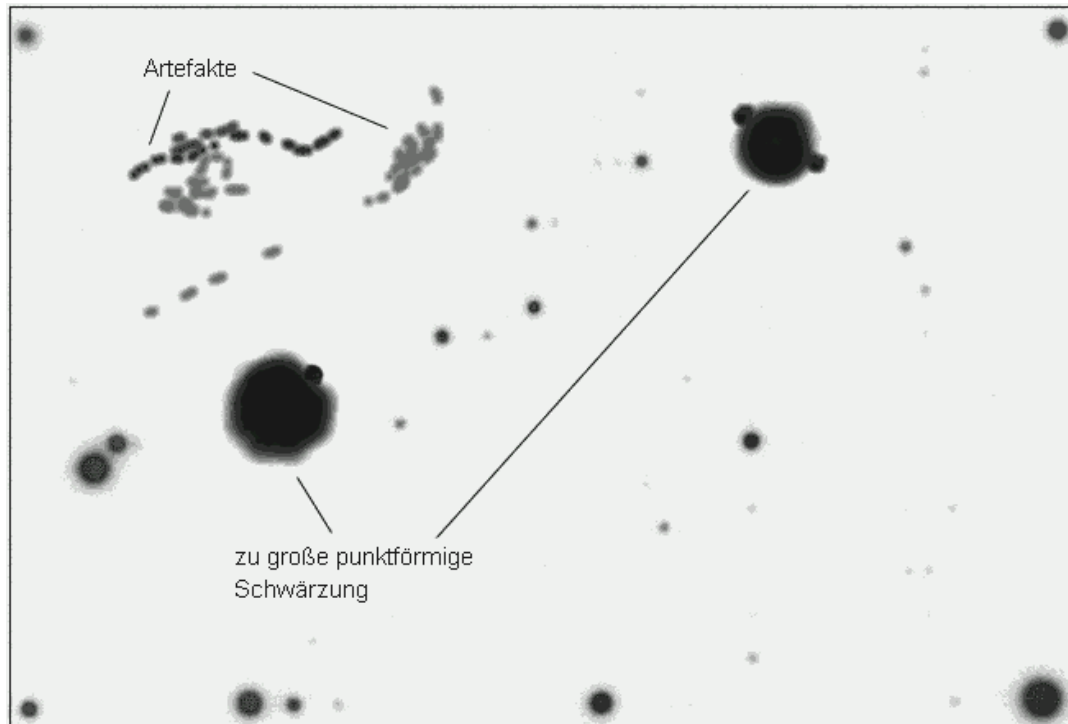


Abb. 4.2 Beispiel für eine nicht verwertbare Autoradiografie. Insgesamt zu schwach ausgeprägte Hybridisierungsprodukte mit schlechter Abgrenzbarkeit schwach exprimierter Gene. Artefakte und zu große punktförmige Hybridisierungsprodukte überlagern mögliche benachbarte punktförmige Hybridisierungsprodukte.

Bei dem Vergleich der Abbildungen 4.1 und 4.2 fallen sehr deutliche Unterschiede in der Erfüllung der Auswahlkriterien auf.

Die Abb. 4.1 enthält keine zu großen punktförmigen Hybridisierungsprodukte, die zur Überstrahlung benachbarter Gene führen, wohingegen in Abb. 4.2 zwei deutlich zu große punktförmige Hybridisierungsprodukte zu sehen sind. Viele, auch schwach exprimierte Gene, stellen sich in der Abb. 4.1 gut dar, wohingegen in der Abb. 4.2 nur wenige, stark exprimierte Gene zu erkennen sind. Eine Beurteilung der Unterschiede in der Gesamtgenexpression der beiden dargestellten Autoradiographien ist ohne Vergleichsautoradiographie nicht möglich. Die Abb. 4.1 ist im Gegensatz zu der Abb. 4.2 artefaktfrei.

4.2 Auswertung

Die Vorgehensweise der Auswertung ist in der Abb. 4.9 am Ende dieses Kapitels schematisch dargestellt.

Nach Auswahl der geeigneten Autoradiografien und deren Digitalisierung (siehe Kapitel 4.1) begann die Auswertung der Autoradiografien. Dazu gehörte die Einstellung von Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode, die Auswertung der Rohdaten, die Normalisierung und die Ermittlung von Genexpressionsunterschieden.

4.2.1 **Einstellung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Methode**

Die Notwendigkeit der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität und eine Beschreibung des Vorgehens und der Parameter ist in Kapitel 3.2.5 zu finden. Die Festlegung der Höhe des Hintergrundes (Schwellenwert) und der Höhe der als differentiell exprimiert geltenden Gene wurden so gewählt, dass eine Reproduzierbarkeit größer 95 % bei höchst möglicher Sensitivität vorlag. Der Tabelle 4.1 sind die Reproduzierbarkeiten unter verschiedenen Einstellungsparametern zu entnehmen. Dabei enthält die linke Hälfte der Tabelle die Reproduzierbarkeit bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene und die rechte Hälfte bezogen auf die Anzahl aller Gene (1176). Der obere Teil der Tabelle enthält die Ergebnisse aus den Versuchen 0 und 2 Gy und der untere Teil die Ergebnisse aus den Versuchen 0 und 6 Gy. Die Versuche wurden in gleicher Weise zweimal durchgeführt. Der Vergleich der Autoradiografien, die unter gleichen Bedingungen entstanden waren, hätte theoretisch für jedes Gen eine differentielle Genexpression von 1,0 ergeben können. Die Reproduzierbarkeit hätte dann 100 % betragen. Die Reproduzierbarkeit der Versuche ergab sich aus der Differenz zwischen der theoretischen Reproduzierbarkeit von 100 % und dem Mittelwert der tatsächlichen differentiellen Genexpression.

Wählte man den Schwellenwert 1.000 und eine differentielle Genexpression > 2 für die Berechnungen aus, ergaben sich Reproduzierbarkeiten von 70,6 % bezogen auf die Anzahl exprimierter Gene und 82,4 % bezogen auf die Anzahl aller 1176 Gene. Bei der Festlegung des Schwellenwertes auf 1.000 und selektierter Gene mit einer differentiellen Genexpression $> 2,5$ ergab sich eine Reproduzierbarkeit von 81,4 % bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene und von 89,3 % bezogen auf die Anzahl aller 1176 Gene.

Für die Festlegung des Schwellenwertes auf 1.000 und der differentiellen Genexpression auf > 5 entstanden Reproduzierbarkeiten von 98,6 % bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene und auf die Anzahl aller 1176 Gene.

Unter Benutzung eines Schwellenwertes von 10.000 und einer differentiellen Genexpression > 2 ergab sich eine Reproduzierbarkeit von 89,7 % bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene und eine Reproduzierbarkeit von 99,1 % bezogen auf die Anzahl aller 1176 Gene.

Bei der Festsetzung des Schwellenwertes auf 10.000 und der Berücksichtigung einer differentiellen Genexpression $> 2,5$ ergab sich eine Reproduzierbarkeit von 95,5 % bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene und von 99,6 % bezogen auf die Anzahl aller 1176 Gene. Gleichzeitig zeigten sich bei diesen Einstellungen 72 differentiell exprimierte Gene.

Die Verwendung eines Schwellenwertes von 10.000 in Verbindung mit der Suche nach Genen mit einer differentiellen Genexpression > 5 ergab eine Reproduzierbarkeit von 100 %, unabhängig davon, ob man die Anzahl der exprimierten Gene oder alle 1176 Gene zugrunde legte. Andererseits konnten bei diesen Einstellungen kein differentiell exprimiertes Gen gefunden werden. Die Sensitivität war demnach sehr gering.

Für die folgende Auswertung der Versuche wurde somit ein Schwellenwert von 10.000 festgelegt (Gene mit einem Summengrauwert < 10.000 wurden auf 10.000 gesetzt). Als differentiell exprimiert wurden Unterschiede $> 2,5$ relativ zur Kontrolle definiert. Allerdings schränkten diese Maßnahmen zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit gleichzeitig die Sensitivität des Verfahrens ein.

Betrachtet man die Tabelle detailliert, fällt auf, dass die Anzahl differentiell exprimierter Gene bei den unterschiedlichen Versuchen stark variierte.

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl differentiell exprimierter Gene und dem Normalisierungsfaktor.

Es war wichtig eine Normalisierung durchzuführen, um eine Vergleichbarkeit der Autoradiografien auf Genexpressionsebene herzustellen. Als Normalisierungsverfahren wurde die Gesamtgenexpression, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, herangezogen. Der gewonnene Normalisierungsfaktor, als Quotient zwischen den beiden verglichenen Autoradiografien, stellte ein wichtiges Kriterium in der Auswahl geeigneter Autoradiografien dar.

Betrachtet man beispielsweise die Ergebnisse der Tabelle bezogen auf die Anzahl exprimierter Gene aus der Versuchsreihe 0 und 2 Gy, so zeigen sich bei 20 min p.r. und einer Bestrahlung mit 2 Gy bei allen Einstellungsvarianten höhere Ergebnisse als der Mittelwert. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei dem Versuch 24 h p.r. bei einer Bestrahlung mit 2 Gy.

Die Anzahl differentiell exprimierter Gene lag teilweise mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu dem Mittelwert und zeigte unter den gewählten Einstellungen oft die niedrigste Reproduzierbarkeit.

Betrachtet man die Normalisierungsfaktoren zeigten sich Werte von 1,26 bzw. 0,51. Die Gesamtgenexpression der einen Autoradiografie betrug in dem einen Fall das 1,26 Fache und in dem anderen Fall fast das Doppelte der anderen Autoradiografie.

Bei dem unbestrahlten Versuch 48 h p.r. lag die Anzahl differentiell exprimierter Gene durchgehend unter dem Mittelwert. Der Normalisierungsfaktor lag bei 0,92.

Betrachtet man die Ergebnisse des unbestrahlten Versuchs 24 h p.r., so zeigt sich, dass unter manchen Einstellungsparametern die Anzahl der differentiell exprimierten Gene unter, und bei manchen über dem Mittelwert liegt. Der Normalisierungsfaktor betrug 0,61.

Es zeigte sich, dass bei Normalisierungsfaktoren nahe 1 die Reproduzierbarkeit hoch war und je weiter sie von eins entfernt lag, die Reproduzierbarkeit abnehmen konnte.

Versuche, bei denen der Normalisierungsfaktor größer als zwei bzw. kleiner als 0,5 war, wurden nicht ausgewertet. Bei Versuchen mit einem hohen Normalisierungsfaktor musste die Auswertbarkeit genau geprüft werden.

Für jede zur Auswertung ausgewählte Autoradiografie war es wichtig, dass der Normalisierungsfaktor zu zwei anderen Autoradiografien möglichst nahe an 1 lag. Zum einen war das die Autoradiografie, die zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit herangezogen wurde und zum anderen die Autoradiografie, die zur Ermittlung der differentiellen Genexpression benutzt wurde.

Exprimierte Gene						
2 Gy						
Zeit	Dosis	Anzahl exprim. Gene	Schwellenwert: 1.000			Normalisierung
			Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			
Zeit	Dosis	Anzahl exprim. Gene	>2	>2,5	>5	Normalisierung
			20 min	0 Gy	626	
	2 Gy	318	32	45	11	1,26
12 h	0 Gy	1173	60	29	1	0,75
	2 Gy	662	12	5	0	0,7
24 h	0 Gy	565	30	17	2	0,61
	2 Gy	602	35	20	3	0,51
36 h	0 Gy	658	19	9	0	1,13
	2 Gy	512	24	14	2	1,26
48 h	0 Gy	502	23	15	3	0,92
	2 Gy	491	22	14	2	0,83
72 h	0 Gy	781	43	31	6	0,86
	2 Gy	752	21	11	2	0,86
Mittelwert in %		637	29,7	19,3	3,3	0,89
Reproduzierbarkeit %			70,3	80,7	96,7	
Anzahl exprimierte Gene = 100%						

6 Gy						
Zeit	Dosis	Anzahl exprim. Gene	Schwellenwert: 1.000			Normalisierung
			Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			
Zeit	Dosis	Anzahl exprim. Gene	>2	>2,5	>5	Normalisierung
			20 min	0 Gy	935	
	6 Gy	795	16	7	44	0,94
12 h	0 Gy	731	33	20	60	0,76
	6 Gy	719	39	28	72	1,1
24 h	0 Gy	937	39	26	65	0,75
	6 Gy	776	32	22	69	0,83
36 h	0 Gy	474	20	10	48	1,03
	6 Gy	649	21	12	58	0,83
48 h	0 Gy	652	29	17	58	1
	6 Gy	460	22	16	73	0,69
72 h	0 Gy	751	33	22	66	1,14
	6 Gy	627	35	22	62	0,99
Mittelwert in %		709	29,1	18,0	0,1	0,99
Reproduzierbarkeit %			70,9	82,0	99,9	

Gesamtanzahl (1176 Gene)						
2 Gy						
Zeit	Dosis	Bezugszahl	Schwellenwert: 1.000			Normalisierung
			Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			
Zeit	Dosis	Bezugszahl	>2	>2,5	>5	Normalisierung
			20 min	0 Gy	1176	
	2 Gy	1176	9	12	3	1,26
12 h	0 Gy	1176	59	29	1	0,75
	2 Gy	1176	7	3	0	0,7
24 h	0 Gy	1176	15	8	1	0,61
	2 Gy	1176	18	10	2	0,51
36 h	0 Gy	1176	10	5	0	1,13
	2 Gy	1176	11	6	1	1,26
48 h	0 Gy	1176	10	6	1	0,92
	2 Gy	1176	9	6	1	0,83
72 h	0 Gy	1176	29	20	4	0,86
	2 Gy	1176	13	7	1	0,86
Mittelwert in %			17,3	10,4	1,5	0,89
Reproduzierbarkeit %			82,7	89,6	98,5	
Anzahl alle Gene = 1176 (=100%)						

6 Gy						
Zeit	Dosis	Bezugszahl	Schwellenwert: 1.000			Normalisierung
			Anzahl differentiell exprimierter Gene (%)			
Zeit	Dosis	Bezugszahl	>2	>2,5	>5	Normalisierung
			20 min	0 Gy	1176	
	6 Gy	1176	11	5	0	0,94
12 h	0 Gy	1176	20	12	3	0,76
	6 Gy	1176	24	17	5	1,1
24 h	0 Gy	1176	31	20	3	0,75
	6 Gy	1176	21	15	3	0,83
36 h	0 Gy	1176	8	4	1	1,03
	6 Gy	1176	12	7	1	0,83
48 h	0 Gy	1176	16	9	2	1
	6 Gy	1176	8	6	1	0,69
72 h	0 Gy	1176	21	14	2	1,14
	6 Gy	1176	19	12	3	0,99
Mittelwert in %			17,9	11,0	2,0	0,99
Reproduzierbarkeit %			82,1	89,0	98,0	

Tab. 4.1 Die Tabelle zeigt die Ergebnisse bei der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität, die nach Wiederholung eines Versuchs gewonnen wurden. Die linke Hälfte enthält die Reproduzierbarkeit bezogen auf die Anzahl exprimierter Gene, die rechte Hälfte bezogen auf alle 1176 Gene. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit einer Bestrahlung von 2 Gy sind im oberen, aus den Versuchen mit einer Bestrahlung von 6 Gy in dem unteren Bereich der Tabelle dargestellt. Die Reproduzierbarkeit ergibt sich aus der Differenz zwischen einer theoretischen Reproduzierbarkeit von 100 % und dem berechneten Mittelwert der, nach den jeweils oben genannten Kriterien, differentiell exprimierten Genen.

4.2.2 Differentiell exprimierte Gene nach Bestrahlung

4.2.2.1 Unterteilung der differentiell exprimierten Gene gegen Zeit und Strahlendosis

4.2.2.1.1 72 differentiell exprimierte Gene

Die Grundlagen zur Auswahl dieser Werte sind in Kapitel 4.2.2 dargestellt. Nach der Berechnung zeigten sich 72 Gene, die in einem oder beiden Versuchen zu einer oder mehreren Zeiten eine strahleninduzierte Hoch- oder Herunterregulation aufwiesen.

Um die gewonnenen Daten übersichtlicher aufzubereiten, wurden die Zahlen grafisch dargestellt.

Jedes Gen wurde, wie in Abbildung 4.3 an den verschiedenen Beispielen gezeigt, in einer eigenen Grafik abgebildet. Dabei wurde die differentielle Genexpression des Gens für 2 und 6 Gy gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen.

Für die Nomenklatur der Gene wurden die offiziellen Abkürzungen verwendet. Die vollständigen Bezeichnungen für die Gene sind in der Liste des Abkürzungsverzeichnisses beschrieben.

Die 72 Gene ließen sich aufgrund des zeitlichen Verlaufs der gemessenen strahleninduzierten differentiellen Genexpression in zwei Hauptgruppen mit fünf Untergruppen einordnen.

Die Kriterien der einzelnen Haupt- und Untergruppen waren:

1. Hauptgruppe: Hoch- bzw. Herunterregulation der Gene zu einem Zeitpunkt

Die Untergruppen eins bis drei unterteilten die Gene der ersten Hauptgruppe nach dem Zeitpunkt der differentiellen Genexpression:

Gruppe eins: frühzeitige differentielle Genexpression (bei 0,3 oder 12 h)

Gruppe zwei: differentielle Genexpression im mittleren zeitlichen Bereich (bei 24 oder 36 h)

Gruppe drei: zeitlich späte differentielle Genexpression (bei 48 oder 72 h).

2. Hauptgruppe: Hoch- bzw. Herunterregulation der Gene zu mehreren Zeitpunkten

Die Gene, die der Hauptgruppe zwei zugeordnet waren, wurden in die Untergruppen vier und fünf unterteilt. Die Kriterien dieser Einteilung waren:

Gruppe vier: differentielle Genexpressionen im mittleren Bereich (zwischen 12 und 48 h p.r.)

Gruppe fünf: differentielle Genexpressionen zu irgendeinem Zeitraum (zwischen 0,3 und 72 h p.r.)

Die Abbildung 4.3 zeigt je ein Beispiel für die Gruppen eins bis fünf.

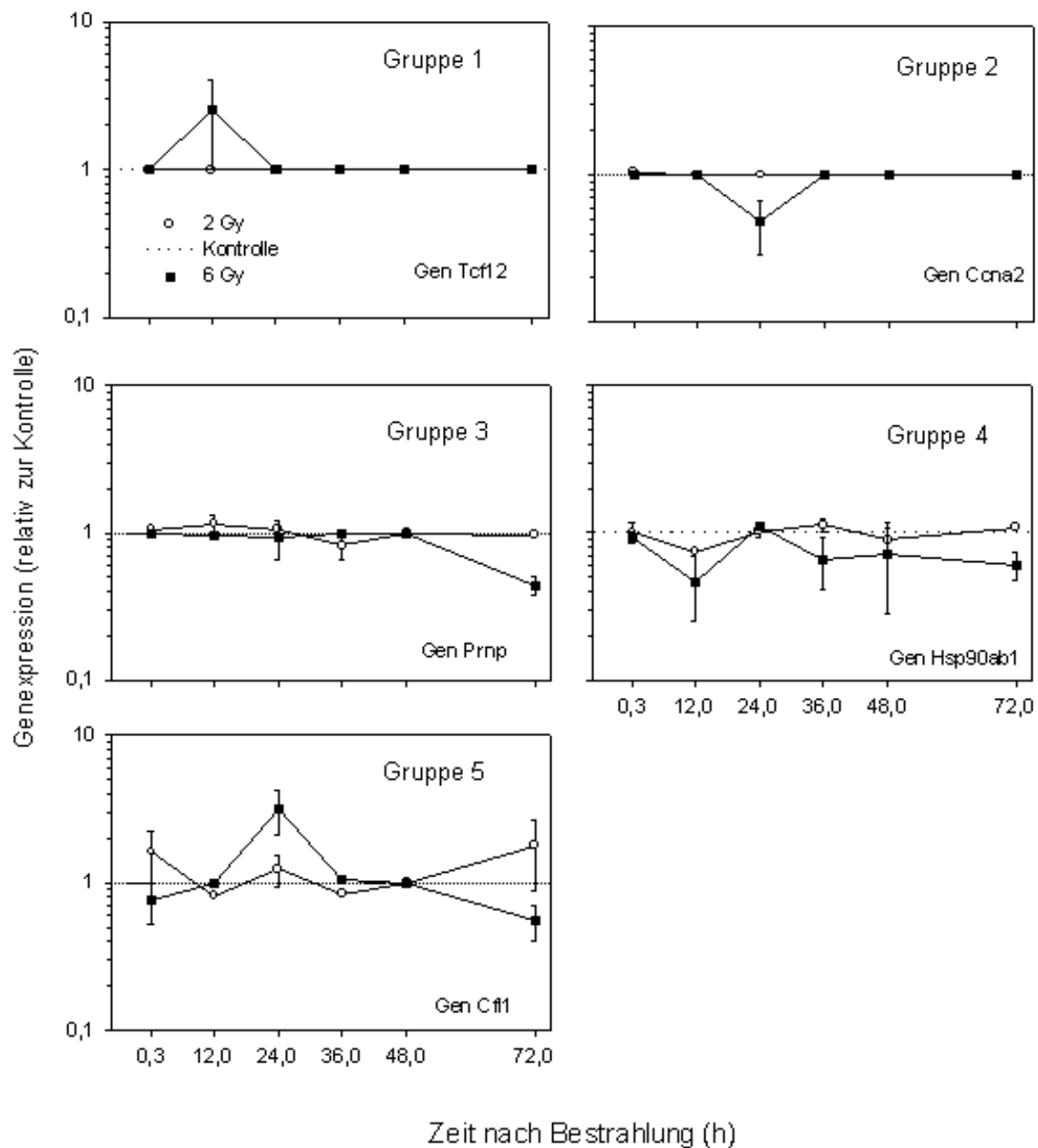


Abb. 4.3 Die Grafiken zeigen Beispiele für differentiell exprimierte Gene, die gegen die Zeit und mit 2 und 6 Gy aufgetragen, einer der fünf im Text dargestellten Untergruppen zugeordnet werden können. Auf der X-Achse wurde die Zeit nach Strahlenexposition (h), auf der Y-Achse die differentielle Genexpression relativ zur unbestrahlten Kontrolle halblogarithmisch aufgetragen. Jeder abgebildete Punkt berechnete sich aus zwei Versuchen. Der Durchschnitt wurde als Symbol, das Maximum und das Minimum als oberer bzw. unterer Fehlerbalken abgebildet.

Bei der ersten Grafik, beispielhaft für die Gene der Gruppe 1, erkennt man die differentielle Genexpression des Gens Tcf12, 12 h nach einer Bestrahlung mit 6 Gy. Dieses Gen zeigte im ersten Versuch keinen Unterschied und im zweiten Versuch eine Hochregulation um den

Faktor 4,1 gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Eine differentielle Genexpression war nur bei 12 h p.r. zu erkennen. Deshalb erfolgte die Zuordnung dieses Gens zu der Gruppe 1. Die Grafik ist beispielhaft für insgesamt 11 Gene, die dieser Gruppe zugeordnet werden konnten. Die zweite Grafik zeigt die Veränderungen des Gens *Ccna2*, 24 h nach Bestrahlung mit 6 Gy. Die Herunterregulation um den Faktor 3,5 (Kehrwert:0,3) im ersten Versuch und die Herunterregulation um den Faktor 1,4 (Kehrwert:0,7) im zweiten Versuch gegenüber der unbestrahlten Kontrolle stellte die einzige gemessene differentielle Genexpression dieses Gens nach Strahlenexposition dar. Der Gruppe zwei konnten insgesamt 21 Gene zugeordnet werden, für die beispielhaft die Grafik zwei steht.

In der dritten Grafik, die ein Beispiel für die Gene der Gruppe drei darstellt, erkennt man die Herunterregulation des Gens *Prnp* 72 h nach Bestrahlung mit 6 Gy. Die differentielle Genexpression betrug 2,6 (Kehrwert:0,4) im ersten, und 2 (Kehrwert:0,5) im zweiten Versuch. Zwar zeigt die Grafik auch Herunterregulationen bei 24 und 36 h p.r., aber die Höhe der differentiellen Genexpressionen war jeweils kleiner als 2,5 und wurde deshalb nicht berücksichtigt. Der Gruppe drei konnten 15 Gene zugeordnet werden.

Die vierte Grafik zeigt bei dem Gen *Hsp90ab1* Herunterregulationen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle bei 12 h, 36 h und 48 h p.r. mit 6 Gy. Die differentielle Genexpression betrug beim ersten Versuch 1,4 (Kehrwert: 0,7) bei 12 h, 2,5 (Kehrwert:0,4) bei 36 h und 1,2 bei 48 h p.r. Im zweiten Versuch betrug die differentielle Genexpression 4,0 (Kehrwert: 0,3) bei 12 h, 1,1 (Kehrwert:0,9) bei 36 h und 3,6 (Kehrwert:0,3) bei 48 h p.r.. Die Grafik steht als Beispiel für insgesamt neun Gene dieser Gruppe.

Beispielhaft für insgesamt 16 Gene der fünften Gruppe zeigt die Grafik fünf das Gen *Cfl1*. Zu dem Zeitpunkt 24 h p.r. mit 6 Gy zeigte sich eine Hochregulation mit einer differentiellen Genexpression von 2,1 im ersten und 4,2 im zweiten Versuch. 72 h p.r. mit 2 Gy zeigte sich eine Hochregulation um den Faktor 2,7 im ersten und eine Herunterregulation um den Faktor 1,1 (Kehrwert:0,9) im zweiten Versuch, gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Differentielle Genexpression kleiner 2,5 wie z.B. bei Versuch eins 0,3 h p.r. nach Bestrahlung mit 2 Gy von 2,3 wurden nicht berücksichtigt.

In der Tabelle 4.2 sind alle 72 Gene, sortiert nach ihrer Zugehörigkeit zu den fünf Gruppen, dargestellt. Im Anhang in den Abbildungen 8.5 bis 8.12 sind die Grafiken aller 72 Gene, aufgetragen gegen die Zeit, dargestellt.

	EINFACH			MEHRFACH		
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	
Hoch-/Runterregulation bei:	≤ 12h	24h+36h	≥ 48h	12h - 48h	0,3h - 72h	
	Evx-1	Refbp2	Sema5b	Dag1	Hmgn1	
	Tcf12	Atf4	Fosl2	Elk3	Ccng1	
	Zfx	Ccna2	Sqstm1	Myc	Ttf1	
	Ccne1	Ccnb1	Prnp	Hsp90ab1	Jun	
	Nek3	Gmnn	Fas	Rpsa	Jund1	
	Vil2	Ctnnd2	Bax	Ddit3	Hsp110	
	Phlda1	Cdh1	Dynll1	Fgfr1	Hspa5	
	Rxra	Ctnna1	Csf2ra	Fgf7	Mgst1	
	Rab2	Sema5a	Ccl7	Col6a1	Pdia4	
	Rag1ap1	Bnip3	Calm1		Gadd45a	
	Ssrp1	Clu	Ctsl		Ryk	
		Igfbp4	Sdc3		Vegfa	
		Rfng	Myl6		Zyx	
		Map2k4	Rad23b		Cst3	
		Map3k3	Pten		Cfl1	
		Ppm1a			Rad21	
		Cdc42				
		Cacybp				
		App				
		Fn1				
		Pcna				
Gesamt:	11	21	15	9	16	72

Tab. 4.2 Die Tabelle zeigt eine Auflistung aller 72 differentiell exprimierten Gene aus beiden Versuchen. Die Gene wurden nach Genexpressionshäufigkeit (einfach oder mehrfach) in zwei Hauptgruppen und nach Genexpressions-Zeitpunkt p.r. in die entsprechenden Untergruppen eingeteilt.

4.2.2.1.2 Selektion der sieben, für die biologische Dosimetrie geeignetsten Gene

Aus den dargestellten 72 Genen wurden solche Gene selektiert, die den folgenden Auswahlkriterien entsprachen:

- Möglichst geringe Differenzen zwischen der differentiellen Genexpression aus Versuch eins und Versuch zwei
- Tendenz einer dosisabhängigen Hoch- oder Herunterregulation, möglichst konstant gegen die Zeit, auch bei den Genen, die sich nur zu einem Zeitpunkt differentiell exprimiert zeigten
- Möglichst gleichsinnige Veränderung der Genexpression bei zwei und sechs Gray

Die Auswahlkriterien erfüllten sieben Gene. Diese sieben Gene wurden zu den Zeitpunkten p.r. betrachtet, zu denen sie, entsprechend den Auswahlkriterien, eine differentielle Genexpression > 2,5 zeigten. Die differentielle Genexpression der Gene wurde zu einem

Zeitpunkt p.r. sowohl gegen die Strahlendosis (in Gy) (durchgängige Linie) als auch gegen die Klonogenität (in %) (unterbrochene Linie) aufgetragen.

Aus den Gruppen eins bis drei erfüllte jeweils ein Gen die Auswahlkriterien.

- Gruppe 1 (differentielle Genexpression bei ≤ 12 h p.r.): Rab2 12h p.r.
- Gruppe 2 (differentielle Genexpression bei 24h p.r. oder 36h p.r.): Atf4 24h p.r.
- Gruppe 3 (differentielle Genexpression bei ≥ 48 h p.r.): Bax 48h p.r.

Aus den Gruppen vier und fünf kamen vier Gene für die weitere Bearbeitung in betracht.

- Gruppe 4 (differentielle Genexpressionen zwischen 12h und 48h p.r.): Myc 12h und 48h p.r., Fgfr1 24h und Col6a1 36h p.r.
- Gruppe 5 (differentielle Genexpressionen zwischen 0,3h und 72h): Ryk 36h und 72h p.r.

Die Gene aus den Gruppen vier und fünf zeigten zu mehreren Zeitpunkten p.r. eine differentielle Genexpression. Bei den Genen Myc und Ryk wurden mehrere Grafiken, je eine für jeden Zeitpunkt, angefertigt. Die 7 Gene wurden somit in insgesamt 9 Grafiken dargestellt. Die neun Grafiken sind im Anhang in den Abbildungen 8.13 bis 8.15 aufgeführt.

Mit Hilfe der grafischen Darstellung konnten die sieben Gene als für die biologische Dosimetrie besonders geeignet identifiziert werden. Sie wiesen entweder einen besonders niedrigen Unterschied zwischen der differentiellen Genexpression von Versuch eins und Versuch zwei auf oder sie zeigten eine deutliche Tendenz der differentiellen Genexpression abhängig von der Strahlendosis.

Diese neun Grafiken ließen sich in drei gleich große Gruppen nach den folgenden Kriterien unterteilen:

- Die Gene der ersten Gruppe zeigten eine Hoch- oder Herunterregulation nach einer Bestrahlung mit 6 Gy und eine Tendenz in die gleiche Richtung nach einer Bestrahlung mit 2 Gy.
Bei den Genen dieser Gruppe zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen differentieller Genexpression und Strahlendosis. Zu dieser Gruppe gehörten die Gene Myc 12 h p.r., Myc 48 h p.r. und Ryk 72 h p.r..
- Der Gruppe zwei gehörten die Gene an, die nach einer Bestrahlung mit 6 Gy eine

Hochregulation, nach Bestrahlung mit 2 Gy hingegen keine oder keine gleichsinnige Veränderung zeigten. Die folgenden Gene gehörten zu dieser Gruppe: Atf4 24 h p.r., Bax 48 h p.r. und Fgfr1 24 h p.r.

- Den Genen der Gruppe drei war gemeinsam, dass sie nach einer Bestrahlung mit 2 Gy eine differentielle Genexpression mit einer Hoch- oder Herunterregulation aufwiesen. Nach einer Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich keine differentielle Genexpression. Der Gruppe drei gehörten die Gene: Ryk 36 h p.r., Rab2 12 h p.r. und Col6a1 36 h p.r. an.

Die folgenden Abbildungen stellen jeweils ein Beispiel aus jeder Gruppe dar.

Die grafische Darstellung zeigt auf der unteren X-Achse die Strahlendosis in Gray und auf der oberen X-Achse die Klonogenität abnehmend in Prozent. Auf der Y-Achse ist halblogarithmisch die differentielle Genexpression eines untersuchten Gens abgebildet. Die Kurve beschreibt jeweils den errechneten Verlauf der Regression zweiter Ordnung. Vorausgegangene Versuche zeigten, dass die Klonogenität bei 0 Gray 100%, bei 2 Gray 71% und bei 6 Gray 6,8% betrug.

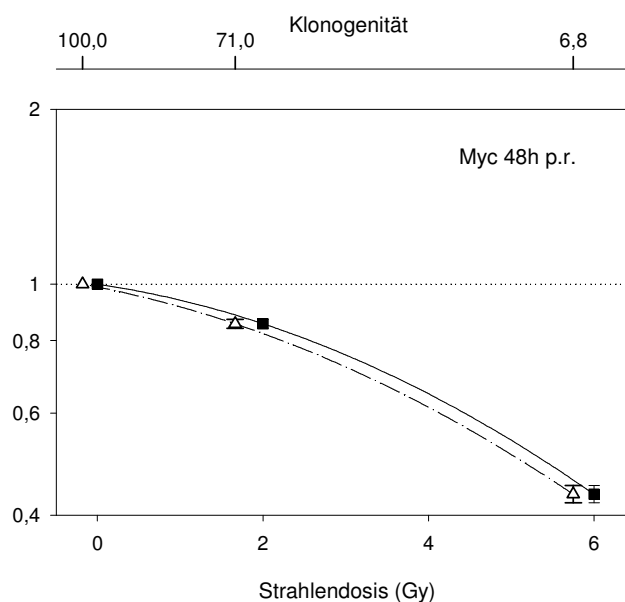


Abb. 4.4 Grafische Darstellung der differentiellen Genexpression des Gens Myc, 48 h nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis (durchgängige Linie/Symbol:Rechteck) und der Klonogenität (unterbrochene Linie/Symbol:Dreieck). Dargestellt ist der Durchschnitt der differentiellen Genexpression des Gens zu diesem Zeitpunkt mit Fehlerbalken (Maximalwert und Minimalwert). Die Linie beschreibt die Genexpressionsdaten mit einer Regression zweiter Ordnung.

Die Abbildung 4.4 zeigt die differentielle Genexpression des Gens Myc, 48 h p.r. in Abhängigkeit von der Strahlendosis bzw. der Klonogenität. Es konnte mit zunehmender

Strahlendosis eine Herunterregulation des Gens gezeigt werden. 48 h nach Bestrahlung mit 2 Gy war das Gen nur um den Faktor 1,1 (Kehrwert: 0,9), nach Bestrahlung mit 6 Gy hingegen um den Faktor 2,5 (Kehrwert: 0,4) herunterreguliert. Der Wiederholungsversuch brachte nahezu das gleiche Ergebnis. Aufgrund des dosisabhängigen Abfalls der differentiellen Genexpression erfolgte die Zuordnung dieses Gens zu der Gruppe 1.

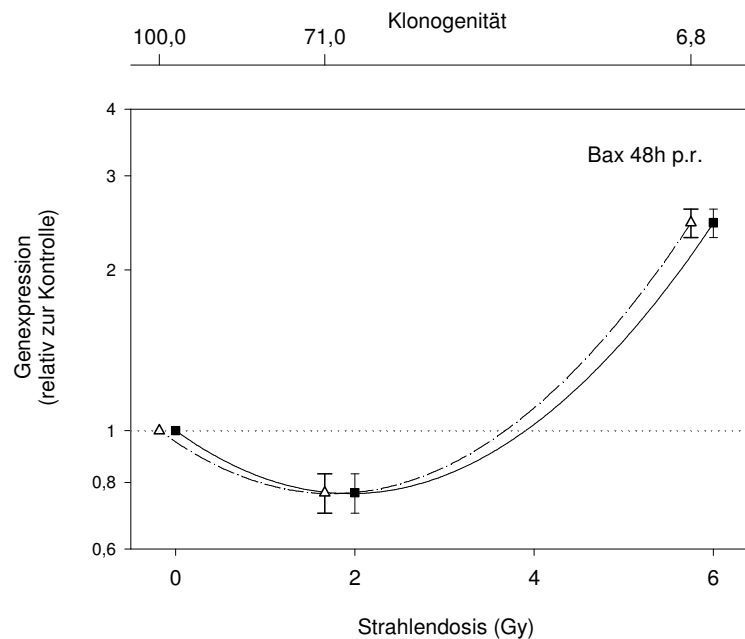


Abb. 4.5 Grafische Darstellung der differentiellen Genexpression des Gens Bax, 48 h nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis (durchgängige Linie/Symbol:Rechteck) und der Klonogenität (unterbrochene Linie/Symbol:Dreieck). Dargestellt ist der Durchschnitt der differentiellen Genexpression des Gens zu diesem Zeitpunkt mit Fehlerbalken (Maximalwert und Minimalwert). Die Linie beschreibt die Genexpressionsdaten mit einer Regression zweiter Ordnung.

Wie in der Abbildung 4.5 gezeigt, bestand bei dem Gen Bax, 48 h p.r. nach einer Bestrahlung mit 6 Gy eine Hochregulation. Die differentielle Genexpression betrug 2,6. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy hingegen zeigte sich eine Herunterregulation um den Faktor 1,3 (Kehrwert: 0,8), die aber kleiner als 2,5 war. Die Ergebnisse aus den beiden Versuchen unterschieden sich maximal um den Faktor 0,15. Es zeigte sich bei niedriger Dosis eine Herunter- und bei 6 Gy eine Hochregulation. Deshalb erfolgte eine Zuordnung dieses Gens zu Gruppe 2.

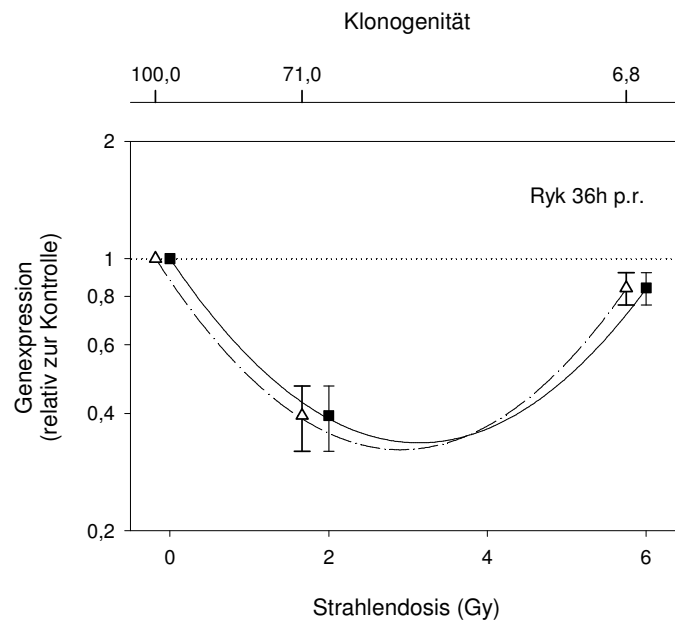


Abb. 4.6 Grafische Darstellung der differentiellen Genexpression des Gens Ryk, 36 h nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis (durchgängige Linie/Symbol:Rechteck) und der Klonogenität (unterbrochene Linie/Symbol:Dreieck). Dargestellt ist der Durchschnitt der differentiellen Genexpression des Gens zu diesem Zeitpunkt mit Fehlerbalken (Maximalwert und Minimalwert). Die Linie beschreibt die Genexpressionsdaten mit einer Regression zweiter Ordnung.

In der Abbildung 4.6 ist die differentielle Genexpression des Gens Ryk, 36 h p.r. gezeigt. Dargestellt ist die Herunterregulation nach einer Bestrahlung mit 2 Gy um den Faktor 3,1, wobei sich nach Bestrahlung mit 6 Gy keine differentielle Genexpression $\geq 2,5$ zeigte. Das Gen ist durch die differentielle Genexpression nur nach der Bestrahlung mit 2 Gy ein typisches Beispiel für die Gene der Gruppe 3.

Die sieben Gene, betrachtet zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.r. sind in der Tabelle 4.3, sortiert nach dem Zeitpunkt der differentiellen Genexpression, wiedergegeben.

		Zeitpunkt der differentiellen Genexpression p.r. in h					
		0,3	12	24	36	48	72
Hochregulierte Gene		Rab2 2Gy	Fgfr1 6Gy			Bax 6Gy	Ryk 6Gy
		Col6a1 6Gy	Atf4 6Gy				
Herunterregulierte Gene		Myc 6Gy			Ryk 2Gy	Myc 6Gy	
					Col6a1 2Gy		

Tab. 4.3 Die Tabelle zeigt für die sechs verschiedenen Zeitpunkte p.r. die jeweiligen, für die biologische Dosimetrie geeigneten Gene, sortiert nach Hoch- oder Herunterregulation. Auch die Strahlendosis, bei der sich die differentielle Genexpression zeigte, ist mit aufgeführt.

Die Tabelle zeigt die differentiell exprimierten Gene, sortiert nach Hoch- und Herunterregulation und nach Zeitpunkt der differentiellen Genexpression p.r..

Dabei kann zu fast jedem Zeitpunkt p.r. ein Gen identifiziert werden, dass sich als differentiell exprimiert zeigt. 48 h nach einer Bestrahlung der Zelle mit 6 Gy beispielsweise, zeigte das Gen Bax eine Hochregulation und das Gen Myc eine Herunterregulation $\geq 2,5$.

Außer für den Zeitraum 0,3 h p.r. konnte jeweils mindestens ein differentiell exprimiertes Gen gefunden werden.

4.2.2.2 Unterteilung der differentiell exprimierten Gene in Abhängigkeit von ihrer Hauptfunktion

Von den 72 differentiell exprimierten Genen wurden solche mit gleicher Hauptfunktion jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst.

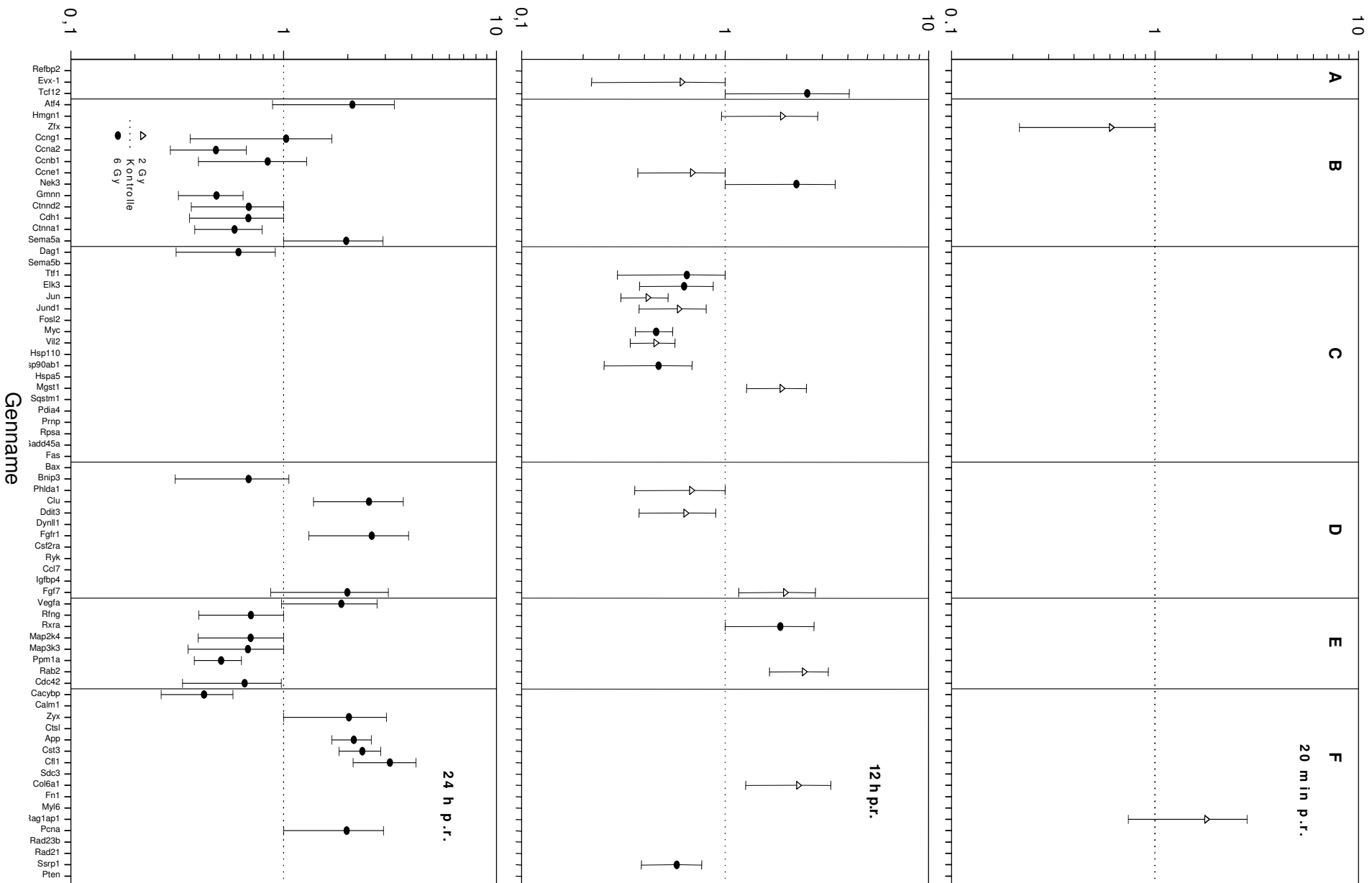
Es ergaben sich sechs Gruppen, die mit den Großbuchstaben A-F bezeichnet wurden. Die Hauptfunktionen der Gene innerhalb der sechs Gruppen sind in der Tabelle 4.3 aufgeführt. Die 72 Gene waren sehr ungleichmäßig auf die einzelnen Gruppen verteilt. Die quantitative Zuordnung der Gene zu den Gruppen stellte sich folgendermaßen dar:

Gruppe	Hauptfunktion	Anzahl diff. exprimierter Gene
A	Onkogene, Tumor Supressorgene und Zellzyklus-Regulatoren	3
B	Gene für die Widerstandsfähigkeit der Zelle, Ionenkanäle und Ionentransport, Intrazelluläre Signaltransduktions-, Molekül-Modulatoren und Effektoren	13
C	Apoptose, DNA Synthese, Reparatur und Rekombination	19
D	Transkriptionsfaktoren und DNA Bindungsproteine	12
E	Rezeptoren, Zellhüllen Antigene und Zelladhäsionsverhalten	8
F	Zell-Zell-Kommunikation, Zytoskelett, die Zellbeweglichkeit und Proteinauf- und -abbau	17

Tab. 4.4 Die Tabelle zeigt die quantitative Verteilung der 72 differentiell exprimierten Gene zu den sechs Gruppen A-F und die Hauptfunktionen der Gene innerhalb der Gruppen, unabhängig von dem Zeitpunkt nach Strahlenexposition.

Die grafische Darstellung der differentiellen Genexpression der Gene zu einem Zeitpunkt p.r. ist in den folgenden sechs Grafiken der Abbildung 4.7 wiedergegeben.

Differentielle Genexpression



Differenzielle Genexpression

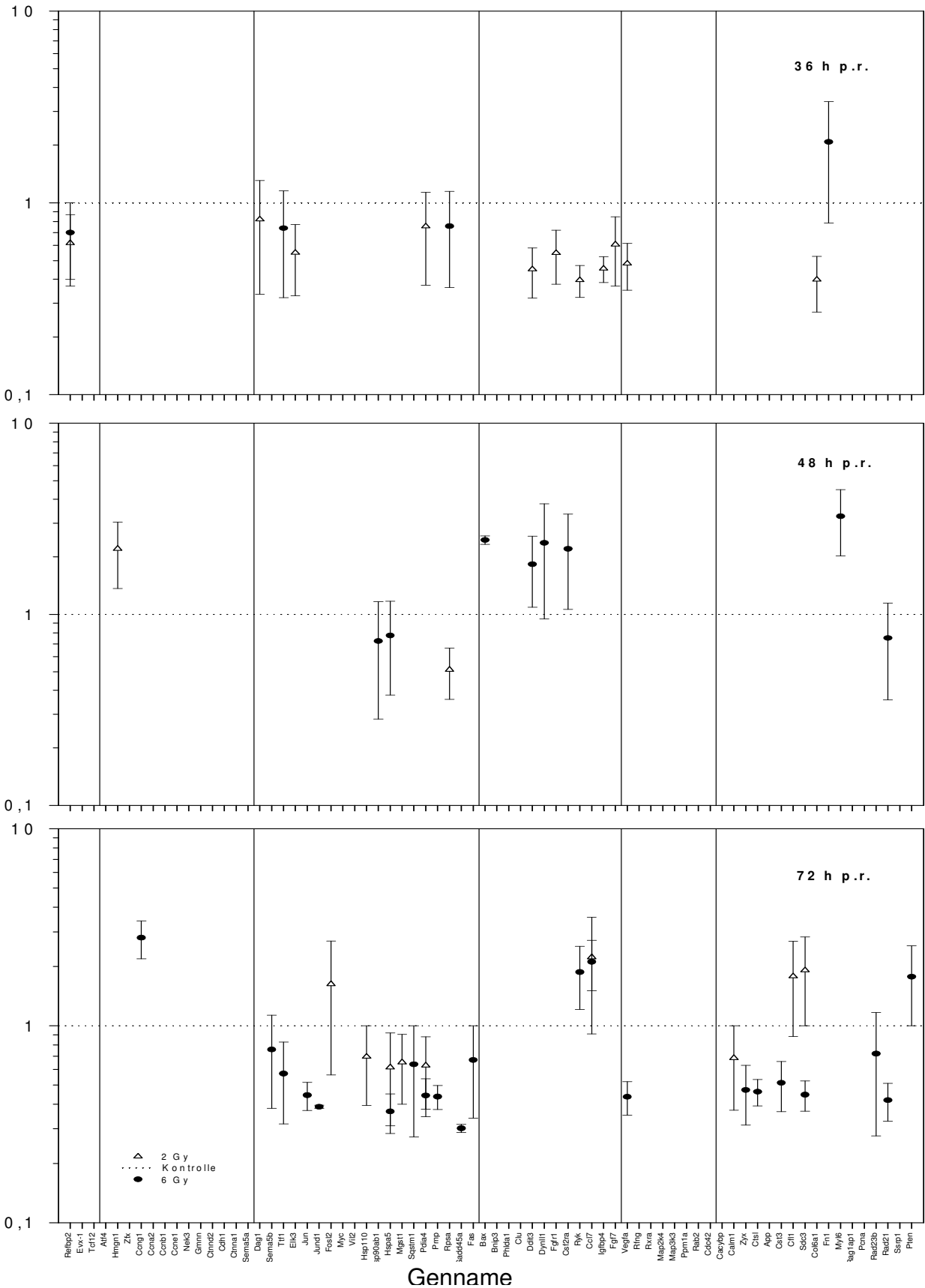


Abb. 4.7 Die Abbildung enthält 6 Grafiken, welche die differenzielle Genexpression der 72 Gene zu unterschiedlichen Zeiten p.r. angibt. Die Ergebnisse p.r. mit 2 Gy sind mittels des Dreiecks, p.r. mit 6 Gy, mittels Kreis dargestellt. Jede Grafik gibt die Ergebnisse zu einem Zeitpunkt p.r. wieder.

Die Grafiken wurden nach folgenden Kriterien ausgewertet:

- Gene, deren differentielle Genexpression in mindestens einem Versuch größer als 2,5 war, wurden als hochreguliert bezeichnet.
- Gene, deren differentielle Genexpression in mindestens einem Versuch kleiner als 0,4 (entspricht einer Herunterregulation um den Faktor 2,5) war, wurden als herunterreguliert bezeichnet.
- Gene, deren differentielle Genexpression aus einem der beiden Versuche größer und aus dem anderen kleiner als die Kontrolle (1) waren, wurden nicht zugeordnet (N).

Um die Tabelle übersichtlicher zu gestalten, wurden die Ergebnisse mittels Symbolen dargestellt. Dabei wurde jeweils betrachtet, ob und welche Änderung der differentiellen Genexpression die meisten Gene zeigten. Jedem Zeitpunkt nach Bestrahlung mit 2 und 6 Gy in jeder Gruppe wurde die Auswirkung der Bestrahlung mittels eines Symbols der Tabelle 4.5 zugeordnet. Abhängig von der Art der differentiellen Genexpression wurde das entsprechende Symbol aus Tabelle 4.5 vergeben. In Klammern ist jeweils die Anzahl der differentiell exprimierten Gene, die zur Vergabe des Symbols führten, angegeben. In den Kästchen der Tabelle, in denen sich kein Symbol befindet, war zu dem Zeitpunkt in dieser Gruppe kein Gen differentiell exprimiert.

Folgende Symbole wurden dabei verwendet:

Symbol	Bedeutung
↑	≥ 50% der Gene zeigten eine differentielle Genexpression ≥ 2,5.
↑↓	Die differentielle Genexpression lag bei ≥ 50% der Gene oberhalb 2,5 bzw. unterhalb 0,4. Verteilung zwischen Hoch- und Herunterregulation 1:1.
↓	≥ 50% der Gene zeigten eine differentielle Genexpression ≤ 0,4.
N	≥ 50% der Gene zeigten eine differentielle Genexpression mit einem Wert größer als die Kontrolle und einem Wert kleiner als die Kontrolle. Sie konnten nicht zugeordnet werden.

Tab. 4.5 Die Tabelle zeigt die Symbole, die in Tabelle 4.6 zur Beschreibung der verschiedenen Gen-Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.r. verwendet wurden und ihre Bedeutung.

Gruppe

A	2 Gy	6 Gy
0,3 h		
12 h	↓ (1/1)	↑ (1/1)
24 h		
36 h	↓ (1/1)	↓ (1/1)
48 h		
72 h		

Gruppe

D	2 Gy	6 Gy
0,3 h		
12 h	↓ (2/2)	
24 h		↑ (2/4)
36 h	↓ (5/5)	
48 h		↑ (3/4)
72 h	N (1/1)	↑ (2/2)

B	2 Gy	6 Gy
0,3 h	↓ (1/1)	
12 h	↓ (1/2) N (1/2)	↑ (1/1)
24 h		↓ (5/9)
36 h		
48 h	↑ (1/1)	
72 h		↑ (1/1)

E	2 Gy	6 Gy
0,3 h		
12 h	↑ (1/1)	↑ (1/1)
24 h		↓ (5/6)
36 h	↓ (1/1)	
48 h		
72 h		↓ (1/1)

C	2 Gy	6 Gy
0,3 h		
12 h	↓ (3/4)	↓ (4/4)
24 h		↓ (1/1)
36 h	N (2/3)	N (2/2)
48 h	↓ (1/1)	N (2/2)
72 h	↓ (4/5)	↓ (9/10)

F	2 Gy	6 Gy
0,3 h	N (1/1)	
12 h	↑ (1/1)	↓ (1/1)
24 h		↑ (5/6)
36 h	↓ (1/1)	N (1/1)
48 h		↑ (1/2) N(1/2)
72 h	↑↓ (2/3)	↓ (5/7)

Tab. 4.6 Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Grafiken, sortiert nach Hauptfunktion der Gene in die Gruppen A-F gegen die Zeit und Dosis. Die verwendeten Zeichen sind in Tabelle 4.5 erklärt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der differentiell exprimierten Gene an. Die erste Zahl entspricht der Anzahl der in Richtung des angegebenen Zeichens exprimierten Gene. An zweiter Stelle ist die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben.

Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigten sich insgesamt 36 Gene als differentiell exprimiert. Der Großteil der Gene (23) war herunterreguliert, das entspricht 64 %. 7 Gene konnten nicht zugeordnet werden (19 %) und 6 Gene waren hochreguliert (17 %). Die meisten differentiell exprimierten Gene waren den Gruppen C und D zugeordnet (13 bzw. 8 Gene). In den anderen

Gruppen waren zwischen 2 und 5 Genen differentiell exprimiert. In den Gruppen C und D zeigte sich außerdem, dass die Gene, die zugeordnet werden konnten, herunterreguliert waren.

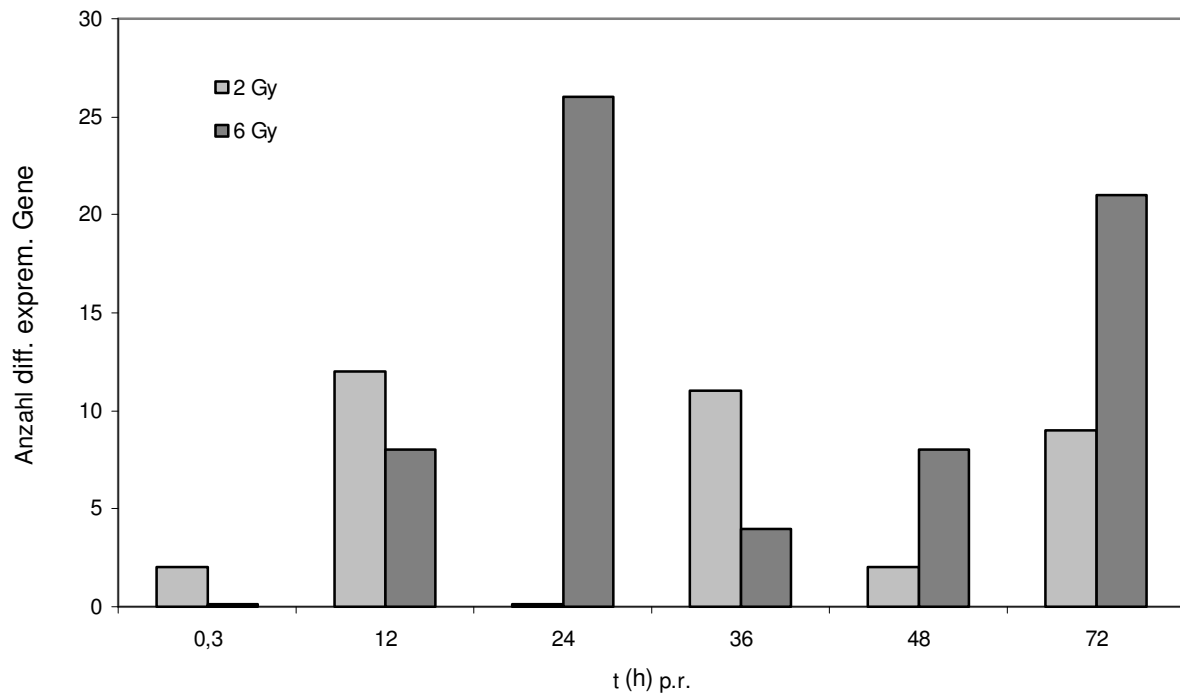


Abb. 4.8 Die Abbildung zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten Gene nach einer Bestrahlung mit 2 Gy (hellere Balken) und 6 Gy (dunklere Balken) sortiert nach Zeitpunkten nach Strahlenexposition

Zu den Zeitpunkten 12, 36 und 72 h p.r. sind die meisten Gene (12/11/9 Gene) differentiell exprimiert. Zu den anderen Zeitpunkten sind maximal 2 Gene differentiell exprimiert.

Nach Bestrahlung mit 6 Gy waren insgesamt 67 Gene differentiell exprimiert. Davon waren die meisten (33) Gene herunterreguliert (49 %). 19 Gene waren hochreguliert (28 %) und 15 Gene konnten nicht zugeordnet werden (22 %).

Differentielle Genexpression zeigte sich vor allem in den Gruppen B-F. In der Gruppe A zeigten sich nur 2 Gene, in den Gruppen B-F zwischen 8 und 19 Gene als differentiell exprimiert. Die Richtung der differentiellen Genexpression war abhängig von der Gruppe. So zeigten sich in Gruppe B 5 von 11 Genen herunterreguliert, in der Gruppe E waren es 6 von 8 differentiell exprimierten Genen. Einheitlich herunterreguliert waren die Gene der Gruppe C. Alle 14 Gene dieser Gruppe, die zugeordnet werden konnten, waren herunterreguliert. In der Gruppe D waren 7 von 10 differentiell exprimierten Genen hochreguliert. In der Gruppe F waren 7 Gene hochreguliert, genauso viele Gene waren auch herunterreguliert.

Betrachtet man die differentielle Genexpression p.r. mit 6 Gy, sortiert nach den unterschiedlichen Zeitpunkten p.r., so zeigt sich, dass die meisten Gene zu den Zeitpunkten

24 und 72 h p.r. differentiell exprimiert sind. 0,3 h p.r. zeigt sich kein Gen und zu den Zeitpunkten 12 h, 36 h und 48 h p.r. 4 bzw. 8 Gene differentiell exprimiert.

Vergleicht man die differentielle Genexpression von 2 Gy und 6 Gy so fällt zunächst auf, dass p.r. mit 6 Gy mehr Gene (67/36) differentiell exprimiert waren und dass zu mehreren Zeitpunkten p.r. innerhalb der Gruppen, differentiell exprimierte Gene vorliegen (21/18).

Unabhängig von der Strahlendosis sind die meisten Gene herunterreguliert, bei 2 Gy 23 von 36 und bei 6 Gy 33 von 67. Bei 2 Gy entspricht das 64 % und bei 6 Gy 49 % aller differentiell exprimierten Gene.

Wenn sich nach einer Bestrahlung mit 2 Gy differentiell exprimierte Gene zeigten, lagen in 12 Fällen auch nach einer Bestrahlung mit 6 Gy differentiell exprimierte Gene vor, die sich in fünf Fällen gleichsinnig verändert hatten. In sechs Fällen zeigten sich nur nach Bestrahlung mit 2 Gy differentiell exprimierte Gene und in neun Fällen waren p.r. mit 2 Gy keine differentiell exprimierten Gene zu finden, wohl aber nach Bestrahlung mit 6 Gy.

Bei dem Vergleich der einzelnen Gruppen fällt auf, dass in Gruppe A, unabhängig von der Strahlendosis, nur zwei Gene differentiell exprimiert waren. In den Gruppen B, E und F zeigten sich die Gene bezüglich der Hoch- oder Herunterregulation sowohl innerhalb einer Strahlendosis als auch im Vergleich zwischen den Strahlendosen uneinheitlich.

Gleichsinnig verhielten sich die Gene in der Gruppe C: Unabhängig von der Strahlendosis oder der Zeit p.r. waren die meisten Gene herunterreguliert. Abhängig von der Höhe der Strahlendosis zeigten die Gene der Gruppe D ein gegensätzliches Verhalten. Nach Bestrahlung mit 2 Gy waren alle Gene, die zugeordnet werden konnten, herunterreguliert. Die meisten Gene der Gruppe waren, nachdem sie einer Strahlendosis von 6 Gy ausgesetzt waren, hochreguliert.

Die Gene waren sehr unterschiedlich auf die einzelnen Gruppen verteilt, was die Gruppen von der Gewichtung sehr ungleich macht. Deutlich wird das, wenn man die Gruppen C oder F mit einer Vielzahl differentiell exprimierter Gene mit der Gruppe A mit jeweils zwei differentiell exprimierten Genen vergleicht.

Betrachtete man die Unterschiede in der differentiellen Genexpression abhängig von der Strahlendosis und der Zeit, so fällt auf, dass die meisten Gene, p.r. mit 2 Gy, nach 12, 36 und 72 h differentiell exprimiert waren. Nach Bestrahlung mit 6 Gy waren 24 und 72 h p.r. die meisten Gene differentiell exprimiert (siehe Abb. 4.8).

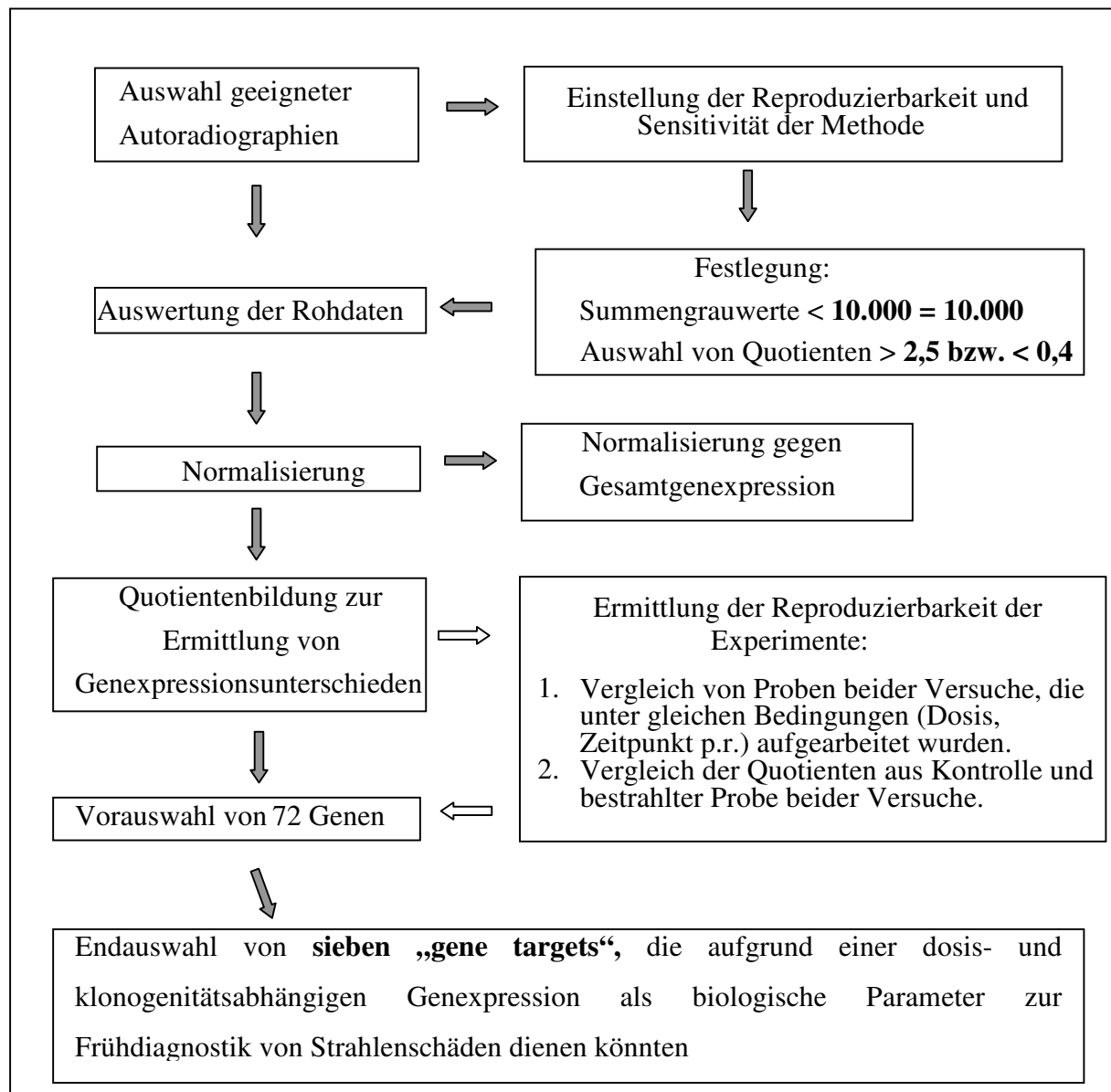


Abb. 4.9 Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Auswahl biologischer Parameter („gene targets“) zur Abschätzung der Strahlendosis (biologische Dosimetrie) und des Strahlenschadens (biologische Indikatoren).

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Genexpressionsarray

In der Literatur finden sich erst seit dem Jahr 2002 Richtlinien und Ergebnisse für die Untersuchung methodischer Fragestellungen, wie Reproduzierbarkeit und Normalisierungsverfahren des Genexpressionsarrays. So wurden früher viele molekulargenetische Studien ohne Wiederholungsversuche durchgeführt (Le et al. 2000, S.9834) bzw. wenige Untersuchungsergebnisse diesbezüglich publiziert (Brazma et al. 2000, S.17). Eine Arbeit beschreibt eine neue Gen-Selektionsmethode, die durch mehrfache Vergleichsprüfung Fehler und Reproduzierbarkeit der Array-Auswertung bewertet. Die Ursachen der Unterschiede in der Datenauswertung sollen damit gefunden werden (Fu et al. 2003, S.191). Eine Arbeit von Yang et al. 2002 (S.62) beschreibt, wie wichtig die Betrachtung der Gesamtgenexpression als Normalisierungsverfahren ist. Diese Normalisierung sollte als Grundlage zur Auswertung eines cDNA Arrays benutzt werden. Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit gewählt. Eine weitere Arbeit befasste sich ebenfalls mit der Art der Ermittlung von Reproduzierbarkeit und Normalisierung (Staßen et al. 2003, S. 321). Hier wurden die gleichen Methoden zur Bestimmung von Sensitivität und Spezifität wie in dieser Doktorarbeit angewandt. Die Beschreibung der durchgeführten Methoden zur Normalisierung war ein Teil der vorliegenden Arbeit, um eine hohe Reproduzierbarkeit von 95,5 % zu erzielen.

5.1.2 Hybridisierung und Autoradiographie

Die Erstellung optimaler Autoradiografien, die für die Auswertung des Experimentes verwendet werden konnten, stellte sich als problematisch heraus, da die hybridisierten Proben unterschiedlich starke Schwärzungen der Autoradiografien hervorriefen. Für jede hybridisierte Probe mussten mehrere Autoradiografien zur Auswahl stehen, damit solche in

die Auswertung eingehen konnten, die eine vergleichbare Gesamtgenexpression aufwiesen, gegen die später normalisiert werden sollte. Die Expositionszeit der jeweiligen Autoradiografien musste dabei anhand von Erfahrungswerten und unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des ^{32}P abgeschätzt werden und lag zwischen 3 und 14 Tagen.

Wurden Autoradiografien miteinander verglichen, deren Normalisierungsfaktor im Bereich von 2 oder darüber bzw. im Bereich von 0,5 oder darunter lag, konnten erhebliche Reduktionen in der Reproduzierbarkeit auftreten (Tab. 4.1, Kap. 4.2.1). Diese Autoradiografien durften nur ausnahmsweise und nach Kontrolle der Auswertbarkeit für den Vergleich benutzt werden. Verantwortlich dafür ist der geringe lineardynamische Bereich, innerhalb dessen die Schwärzungen linear in Grauwerte übertragen werden können.

Die Erfassung der Hybridisierungsprodukte mittels eines Phosphorimagers hilft, diese Schwierigkeiten zu beheben, da die handelsüblichen Geräte einen dynamischen Bereich von 5 Zehnerpotenzen aufweisen. Zusätzlich bietet der Phosphorimager noch den Vorteil der direkten Digitalisierung der Ergebnisse: Durch den Prozess des Scannens der Autoradiografien entstand unweigerlich ein Informationsverlust.

Darüber hinaus waren in einigen Fällen die punktförmigen Hybridisierungsprodukte durch einen zu großen Abstand zwischen der in Plastikfolie eingepackten Nylonmembran und dem Film unscharf abgebildet oder der Film wies Artefakte auf, so dass diese Autoradiografien unbrauchbar waren.

5.1.3 Atlas Image 2.01 Software

Die Anwendung der „Atlas Image 2.01“ Software zeigte einige Nachteile auf. So mussten die punktförmigen Schwärzungen der Autoradiographien nach der Digitalisierung mit dem Koordinatensystem der Software in Übereinstimmung gebracht werden („Alignment“). Dabei mussten alle sich von dem Hintergrund abhebenden Punkte exakt zugeordnet werden, da eine Verschiebung um einen Pixel einen falschen Zahlenwert ergab. Bei der Menge der zuzuordnenden Hybridisierungsprodukte (200 hybridisierte Membranen mit maximal 1176 Genen) bedeutete das einen erheblichen Zeitaufwand und hohe Konzentration. Darüber hinaus musste der Hintergrund an vielen Stellen von Hand angeglichen werden, da große Hybridisierungsprodukte die Koordinaten anderer Gene überlagerten und damit diese Gene fälschlicherweise von der Software detektiert wurden. Zudem sind folgende Limitierungen zu nennen:

- Der maximale Summengrauwert eines Hybridisierungsproduktes betrug 60.000. Der Schwellenwert in der vorliegenden Arbeit wurde bei 10.000 festgelegt, um eine befriedigende Reproduzierbarkeitsrate von 95 % zu erhalten (Kap. 4.2.1). Damit ergab sich ein enger lineardynamischer Bereich von 6, innerhalb dessen die Genexpressionsunterschiede dargestellt werden konnten. Diese Limitierung war der Grund dafür, dass nur solche Membranen miteinander verglichen wurden, deren Normalisierungsfaktor möglichst nahe bei 1 und maximal bei 2 lag.
- Die Ausdehnung der punktförmigen Hybridisierungsprodukte der Autoradiografien blieb dann unberücksichtigt, wenn die Hybridisierungsprodukte auch außerhalb des Messfeldes lagen. Dadurch fielen diese Gene aus der Beurteilung.
- Die Software ermittelte häufig undefinierte Quotienten, die sie von weiteren Berechnungen ausschloss.
- Zu große punktförmige Hybridisierungsprodukte, die benachbarte Koordinaten überlagerten, verhinderten eine Auswertung der benachbarten Gene. Es ist möglich, dass dadurch wichtige differentiell exprimierte Gene unberücksichtigt blieben.
- Eine Auswertung der Daten wie z.B. die Ermittlung der differentiellen Genexpression zweier Autoradiografien war mit dieser Software nicht möglich.

Die weitere Auswertung der Daten, die Normalisierung und die Berechnung der differentiellen Genexpression erfolgten daher mithilfe eines selbst programmierten Excel-Makros. Damit konnten die Limitierungen der Software zumindest teilweise umgangen werden.

5.1.4 Einstellung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode

Nach Bestimmung des Summengrauwertes eines exprimierten Gens wurde durch die Atlas Image-Software der Grauwert des Hintergrundes ermittelt und von dem Summengrauwert des Gens subtrahiert. Lag der Grauwert des Hintergrundes über dem Summengrauwert des Gens, nahm die Expression dieses Gens den Wert Null an. Wurde die Genexpression zweier Proben über Quotientenbildung miteinander verglichen, bildete die Software aufgrund des „Problems der Null“ häufig „undefinierte Quotienten“, die nicht in die weiteren Berechnungen eingehen konnten. Die Auswertung gerade solcher Gene erschien jedoch interessant, da es sich in der Regel um Gene mit deutlichen Genexpressionsunterschieden handelte. Um dennoch Berechnungen mit diesen Genen durchführen zu können wurde ein Schwellenwert von 10.000

festgelegt: Gene, deren Summengrauwert < 10.000 lag wurden auf 10.000 gesetzt. Dieser Schwellenwert wurde unter dem Aspekt der Erzielung einer zufriedenstellenden Reproduzierbarkeit von $95,5\%$ zweier unabhängiger Versuche ermittelt (Kap. 4.2.1). Durch die Einführung dieses Schwellenwertes konnte die Reproduzierbarkeit individuell eingestellt und damit eine Unterscheidung hoch- und herunterregulierter Gene vom Hintergrundrauschen ermöglicht werden. Jedoch haben die Maßnahmen zur Gewährleistung einer hohen Reproduzierbarkeit eine Reduktion der Sensitivität zur Folge. Wie bereits erwähnt, können die Summengrauwerte den maximalen Wert von 60.000 annehmen. Der für die Auswertung gesetzte Schwellenwert lag bei einem Summengrauwert von 10.000 . Aus diesen Gründen wurden höchstens 6-fache Unterschiede in der Genexpression erkannt. Unter Einbeziehung eines maximalen Normalisierungsfaktors von 2 ließ die Methode demnach höchstens die Erkennung eines Genexpressionsunterschiedes um den Faktor 12 zu. Bei der Literaturrecherche zeigte sich, dass bei etwa 80% der Veröffentlichungen die differentielle Genexpression maximal den Faktor 10 erreicht.

Mithilfe der Festlegung eines unteren Schwellenwertes von 10.000 und der Höhe der messbaren Genexpressionsunterschiede zweier Proben von $> 2,5$ bzw. $< 0,4$ konnte eine Reproduzierbarkeit der Versuche, je nach Art des durchgeführten Vergleiches, im günstigsten Fall von $95,5\%$ bis $99,6\%$ erreicht werden (Tab. 4.1, Kap. 4.2.1). Eine Arbeit von Port et al. 2005 (S.59) beschreibt eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Anwendung des selben Genexpressionsarrays von $\geq 90\%$ im Vergleich mit der RTQ-PCR.

5.1.5 Normalisierung

Für die Normalisierung standen zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung. Zum einen konnten die Autoradiografien gegen die ermittelte Gesamtgenexpression zum anderen gegen die Genexpression eines oder mehrerer „Haushaltsgene“ (z.B. Ubiquitin) normalisiert werden. In anderen, vergleichbaren Arbeiten (Staßen et al. 2003, S.322) zeigte sich, dass in der Regel bezüglich der erzielten Reproduzierbarkeit, im Vergleich die Normalisierung gegen Ubiquitin häufiger Abweichungen zeigte. Unter Umständen war die unterschiedliche Genexpression des Ubiquitins artefaktbedingt. Die Ursachen für diese Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Die Normalisierung gegen die Gesamtgenexpression zeigte dagegen geringere Abweichungen zwischen den Versuchen. Insgesamt hatte die Art der Normalisierung bei Staßen et al. keinen Einfluss auf die Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde die Normalisierung mittels der Gesamtgenexpression durchgeführt, um mögliche

Fehlhybridisierungen, unvollständige Hybridisierungen der Proben cDNA an den komplementären Bindungspartnern des Arrays auszuschalten und die Abweichungen so gering wie möglich zu halten. Unterschiede in der Gesamtgenexpression konnten auf unterschiedlich lange Expositionszeiten der Autoradiografien gegenüber den Hybridisierungsproben oder intraindividuellen Schwankungen bei der Durchführung der Versuche zurückgeführt werden. Unsere Erfahrungen zeigten, dass zur Erzielung einer hohen Reproduzierbarkeit der Normalisierungsfaktor kleiner als 2 bzw. größer als 0,5 sein sollte. In der Literatur fanden sich keine Arbeiten, die sich mit der Höhe des Normalisierungsfaktors beschäftigten.

5.1.6 Reproduzierbarkeit der durchgeführten Experimente

Der Vergleich der Proben beider Versuche, die bezüglich der Bestrahlungsdosis und des Untersuchungszeitpunktes nach Strahlenexposition unter gleichen Bedingungen gewonnen wurden, ergab eine hohe Reproduzierbarkeit von durchschnittlich 95,5 %. Die Versuche zeigten zum Teil deutliche Abweichung um bis zu 16 Prozentpunkte der Reproduzierbarkeiten bei Werten zwischen 84 % und 100 %. Es gilt zu bedenken, dass trotz dieses guten Durchschnittswertes davon abweichende Proben eine nur unzureichende Reproduzierbarkeit aufwiesen. Aus diesem Grund müssten bei dem 2 Gy-Versuch 2 von 12 Autoradiografien (17 %) und bei dem 6 Gy-Versuch 3 von 12 Autoradiografien (25 %), die eine Reproduzierbarkeit kleiner 95 % erreichten, erneut aufgearbeitet werden.

Eine Erklärung für die beschriebenen Abweichungen liegt sicherlich in dem kritischen Schritt der Umschreibung der mRNA in cDNA und der Limitierung autoradiographischer Auswertung durch den geringen lineardynamischen Bereich.

Trotz der aufgezeigten Limitierungen und Probleme bei der Handhabung eignete sich der Atlas Array als Screeningverfahren, um aus einer Vielzahl von Genen eine überschaubare Menge an differentiell exprimierten Genen herauszufiltern. So konnten aus 1176 Genen sieben Gene definiert werden, die im Anschluss mittels RTQ-PCR (Taqman) noch überprüft werden müssen. Auf diese Weise wird dem Umstand Rechnung getragen, dass bei Benutzung des komplexen Primercocktails mit mehreren hunderten Primern trotz stringenter Hybridisierungsbedingungen Fehlhybridisierungen aufgetreten sein könnten. Erst mit Hilfe der RTQ-PCR ist eine valide Quantifizierung möglich. Diese Vorgehensweise findet sich häufig in der Literatur. Die Detektion geeigneter Gene mittels Array und Bestätigung der Ergebnisse mittels Q-PCR beschreiben Li et al. 2004, (S.8442), Kim et al. 2005 (S.1759) und

Goff et al. 2004 (S.76) um beispielhaft drei aktuelle Veröffentlichungen zu nennen. Die Veröffentlichung von Liss 2002 (S.89) beschreibt die Vorteile der RTQ-PCR und ihre Entwicklung zu einem Routineverfahren zur quantitativen Bestimmung der Genexpression.

5.2 Genexpression - Differenziell exprimierte Gene nach Bestrahlung

Die Gene, die als biologische Parameter zur Frühdiagnostik der Strahlendosis in Frage kommen, sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Abhängigkeit der differentiellen Genexpression von der Dosis / Klonogenität
- Konstante differentielle Genexpression über einen längeren Zeitraum
- Bestätigung der gefundenen Ergebnisse im zweiten Versuch

Unter den sieben definierten Genen zeigten sich drei Gene zu zwei Zeitpunkten p.r. als differentiell exprimiert. Vier Gene waren nur zu einem Zeitpunkt p.r. differentiell exprimiert. In der Tabelle 4.2 sind die Gene sortiert nach Zeitpunkt p.r. und Art der differentiellen Genexpression aufgeführt. Das Gen **Myc** ist 12 h und 48 h p.r. mit 6 Gy um den Faktor 2,8 bzw. 2,5 herunterreguliert. Es handelt sich dabei um das „**c-myc proto-onkogen**“. Für das Gen sind in der Literatur mehrere Funktionen beschrieben. Es beeinflusst die Zellzyklusregulation, die Transkription und das Zellwachstum. Eine Überexpression des Gens wird mit der Entstehung diverser Tumoren in Verbindung gebracht (Trumpp et al. 2001, S.768). Es ist beispielsweise für die Neovaskularisierung in Tumoren essentiell (Baudino et al. 2002, S.2530) und beeinflusst die Latenzzeit bei Brustkrebs (Cozma et al. 2002, S.969). Eine Arbeit fand eine Herunterregulation des c-myc Gens als wichtigen Bestandteil der strahleninduzierten Apoptose (Enomoto et al. 2003, S.589). Bei dem Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten fiel ebenfalls eine Repression dieses Genes bei der ML-1 Zellreihe um den Faktor 8 (Amundson et al. 1999, S.3666), bei der humanen lymphoblastoiden Zelllinie GM14660 (Tusher et al. 2001, S.5116) und bei HL-60 Zellen um den Faktor 5 (Balcer-Kubiczek et al. 1998, S.663) auf. Die einzige Arbeit, in der eine strahleninduzierte differentielle Genexpression des Myc Genes beschrieben wird, ist von Staßen et al. (2003, S.323). In dieser Arbeit mit MCF-7-Zellen fand sich das Gen nach Strahlenexposition ohne deutliche Dosisabhängigkeit bis Faktor 3,1 konstant hochreguliert .

Eine dosisabhängige Hoch- und Herunterregulation zeigte sich bei den Genen **Ryk** und **Col6a1**. Beide Gene zeigten 36 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy eine Herunterregulation um den Faktor 3,1 bzw. 3,7. Das Gen Ryk war 72 h nach Strahlenexposition mit 6 Gy um den Faktor 2,5 und das Gen Col6a1 12 h nach Bestrahlung mit 6 Gy um den Faktor 3,3 hochreguliert.

Bei dem Gen Ryk handelt es sich um eine „**receptor-like tyrosin kinase**“, die auf die Aktivität verschiedener Proteinkinasen, des Rezeptors, der ATP Bindung und der Transferase Einfluss nimmt. Sie kontrolliert die kraniofaziale Entwicklung und die Entstehung neurologischer Bahnen (Halford et al. 2001, S.34). Ebenfalls wurde von Halford die Bedeutung des RYK-Gens für den Aufbau und die Verteilung von EPH-Rezeptoren beschrieben. EPH Rezeptoren und Epiphryn (Ligand des EPH Rezeptors) Überexpression kann zur Tumorgenese durch Beeinflussung des Tumorwachstums und des Überlebens (Surawska et al. 2004, S.419) beitragen.

Das Protein des Col6a1 Gens stellt die „**collagen 6 alpha 1 Untereinheit**“ dar. Es beeinflusst den Aufbau und die Struktur des Kollagens und damit der extrazellulären Matrix. Eine Funktionsstörung des Gens wird für die Entstehung verschiedener Myopathien (z.B. Bethlem Myopathie) verantwortlich gemacht (Vanegas et al. 2002, S.513). Für beide Gene fand sich keine Literatur, die eine strahleninduzierte Veränderung dieser Gene beschreibt.

12 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich das Gen RAB-2 um den Faktor 3,2 erhöht. Das Gen „**RAB-2**“ aus der Familie der RAS-Onkogene ist an der Rezeptorvermittelten Signaltransduktion beteiligt. In der Literatur wird der Einfluss des Gens auf die ATP, und GTP Bindungsaktivität, außerdem auf die Aktivität der GTPase und die Protein-Transport Aktivität beschrieben. Nach Lee et al. (2003, S.559) handelt es sich um ein anti-apoptotisches Gen. Eine weitere wichtige Funktion des Gens liegt in der Einflussnahme auf die Endo- und Exozytose und intrazelluläre, vesikuläre Transportmechanismen. Eine Überexpression dieses Gens wurde im peripheren Blut von Patienten gefunden, die am Sezary-Syndrom oder anderen myeloischen oder lymphatischen malignen Erkrankungen leiden (Culine et al. 1993, S.41). In zwei Arbeiten zeigten sich folgende Ergebnisse nach Strahlenexposition: Bei MCF-7-Zellen zeigte sich eine erhöhte Genexpression nach einer Dosis von 2 Gy mit Quotienten bis 2,6 (Staßen et al. 2003, S.323) und Amundson et al. (1999, S.3666) beschrieb für ML-1-Zellen eine Induktion eines RAB-Gens (nicht näher definiert) 4 h nach einer Dosis von 20 Gy um den Faktor 6,4.

24 h p.r. mit 6 Gy fanden sich zwei Gene hochreguliert. Das Gen **ATF4**, „**activating transkription faktor 4**“ war nach Bestrahlung mit 6 Gy um den Faktor 3,3 stärker

exprimiert. Der Transkriptionsfaktor gehört zu einem Komplex aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren und nimmt Einfluss auf die Aktivität der Translationsregulatoren, der DNA-Bindung und der Proteinbindung. ATF4 ist als wichtiger Teil einer Signaltransduktionskette als zelluläre Antwort auf Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums aufgefallen (Ma et al. 2003, S.34864). Eine andere Arbeit zeigte, dass ATF4 Überexpression die Proliferation und Differenzierung von Brustdrüsenepithel inhibiert und damit eine einseitige Laktation und frühzeitige Involution fördert (Bagheri-Yarmand et al. 2003, S.17421).

Das andere Gen, **FGFR1**, war um den Faktor 3,9 hochreguliert. Bei diesem Gen handelt es sich um den „**fibroblast growth factor receptor 1**“. Seine Aktivierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivität verschiedener Kinasen, der Gehirnentwicklung, der Innenohr-Morphologie, der Signaltransduktion, der Aktivität von Transferasen und hat Einfluss auf die Zellzyklusregulation (Zhan et al. 2004, S. 55348). Der FGFR1 ist für viele zelluläre Prozesse wichtig. Dazu gehören beispielsweise die Proliferation, die Migration und Differenzierungen für z.B. die Angiogenese, Osteogenese und die Chondrogenese (Kovalenko et al. 2003, S.14087). In der Literatur fanden sich für keines der beiden Gene Untersuchungen auf strahleninduzierte differentielle Genexpression.

Ein weiteres Gen, das sich nur zu einem Zeitpunkt nach Strahlenexposition, nämlich 48 h p.r. mit 6 Gy um den Faktor 2,6 hochreguliert zeigte, war das „**Bcl2-associated X protein (BAX)**“. Das Protein findet sich auf endoplasmatischen, nukleären und mitochondrialen Membranen. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind zwei in der Literatur beschriebene Eigenschaften des BAX. Zum einen kann es Apoptose induzieren, zum anderen ist das Gen in der Literatur als gut auf ionisierende Strahlung reagierend beschrieben. Amundsen et al. bestätigten 1999 (S.3666) mit Hilfe eines Mikroarrays die strahlenabhängige Veränderung der Genexpression des BAX Gens. Seine Fähigkeit die Apoptose oder Mikrokernbildung einzuleiten scheint eng mit der Strahlendosis zusammenzuhängen. Ahmed beschrieb 2004 (S.43), dass u. a. BAX ein Effektor der Apoptose nach ionisierender Strahlung ist. Eine Arbeit von Bishay et al. (2000, S.916) fand, dass nach Bestrahlung die Mikrokernbildung zunahm und sich eine deutliche positive Korrelation zwischen der Hochregulation u. a. des BAX Gens und der Zunahme der Mikrokernbildung zeigte. Cui et al. beschrieben 2004 (S.39), dass die Expression des Apoptose induzierenden BAX mit einem Anstieg der Strahlendosis verbunden ist. Guo et al. veröffentlichten 2004 (S.535) eine Arbeit in der sie nach Exposition von MCF-7 Zellen mit ionisierender Strahlung keine BAX Hochregulation fanden, obwohl BAX auf ionisierende Strahlung reagiert.

Bei dem Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Gene mit strahleninduzierter differentieller Genexpression gegenüber der Kontrolle mit den bereits publizierten Genen fällt die weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen unterschiedlicher Modelle auf. Dies unterstreicht die Einsatzfähigkeit des Genexpressionsarrays als Screeningverfahren zur Identifizierung strahleninduzierter Gene.

Zusätzlich zu bereits von weiteren Arbeitsgruppen in anderen Modellen beschriebenen differentiell exprimierten Genen konnten vier bislang unbekannte strahleninduzierte Gene ermittelt werden:

Atf4 - activating transcription factor 4

Fgfr1 - fibroblast growth factor receptor 1

Ryk - receptor-like tyrosin kinase und

Col6a1 - collagen 6 alpha 1 Untereinheit

Die bekannten biologischen Funktionen der Gene können mit den gefundenen differentiellen Genexpressionen und der Induktion des Zelltodes nach ionisierender Strahlung meistens vereinbart werden.

So ist eine Herunterregulation des Zellwachstums und der Transkription, die über das c-myc Gen gesteuert wird, bei strahleninduzierter Apoptose zu erwarten gewesen. Ebenso ist die Abnahme von Zellfunktionen wie: ATP Bildung und Steuerung verschiedener Rezeptoren mit Hilfe des Ryk Gens und Abnahme des Kollagenaufbau mit Hilfe des COL6a-1 Gens nach ionisierender Bestrahlung der Zellen nachvollziehbar.

Die Hochregulation des ATF4 als Teil eines Komplexes verschiedener Transkriptionsfaktoren wirkt zunächst verwunderlich, wenn man eine Zunahme der Transkription bei Hochregulation des Gens erwartet. In der Literatur wird die Hochregulation des ATF4 aber mit einer Abnahme der Proliferation und Differenzierung der Zellen in Zusammenhang gebracht. Das lässt sich auch mit der Induktion des Zelltodes vereinbaren.

Die Hochregulation des Gens RAB-2, das an der rezeptorvermittelten Signaltransduktion im Rahmen der Apoptose beteiligt ist und des proapoptischen BAX Gens, ist nach ionisierender Strahlung verständlich. In der Literatur wird der Zelltod oder ein Stopp des Zellwachstums mit einer Herunterregulation des FGFR1 Gens, dass beispielsweise auf die Proliferation, die Migration und die Differenzierung verschiedener Gewebe Einfluss nimmt, in Zusammenhang gebracht.

In der Tabelle 4.3 sind die sieben differentiell exprimierten Markergene sortiert nach den sechs Zeitpunkten nach Strahlenexposition und Hoch- und Herunterregulation dargestellt.

Diese Tabelle kann, im Sinne einer biologischen Dosimetrie, ein wichtiges Instrument zur Detektion stattgefundenener Strahlenexposition sein. Markergene können ausgewählt werden und bei dem Nachweis einer differentiellen Expression dieser Gene können durch einen Vergleich mit den Ergebnissen der Tabelle Rückschlüsse auf die Strahlendosis und den Zeitpunkt der Strahlenexposition gezogen werden. Umgekehrt können auch bei bekannter Zeit nach fraglicher Strahlenexposition Gene aus der Tabelle ausgewählt werden, deren differentielle Genexpression ein Hinweis auf eine stattgefundenene Strahlenexposition und die Dosis derselben gibt. Insgesamt konnte kein Gen gefunden werden, dass dosisabhängig kontinuierlich gegen die Zeit eine differentielle Genexpression zeigte. Ein Gen reicht zur Beurteilung nicht aus, deshalb sollten möglichst alle sieben Markergene in einem Versuch berücksichtigt werden. Erst dann kann eine Aussage über die Höhe der Strahlenexposition getroffen werden.

Nachfolgende Untersuchungen werden weiterhin herausstellen, wie sich die ermittelten strahleninduzierten differentiellen Genexpressionen auf translationaler und posttranslationaler Ebene auswirken. Davon ausgehend wird sich die klinische Bedeutung der gefundenen differentiell exprimierten Gene zur Frühdiagnostik von Strahlenschäden in der Medizin zeigen.

5.2.1 Strahleninduzierte differentielle Genexpression bei unterschiedlichen Zellreihen

Die Mikrokernbildung wurde bei unterschiedlichen Lebewesen und Zellreihen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden Mäusefibroblasten der Zellreihe L929 untersucht und die MN-Bildung nachgewiesen. Die Zelllinie MCF-7, humane Adenokarzinomzellen der Brustdrüse sind ebenfalls zur MN-Bildung fähig. Eine Arbeit von Staßen et al. (2003) über die MCF-7 Zellreihe wurde herangezogen, um einen Vergleich der differentiell exprimierten Gene unterschiedlicher Zelltypen zu erhalten, die für die Mikrokernbildung verantwortlich sein könnten. In der Arbeit mit der MCF-7 Zelllinie wurde der „BD Atlas **Human** 1.2 Array“ (Clontech) mit ebenfalls 1176 Genen verwendet. 219 von jeweils 1176 Genen (18,6 %) wurden sowohl auf dem „BD Atlas **Human** 1.2“ Array als auch auf dem in dieser Arbeit verwendeten „BD Atlas **Mouse** 1.2 Array“ abgebildet.

In beiden Arbeiten zeigten sich 72 der 1176 Gene als differentiell exprimiert (6,1 %). Bei dem Vergleich der Ergebnisse fiel auf, dass drei Gene, nämlich: BNIPL, RAB2 und APP unter den 72 differentiell exprimierten Genen in beiden Arbeiten gefunden wurden (6 %). Die

differentielle Genexpression verhielt sich bei den drei Genen in beiden Arbeiten bezüglich der Dosisabhängigkeit, dem Zeitpunkt nach Bestrahlung und der Richtung der differentiellen Genexpression nahezu gleich. Für alle drei Gene findet sich in der Literatur kein Hinweis auf eine differentielle Genexpression nach ionisierender Strahlung.

Beide Arrays enthielten die Gene sortiert nach 6 Hauptgruppen, in denen je 196 Gene mit ähnlicher Hauptfunktion zusammengefasst waren. Die Hauptfunktionen sind bei beiden Arrays identisch und in Tabelle 5.1 angegeben.

Gruppe	Hauptfunktion
A	Onkogene, Tumor Supressorgene und Zellzyklus-Regulatoren
B	Gene für die Widerstandsfähigkeit der Zelle, Ionenkanäle und Ionentransport, Intrazelluläre Signaltransduktions-Molekül- Modulatoren und Effektoren
C	Apoptose, DNA Synthese, Reparatur und Rekombination
D	Transkriptionsfaktoren und DNA Bindungsproteine
E	Rezeptoren, Zellhüllen Antigene und Zelladhäsionsverhalten
F	Zell-Zell Kommunikation, Zytoskelett, die Zellbeweglichkeit und Proteinauf- und -abbau

Tab. 5.1 Die Tabelle zeigt die sechs Gruppen A-F und die Hauptfunktionen der Gene innerhalb der Gruppen.

Die Zuordnung der Hauptfunktionen zu den einzelnen Hauptgruppen ist bei beiden Arrays gleich. Aufgrund der geringen Übereinstimmung in der Untersuchung einzelner Gene wurde der Vergleich der differentiellen Expression von Gengruppen, die gemäß ihrer Hauptfunktion eingeordnet wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse der Zellreihe L929 sind in Kapitel 4.2.2 in Tabelle 4.5 zu sehen. Die Tabelle 5.2 zeigt die Ergebnisse der Zellreihen L929 und MCF-7 im Vergleich.

Gruppe	MCF 7			Gruppe	L929		
A		2 Gy	6 Gy	A		2 Gy	6 Gy
	0,3 h	↓ N (1/2)	↑ (3/3)		0,3 h		
	12 h	↑ (1/1)	N (3/4)		12 h	↓ (1/1)	↑ (1/1)
	24 h	↑ (5/5)	↓ (2/3)		24 h		
	36 h				36 h	↓ (1/1)	↓ (1/1)
	48 h	↓ (2/2)	↑ (4/7)		48 h		
	72 h	↑ N (1/2)	↑ (5/7)		72 h		
B		2 Gy	6 Gy	B		2 Gy	6 Gy
	0,3 h	↑ (3/3)			0,3 h	↓ (1/1)	
	12 h		↑ ↓ (1/2)		12 h	↓ (1/2) N (1/2)	↑ (1/1)
	24 h		↓ (1/1)		24 h		↓ (5/9)
	36 h				36 h		
	48 h	↑ (1/1)			48 h	↑ (1/1)	
	72 h		↓ (2/2)		72 h		↑ (1/1)
C		2 Gy	6 Gy	C		2 Gy	6 Gy
	0,3 h	↑ N (1/2)			0,3 h		
	12 h	↓ (2/2)	↓ (6/7)		12 h	↓ (3/4)	↓ (4/4)
	24 h	↓ (2/4)	↑ (2/3)		24 h		↓ (1/1)
	36 h				36 h	N (2/3)	N (2/2)
	48 h	↓ (1/1)	↓ (2/4)		48 h	↓ (1/1)	N (2/2)
	72 h	↓ (3/3)	↓ (3/5)		72 h	↓ (4/5)	↓ (9/10)
D		2 Gy	6 Gy	D		2 Gy	6 Gy
	0,3 h	↓ N (1/2)	↑ (1/1)		0,3 h		
	12 h				12 h	↓ (2/2)	
	24 h	↑ (3/3)	↑ (2/3)		24 h		↑ (2/4)
	36 h				36 h	↓ (5/5)	
	48 h		↑ N (2/4)		48 h		↑ (3/4)
	72 h	↑ N (1/2)	↑ (3/4)		72 h	N (1/1)	↑ (2/2)
E		2 Gy	6 Gy	E		2 Gy	6 Gy
	0,3 h		↑ (1/1)		0,3 h		
	12 h	N (2/2)	↑ (1/1)		12 h	↑ (1/1)	↑ (1/1)
	24 h	↑ (3/5)	↑ (1/1)		24 h		↓ (5/6)
	36 h				36 h	↓ (1/1)	
	48 h	↓ (4/5)	↑ (4/5)		48 h		
	72 h	↓ (2/3)	↑ (3/4)		72 h		↓ (1/1)
F		2 Gy	6 Gy	F		2 Gy	6 Gy
	0,3 h	N (1/1)	↑ (3/5)		0,3 h	N (1/1)	
	12 h		↑ (2/2)		12 h	↑ (1/1)	↓ (1/1)
	24 h	↑ (7/7)	↓ (2/3)		24 h		↑ (5/6)
	36 h				36 h	↓ (1/1)	N (1/1)
	48 h	↓ (3/3)	N (3/6)		48 h		↑ (1/2) N(1/2)
	72 h		↑ (12/13)		72 h	↑ ↓ (2/3)	↓ (5/7)

Tab. 5.2 Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Auswertung der Grafiken der Zelllinien MCF-7 und L929, sortiert nach Hauptfunktion der Gene in die Gruppen A-F gegen die Zeit und Dosis. Die verwendeten Zeichen sind in Kap. 4.2.2.2, Tab. 4.5 erklärt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der differentiell exprimierten Gene an. Die erste Zahl entspricht der Anzahl der, in Richtung des angegebenen Zeichens, exprimierten Gene. An zweiter Stelle ist die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben.

Bei dem Vergleich zwischen den beiden Zelllinien fällt auf, dass die 72 differentiell exprimierte Gene in beiden Versuchen sehr unterschiedlich auf die 6 Hauptgruppen verteilt sind. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.1 dargestellt.

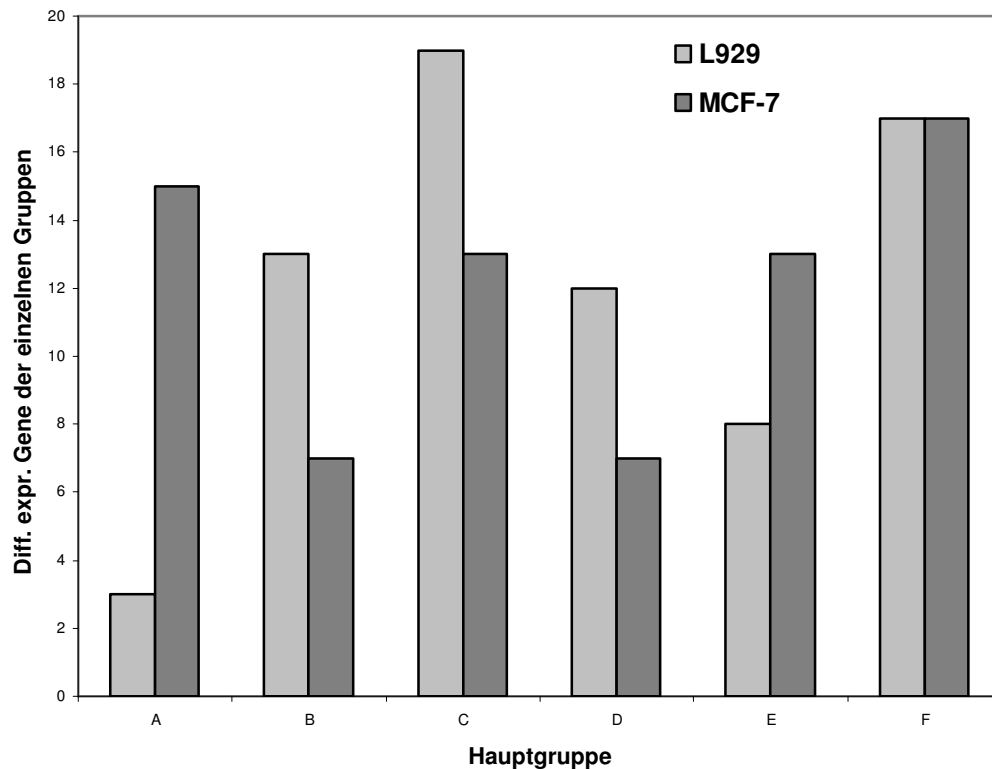


Abb. 5.1 Die Abbildung zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten Gene nach Bestrahlung der beiden Zellreihe (hellere Balken = L929 / dunklere Balken = MCF-7) sortiert nach den 6 Hauptgruppen A-F

Besonders deutliche Unterschiede zeigten sich in den Gruppen A und B. Der Gruppe A konnten nur 3 differentiell exprimierte Gene der Zellreihe L929, aber 15 Gene der Zellreihe MCF-7 zugeordnet werden. In der Gruppe B fanden sich mit 13 differentiell exprimierten Genen der Zellreihe L929 fast doppelt so viele wie in der Zellreihe MCF-7 mit 7 Genen.

Betrachtet man die Anzahl der hoch- und der herunterregulierten Gene innerhalb der Hauptgruppen, so fällt auf, dass bei der Zellreihe MCF-7 in den Gruppen A, D und F die meisten Gene hochreguliert waren. In diesen Gruppen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Strahlendosen 2 und 6 Gy. In der Gruppe E waren p.r. mit 2 Gy die meisten Gene herunterreguliert, p.r. mit 6 Gy hochreguliert. Da mehr Gene p.r. mit 6 Gy differentiell exprimiert waren, können die Gene der Gruppe E als zumeist hochreguliert bezeichnet werden. Die meisten Gene der Gruppe C zeigten sich unabhängig von der Strahlendosis herunterreguliert. Innerhalb der Gruppe B waren die meisten Gene p.r. mit 2 Gy

herunterreguliert und p.r. mit 6 Gy hochreguliert. Aufgrund der Tatsache, dass nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen die Anzahl der exprimierten Gene der Gruppe B fast gleich war, muss die Richtung der differentiellen Genexpression als uneinheitlich hoch- und herunterreguliert angegeben werden.

Bei der Zellreihe L929 waren die meisten Gene der Gruppe A im Gegensatz zu den Genen der MCF-7 Zellen herunterreguliert. Bei den Genen der Gruppe A handelt es sich um Onkogene, Tumor Supressorgene und Zellzyklus-Regulatoren. Es gilt zu berücksichtigen, dass nur drei Gene der Gruppe A bei der Zellreihe L929 differentiell exprimiert waren. Gleichsinnige Veränderungen der Genexpression zeigten sich bei den Genen der Gruppen C und D. Alle Gene der Gruppe D waren bei beiden Zelllinien nach Bestrahlung mit 6 Gy hochreguliert. Dabei handelt es sich um Gene, deren Hauptfunktion in der Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren und DNA Bindungsproteinen besteht.

Die meisten Gene der Gruppe C waren bei beiden Zellreihen herunterreguliert. Es handelt sich dabei um Gene, die Apoptose, DNA Synthese, Reparatur und Rekombination als Hauptfunktionen steuern. Eine Herunterregulation der Gene der Gruppe C kann, obwohl sie vermeintlich bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielen, durch zwei Dinge begründet werden. Zum einen ist keines der differentiell exprimierten Gene der Gruppe C nach der „functionell classification“ der Firma Clontech als direkt Apoptose assoziiert eingestuft. Die herunterregulierten Gene dienen beispielsweise der DNA Synthese, was eine Herunterregulation nach Bestrahlung erklärt. Zum zweiten konnte anhand des c-myc Protoonkogen, als Beispiel für ein Gen aus der Gruppe C, in einer anderen Arbeitsgruppe (Enomoto et al. 2003, S.589) ebenfalls eine Herunterregulation des Gens als wichtiger Bestandteil der strahleninduzierten Apoptose gezeigt werden.

Die Gene der Gruppe E zeigten sich p.r. mit 6 Gy bei der MCF-7 Zellreihe hochreguliert, bei den L929 Zellen dagegen herunterreguliert. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigten sie sich jeweils uneinheitlich. Die Hauptfunktionen dieser Gene bestehen in der Beeinflussung von Rezeptoren, Zellhüllen Antigene und des Zelladhäsionsverhaltens.

Die Gene der Gruppe B zeigten sich bei der Zellreihe L929, unabhängig von der Strahlendosis, herunterreguliert, bei den MCF-7 Zellen uneinheitlich. Die Hauptgruppe B enthält Gene für die Widerstandsfähigkeit der Zelle, Ionenkanäle und Ionentransport, Intrazelluläre Signaltransduktions-Molekül-Modulatoren und Effektoren.

Zusammenfassend zeigte sich bei 2 von 6 Hauptgruppen eine gleichsinnige differentielle Genexpression bei beiden Zellreihen. Bei den Genen einer Gruppe fanden sich gegensätzliche

Ergebnisse. Bei drei Gruppen war der Vergleich nur begrenzt möglich, da sich bei jeweils einer Zellreihe keine eindeutige Richtung der differentiellen Genexpression abbildete. Obwohl der Vergleich der beiden Zellreihen, wie oben beschrieben, auf einer sehr abstrakten Ebene stattfinden musste, zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei beiden Versuchen. Dass sich bei drei Hauptgruppen die Gene einer Zelllinie uneinheitlich hoch- bzw. herunterreguliert zeigen, liegt vermutlich darin begründet, dass Gene mit zum Teil gegensätzlicher Funktion nach Strahlenexposition zu einer Hauptgruppe zusammengefasst wurden.

5.2.2 Differentielle Genexpression bei unterschiedlichen Stressoren und Zelllinien

Eine Versuchsreihe mit bisher unveröffentlichten Daten aus dem Institut beschäftigte sich ebenfalls mit der Zellreihe L929. Untersucht wurde die differentielle Genexpression und die Zelltodesform der Zellreihe L929. Die Zellen wurden mit einem Topoisomerase II Inhibitor (VM-26) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und dabei festgestellt, dass die Zelltodesform Apoptose oder Mikrokernbildung abhängig von der Konzentration des VM-26 induziert werden konnte. Die differentielle Genexpression bei dieser Versuchsreihe wurde ebenfalls mit Hilfe des „Mouse 1.2 Array“ von Clontech bestimmt. Die Einstellung von Normalisierung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde analog zu den in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten bei der Apoptose induzierenden Dosis 70 Gene und bei der Mikrokernbildung induzierenden Dosis 61 Gene als differentiell exprimiert.

Im Folgenden werden die drei oben genannten Modelle (MCF-7 nach Bestrahlung / L929 nach Zusatz von VM26 und Mikrokernbildung / L929 nach Zusatz von VM26 und Apoptose) mit den Ergebnissen dieser Arbeit (L929 nach Bestrahlung) verglichen. Alle Versuchsreihen wurden an Zellen mit der Fähigkeit zur MN-Bildung durchgeführt. Bei allen Versuchsreihen wurde die differentielle Genexpression nach Exposition gegenüber dem zum Zelltode führenden Agens bestimmt. Bei allen vier Versuchsreihen wurden jeweils 1176 Gene mittels Genexpressionsarray untersucht. Dabei war in den vier Versuchsreihen eine vergleichbare Anzahl an Genen (zwischen 61 und 72 von jeweils 1176 untersuchten Genen) differentiell exprimiert. Die Anzahl war unabhängig vom Stressor, der Intensität des Stressors, der Zellreihe oder der Zelltodesform.

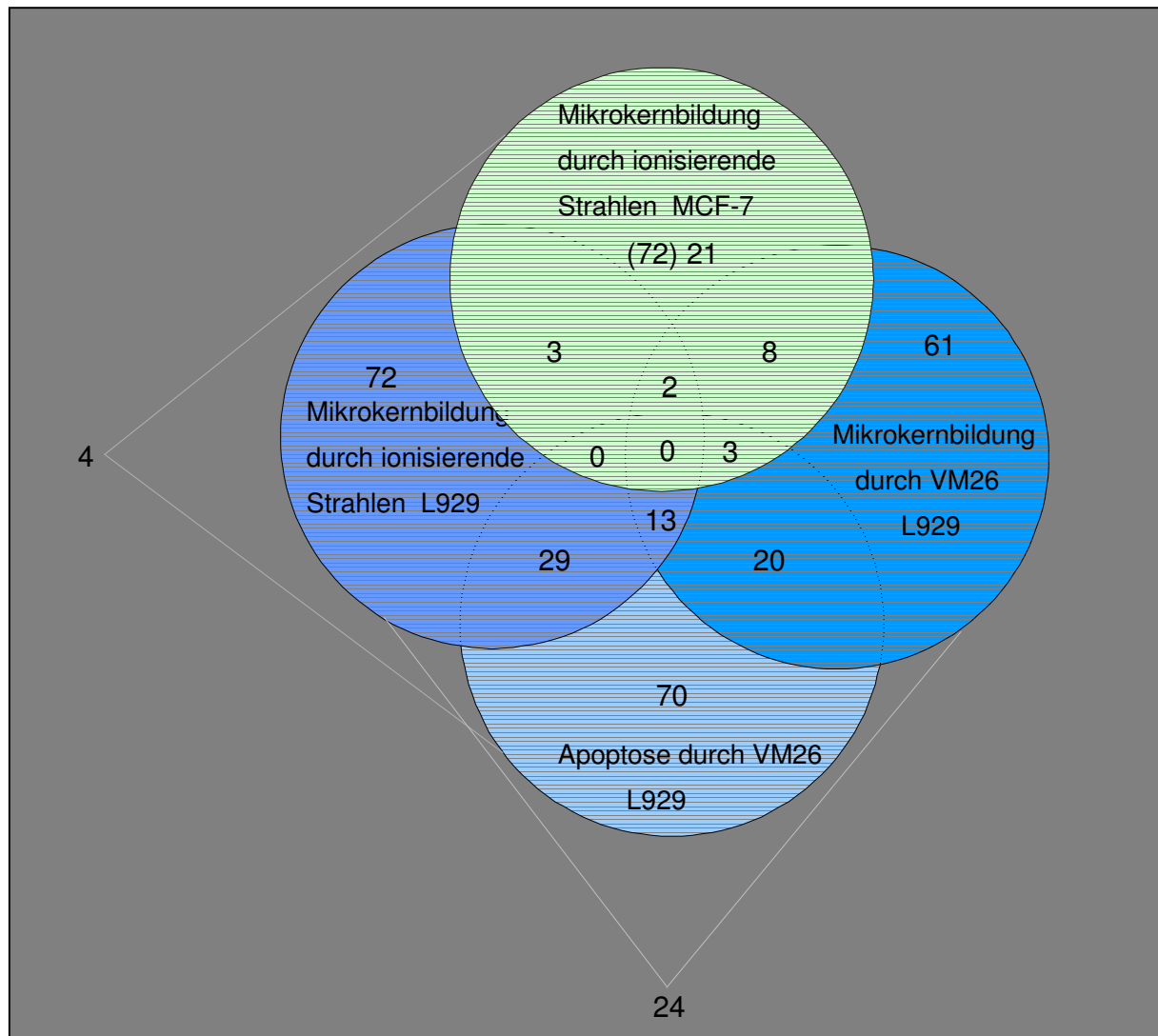


Abb. 5.2 Die Kreise der Abbildung geben die Ergebnisse der vier untersuchten Modelle mit der Anzahl an differenziell exprimierten Genen an. In den Schnittmengen steht die Anzahl an Genen, die in den jeweiligen Modellen gemeinsam differenziell exprimiert waren. Für Kreise, bei denen aufgrund des Modells eine Schnittmengendarstellung nicht möglich ist, wurde die Anzahl gemeinsam differenziell exprimierter Gene am Ende der verbindenden Linien dargestellt.

Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in der Abbildung 5.2 dargestellt. Beim Vergleich der verschiedenen Modelle zeigte sich eine Übereinstimmung der differenziell exprimierten Gene in 20-40%. Es findet sich keines der Gene in allen vier Modellen differenziell exprimiert. Die gefundenen Ergebnisse verdeutlichen, dass nicht ein einzelnes Gen, sondern immer eine Gruppe an Genen zur biologischen Dosimetrie verwendet werden muss. Insgesamt fanden sich 52 Gene die in mindestens zwei der oben genannten Modelle differenziell exprimiert waren. Die Gene sind in Tabelle 5.3 ihrer Funktion nach geordnet aufgeführt. Bei mehreren bekannten Funktionen sind die Gene auch in mehreren Kategorien aufgeführt.

Die meisten differenziell exprimierten Gene stehen in Verbindung mit der Apoptose. In dieser Gruppe finden sich 21 der 52 Gene (40 %) und das, obwohl drei der vier Zellreihen durch

MN-Bildung gekennzeichnet sind. Dieses Ergebnis kann als Hinweis auf Gemeinsamkeiten der Zelltodesformen Apoptose und MN-Bildung verstanden werden. Die zweitgrößte Gruppe enthielt Gene, deren Funktion in der Regulation der Zellzykluskontrolle bzw. der Zellreplikation und in der Regulation von Wachstumsfaktoren bestand. Hier finden sich 19 bzw. 16 von 52 Genen, wobei mehrere Gene in zwei oder allen drei Gruppen aufgeführt sind. In der Gruppe mit Genen, deren Funktion in der DNA-Reparatur besteht, finden sich lediglich vier Gene in mindestens zwei Modellen differentiell exprimiert. Das zeigt, dass die DNA-Reparatur nach Strahlenexposition bzw. Chemotherapie mit VM26, gerade im Vergleich zur Apoptose, eine untergeordnete Rolle spielt. Das bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, denn die meisten differentiell exprimierten Gene gehörten, wie in Abbildung 5.1 dargestellt, der Gruppe C (Apoptose) an.

DNA Reparatur	Chromosomentrennung, Zytokinese	Zellmigration, Zelladheseion, Zytoskeleton	Zellzykluskontrolle, Replikation	Zelltod, Apoptose	Signaltransduktion, Wachstumsfaktoren	Gene	Andere Funktionen
Rad 21	Rad 21	MYL6 (myosin 6)	MCM5 (min chromosome maintenance deficient 5)	Rad 21	RAB2	RFNG (radical fringe homolog)	Glykosyltransferase, Zelldifferenzierung
PCNA	PTMA (prothymosin alpha)	FN1 (fibronectin)	PCNA	APP (amyloid beta [A4] precursor protein)	SSRP1 (structur specific recognition protein 1)	GPI (glucose phosphate isomerase)	Glykolyse (intracell.) und neurotrophischer Faktor (extracell.)
DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3, GADD153)		COL6A1 (collagen VI)	CALM1 (calmodulin 1; phosphorylase kinase delta)	CALM1 (calmodulin 1; phosphorylase kinase delta)	MAP3K3	DNCL1 (dynein)	nNOS Inhibitor
NSEP1 (nuclease sensitive element binding protein)		SDC3 (syndecan)	MAPK14 (SAPK2A)	MAP3K3	MAP2K4 (JNK3)	PRNP (prion protein [p27-30])	Membran Glykoprotein
		CFL1 (cofilin1)	RXRA (retinoid X receptor, alpha; transcription factor)	MAP2K4 (JNK3)	MAPK14 (SAPK2A)	GSTP1 (glutathione S-transferase pi)	Entgiftung
		APP (amyloid beta [A4] precursor protein)	VEGF (vascular endothelial growth factor)	MAPK14 (SAPK2A)	RXRA (retinoid X receptor, alpha; transcription factor)	HSPA5 (heat shock 70 kDa protein 5)	Faltet und baut Proteine am ER auf und Schlüsselrolle bei der Steuerung von Proteintransport durch die Zelle
		CALM1 (calmodulin 1; phosphorylase kinase delta)	DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3, GADD153)	RXRA (retinoid X receptor, alpha; transcription factor)	VEGF (vascular endothelial growth factor)	HSPH1 (heat shock 105/110 kDa protein 1)	Faltet und baut Proteine am ER auf und Schlüsselrolle bei der Steuerung von Proteintransport durch die Zelle
		VEGF (vascular endothelial growth factor)	AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)	VEGF (vascular endothelial growth factor)	CCL7 (chemokine[C-C motif] ligand 7)	HSPCB (heat shock 90 kDa protein 1)	Faltet und baut Proteine am ER auf und Schlüsselrolle bei der Steuerung von Proteintransport durch die Zelle
		CCL7 (chemokine[C-C motif] ligand 7)	BNIPL (BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like)	DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3, GADD153)	CSF2RA (colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity [granulocyte-macrophage])	SEMA5B (semaphorin 5B)	Zelldifferenzierung, -entwicklung
		VIL2 (villin 2)	MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)	CLU (clusterin)	AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)	SEMA5A (semaphorin 5A)	Zelldifferenzierung, -entwicklung
		CDH1 (cadherin 1, epithelial)	JUN (v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog)	DAD1 (defender against cell death 1)	MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)	HMGN1 (high-mobility group nucleosome binding domain)	DNA-Verpackung
		CTNND2 (catenin[cadherin-associated protein])	CDH1 (cadherin 1, epithelial)	PHLDA1 (plekstrin homology-like domain, family A, member 1)	JUN (v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog)	THOC4 (THO complex 4)	Molekularer Begleiter, DNA-Bindung
		SPP1 (secreted phosphoprotein 1, osteopontin)	SPP1 (secreted phosphoprotein 1, osteopontin)	AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)	TTF1 (transcription termination factor, RNA polymerase)		
			PTMA (prothymosin alpha)	BNIPL (BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like)	SPP1 (secreted phosphoprotein 1, osteopontin)		
			CCND1 (cyclin D1)	MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)	ATF4 (activating transcription factor 4, transcription factor)		
			CCNG1 (cyclin G1)	JUN (v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog)	GNAS (GNAS complex locus, GTPase activity, GTP-binding)		
			NSEP1 (nuclease sensitive element binding protein)	CDH1 (cadherin 1, epithelial)			
			PTMA (prothymosin alpha)	SPP1 (secreted phosphoprotein 1, osteopontin)			
			SQSTM1 (sequestosom1)	PTMA (prothymosin alpha)			
				CST3 (cystatin C)			
				SQSTM1 (sequestosom1)			

Tab. 5.3 Die Tabelle zeigt die 52 Gene, welche in mindestens zwei der vier verglichenen Modelle differentiell exprimiert waren. Die Gene sind nach ihrer Funktion in 7 Gruppen sortiert. Gene mit mehreren bekannten Funktionen sind mehrfach aufgeführt.

5.2.2.1 Differentielle Genexpression bei der Zelllinie L929 und unterschiedlichen Stressoren

Es zeigte sich, dass innerhalb der Zelllinie L929, zwischen 20 und 29 Genen (bis zu 41 %) in zwei Modellen und 13 in allen drei Modellen differentiell exprimiert waren. Diese 13 Gene sind bei einer Schädigung der Zelllinie L929 unabhängig vom Stressor und unabhängig von der Zelltodesform differentiell exprimiert. Bei 5 dieser 13 Gene nämlich: JUN, MYC, DDIT3, VEGF und CST3 steht ihre beschriebene Funktion im Zusammenhang mit der Apoptose bzw. dem Zelltod.

Beim Vergleich der L929 Modelle mit MN-Bildung zeigten sich 24 Gene in beiden Versuchsreihen (strahleninduziert und VM-26 induziert) differentiell exprimiert. Von diesen zusätzlichen 11 Genen, die bei der Zelllinie L929 bei Induktion der Zelltodesform MN-Bildung, nicht aber bei der Apoptose differentiell exprimiert waren, fanden sich weitere 5 Gene (SQSTM1, BNIPL, PHLDA1, RXRA, RAB-2), die mit Apoptose bzw. dem Zelltod in Verbindung stehen. Für keines der insgesamt 10 Gene ist in der Literatur ein Zusammenhang mit der MN-Bildung beschrieben.

5.2.2.2 Strahleninduzierte differentielle Genexpression der 52 Gene in anderen Zelllinien

Der Einfluss ionisierender Strahlen auf die differentielle Genexpression ist für 9 der 52 Gene beschrieben worden. Das **CLU** Gen zeigte sich 24 h p.r. unabhängig von der Strahlendosis und 72 h p.r. mit 6 Gy hochreguliert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Literaturangaben, in denen eine strahleninduzierte Hochregulation beschrieben wird (Criswell et al., 2005, S.14212, Criswell et al., 2003, S.372, Leskov et al., 2003, S.11590 und Leskov et al., 2001, S.352). Yang et al. (2000, S.5909) beschrieben eine strahleninduzierte Hochregulation des CLU bei MCF-7 Zellen. Das konnte in der oben genannten Arbeit mit MCF-7 Zellen nicht bestätigt werden. Klovov et al. (2004, S.97) beschrieben, eine Erhöhung der zytotoxischen Effekte der Bestrahlung stehe mit einer Herunterregulation von CLU im Zusammenhang. Eine Expression von **MYC** verändert laut Wang et al. (1993, S.1213) und laut Iliakis et al. (1990, S.6575) die Resistenz der Zelle gegenüber ionisierender Strahlung (IR). Die DNA-Reparatur nach IR ist gemäß Bil'din et al. (1991, S.39) von der MYC-Expression abhängig.

Die Arbeitsgruppen Chen et al. (2005, S.1785), Shan et al. (2003, S.44009), Amorino et al. (2003, S.29394), Bishay et al. (2000, S.916) und Xu und Morris (1999, S.13) zeigten übereinstimmend, dass **PCNA** nach IR hochreguliert ist. Das zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, in der PCNA 24 h p.r. mit 6 Gy hochreguliert war. Das **VEGF** Gen fand sich anfangs (24 h p.r. mit 6 Gy) hochreguliert, später dann (36 h p.r. mit 2 Gy und 72 h p.r. mit 6 Gy) herunterreguliert. Die differentielle Genexpression schien mehr von der Zeit nach Bestrahlung als von der Strahlendosis abhängig zu sein. Polytarchou et al. fanden 2004 (S.2941) eine entgegengesetzte Veränderung mit einer primären Herunter- und einer späteren Hochregulation des Gens. Zu dem Ergebnis einer dosisunabhängigen Genexpression kamen auch Arab et al. (2004, S.1036), wohingegen Dudziak et al. (2000, S.1049) und Mori et al. (2000, S.157) eine Dosisabhängigkeit feststellten. Eine Hochregulation des Gens nach Bestrahlung fanden die drei Arbeitsgruppen Kaliberov et al. (2005, S.407), Lund et al. (2004, S.833) und Park et al. (2001, S.3266), während Jiang et al. (2004, S.106) eine durch IR induzierte Apoptose im Retina Pigmentepithel ohne eine Veränderung der VEGF Expression fanden.

Bezüglich des **MAP2K4** Gens fanden Mitsutake et al. (2001, S.989) keine Veränderung der Genexpression nach Bestrahlung. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Herunterregulation 24 h p.r. mit 6 Gy. Die strahleninduzierte Herunterregulation von **Rad21** 48 h und 72 h p.r. mit 6 Gy decken sich nicht mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe McKay et al. (1996, S.305) die eine Hochregulation des Gens nach Strahlenexposition, allerdings bei einer anderen Zelllinie beschreiben. Laut Fortunato et al. (1996, S.14) ist Rad21 in die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden involviert. Durch strahleninduzierte DNA-Schäden wird auch das **CDH1** hochreguliert fanden Sudo et al. 2001 (S.6499) heraus. Auch dieses Gen zeigte sich in der Zellreihe L929 herunterreguliert (24 h p.r. mit 6 Gy), was mit den Ergebnissen der Arbeit von Fukuda et al. aus dem Jahr 2004 (S.1543) übereinstimmt. Stal et al. (2003, S.R43) beschrieben das **AKT1**-Gen als biologischen Marker der Strahlentherapie, in der Zellreihe MCF-7, nicht aber in der Zellreihe L929, zeigte sich das Gen differentiell exprimiert. Die strahleninduzierte differentielle Genexpression der Zellreihe L929 stimmte mit den meisten Ergebnissen differentieller Genexpression anderer Arbeiten überein. Eine Aufstellung der Literaturstellen sortiert nach Genen findet sich in Tabelle 5.4. Die Zusammenfassung beinhaltet die für den Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit wichtigsten Aussagen in Kurzform. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die vollständige Quellenangabe im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Differenzielle Genexpression bei ionisierender Strahlung (IR)					
Genname	Zusammenfassung	Literaturstelle	Genname	Zusammenfassung	Literaturstelle
CLU (clusterin)	Runterregulation von CLU erhöht die zytotoxischen Effekte der Strahlentherapie	Klokov et al., 2004, S.97	VEGF (vascular endothelial growth factor)	IR führt zur Hochregulation von VEGF	Kaliberov et al., 2005, S.407
	Strahleninduzierte Hochregulation von CLU ab 72h p.r.	Criswell et al., 2005, S.14212		VEGF 6 h p.r. runterreguliert, später signifikant hochreguliert	Polytarchou et al., 2004, S.2941
	CLU Expression wird durch niedrige Dosen ionisierender Strahlung nach 48 bis 96 h hochreguliert	Criswell et al., 2003, S.372		IR induziert Apoptose im Retina Pigmentepithel ohne Veränderung der VEGF Expression	Jiang et al., 2004, S.106
	Strahleninduziert Hochregulation von CLU	Leskov et al., 2003, S.11590		VEGF runterreguliert unabhängig von der Strahlendosis	Arab et al., 2004, S.1036
	Strahleninduziert Hochregulation von CLU	Leskov et al., 2001, S.352		VEGF durch IR im Glioblastom hochreguliert	Lund et al., 2004, S.833
	CLU strahleninduziert hochreguliert bei MCF-7	Yang et al., 2000, S.5909		IR aktiviert die VEGF Expression	Park et al., 2001, S.3266
MYC (v-myc murine myelocytomatosis viral oncogene homolog)	V-MYC Expression verändert die Sensibilität ggü. ionisierender Strahlung	Wang et al., 1993, S.1213		IR verursachte eine dosisabhängige Runterregulation von VEGF in Osteoblasten	Dudziak et al., 2000, S.1049
	Reparatur der DNA nach ionisierender Strahlung abhängig von der Expression von V-MYC	Bil'din et al., 1991, S.39		Induktion von VEGF abhängig von der Strahlendosis	Mori et al., 2000, S.157
	Bei V-MYC Expression hohe Resistenz ggü. IR	Iliakis et al., 1990, S.6575		VEGF verhindert strahleninduzierte Apoptose	Kuramoto et al., 2000, S.425
PCNA	Hochregulation der PCNA Expression nach IR	Chen et al., 2005, S.1785	MAP2K4 (GSK-3)	IR aktiviert die MAP2K2 Expression nicht	Mitsutake et al., 2001, S.989
	Hochregulation der PCNA Expression nach IR in humanen Fibroblasten	Shan et al., 2003, S.44009	DAD1 (defender against cell death 1)	DAD1 Expression unabhängig von IR	Bishay et al., 2000, S.916
	Runterregulation von PCNA führt zur erhöhten Strahlensensibilität; Hochregulation der PCNA nach IR	Amorino et al., 2003, S.29394	Rad 21	Rad 21 hochreguliert nach Strahlenexposition	McKay et al., 1996, S.305
	PCNA nach Strahlenexposition dosisabhängig hochreguliert	Bishay et al., 2000, S.916		Rad 21 involviert in DNA Reparatur nach strahleninduzierten DNA-Schäden	Fortunato et al., 1996, S.14
	Strahleninduzierte Hochregulation von PCNA	Xu et Morris, 1999, S.13	CDH1 (cadherin 1, epithelial)	CDH1 durch strahleninduzierte DNA-Schäden hochreguliert	Sudo et al., 2001, S.6499
AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog)	AKT1 als biologischer Marker der Strahlentherapie	Stal et al., 2003, S.R43		CDH1 nach fraktionierter Bestrahlung mit 60 Gy runterreguliert	Fukuda et al., 2004, S.1543

Tab. 5.4 Die Tabelle enthält die Informationen anderer Arbeitsgruppen über strahleninduzierte Genexpression der 52 Gene aus Tabelle 5.3. In der linken Spalte ist der Genname, in der mittleren Spalte eine Kurzzusammenfassung und in der rechten Spalte die Literaturangabe aufgeführt. Die vollständige Literaturangabe ist in dem Literaturverzeichnis zu finden.

5.2.2.3 Chemotherapeutika-induzierte differenzielle Genexpression der 52 Gene in anderen Zellreihen

Bei der Literaturrecherche zeigte sich, dass für 16 der 52 Gene auch in anderen Arbeiten ein Einfluss von Chemotherapeutika auf die Genexpression beobachtet wurde. Einige Autoren beschrieben eine Hoch- oder Herunterregulation der Genexpression, dann zumeist für ein bestimmtes Chemotherapeutikum wie z.B. eine Hochregulation von SSRP1 unter Cisplatin-Therapie bei Yarnell et al. (2001, S.25736) oder des CDH1 Gens unter Paclitaxel-Therapie bei Wang et al. (2003, S.201) bzw. Decitabine-Therapie bei Shaker et al. (2004, S.1253) u. a. oder allgemein für das MCM5 Gen bei Lu et al. (2003, S.59). Andere Autoren beschrieben die Genexpression abhängig von der Dosis der Chemotherapeutika z.B. eine Herunterregulation

für die Gene PCNA und GSTP1 bei Ramachandran et al. (2005, S.3293) oder eine Hochregulation für das Gen CDH1 bei Meng et al. (2000, S.155) oder Farinha et al. (2004, S.75). Die Expression einiger Gene wurde als Indikator für das Ansprechen der Chemotherapie identifiziert, so ist eine Herunterregulation von AKT1 bei Stal et al. (2003, S.37) mit einer besseren Wirksamkeit der Chemotherapeutika verbunden. Eine Überexpression von AKT1 konnte laut Page et al. (2003, S.407), Ogino et al. (2005, S.6650) und Knuefermann et al. (2003, S.3205) zu einer Chemoresistenz führen. Verschiedene Gene können nach Meinung der Autoren als molekulare Marker unter Chemotherapie eingesetzt werden. So konnte die differentielle Genexpression von Rad21 (Atienza et al. 2005, S361), von AKT1 (Bisht et al. 2003, S.8984), von PCNA (Konishi et al. 1998, S.365, Kimura et al. 2000, S.972, Del Giglio et al. 1993, S.265), von GSTP1 (Ahmed 2005, S.353, Esteller et al. 2005, S.629) und von VEGF (Bisht et al. 2003, S.8984) als Marker für ein Ansprechen der Chemotherapie identifiziert werden. DDIT3 wurde von Weaver et al. (2005, S.18) als Marker für eine Chemoresistenz beschrieben. Die Expression von Subgruppen des Gens GSTP1 wurde von Beeghly et al. (2005, S.1) als Marker für die Prognose bei Ovarialkarzinom und die Expression des FN1-Gens, laut Lossos et al. (2004, S.1828), als Vorhersagemarker für das Überleben bei diffus großzelligem B-Zell-Lymphom unter Chemotherapie erkannt. Die gefundenen Ergebnisse verdeutlichen die Potenz der differentiellen Genexpression verschiedener Gene als biologische Marker für unterschiedliche Fragestellungen wie das Ansprechen der Zellen auf Chemotherapie oder sogar als Prognosefaktor unter Chemotherapie. Es konnte kein Gen gefunden werden, das allgemeingültig als Prognosefaktor gelten kann. Vielmehr ist für die einzelnen Chemotherapeutika und für die verschiedenen Tumorarten jeweils ein Gen oder eine Gruppe von Genen als biologische Marker notwendig. Einen Überblick über die Literaturstellen gibt die Tabelle 5.5. Darin finden sich gekürzt und nach Genen sortiert, die für diese Arbeit wesentlichen Aussagen zusammengestellt.

Differenzielle Genexpression bei Chemotherapie					
Genname	Zusammenfassung	Literaturstelle	Genname	Zusammenfassung	Literaturstelle
Rad 21	Rad 21 Runterregulation und Anstieg der Apoptoserate unter Chemotherapie; Potentieller Marker für die Wirksamkeit der Chemotherapie	Alienza et al., 2005, S.361	CLU (clusterin)	Runterregulation von CLU erhöht die zytotoxischen Effekte der Chemotherapie	Klokov et al., 2004, S.97
AKT1 (v-akt murine thymoma virus oncogene homolog)	Patienten mit runterreguliertem AKT1 zeigen bessere Wirksamkeit gegenüber Chemotherapeutikum	Stal et al., 2003, S.37		Hochregulation von CLU sensitiviert gegenüber Chemotherapie mit 5-FU	Kokkinakis et al., 2005, S.1338
	Eine Überexpression an AKT1 kann zur Resistenz gegenüber Chemotherapie führen	Page et al., 2000, S.407		Runterregulation von CLU erhöht die zytotoxischen Effekte der Chemotherapie bei Blasen-Ca	Chung et al., 2004, S.155
	Eine Überexpression an AKT1 führt zur Resistenz gegenüber multiplen Chemotherapeutica	Knuefermann et al., 2003, S.3205	DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3, GADD153)	DDIT3 als Marker für Chemoresistenz	Weaver et al., 2005, S.18
	Spezifische AKT-Isoformen führen zur Resistenz gegenüber Cisplatin	Gagnon et al., 2004, S.785	MCM5 (mitochondriose maintenance deficient 5)	Chemotherapie senkt die Expression von MCM5	Lu et al., 2003, S.59
	Überexpression von AKT1 scheint eine Therapieresistenz gegenüber Chemotherapie vorhersagen zu können	Ogino et al., 2005, S.6650	MAP3K3	MAP3K3 unter Chemotherapie hochreguliert	Gilmore et al., 2004, S.4148
	AKT1 als molekularer Marker bei Chemotherapie	Bisht et al., 2003, S.8984	SSRP1 (structure specific recognition protein 1)	Unter Cisplatin-Therapie hochregulation von SSRP1	Yarnell et al., 2001, S.25736
PCNA	VEGF ist ein Marker der Tumorgenese und wichtiger Angriffspunkt der Chemotherapie	Rini BI, 2005, S.192	COL6A1 (collagen VI)	Hochregulation von COL6A1 als Marker der Metastasensuppression unter Koffeintherapie	Yang et al., 2004, S.719
	PCNA ist potentiell hilfreich als Marker zur Bestimmung der Tumorreaktion auf adjuvante Chemotherapie beim Zervixcarcinom	Konishi et al., 1998, S.365	MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)	Immortalisierung von Zellen führt zur Hochregulation von V-MYC	Havre et al., 2002, S.1443
	PCNA Runterregulation erscheint als guter Indikator zur Bestimmung der Sensitivität auf adjuvante Chemotherapie bei Gastrointestinalen Tumoren	Kimura et al., 2000, S.971	ATF4 (activating transcription factor 4, transcription factor)	Durch Cisplatin induzierbare Genexpression von ATF4	Tanabe et al., 2003, S.8592
	Runterregulation von PCNA bei tumorschädigenden Effekten durch Chemotherapie	Wang et al., 2002, S.477	CDH1 (cadherin 1, epithelial)	Paclitaxel reguliert die CDH1 Expression hoch	Wang et al., 2003, S.201
	Dosisabhängige Runterregulation von PCNA bei Chemotherapie	Ramachandran et al., 2005, S.3293		Docetaxel interferiert nicht mit der CDH1 Expression	Hurtubise et Momparier, 2004, S.161
	PCNA-Expression zur Vorhersage der Reaktion auf Chemotherapie geeignet	Del Giglio et al., 1993, S.265		Decitabine reguliert CDH1 dosisabhängig hoch	Farinha et al., 2004, S.75
	DNA Reparatur nach Chemotherapie geht mit einer Hochregulation von PCNA einher	Chen et al., 2005, S.1785		Decitabine reguliert CDH1 hoch	Shaker et al., 2004, S.1253
RXRA (retinoid X receptor, alpha, transcription factor)	RXRA in den malignen Zellen überexprimiert; potentiels Ziel der Chemotherapie	Peng et al., 2004, S.961		CDH1 Expression beeinflusst die Chemosensibilität und die Proliferationsrate von Tumorzellen	Fricke et al., 2004, S.150
GSTP1 (glutathione S-transferase pi)	Expression von GSTP1 als Marker für ein Ansprechen der Chemotherapie	Ahmed FE, 2005, S.353		Chemotherapie bewirkt eine dosisabhängige Hochregulation von CDH1	Meng et al., 2000, S.155
	Überexpression von GSTP1 im Cholangiocarcinom und als Marker für ein Ansprechen der Chemotherapie	Tepsiri et al., 2005, S.2748		Chemotherapie reguliert die CDH1 Expression hoch	Slaton et al., 2001, S.2840
	Dosisabhängige Runterregulation von GSTP1 bei Chemotherapie	Ramachandran et al., 2005, S.3293	VEGF (vascular endothelial growth factor)	VEGF als molekularer Marker bei Chemotherapie	Bisht et al., 2003, S.8984
	Expression von GSTP1 Subgruppen als Marker für die Prognose von Ovarial-Ca	Beeghly et al., 2005, S.1		Phenylbutyrat reguliert die Expression von VEGF runter	Goh et al., 2001, S.331
	Expression von GSTP1 als biologischer Marker für ein Carcinom	Esteller M, 2005, S.629		Taxol reguliert die VEGF Expression runter.	Wang et al., 2003, S.201
FN1 (fibronectin)	Expression von FN1 als einer der Vorhersagemarker für ein Überleben bei diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom	Lossos et al., 2004, S.1828			

Tab. 5.5 Die Tabelle enthält die Informationen anderer Arbeitsgruppen über chemoinduzierte Genexpression der 52 Gene aus Tabelle 5.3. In der linken Spalte ist der Genname, in der mittleren Spalte eine Kurzzusammenfassung und in der rechten Spalte die Literaturangabe aufgeführt. Die vollständige Literaturangabe ist in dem Literaturverzeichnis zu finden.

5.3 Mikrokernbildung

5.3.1 Einfluss der differentiell exprimierten, Apoptose regulierenden Gene auf die Mikrokernbildung

Es wird diskutiert, dass die Mikrokernbildung eine aktive Form der Zelltodesform darstellt, da Signaltransduktionswege, die für die Apoptoseinduktion bekannt sind, auch für die MN-Bildung verantwortlich gemacht werden (Abend 2003, S.929). Wenn es sich um einen aktiven Prozess handelt, liegt wahrscheinlich eine differentielle Genexpression verschiedener Gene vor, die an diesem Prozess beteiligt sind. Nach Strahlenexposition wurde die Mikrokern (MN)-Bildung als die häufigste Zelltodesform der Zellreihe L929 nachgewiesen. Auch andere Arbeiten fanden eine MN-Bildung bei L929 Zellen. So wurde von Chlopkiwicz 2001 (S.794) die genotoxische Aktivität von Hydralazine und Dihydralazin anhand der Mikrokernbildung bei L929 Zellen nachgewiesen. Abend et al. publizierten (1995, 1996, 1999) eine strahleninduzierte Mikrokernbildung bei L929 Zellen. Die Apoptose ist in der Literatur als eine mögliche Zelltodesform der Zellreihe L929 bekannt. In bisher unveröffentlichten Daten aus dem Institut zeigten sich die Zelltodesformen Apoptose und Mikrokernbildung bei der Zellreihe L929 abhängig von der Dosis des Chemotherapeutikums VM 26.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich drei Gene, die bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielen. Die Gene BAX und c-myc sind für ihre Fähigkeiten Apoptose einzuleiten bekannt. Enomoto et al. fanden 2003 (S.589) die Herunterregulation des c-myc Gens als wichtigen Bestandteil der strahleninduzierten Apoptose. Auch das Gen RAB2 spielt in etablierten Modellen, durch seine Zugehörigkeit zur RAS-Onkogen –Gruppe, eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion während der Apoptose.

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der MN-Bildung ist das Gen BAX, dessen Hochregulation bei Bishay et al. (2000, S.916) mit der Entstehung von Mikrokernen in Verbindung gebracht wurde. Auch in dieser Arbeit fand sich eine Hochregulation des Gens und die Entstehung von Mikrokernen. Das kann ein weiterer Hinweis darauf sein, dass der Mikrokernbildung ein aktiver Prozess zugrunde liegt. Dass das Gen auch für die Apoptoseinduktion bekannt ist, könnte ein Hinweis auf eine gemeinsame Teilstrecke der Apoptose- und der Mikrokerninduktion sein. Ob im Zusammenhang mit der Mikrokernbildung auch die Herunterregulation des c-myc Gens oder die Hochregulation des RAB-2 Gens eine Rolle spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bislang

findet sich dazu keine Literatur. Auch die vier neu gefundenen Gene sollten in diesem Zusammenhang untersucht werden. Dabei ist vor allem der ATF4 von besonderem Interesse, da er als Teil der Signaltransduktionskette als zelluläre Antwort auf Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums und seine Überexpression mit der Inhibition von Zellwachstum und –differenzierung beschrieben wurde (Averous et al. 2004, S.5288). Neue Gene, deren Zusammenhang mit Bildung von Mikrokernen möglich ist konnten gefunden werden.

5.3.2 Mikrokernbildung bei unterschiedlichen Zellreihen und Stressoren

In der Zellreihe L929 zeigten sich unabhängig vom Stressor 24 Gene bei der MN-Bildung differentiell exprimiert, von denen zehn Gene eine Beteiligung an der Apoptose oder dem Zelltod zeigten. Vergleich man die Gene der Versuchsreihen MCF-7 und L929, bei denen die MN-Bildung jeweils durch ionisierende Strahlung induziert wurde, zeigten sich 3 Gene, welche in beiden Modellen differentiell exprimiert waren. Acht Gene waren gemeinsam in den Modellen L929 mit MN-Bildung durch Chemotherapie und MCF-7 mit MN-Bildung durch ionisierende Strahlung differentiell exprimiert. Bei 5 Genen lag die Funktion im Bereich der Apoptose oder des Zelltodes. Die geringere Zahl an Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Zellreihen lässt sich durch die Tatsache erklären, dass nur 21 der 72 differentiell exprimierten Gene der Zellreihe MCF-7 auch auf dem L929 Array abgebildet waren.

Es fanden sich 2 Gene, die bei allen drei Modellen mit MN-Bildung differentiell exprimiert waren. Zum einen das von Lee et al. (2003, S.559) als anti-apoptotisch bezeichnete Gen namens RAB2 (ausführliche Beschreibung des Gens in Kap. 5.1.2) zeigt sich bei der strahleninduzierten MN-Bildung offensichtlich unabhängig von der Zellart, der Dosis und der Zeit nach Bestrahlung hochreguliert. Bei der L929 Zellreihe war es 12 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy, 36 h p.r. mit 6 Gy und in der Zellreihe MCF-7 sowohl p.r. mit 2 Gy nach 24 h als auch 24 h und 48 h p.r. mit 6 Gy hochreguliert.

Als zweites fand sich das BNIPL-Gen das zur Bcl-2-Familie gehört. Bei Qin et al. (2003, S.379) wird dem Gen eine wichtige Rolle in der Regulation der DNA Fragmentation und Knospung während der Apoptose zugeschrieben. In einer Zellreihe mit hepatozellulärem Karzinom fand sich bei Xie et al. (2005, S.1290) nach Hochregulation des BNIPL Gens acht weitere Gene hochreguliert, die mit der Apoptose oder Hemmung des Zellwachstums in Zusammenhang stehen. Sieben Gene, die in Zusammenhang mit der Zellproliferation stehen,

waren herunterreguliert. BNIPL spielt, nach Meinung der Autoren, eine Rolle in der Apoptosesteuerung durch Beeinflussung anderer Gene.

Bei höherer Dosis zeigte sich das Gen p.r. herunterreguliert. In der Zellreihe L929 war es 24 h p.r. mit 2 Gy hochreguliert und 24 h p.r. mit 6 Gy herunterreguliert. In der Zellreihe MCF-7 zeigte sich eine Herunterregulation des Genes 48 h und 72 h p.r. mit 6 Gy.

Die beiden Gene RAB-2 und BNIPL sind im Zusammenhang mit der MN-Bildung von besonderem Interesse. Zum einen waren sie in allen drei Modellen mit MN-Bildung unabhängig von der Zellreihe oder dem Stressor gleichsinnig differentiell exprimiert. Zum anderen besteht für beide Gene ein Zusammenhang zwischen der differentiellen Genexpression und der Apoptose. Ein Zusammenhang mit der MN-Bildung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Ebenfalls von Interesse sind die Gene: JUN, MYC, DDIT, VEGF, CST3, SQSTM1, PHLDA1, RXRA, PTMA, DAD1 und MAPK14, die in zwei Modellen mit MN-Bildung differentiell exprimiert waren und von denen eine Beteiligung an der Apoptose bzw. am Zelltod bekannt ist. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass es sich bei der MN-Bildung um einen aktiven Prozess handelt, der teilweise von den gleichen Genen gesteuert wird, wie die Apoptose.

In nachfolgenden Versuchen an anderen Modellen mit MN-Bildung könnte eine Beteiligung dieser Gene am Zelltod und ein Zusammenhang zwischen Apoptose und MN-Bildung untersucht werden.

Dabei muss ein Kausalitätszusammenhang zwischen der differentiellen Genexpression und der Zelltodesform gezeigt werden. Dies kann z.B. mittels siRNA geschehen. Durch siRNA kann die Expression spezifischer Zielgene verringert und dadurch Rückschlüsse auf deren Funktion gezogen werden.

Markergene zur Frühdiagnostik sollten das Potential haben, den Strahlenschaden unabhängig von der Zelltodesform frühzeitig anzuzeigen.

6 Zusammenfassung

Die Anwendung ionisierender Strahlen in der Medizin zu therapeutischen Zwecken ist mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Bei gleicher Dosis sind die Nebenwirkungen individuell unterschiedlich. Eine Schädigung der Zellen kann sich z.B. durch morphologische Veränderungen im Rahmen des Zelltodes bemerkbar machen. Einen Strahlenschaden früher zu erkennen ist ein Schwerpunkt in der radiobiologischen Forschung. Ziel ist es z.B. durch Veränderung der Expression bestimmter Gene einen Strahlenschaden zu erkennen. Mithilfe dieser so genannten Markergene könnte die Strahlentherapie individuell angepasst werden, um einen therapeutischen Effekt mit geringen Nebenwirkungen zu erreichen. Die differentielle Genexpression dieser Markergene könnte auch zur biologischen Dosimetrie bei Strahlenunfallopfern dienen und im Sinne eines diagnostischen Verfahrens frühzeitig sowohl Rückschlüsse auf die Strahlendosis zulassen als auch eine frühzeitige Therapie ermöglichen.

Die Zelle kann nach Schädigung durch Stressoren verschiedene Zelltodesformen zeigen. Die Mechanismen dieser Zelltodesformen sind nur teilweise geklärt. Die Verbindung von Mikrokernbildung und anderen Zelltodesformen und der genaue Ablauf sind noch Gegenstand der Forschung.

In dieser Arbeit wurde bei Mäusefibroblasten der Zelllinie L929 die Veränderung der Genexpression nach Bestrahlung untersucht. Dabei wurde mithilfe eines „Makroarrays“ die Genexpression von 1176 Genen nach Bestrahlung mit 2 Gy und mit 6 Gy im Verhältnis zu einer unbestrahlten Probe untersucht. Dieses Verfahren eignete sich gut als Screeningmethode, um die differentielle Genexpression mehrerer hundert Gene gleichzeitig zu bestimmen.

Als Ergebnis zeigten sich 72 differentiell exprimierte Gene, von denen sieben zur biologischen Dosimetrie geeignet erschienen. Sie wiesen einen Genexpressionsunterschied über einen längeren Zeitraum in Abhängigkeit von der Strahlendosis bzw. der Klonogenität in zwei, unter den gleichen Bedingungen durchgeführten, Versuchen auf.

Für drei der sieben Gene (c-myc, BAX, RAB-2) zeigten auch andere Arbeitsgruppen eine strahleninduzierte differentielle Genexpression. Darüber hinaus konnten vier zusätzliche „Markergene“ bestimmt werden (ATF4, FGFR1, ryk, Col6a1). Keines der gefundenen Gene zeigte eine dosisabhängige differentielle Genexpression kontinuierlich gegen die Zeit. Ein Gen reicht zur biologischen Dosimetrie nicht aus, deshalb sollten zur Beurteilung möglichst

alle sieben Markergene berücksichtigt werden. Erst dann kann eine Aussage über die Höhe der Strahlenexposition getroffen werden.

Beim Vergleich der in dieser Arbeit differentiell exprimierten Gene mit der strahleninduzierten differentiellen Genexpression anderer Zelllinien oder unter dem Einfluss anderen Stressoren, die zur MN-Bildung führen, gelang der Nachweis von zwei Genen (RAB-2, BNIPL), die unabhängig vom Zelltyp und dem Stressor in allen drei Versuchsreihen differentiell exprimiert waren. Elf weitere Gene (JUN, MYC, DDIT, VEGF, CST3, SQSTM1, PHLDA1, RXRA, PTMA, DAD1 und MAPK14) zeigten sich in jeweils zwei Versuchsreihen differentiell exprimiert. Die bekannte Funktion aller 13 Gene steht mit der Apoptose bzw. dem Zelltod in direktem Zusammenhang. Nachfolgende Untersuchungen, beispielsweise mittels siRNA, werden zeigen, ob diese Gene einen Einfluss auf die MN-Bildung haben und können weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen MN-Bildung und Apoptose als Formen des Zelltodes geben.

7 Literaturverzeichnis

Abend, M., Rhein, A., Gilbertz, K.-P., Blakely, W.F., van Beuningen, D.: Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int J Radiat Biol* 67 (1995): 315 - 326

Abend, M., Rhein, A., Gilbertz, K.-P., van Beuningen, D.: Evaluation of a modified micronucleus assay. *Int J Radiat Biol* 69 (1996): 717 - 727

Abend, M., van Beuningen, D.: Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie. *Strahlenther Onkol* 174 (1998): 156 - 166

Abend, M., Frombeck, S., van Beuningen, D.: Indications for an active process underlying spontaneous and radiation-induced micronucleation in L929 cells. *Int J Radiat Biol* 75 (1999): 1567 - 1578

Abend, M., Kehe, K., Riedel, M., van Beuningen, D.: Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death can be improved when considering other modes of death. *Int J Radiat Biol* 76 (2000): 249 – 259

Abend, M.: Strahlenbiologische Bedeutung verschiedener Mechanismen des Zelltodes. *Habilitationsschrift. Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, und Universitätsklinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München* (2001)

Abend, M.: Reasons to reconsider the significance of apoptosis in cancer therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 79 (2003): 927-941

Ahmed, M.: Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 genes in solid tumors. *Curr Cancer Drug Target* 4 (2004): 43-52

Ahmed, F.E.: Molecular markers that predict response to colon cancer therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 5 (2005): 353-375

Almassy, Z., Krepinsky, A.B., Bianco, A., Köteles, G.J.: The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Applied and Radiation Isotopes* 38 (1987): 241 - 249

Amorino, G.P., Mikkelsen, R.B., Valerie, K., Schmidt-Ullrich, R.K.: Dominant-negative cAMP-responsive element-binding protein inhibits proliferating cell nuclear antigen and DNA repair, leading to increased cellular radiosensitivity. *J Biol Chem.* 278 (2003): 29394-29399

Amundson, S.A., Bittner, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P., Fornace, A.J. Jr.: Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18 (1999): 3666 - 3672

Amundson, S.A., Do, K.T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Fornace, A.J. Jr.: Identification of Potential mRNA Biomarkers in Peripheral Blood Lymphocytes for Human Exposure to Ionizing Radiation. *Radiat Res* 154 (2000): 342 – 346

Arab, A., Grumann, T., Guttenger, R., Bode, C., Hehrlein, C.: Reoxygenation of hypoxic coronary smooth muscle cells amplifies growth-retarding effects of ionizing irradiation. *Circulation.* 109 (2004): 1036-1040

Ashwell, J.D., Berger, N.A., Cidlowski, J.A., Lane D.P., Korsmeyer, S.J.: Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunol. Today* 15 (1994) 147 – 151

Atienza, J.M., Roth, R.B., Rosette, C., Smylie, K.J., Kammerer, S., Rehbock, J., Ekblom, J., Denissenko, M.F.: Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 4 (2005): 361-368

Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., Fafournoux, P.: Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 279 (2004): 5288-5297

Bagheri-Yarmand, R., Vadlamudi, R.K., Kumar, R.: Activating transcription factor 4 overexpression inhibits proliferation and differentiation of mammary epithelium resulting in impaired lactation and accelerated involution. *J Biol Chem.* 278 (2003): 17421-17429

Balcer-Kubiczek, E.K., Zhang, X.F., Han, L.H., Harrison, G.H., Davis, C.C., Zhou, X.J., Ioffe, V., McCready, W.A., Abraham, J.M., Meltzer, S.J.: BIGEL analysis of gene expression in HL-60 cells exposed to X rays or 60 Hz magnetic fields. *Radiat Res* 150 (1998): 663 - 672

Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., Cleveland, J.L.: c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* 16 (2002): 2530-2543

Beeghly, A., Katsaros, D., Chen, H., Fracchioli, S., Zhang, Y., Massobrio, M., Risch, H., Jones, B., Yu, H.: Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol.* 2005 Sep 28; [Epub ahead of print]

Bil'din, V.N., Seregina, T.B., Pospelova, T.V.: The regulation of DNA repair processes in mammalian cells. II. The repair of DNA radiation damage in NIH 3T3 murine cells transformed by the v-myc oncogene. *Tsitologiya.* 33 (1991): 39-47.

Bishay, K., Ory, K., Lebeau, J., Levalois, C., Olivier, M.F., Chevillard, S.: DNA damage-related gene expression as biomarker to assess cellular response after gamma irradiation of a human lymphoblastoid cell line. *Oncogene.* 19 (2000): 916-923

Bisht, K.S., Bradbury, C.M., Mattson, D., Kaushal, A., Sowers, A., Markovina, S., Ortiz, K.L., Sieck, L.K., Isaacs, J.S., Brechbiel, M.W., Mitchell, J.B., Neckers, L.M., Gius, D.: Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity. *Cancer Res.* 63 (2003): 8984-8995

Bohm, I., Traber, F., Block, W., Schild, H.: Molecular imaging of apoptosis and necrosis -- basic principles of cell biology and use in oncology. *Rofo.* 178 (2006): 263-271.

Brazma, A., Vilo, J.: Gene expression data analysis. *FEBS Letters* 480 (2000): 17 - 24

Brenner, S.L., Liaw, L.-H., Berns, M.W.: Laser microirradiation of kinetochores in mitotic PtK2 cells: chromatid separation and micronucleus formation. *Cell Biophys* 2 (1980): 139 - 152

Brzoska, P.M., Chen, H., Levin, N.A., Kuo, W.L., Collins, C., Fu, K.K., Gray, J.W., Christmann, M.F.: Cloning, mapping, and in vivo localization of a human member of the PKCI-1 protein family (PRKCNH1). *Genomics* 36 (1996): 151 - 156

Buttke, T., Sandstrom, P.A.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15 (1994): 7 - 12

Chai, L.S., Schumer, J.M., Sandberg, A.A.: Effect of mitochondrial inhibitors on metaphase-telophase progression and nuclear membrane formation in Chinese hamster cells. *Cell Tiss Kinetik* 18 (1985): 13 - 25

Chen, C., Chang, M.C., Hsieh, R.K., Chang, Y.F., Lin, J., Tsan, K.W.: Activation of CD44 facilitates DNA repair in T-cell lymphoma but has differential effects on apoptosis induced by chemotherapeutic agents and ionizing radiation. *Leuk Lymphoma*. 46 (2005): 1785-1795

Chlopkiewicz, B.: Influence of metabolic activation on the induction of micronuclei by antihypertensive drugs in L929 cells. *Arch Toxicol*. 2001: 794-798

Chung, J., Kwak, C., Jin, R.J., Lee, C.H., Lee, K.H., Lee, S.E.: Enhanced chemosensitivity of bladder cancer cells to cisplatin by suppression of clusterin in vitro. *Cancer Lett*. 203 (2004): 155-161

Collins, R.J., Harmon, B.V., Gobé, G.C., Kerr, J.F.R.: Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61 (1992): 451 - 453

Columbano, A.: Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 58 (1995): 181 - 190

Cozma, D., Lukes, L., Rouse, J., Qiu, T.H., Liu, E.T., Hunter K.W.: A bioinformatics-based strategy identifies c-Myc and Cdc25A as candidates for the Apmt mammary tumor latency modifiers. *Genome Res.* 12 (2002): 969-75

Criswell, T., Klokov, D., Beman, M., Lavik, J.P., Boothman, D.A.: Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther.* 2 (2003): 372-80

Criswell, T., Beman, M., Araki, S., Leskov, K., Cataldo, E., Mayo, L.D., Boothman, D.A.: Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor. *J Biol Chem.* 280 (2005): 14212-14221

Culine, S., Honore, N., Closson, V., Lang, P., Bertoglio, J., Tavitian, A., Olofsson, B.: A possible role for the Ras-related Rab2 protein in the immunological events associated with hematological malignancies. *Nouv Rev Fr Hematol.* 35 (1993): 41-44

Cui, Y.F., Zhang, Y., Liu, X.L., Wang, L.H., Jiang, Z.J., Gu, Q.Y., Jin, W., Xu, H., Mao, B.Z.: Apoptosis and modulatory mechanism of human AHH-1 T lymphocyte induced by gamma-irradiation. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 20 (2004): 39-41

Del Giglio, A., O'Brien, S., Ford, R.J. Jr, Manning, J., Saya, H., Keating, M., Johnston, D., Chamone, D.F., Deisseroth, A.B.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Lymphoma.* 10 (1993): 265-271

Demirci, G., Li, X.C.: IL-2 and IL-15 exhibit opposing effects on Fas mediated apoptosis. *Cell Mol Immunol.* 1 (2004): 123-128

Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W., Vandenabeele, P.: Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58 (2001): 356-370

Dragovich, T., Rudin, C.M., Thompson, C.B.: Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17 (1998): 3207-3213

Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, Longaker MT.: The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg.* 106 (2000): 1049-1061

Enomoto, A., Suzuki, N., Kang, Y., Hirano, K., Matsumoto, Y., Zhu, J., Morita, A., Hosoi, Y., Sakai, K., Koyama, H.: Decreased c-Myc expression and its involvement in X-ray-induced apoptotic cell death of human T-cell leukaemia cell line MOLT-4. *Int J Radiat Biol.* 79 (2003): 589-600

Esteller, M.: Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45 (2005): 629-656

Farinha, N.J., Shaker, S., Lemaire, M., Momparler, L., Bernstein, M., Momparler, R.L.: Activation of expression of p15, p73 and E-cadherin in leukemic cells by different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine). *Anticancer Res.* 24 (2004): 75-78

Fenech, M., Morley, A.A.: Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobiosynthesis* 43 (1985): 233 - 246

Fortunato, E.A., Osman, F., Subramani, S.: Analysis of spontaneous and double-strand break-induced recombination in rad mutants of *S. pombe*. *Mutat Res.* 364 (1996): 14-60

Fricke, E., Hermannstadter, C., Keller, G., Fuchs, M., Brunner, I., Busch, R., Hofler, H., Becker, K.F., Luber, B.: Effect of wild-type and mutant E-cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil. *Oncology.* 66 (2004): 150-159.

Fu, L.M., Youn, E.S.: Improving reliability of gene selection from microarray functional genomics data. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* 7 (2003): 191-196

Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R.N.V.T.: The role of the sphingomyelin pathway and protein kinase C in radiation-induced cell kill. In: "Important Advances in Oncology"; DeVita, S.; Hellman, S. A.; Rosenberg, J. B. (Eds); Lippincott Company, Philadelphia (1995)

Fukuda, K., Sakakura, C., Miyagawa, K., Kuriu, Y., Kin, S., Nakase, Y., Hagiwara, A., Mitsufuji, S., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Yamagishi, H.: Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer*. 91 (2004): 1543-1550

Fukunaga-Johnson, N., Ryan, J.J., Wicha, M., Nunez, G., Clarke, M.F.: Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and -independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis* 16 (1995) 1761 - 1767

Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., Asselin, E.: AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol*. 94 (2004): 785-795

Gilmore, P.M., McCabe, N., Quinn, J.E., Kennedy, R.D., Gorski, J.J., Andrews, H.N., McWilliams, S., Carty, M., Mullan, P.B., Duprex, W.P., Liu, E.T., Johnston, P.G., Harkin, D.P.: BRCA1 interacts with and is required for paclitaxel-induced activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3. *Cancer Res*. 64 (2004): 4148-4154

Goetz, C., Montenahr, M.: p53 and its implication in apoptosis (Review). *Int J Oncol* 6 (1995) 1129 – 1135

Goff, L.A., Bowers, J., Schwalm, J., Howerton, K., Getts, R.C., Hart, R.P.: Evaluation of sense-strand mRNA amplification by comparative quantitative PCR. *BMC Genomics*. 5 (2004): 76

Goh, M., Chen, F., Paulsen, M.T., Yeager, A.M., Dyer, E.S., Ljungman, M.: Phenylbutyrate attenuates the expression of Bcl-X(L), DNA-PK, caveolin-1, and VEGF in prostate cancer cells. *Neoplasia*. 3 (2001): 331-338

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., Perez, J.M.: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59 (2001): 657 - 663

Granville, D.J., Carthy, C.M., Hunt, D.W., McManus, B.M.: Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78 (1998): 893-913

Guo, G., Wang, T., Gao, Q., Tamae, D., Wong, P., Chen, T., Chen, W.C., Shively, J.E., Won Li, J.J.: Expression of ErbB2 enhances radiation-induced NF-kappaB activation.

Oncogene 23 (2004): 535-545

Halford, M.M., Stacker, S.A.: Revelations of the RYK receptor. *Bioessays. 2001 Jan; 23(1): 34-45*

Havre, P.A., O'Reilly, S., McCormick, J.J., Brash, D.E.: Transformed and tumor-derived human cells exhibit preferential sensitivity to the thiol antioxidants, N-acetyl cysteine and penicillamine. *Cancer Res. 62 (2002): 1443-1449*

Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr.: Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. *Mut Res 127 (1984): 129 - 137*

Heddle, J.A., Carrano, A.V.: The DNA content of micronuclei induced in mouse bone by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mut Res 44 (1977): 63 - 69*

Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., Salamone, M.F.: The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mut Res 123 (1983): 61 - 118*

Hirsch, T., Marchetti, P., Asusin, S., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., Kroemer, G.: The Apoptosis - necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene 15 (1997), 1573 - 1581*

Hockenbery, D., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J.: Bcl₂ functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell 75 (1993): 241 - 251*

Hockenbery, D.: Defining apoptosis. *American J Pathol 146 (1995): 16 - 23*

Howell, W.H.: The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *Journal of Morphology 4 (1891): 57 - 116*

- Hurtubise, A., Momparler, R.L.:** Evaluation of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine (Dacogen) and docetaxel (Taxotere) on human breast, lung and prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs*. 15 (2004): 161-167
- Iliakis, G., Metzger, L., Muschel, R.J., McKenna, W.G.:** Induction and repair of DNA double strand breaks in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Cancer Res*. 50 (1990): 6575-6579.
- Isaacs, J.T.:** Advances and controversies in the study of programmed cell death / apoptosis in the development of and therapy for cancer. *Curr Opin Oncol* 6 (1994): 82 - 89
- Jiang, Y.L., Escano, M.F., Sasaki, R., Fujii, S., Kusahara, S., Matsumoto, A., Sugimura, K., Negi, A.:** Ionizing radiation induces a p53-dependent apoptotic mechanism in ARPE-19 cells. *Jpn J Ophthalmol*. 48 (2004): 106-114
- Jolly, J.:** Recherches sur la formation des globules rouges des mammifères. *Arch Anat Microsc* 9 (1907): 133 - 314
- Kaliberov, S.A., Kaliberova, L.N., Buchsbaum, D.J.:** Combined ionizing radiation and sKDR gene delivery for treatment of prostate carcinomas. *Gene Ther*. 12 (2005): 407-417
- Kato, H., Sandberg, A.A.:** Chromosome pulverisation in human cells with micronuclei. *J Nat Cancer Inst* 40 (1968): 165 - 179
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.:** Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J Cancer* 26 (1972): 239 - 257
- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V.:** Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 (1994): 2013 - 2026
- Kim, K.T., Baird, K., Ahn, J.Y., Meltzer, P., Lilly, M., Levis, M., Small, D.:** Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood*. 105 (2005): 1759-67
- King, K.L., Cidlowski, J.A.:** Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 58 (1995): 175 - 180

Kimura, H., Konishi, K., Kaji, M., Maeda, K., Yabushita, K., Tsuji, M., Ogino, H., Satomura, Y., Unoura, M., Miwa, A.: Apoptosis, cell proliferation and expression of oncogenes in gastric carcinomas induced by preoperative administration of 5-fluorouracil. *Oncol Rep.* 7 (2000): 971-976

Klokov, D., Criswell, T., Leskov, K.S., Araki, S., Mayo, L., Boothman, D.A.: IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat Res.* 568(2004): 97-110

Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G.B., Mendelsohn, J., Fan, Z.: HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 22 (2003): 3205-3212

Kokkinakis, D.M., Liu, X., Neuner, R.D.: Modulation of cell cycle and gene expression in pancreatic tumor cell lines by methionine deprivation (methionine stress): implications to the therapy of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 4 (2005): 1338-1348

Konishi, I., Nanbu, K., Mandai, M., Tsuruta, Y., Kataoka, N., Nagata, Y., Mori, T.: Tumor response to neoadjuvant chemotherapy correlates with the expression of P-glycoprotein and PCNA but not GST-pi in the tumor cells of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 70 (1998): 365-371

Kovalenko, D., Yang, X., Nadeau, R.J., Harkins, L.K., Friesel, R.: Sef inhibits fibroblast growth factor signaling by inhibiting FGFR1 tyrosine phosphorylation and subsequent ERK activation. *J Biol Chem.* 278 (2003): 14087-14091

Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S.-S., Flavell, R.A.: Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 267 (1995): 2000 - 2009

Kuramoto, K., Uesaka, T., Kimura, A., Kobayashi, M., Watanabe, H., Katoh, O.: ZK7, a novel zinc finger gene, is induced by vascular endothelial growth factor and inhibits apoptotic death in hematopoietic cells. *Cancer Res.* 60 (2000): 425 - 430

- Lee, J.M., Bernstein, A.:** Apoptosis, cancer and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 14 (1995): 149 - 161
- Lee, K.H., Ahn, J.I., Yu, D.H., Koh, H.C., Kim, S.H., Yang, B.H., Lee, Y.S.:** Dextromethorphan alters gene expression in rat brain hippocampus and cortex. *Int J Mol Med*. 11 (2003): 559-568
- Lee, M.L., Kuo, F.C., Whitmore, G.A., Sklar, J.:** Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000): 9834 – 9839
- Leskov, K.S., Criswell, T., Antonio, S., Li, J., Yang, C.R., Kinsella, T.J., Boothman, D.A.:** When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair. *Semin Radiat Oncol*. 11(2001): 352-372
- Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J., Boothman, D.A.:** Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem*. 278 (2003): 11590-11600
- Letai, A.:** Growth factor withdrawal and apoptosis: the middle game. *Mol Cell*. 21 (2006): 728-730
- .
- Li, Y., St John, M.A., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R.C., Eisele, D., Abemayor, E., Elashoff, D., Park, N.H., Wong, D.T.:** Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 10 (2004): 8442-50
- Liss, B.:** Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res*. 30 (2002): e89
- Lossos, I.S., Czerwinski, D.K., Alizadeh, A.A., Wechser, M.A., Tibshirani, R., Botstein, D., Levy, R.:** Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*. 350 (2004): 1828-1837
- Lu, X., Guo, J., Hsieh, T.C.:** PC-SPES inhibits cell proliferation by modulating p21, cyclins D, E and B and multiple cell cycle-related genes in prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 2 (2003): 59-63

- Lund, E.L., Hog, A., Olsen, M.W., Hansen, L.T., Engelholm, S.A., Kristjansen, P.E.:** Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. *Int J Cancer*. 108 (2004): 833 - 838
- Ma, Y., Hendershot, L.M.:** Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 278 (2003): 34864 - 34873
- Maier, P., Schmid, W.:** Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mut Res* 40 (1976): 325 - 338
- Martin, L.J.:** Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *Int J Mol Med* 7 (2001): 455 - 478
- McKay, M.J., Troelstra, C., van der Spek, P., Kanaar, R., Smit, B., Hagemeyer, A., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.:** Sequence conservation of the rad21 Schizosaccharomyces pombe DNA double-strand break repair gene in human and mouse. *Genomics*. 36 (1996): 305 - 315
- Melino, G., Catani, M.V., Corazzari, M., Guerrieri, P., Bernassola, F.:** Nitric oxide can inhibit apoptosis or switch into necrosis. *Cellular and Molecular Life Science* 57 (2000): 1001 - 1016
- Meng, Q., Qi, M., Chen, D.Z., Yuan, R., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., Auburn, K., Fan, S.:** Suppression of breast cancer invasion and migration by indole-3-carbinol: associated with up-regulation of BRCA1 and E-cadherin/catenin complexes. *J Mol Med*. 78 (2000): 155 - 165
- Mitsutake, N., Namba, H., Shklyae, S.S., Tsukazaki, T., Ohtsuru, A., Ohba, M., Kuroki, T., Ayabe, H., Yamashita, S.:** PKC delta mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. *Oncogene*. 20 (2001): 989 - 996
- Mohan, N., Meltz, M.L.:** Induction of nuclear factor κ B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. *Radiat Res* 140 (1994): 97 - 104

Mori, K., Tani, M., Kamata, K., Kawamura, H., Urata, Y., Goto, S., Kuwano, M., Shibata, S., Kondo, T.: Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, is essential for the induction of vascular endothelial growth factor by ionizing radiation mediated by activator protein-1 in human glioblastoma cells. *Free Radic Res.* 33 (2000): 157 - 166

Müller, W.U., Streffer, C.: Micronucleus Assay. *Adv Mut Res* 5 (1994): 1 - 133

Natarajan, A.T., Darroudi, F., Mullenders, L.H.F., Meijers, M.: The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. *Mut Res* 160 (1986): 231 - 236

Obe, G., Natarajan, A.T., Palitti, F.: Role of double-strand breaks in the formation of radiation-induced chromosomal aberrations. In: "DNA repair, chromosome alterations and chromosome structure"; Natarajan, A. T.; Obe, G.; Altman, H. (Eds); *Progress in Mutation Research, Vol. 4, Elsevier, Amsterdam (1982)*

Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A.: Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259 (1993): 1769 - 1772

Ogino, S., Meyerhardt, J.A., Cantor, M., Brahmandam, M., Clark, J.W., Namgyal, C., Kawasaki, T., Kinsella, K., Michelini, A.L., Enzinger, P.C., Kulke, M.H., Ryan, D.P., Loda, M., Fuchs, C.S.: Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 11(2005): 6650 - 6656

Ojeda, F., Guarda, M.I., Maldonado, C., Folch, H.: Induction of apoptosis in thymocytes: new evidence for an interaction of PKC and PKA pathways. *Biol Chem* 376 (1995): 389 - 393

Page, C., Lin, H.J., Jin, Y., Castle, V.P., Nunez, G., Huang, M., Lin, J.: Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 20 (2000): 407 - 416

Park, J.S., Qiao, L., Su, Z.Z., Hinman, D., Willoughby, K., McKinstry, R., Yacoub, A., Duigou, G.J., Young, C.S., Grant, S., Hagan, M.P., Ellis, E., Fisher, P.B., Dent, P.: Ionizing radiation modulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression through multiple mitogen activated protein kinase dependent pathways. *Oncogene*. 20 (2001): 3266 - 3280

Peng, X., Yun, D., Christov, K.: Breast cancer progression in MCF10A series of cell lines is associated with alterations in retinoic acid and retinoid X receptors and with differential response to retinoids. *Int J Oncol*. 25 (2004): 961 - 971

Pincu, M., Bass, D., Norman, A.: An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mut Res* 139 (1984): 61 - 65

Pincu, M., Callisen, H., Norman, A.: DNA content of micronuclei in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 47 (1985): 423 – 432

Polytarchou, C., Gligoris, T., Kardamakis, D., Kotsaki, E., Papadimitriou, E.: X-rays affect the expression of genes involved in angiogenesis. *Anticancer Res*. 24 (2004): 2941 - 2945

Port, M., Schmelz, H.U., Stockinger, M., Sparwasser, C., Albers, P., Pottek, T., Abend, M.: Gene Expression Profiling in Seminoma and Nonseminoma. *J Clin Oncol*. 23 (2005): 58 - 69

Qin, W., Hu, J., Guo, M., Xu, J., Li, J., Yao, G., Zhou, X., Jiang, H., Zhang, P., Shen, L., Wan, D., Gu, J.: BNIPL-2, a novel homologue of BNIP-2, interacts with Bcl-2 and Cdc42GAP in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 308 (2003): 379-385

Ramachandran, C., Rodriguez, S., Ramachandran, R., Raveendran Nair, P.K., Fonseca, H., Khatib, Z., Escalon, E., Melnick, S.J.: Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines. *Anticancer Res*. 25 (2005): 3293 - 3302

Randall, R.L., Wade, M., Albritton, K.H., Coffin, C.M., Joyner, D.E.: Validation of cDNA microarray analysis to distinguish tumor type ex vivo. *Clin Orthop.* 415 (2003): 5110 - 119

Rini, B.I.: VEGF-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Oncologist.* 10 (2005): 191-197

Salassidis, K., Huber, R., Zitzelsberger, H., Bauchinger, M.: Centromere detection in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of cytokinesis-blocked mouse cells by using in situ hybridization with mouse gamma (major) satellite DNA probe. *Environment Mol Mutagen* 19 (1992): 1 – 6

Salvesen, G.S., Dixit, V.M.: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91 (1997): 443 - 446

Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Ishikura, H., Umehara, H., Domae, N.: Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 270 (1995): 27326 - 27331

Schwartz, L.M., Osborne, B.A.: Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol. Today* 14 (1993): 582 - 590

Shaker, S., Bernstein, M., Momparler, R.L.: Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine (Dacogen) and depsipeptide on Raji lymphoma cells. *Oncol Rep.* 11(2004): 1253 - 1256

Shan, B., Lee, W.-H.: Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Moll Cell Biol* 14 (1994): 8166 – 8173

Shan, B., Xu, J., Zhuo, Y., Morris, C.A., Morris, G.F.: Induction of p53-dependent activation of the human proliferating cell nuclear antigen gene in chromatin by ionizing radiation. *J Biol Chem.* 278 (2003): 44009 - 44017

Slater, F.G., Stefan, C., Nobel, I., Orrenius, S.: The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1271 (1995): 59 - 62

Slaton, J.W., Karashima, T., Perrotte, P., Inoue, K., Kim, S.J., Izawa, J., Kedar, D., McConkey, D.J., Millikan, R., Sweeney, P., Yoshikawa, C., Shuin, T., Dinney, C.P.: Treatment with low-dose interferon-alpha restores the balance between matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 7 (2001): 2840 - 2853

Stal, O., Perez-Tenorio, G., Akerberg, L., Olsson, B., Nordenskjold, B., Skoog, L., Rutqvist, L.E.: Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res.* 5 (2003): R37 - 44

Staßen, T., Port, M., Nuyken, I., Abend, M.: Radiation-induced gene expression in MCF-7 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 5 (2003): 319 - 331

Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T., Cory, S.: DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79 (1994): 329 - 339

Sudo, T., Ota, Y., Kotani, S., Nakao, M., Takami, Y., Takeda, S., Saya, H.: Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells. *EMBO J.* 20 (2001): 6499 - 6508

Surawska, H., Ma, P.C., Salgia, R.: The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (2004): 419 - 433

Tanabe, M., Izumi, H., Ise, T., Higuchi, S., Yamori, T., Yasumoto, K., Kohno, K.: Activating transcription factor 4 increases the cisplatin resistance of human cancer cell lines. *Cancer Res.* 63 (2003): 8592 - 8595

Tepsiri, N., Chaturat, L., Sripan, B., Namwat, W., Wongkham, S., Bhudhisawasdi, V., Tassaneeyakul, W.: Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 11(2005): 2748 - 2753

- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.:** Caspases: Enemies within. *Sciences* 281 (1998): 1312 - 1316
- Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G.R., Bishop, J.M.:** c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size *Nature*. 414 (2001): 768 - 773
- Tucker, J.D., Nath, J., Hando J.C.:** Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. *Human Genetics* 97 (1996): 471-475
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G.:** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001): 5116 - 5121
- Vanegas, O.C., Zhang, R.Z., Sabatelli, P., Lattanzi, G., Bencivenga, P., Giusti, B., Columbaro, M., Chu, M.L., Merlini, L., Pepe, G.:** Novel COL6A1 splicing mutation in a family affected by mild Bethlem myopathy. *Muscle Nerve*. 4 (2002): 513 - 519
- Vaux, D.L.:** Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993): 786 - 789
- Viaggi, S., Bonatti, S., Abbondandolo, A.:** New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 2 (1987): 367 - 370
- Voehringer, D.W., Hirschberg, D.L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C.B., Herzenberg, L.A., Steinman, L.:** Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000): 2680 - 2685
- Wagner A.J., Small, M.B., Hay, N.:** Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of Bcl₂. *Mol Cell Biol* 13 (1993): 2432 – 2440
- Walker, P.R., Pandey, S., Sikorska, M.:** Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death and Differentiaton* 2 (1995): 97 - 104

Wang, F., Cao, Y., Zhao, W., Liu, H., Fu, Z., Han, R.: Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression. *J Pharmacol Sci.* 93 (2003): 197-203

Wang, K., Gan, L., Jeffery, E., Gayle, M., Gown, A.M., Skelly, M., Nelson, P.S., Ng, W.V., Schummer, M., Hood, L., Mulligan, J.: Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* 229 (1999): 101 - 108

Wang, Q., Wu, L.M., Zhao, Y., Zhang, X.L., Wang, N.P.: The anticancer effect of artesunate and its mechanism. *Yao Xue Xue Bao.* 37(2002): 477 - 478

Wang, Y., Cheong, N., Iliakis, G.: Persistent inhibition of DNA synthesis in irradiated rat embryo fibroblasts expressing the oncogenes H-ras plus v-myc derives from inhibition of replicon initiation and is mitigated by staurosporine. *Cancer Res.* 53(1993): 1213 - 1217

Weaver, D.A., Crawford, E.L., Warner, K.A., Elkhairi, F., Khuder, S.A., Willey, J.C.: ABCC5, ERCC2, XPA and XRCC1 transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer.* 4 (2005): 18

Wertz, I.E., Hanley, M.R.: Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS* 21 (1996): 359 - 364

Xie, L., Qin, W.X., He, X.H., Shu, H.Q., Yao, G.F., Wan, D.F., Gu J.R.: Differential gene expression in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells induced by apoptosis-related gene BNIPL-2. *World J Gastroenterol.* 10 (2004): 1286-1291

Xu, J., Morris, G.F.: p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol Cell Biol.* 19 (1999): 12-20

Yang, C.R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J.J., Kinsella, T.J., Boothman, D.A.: Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (2000): 5907 - 5912

Yang, H., Rouse, J., Lukes, L., Lancaster, M., Veenstra, T., Zhou, M., Shi, Y., Park, Y.G., Hunter, K.: Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: a prototype molecule for prophylaxis of metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 21 (2004): 719 - 735

Yang, I.V., Chen, E., Hasseman, J.P., Liang, W., Frank B.C., Wang, S., Sharov, V., Saeed, A.I., White, J., Li, J., Lee, N.H., Yeatman, T.J., Quackenbush, J.: Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol.* 11 (2002): research 0062

Yarnell, A.T., Oh, S., Reinberg, D., Lippard, S.J.: Interaction of FACT, SSRP1, and the high mobility group (HMG) domain of SSRP1 with DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *J Biol Chem.* 276 (2001): 25736 - 25741

Zhang, Y., Lin, Y., Bowles, C., Wang, F.: Direct cell cycle regulation by the fibroblast growth factor receptor (FGFR) kinase through phosphorylation-dependent release of Cks1 from FGFR substrate 2. *J Biol Chem.* 279 (2004): 55348 - 55354

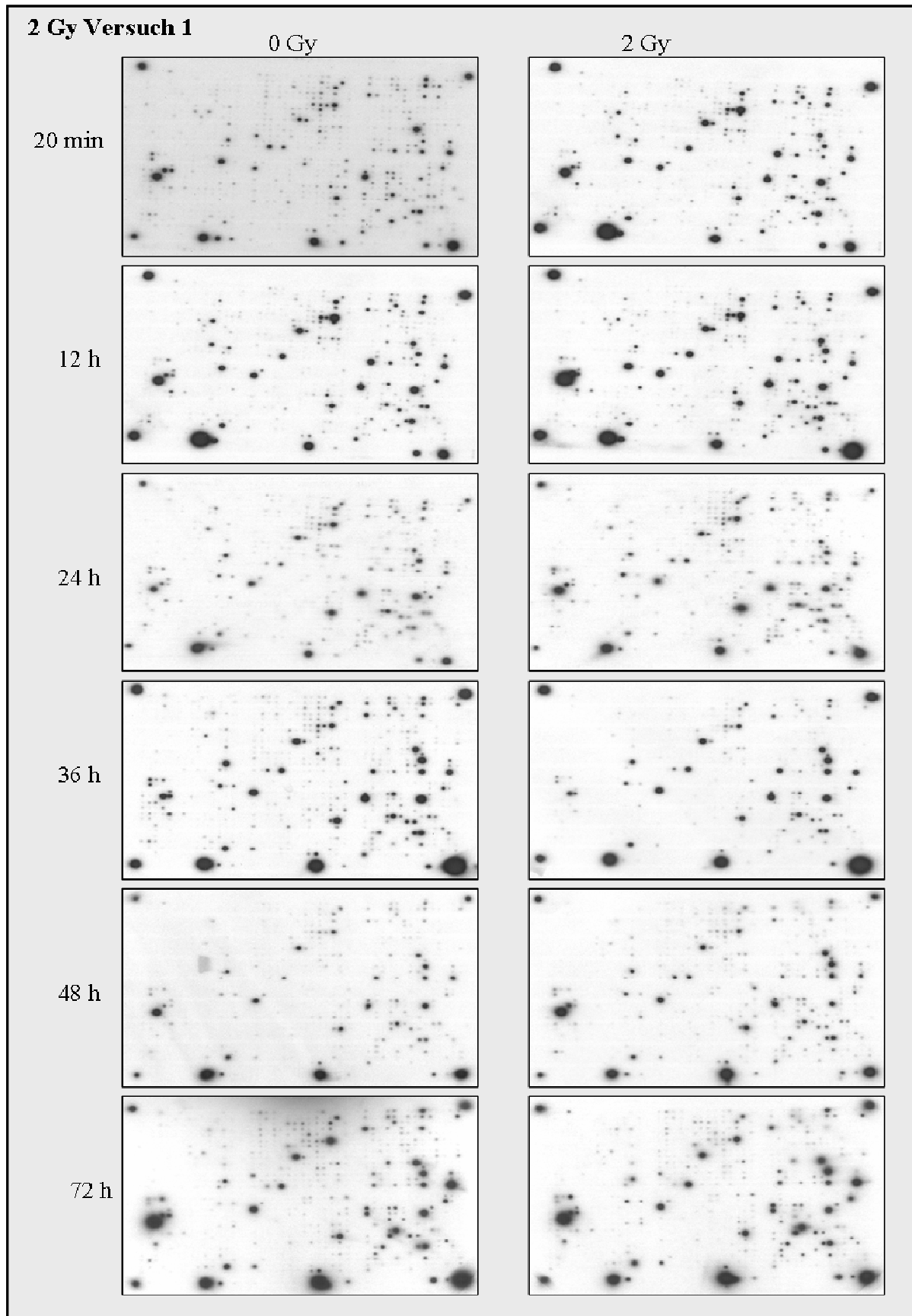


Abb. 8.1 Autoradiographie der Hybridisierungsergebnisse der cDNA-Proben eines Bestrahlungsexperimentes. (2 Gy, Versuch 1). Die Proben wurden auf eine Nylonmembran hybridisiert, die mit immobilisierten cDNA-Spezies bestückt ist. Die unterschiedlichen Graustufen der punktförmigen Hybridisierungen korrelieren mit der Anzahl entsprechender mRNA-/cDNA-Spezies der Proben.

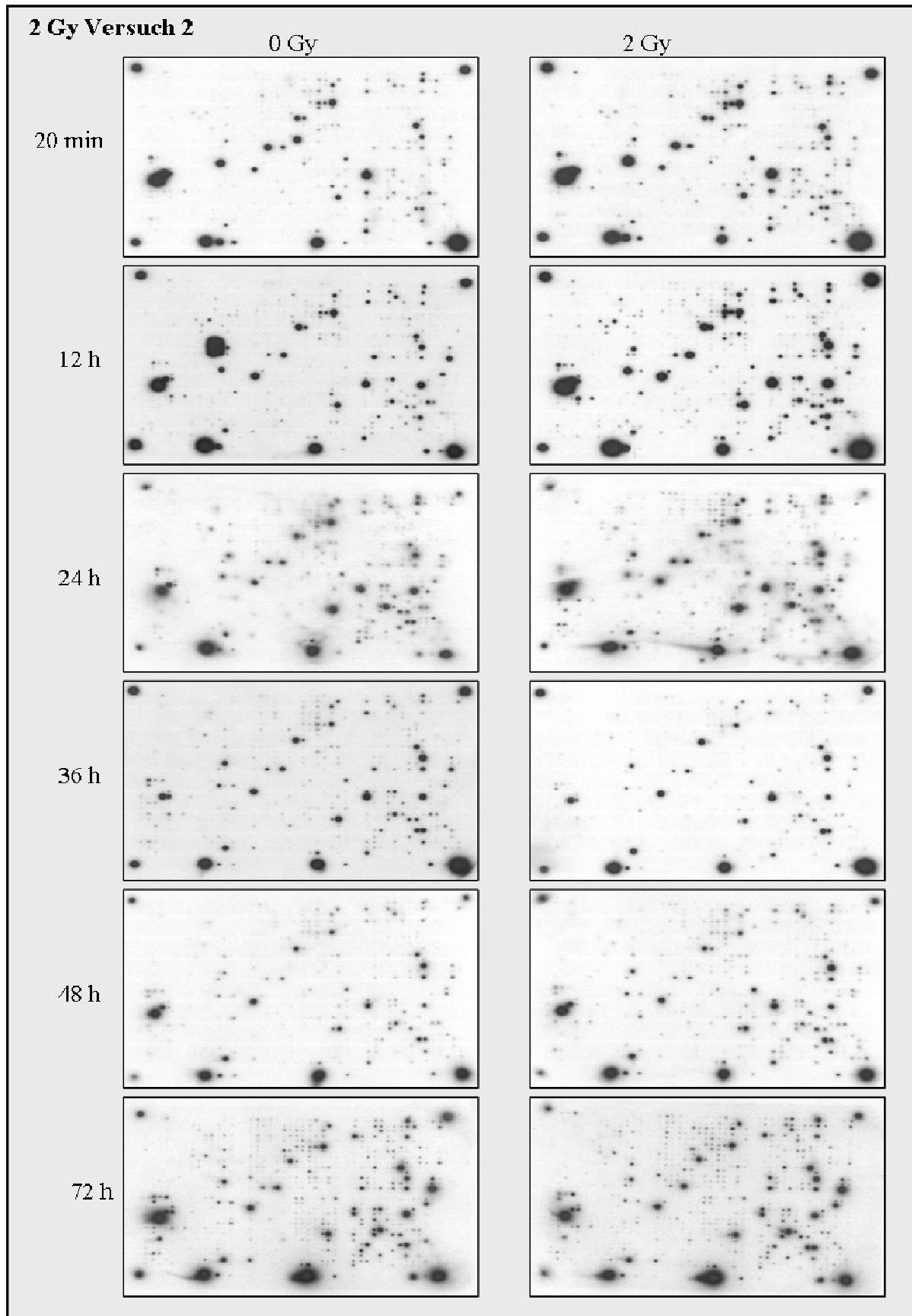


Abb. 8.2 Autoradiographie der Hybridisierungsergebnisse der cDNA-Proben eines Bestrahlungsexperimentes (2 Gy, Versuch 2). Die Proben wurden auf eine Nylonmembran hybridisiert, die mit immobilisierten cDNA-Spezies bestückt ist. Die unterschiedlichen Graustufen der punktförmigen Hybridisierungen korrelieren mit der Anzahl entsprechender mRNA-/cDNA-Spezies der Proben.

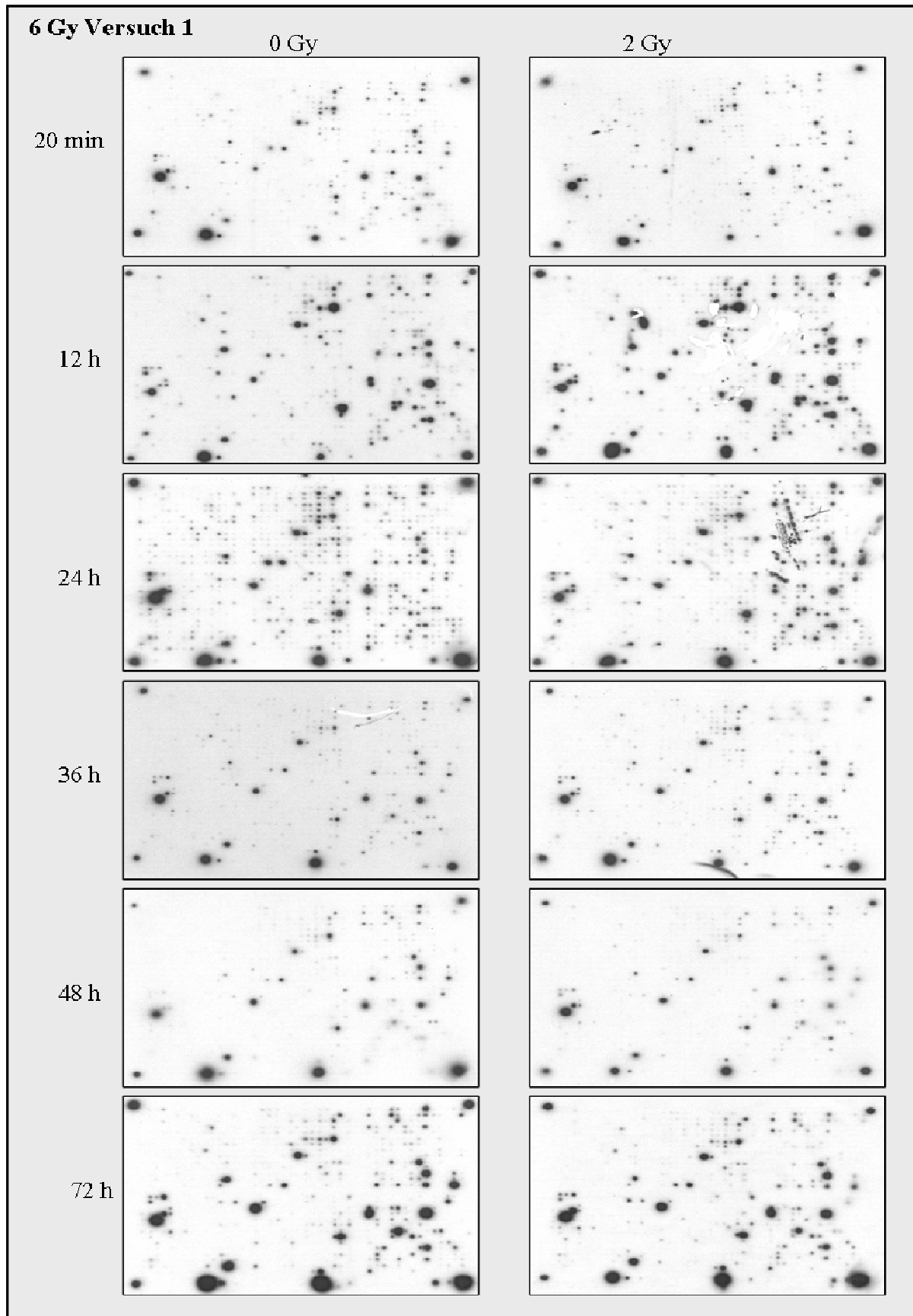


Abb. 8.3 Autoradiographie der Hybridisierungsergebnisse der cDNA-Proben eines Bestrahlungsexperimentes (6 Gy, Versuch 1). Die Proben wurden auf eine Nylonmembran hybridisiert, die mit immobilisierten cDNA-Spezies bestückt ist. Die unterschiedlichen Graustufen der punktförmigen Hybridisierungen korrelieren mit der Anzahl entsprechender mRNA-/cDNA-Spezies der Proben.

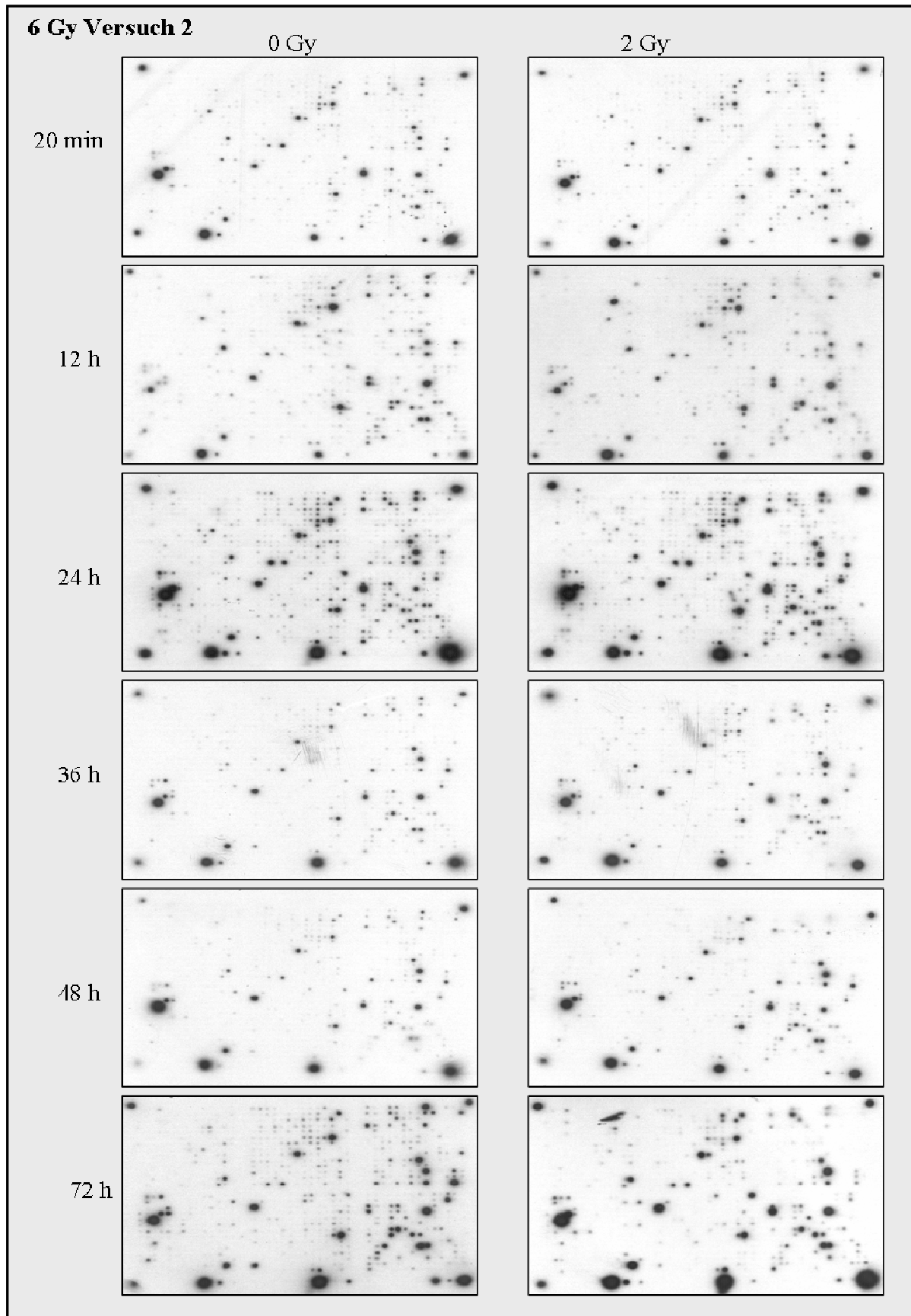


Abb. 8.4 Autoradiographie der Hybridisierungsergebnisse der cDNA-Proben eines Bestrahlungsexperimentes (6 Gy, Versuch 2). Die Proben wurden auf eine Nylonmembran hybridisiert, die mit immobilisierten cDNA-Spezies bestückt ist. Die unterschiedlichen Graustufen der punktförmigen Hybridisierungen korrelieren mit der Anzahl entsprechender mRNA-/cDNA-Spezies der Proben.

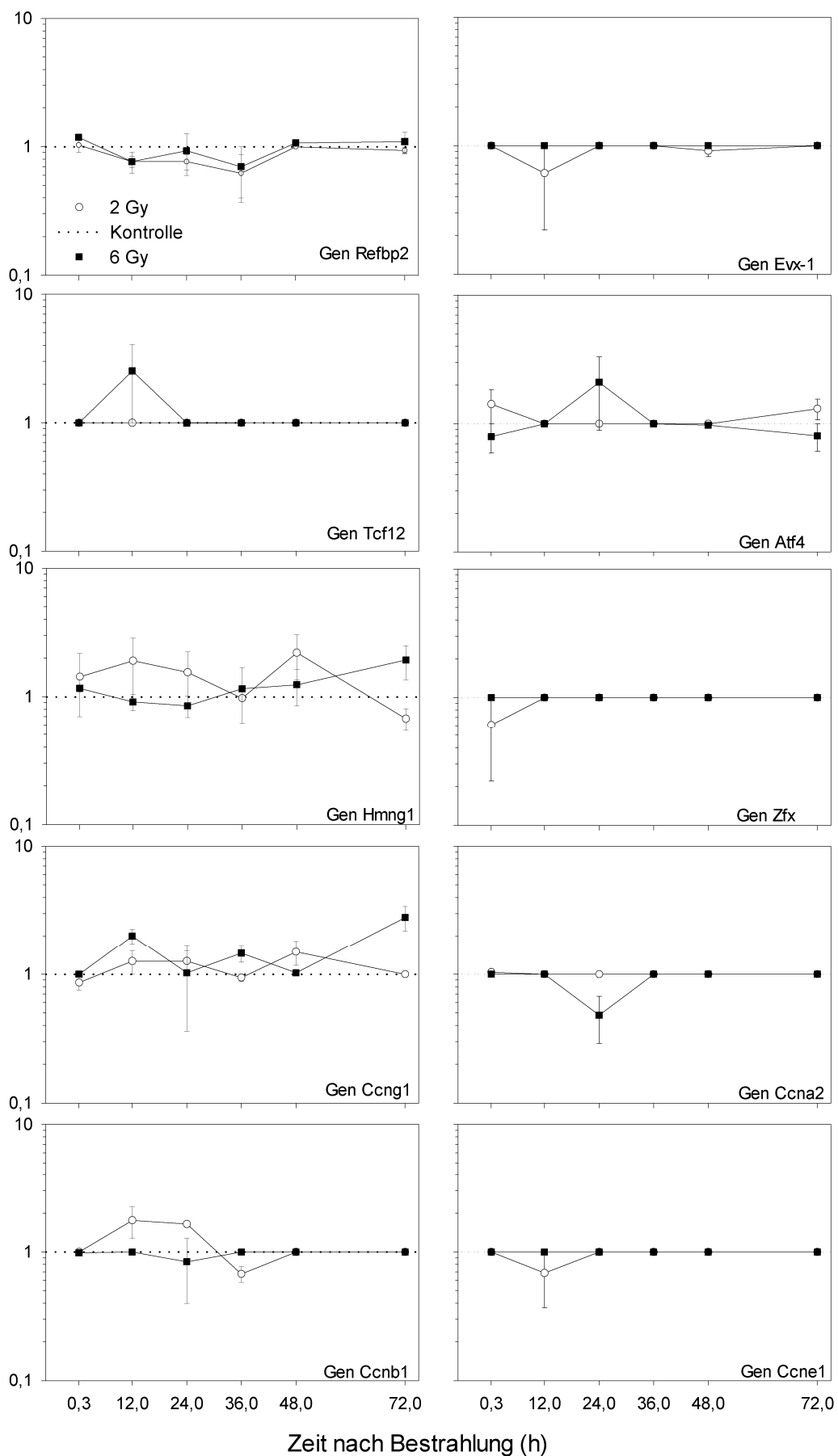


Abb. 8.5 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

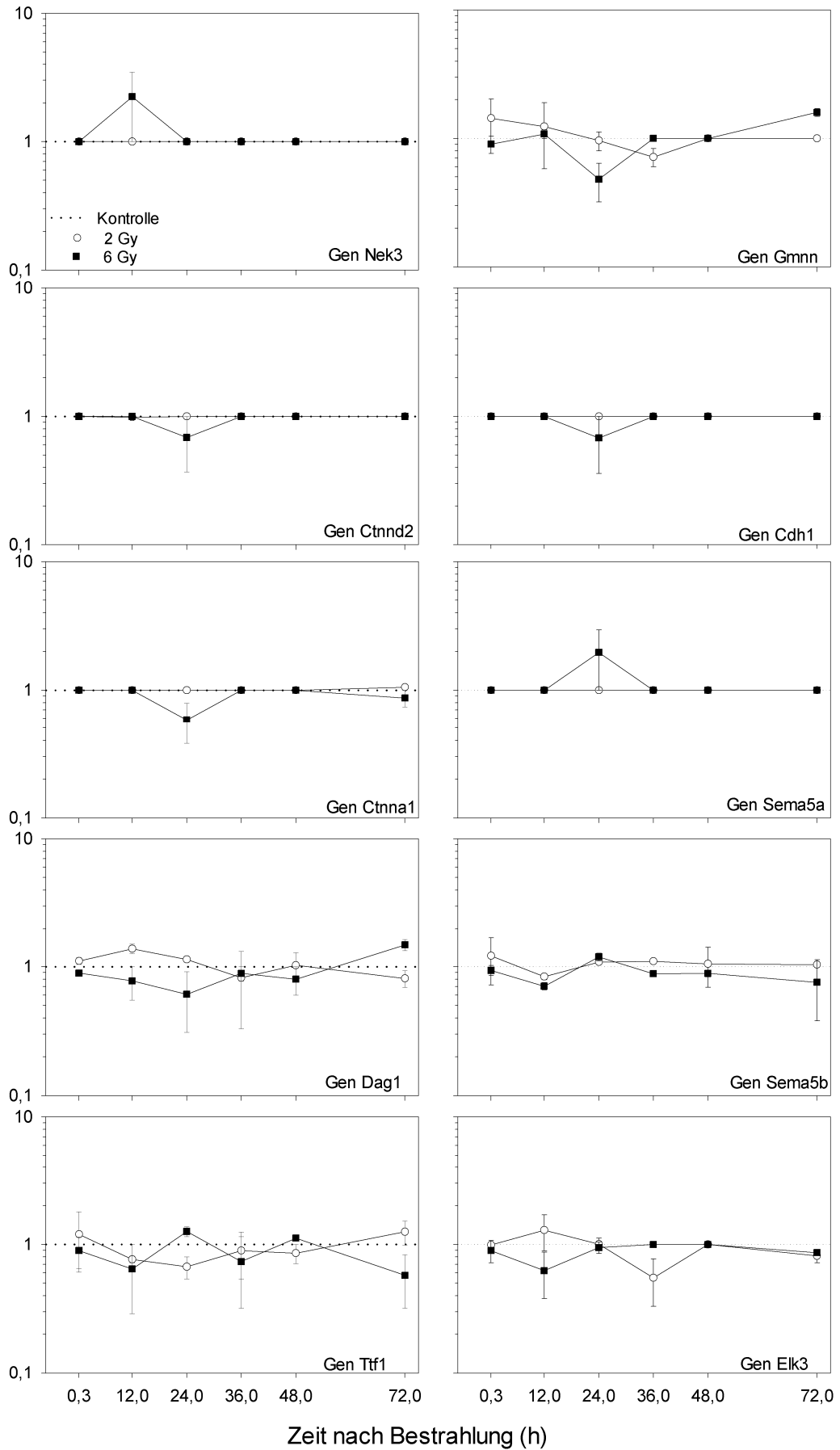


Abb. 8.6 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

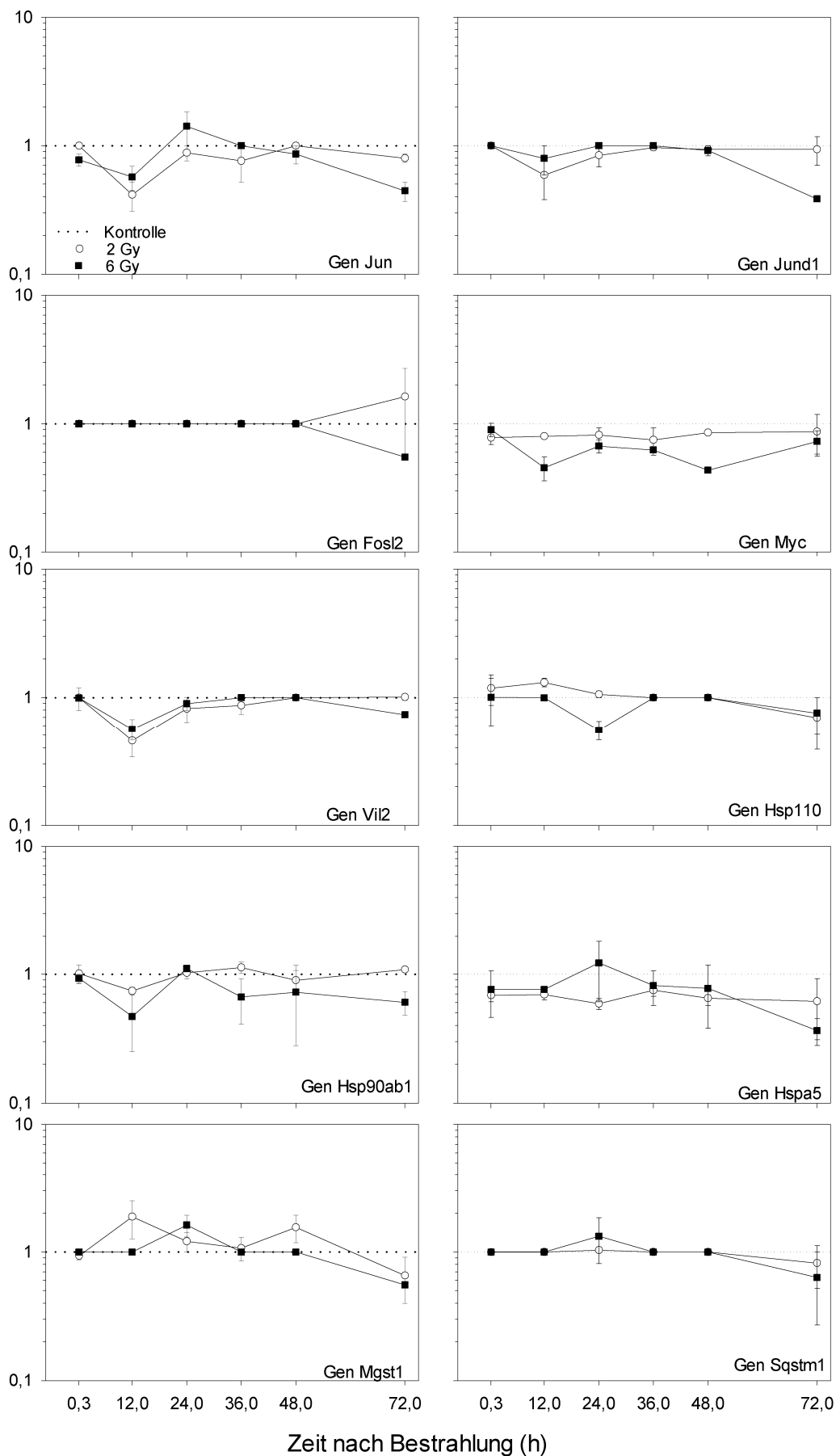


Abb. 8.7 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

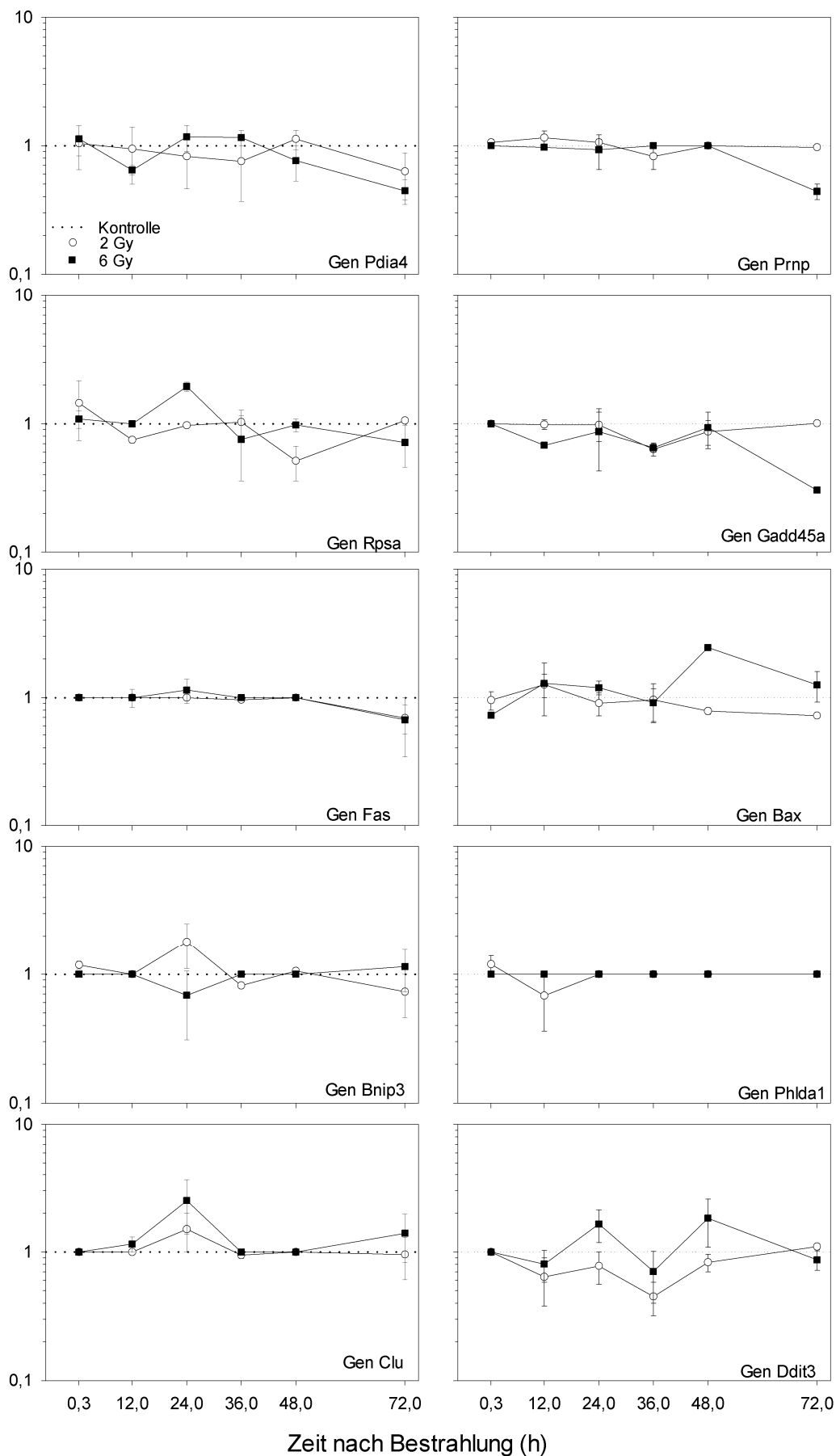


Abb. 8.8 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.2.1 beschrieben.

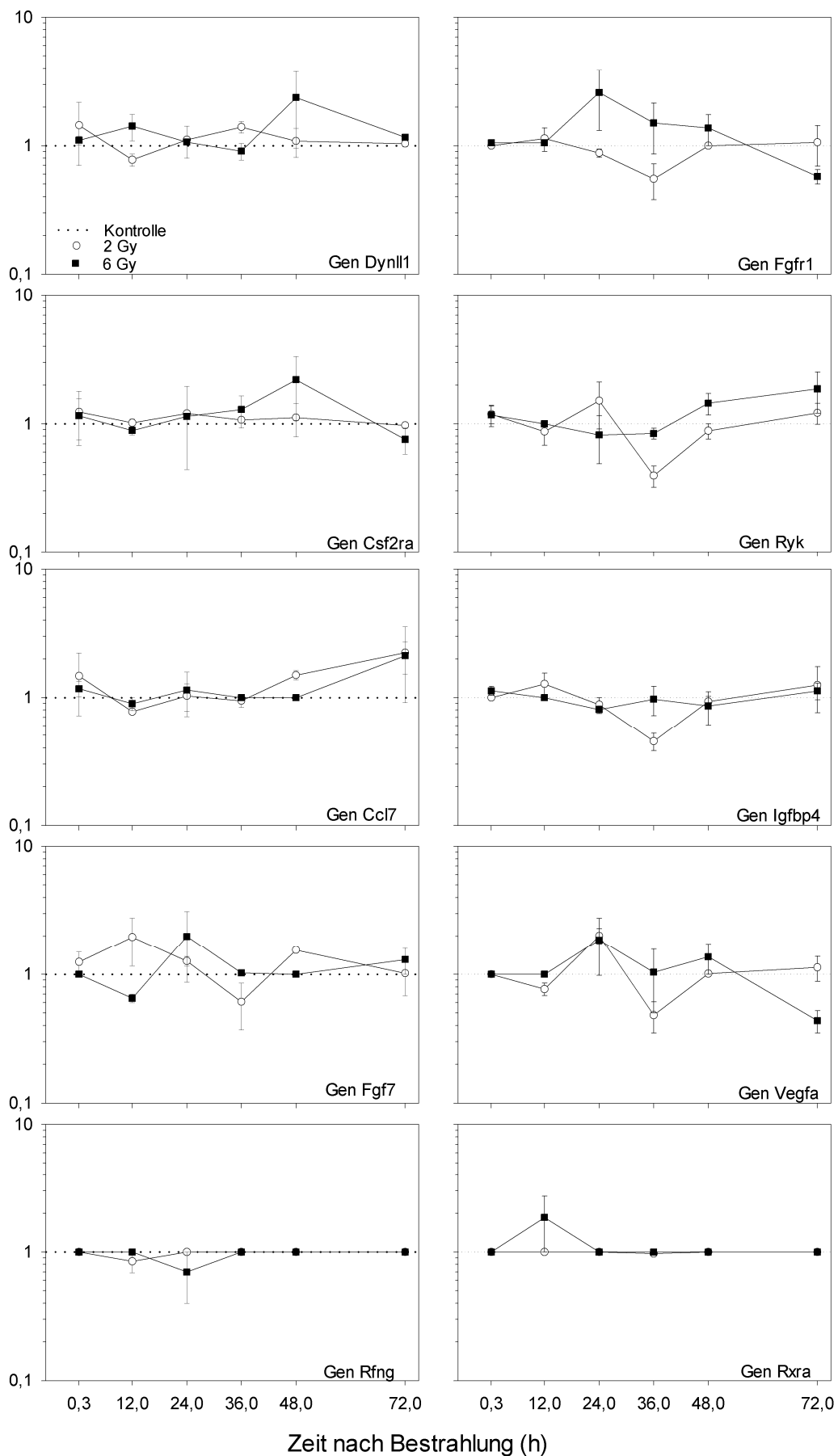


Abb. 8.9 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

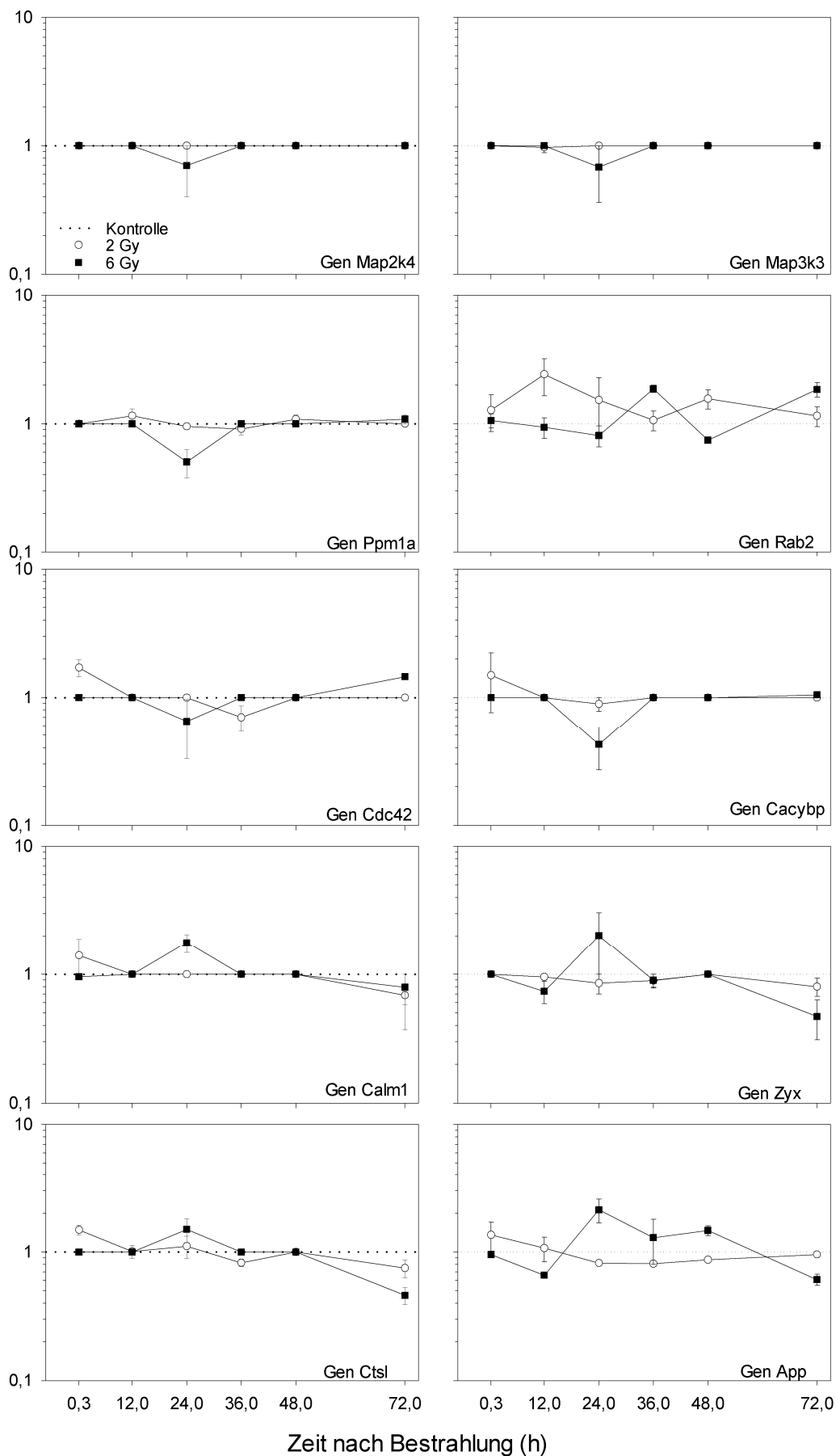


Abb. 8.10 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

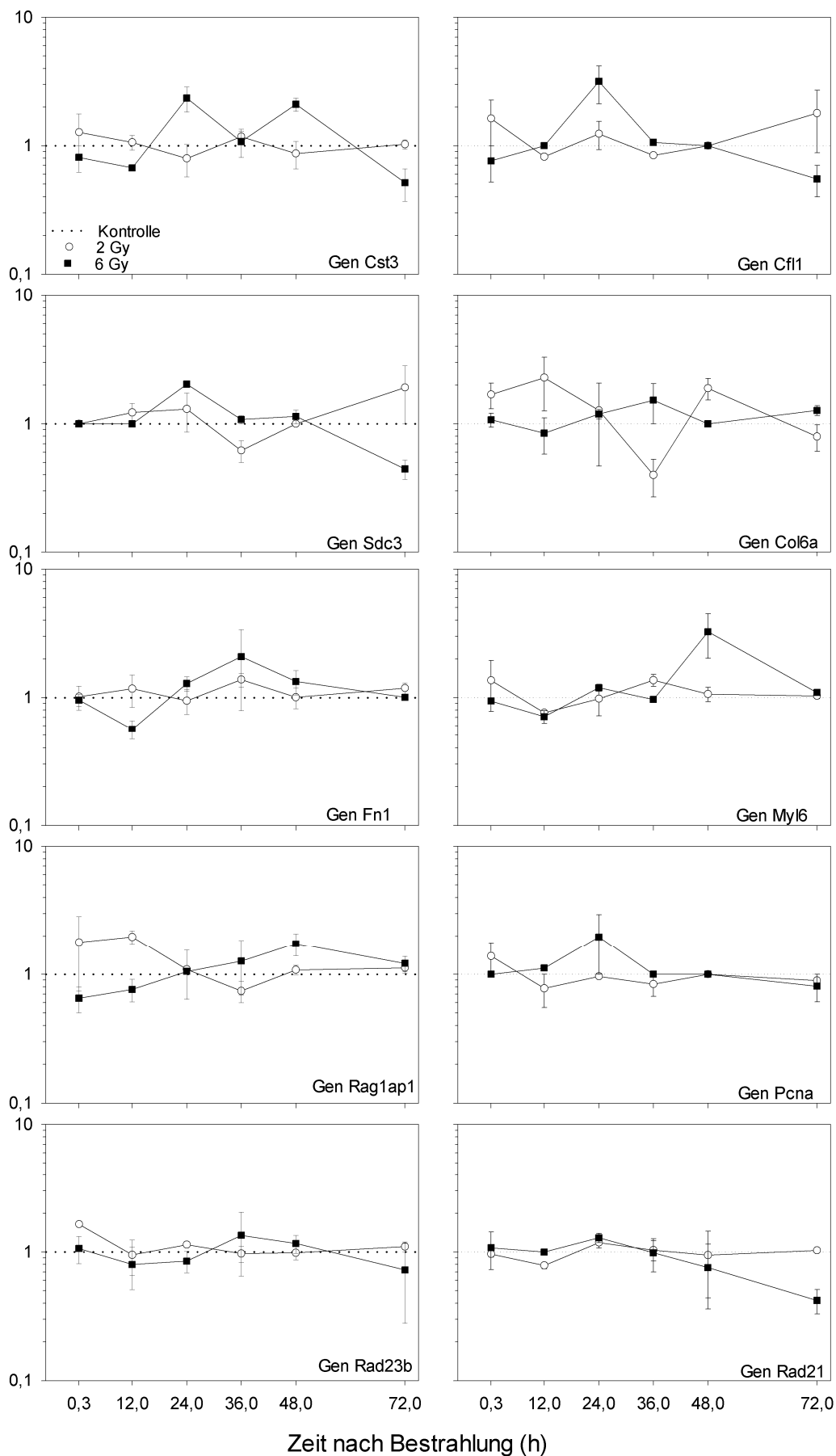


Abb. 8.11 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

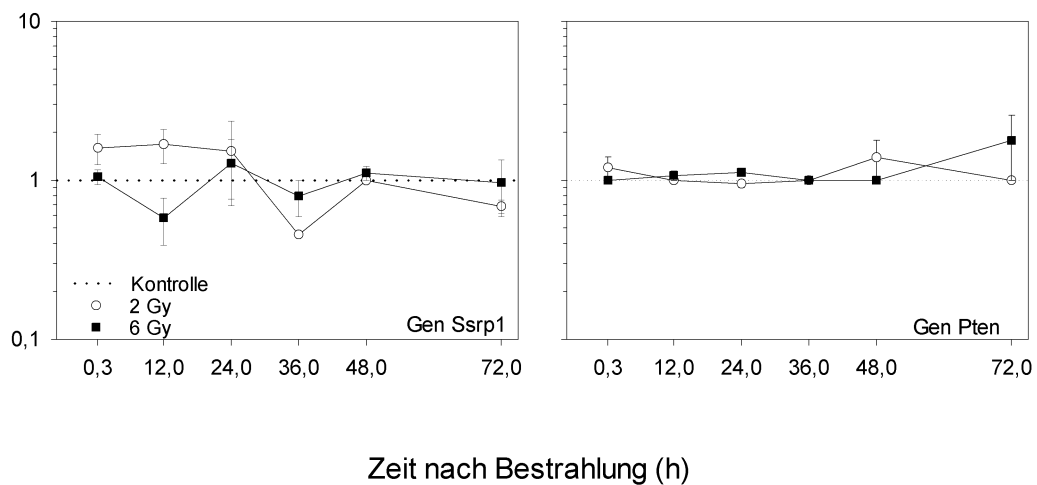
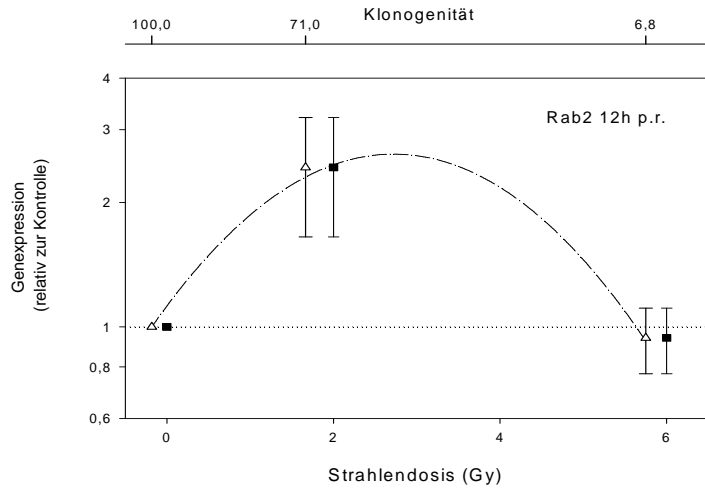
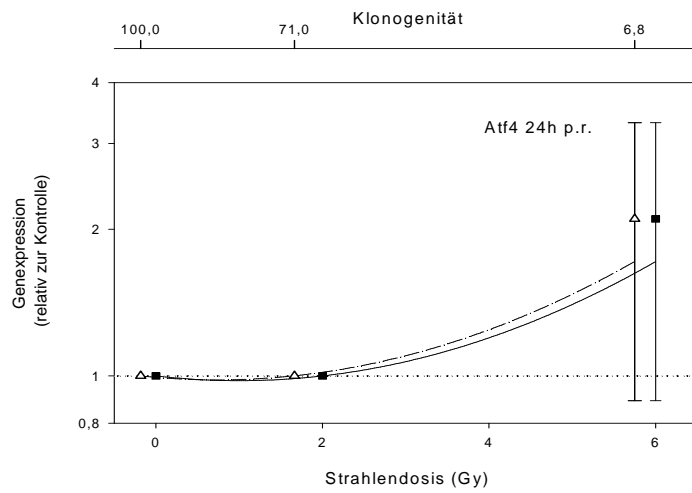


Abb. 8.12 Darstellung der Genexpression nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy. Die Symbole stellen die Mittelwerte mit Fehlerbalken (Maximum/Minimum) aus beiden Versuchen dar. Die Auswahlkriterien für diese Gene sind in Kap. 4.2.2.1.1 beschrieben.

Gruppe 1



Gruppe 2



Gruppe 3

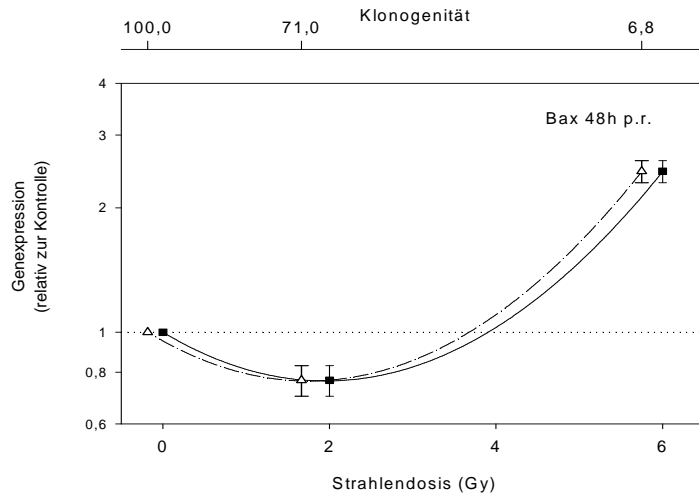


Abb. 8.13 Grafische Darstellung der differentiellen Genexpression der Gene Rab2, Atf4 und Bax zu einem Zeitpunkt nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis (durchgängige Linie/Symbol:Rechteck) und der Klonogenität (unterbrochene Linie/Symbol:Dreieck). Dargestellt ist der Durchschnitt der differentiellen Genexpression des Gens zu diesem Zeitpunkt mit Fehlerbalken (Maximalwert und Minimalwert). Die Linie beschreibt die Genexpressionsdaten mit einer Regression zweiter Ordnung. Es handelt sich um Gene, die für die biologische Dosimetrie besonders geeignet scheinen. Die Einordnung in die Gruppen und die Auswahl der Gene ist in Kap. 4.2.2.1.2 beschrieben.

Gruppe 4

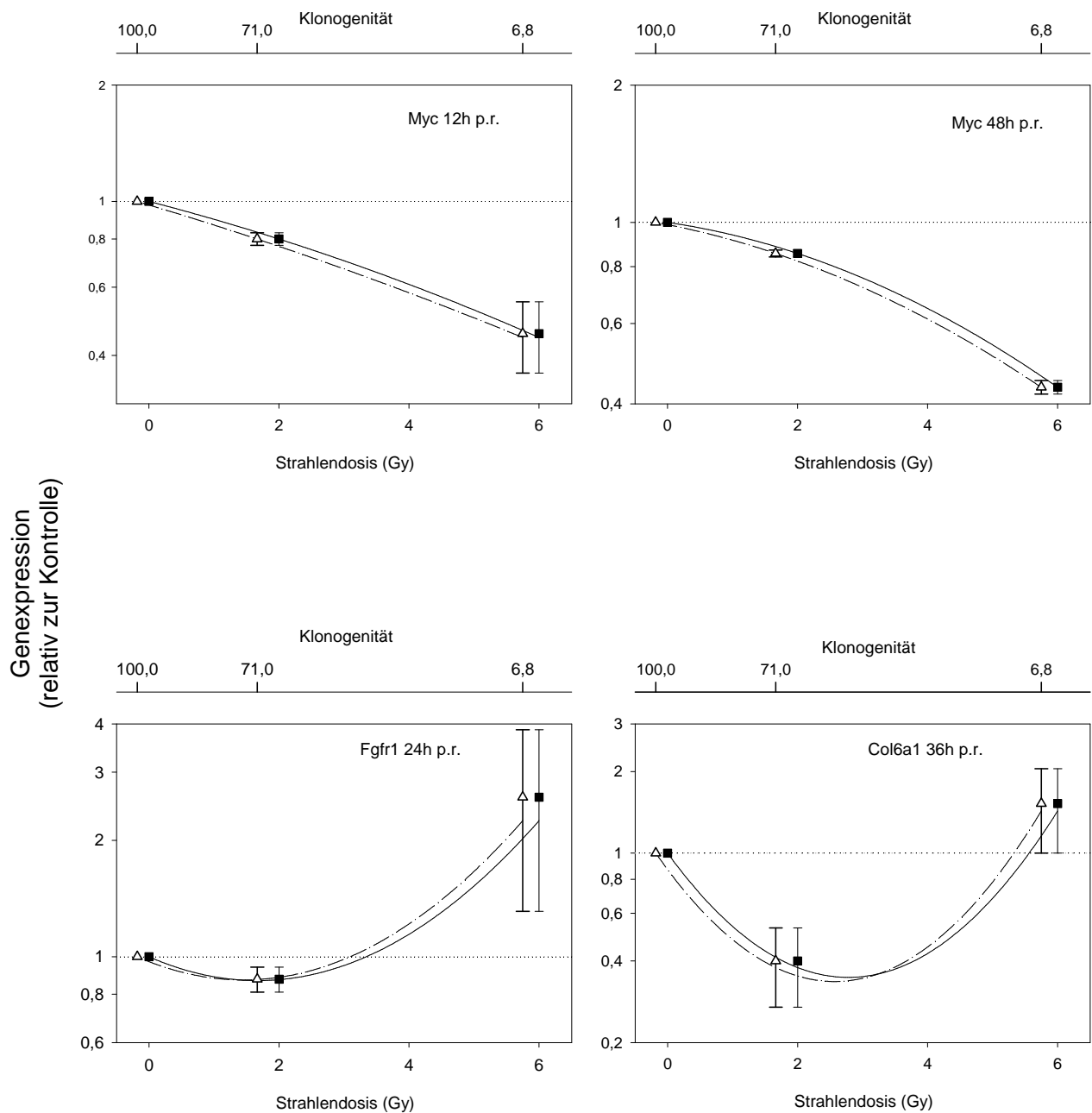


Abb. 8.14 Grafische Darstellung der differentiellen Genexpression des Myc Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten, der Gene Fgfr1 und Col6a1 zu einem Zeitpunkt nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis (durchgängige Linie/Symbol:Rechteck) und der Klonogenität (unterbrochene Linie/Symbol:Dreieck). Dargestellt ist jeweils der Durchschnitt der differentiellen Genexpression des Gens zu diesem Zeitpunkt mit Fehlerbalken (Maximalwert und Minimalwert). Die Linie beschreibt die Genexpressionsdaten mit einer Regression zweiter Ordnung. Es handelt sich um Gene, die für die biologische Dosimetrie besonders geeignet scheinen. Die Einordnung in die Gruppe und die Auswahl der Gene ist in Kap. 4.2.2.1.2 beschrieben.

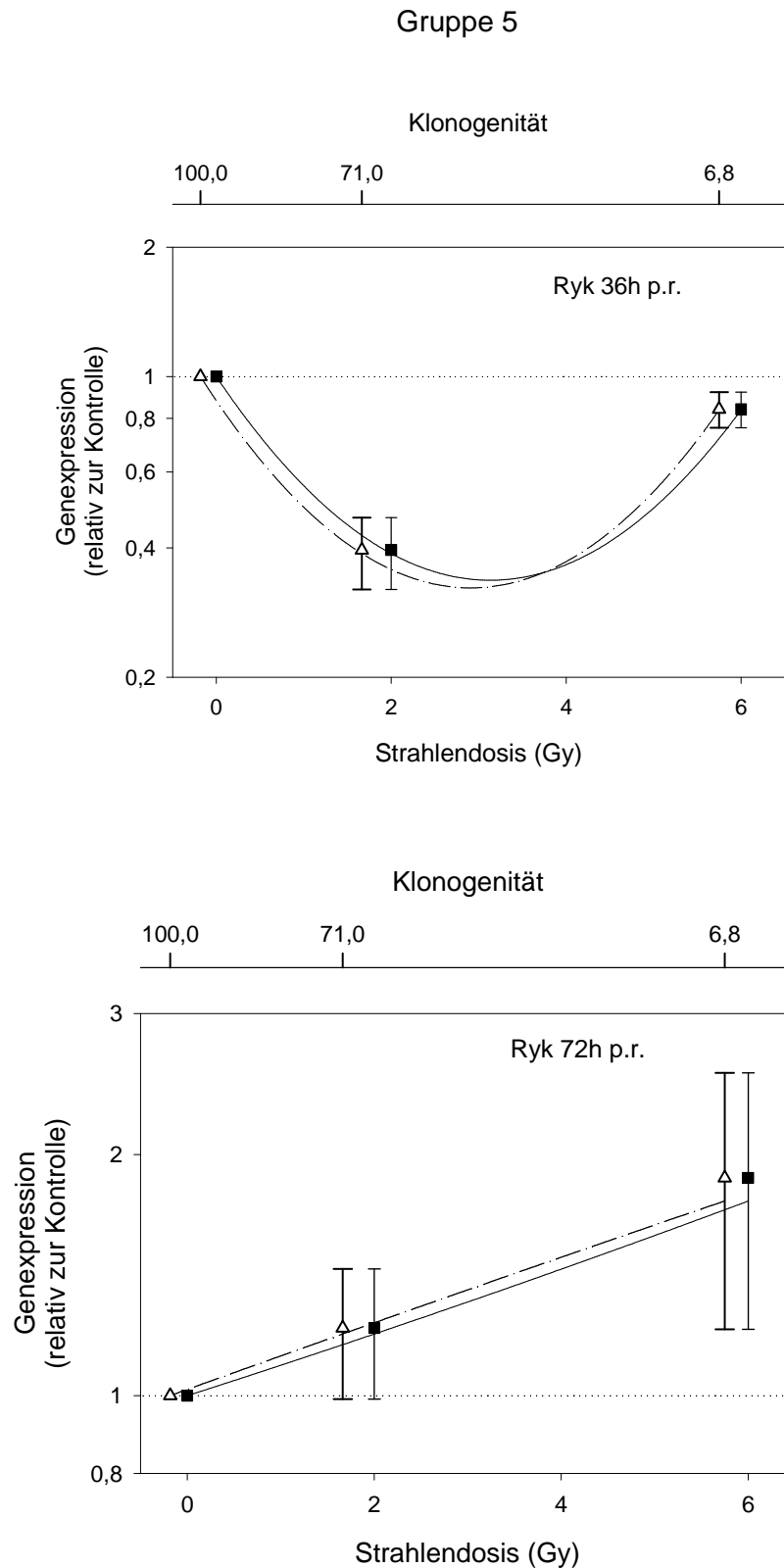


Abb. 8.15 Grafische Darstellung der differentiellen Genexpression des Ryk Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Strahlendosis (durchgängige Linie/Symbol:Rechteck) und der Klonogenität (unterbrochene Linie/Symbol:Dreieck). Dargestellt ist der Durchschnitt der differentiellen Genexpression des Gens zu diesem Zeitpunkt mit Fehlerbalken (Maximalwert und Minimalwert). Die Linie beschreibt die Genexpressionsdaten mit einer Regression zweiter Ordnung. Es handelt sich um ein Gen, das für die biologische Dosimetrie besonders geeignet scheint. Die Einordnung in die Gruppe und die Auswahl der Gene ist in Kap. 4.2.2.1.2 beschrieben.

Danksagung

Am Schluss der Arbeit ist es mir ein besonderes Anliegen, mich bei all denjenigen zu bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Molls für die Vertretung der Arbeit an der Technischen Universität München.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. D. van Beuningen und seinem Nachfolger Herrn PD Dr. V. Meineke für die freundliche Aufnahme im Institut für Radiobiologie an der Sanitätsakademie der Bundeswehr und die Bereitstellung der benötigten Materialien.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M. Abend für die Überlassung des Themas, die kompetente Betreuung während der Durchführung und der Korrektur der Arbeit. Er vermittelte mir das wissenschaftliche Arbeiten, anhand seiner wertvollen Ratschläge entwickelte ich eine Vorstellung über „Ästhetik“ in der wissenschaftlichen Literatur. Ich freue mich auf unsere zukünftige Zusammenarbeit.

Herrn Dr. M. Port möchte ich ganz herzlich danken für die angenehme Zusammenarbeit, die Hilfestellungen während der Durchführung der Arbeit und die Anleitung bei Computerproblemen aller Art.

Den nicht namentlich genannten Institutsmitgliedern danke ich für die Unterstützung und die freundliche Aufnahme im Institut.

Meinen Eltern Gerlinde und Heinrich Ruf, meinem Bruder Mathias sowie meiner Tante und meinem Onkel, Hannelore und Alfons Erbacher und meinen Großeltern danke ich für die Unterstützung und das Interesse an meinem Werdegang. Durch ihren liebevollen Rückhalt und viele ermutigende Worte ermöglichten sie mir das Studium und den Abschluss dieser Arbeit.

Ich möchte es nicht versäumen, mich bei meiner Freundin sowie allen Freunden, die mich bei der Durchführung der Arbeit auf so viele Arten unterstützt haben, zu bedanken.

Lebenslauf

Christian Ruf

Geburtsdatum	21. Januar 1978
Geburtsort	Langen / Hessen
Eltern	Heinrich Ruf, geb. 1948, Verwaltungsdirektor Gerlinde Ruf, geb. Schuster geb. 1945, Hausfrau
Geschwister	Mathias Ruf, geb. 1982
1984 bis 1988	Ludwig-Erk-Grundschule Dreieichenhain
1988 bis 1997	Ricarda-Huch-Gymnasium in Sprendlingen
Juli 1997 bis Oktober 1998	Grundausbildung und Lehrgänge im Sanitätsdienst der Deutschen Bundeswehr
November 1998 bis Oktober 2000	Vorklinischer Abschnitt des Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
November 2000 bis November 2004	Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Technischen Universität München
Oktober 2001	Beginn der Promotion am Institut für Radiobiologie (Leiter: PD Dr. V. Meineke) an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München
November 2004	Approbation als Arzt Assistenzarzt am Bundeswehrkrankenhaus Hamburg, Abteilung für Urologie