

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

Strahleninduzierte Genexpressionsänderung in peripheren mononukleären Zellen:

Quantitative PCR-Untersuchungen an einem modifizierten In-vitro-Modell

Roland Brosow

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. apl. Prof. Dr. M. Abend
2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 11.10.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.06.2011 angenommen.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Verzeichnis der untersuchten Gene	IX
1 EINLEITUNG	1
2 STAND DES WISSENS	3
2.1 Notwendigkeit der Biodosimetrie	3
2.2 Verschiedene Verfahren der Biodosimetrie	5
2.2.1 Zytogenetische Verfahren	5
2.2.2 Die Elektronenspinresonanz-Messung	9
2.2.3 Die Sequentialdiagnostik	10
2.2.4 Untersuchung metabolischer und anderer Parameter	11
2.2.5 Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray	13
2.3 Funktionsweise der Polymerase-Kettenreaktion	14
2.3.1 Die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.3.2 Die quantitative PCR im Realtime-Verfahren (RT Q-PCR)	18
2.3.3 Eigenschaften von Primer-Probe-Designs (PPD)	23
2.3.4 Normalisierung mittels Haushaltsgenen	24
2.4 Beschreibung der untersuchten Gene	24
2.4.1 „Activating Transcription Factor 3“ (ATF3)	24
2.4.2 „BCL-2 -associated X Protein“ (BAX)	27
2.4.3 „Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1 A“ (CDKN1A) / p21	29
2.4.4 „Damaged DNA binding Protein 2“ (DDB2) / p48	30
2.4.5 „Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 45 A“ (GADD45A)	32
2.4.6 „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA)	33
3 MATERIAL UND METHODEN	36
3.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	36
3.1.1 Reagenzien und deren Bezugsquellen	36
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen	38
3.1.3 Laborgeräte und deren Hersteller	39
3.2 Blutprobengewinnung und Bestrahlung	41
3.3 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	43
3.3.1 Die RNA-Isolation	43
3.3.2 Qualitätskontrolle der RNA	44
3.3.3 Die cDNA-Synthese	48
3.3.4 Qualitätskontrolle der cDNA	50

3.4 Vorbereitungen für die RT Q-PCR	50
3.4.1 Definition des „Threshold Cycle“ (Ct)	50
3.4.2 Funktionsweise von Standardreihen und deren Herstellung	52
3.4.3 Verdünnung der cDNA-Proben für die RT Q-PCR	53
3.5 Durchführung der RT Q-PCR	54
3.5.1 Allgemeine Versuchsgrundlagen	54
3.5.2 Aufbereitung der cDNA-Proben	55
3.5.3 Ansatz der Synthese-Chemie	55
3.5.4 Ablauf der eigentlichen Reaktion	57
3.5.5 Darstellung der Messwerte in Amplifikationsplots	59
3.6 Auswertung der Messergebnisse der RT Q-PCR	60
3.6.1 Quantifizierung mittels Standardkurve	60
3.6.2 Berechnung der normalisierten Genexpression	61
3.6.3 Berechnung der differentiellen Genexpression	62
3.6.4 Weitere Berechnungen und statistische Auswertungen	63
4 ERGEBNISSE	64
4.1 Beschreibung der demographischen Daten und des Blutbildes	64
4.2 Darstellung der Messergebnisse der RT Q-PCR	66
4.2.1 Beschreibung der Rohdaten	66
4.2.2 Ergebnisse der normalisierten Genexpression	66
4.2.3 Ergebnisse der differentiellen Genexpression	71
4.2.4 Kolinearität zwischen den Zielgenen	77
4.3 Einfluss der Bestrahlung auf die Höhe der Genexpression	79
4.4 Bedeutung nicht-strahlenbedingter Variablen	82
4.4.1 Auswirkungen der Inkubationszeit und des In-vitro-Modells	82
4.4.2 Einfluss der demographischen Parameter und des differentiellen Blutbildes	83
5 DISKUSSION	90
5.1 Zielsetzung der Arbeit	90
5.2 Besonderheiten der Methodik	92
5.3 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen der etablierten Modelle	93
5.3.1 Studien zur Expressionsänderung von ATF3	96
5.3.2 Studien zur Expressionsänderung von BAX	96
5.3.3 Studien zur Expressionsänderung von CDKN1A	97
5.3.4 Studien zur Expressionsänderung von DDB2	99
5.3.5 Studien zur Expressionsänderung von GADD45A	100
5.3.6 Studien zur Expressionsänderung von PCNA	101

5.4 Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse	102
5.4.1 Auswirkung des modifizierten In-vitro-Modells	102
5.4.2 Effekt der verwendeten Strahlenart	103
5.4.3 Einfluss von pathologischen Zelltypen	104
5.4.4 Einfluss von Lymphozyten-Subpopulationen	105
5.4.5 Einfluss der Monozyten-Konzentration	105
6 ZUSAMMENFASSUNG	109
7 LITERATURVERZEICHNIS	110
8 ANHANG	126
8.1 Ergebnisse der RNA-Qualitätskontrolle mittels Spektralphotometrie	126
8.2 Auswertung der Standardkurven der RT Q-PCR	130
8.3 Ergebnisse der normalisierten Genexpression	131
8.4 Ergebnisse der differentiellen Genexpression	133
8.5 Kolinearität zwischen den Zielgenen	135
8.6 Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Genexpression	139
8.7 Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit und der Genexpression	140
8.8 Zusammenhang zwischen weiteren Parametern und der Genexpression	141
8.9 Einflussfaktoren auf die Genexpression im verwendeten In-vitro-Modell	167
9 DANKSAGUNG	168
10 LEBENSLAUF	169

Ø	Mittelwert
#	Anzahl bzw. absolute Häufigkeit
%	relative Häufigkeit
°C	Grad Celsius
Δ	Delta bzw. Differenz
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
6-4PP	Pyrimidin(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukt
Abb.	Abbildung
ACTB	β-Aktin
AP	Activator Protein
aqua dest.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASPP	Apoptosis-stimulating Protein of p53 Protein
AT	Ataxia-Telangiectasia (-Proteinkinase)
ATF	activating Transcription Factor
ATM	AT-mutated (-Proteinkinase)
BAD	BCL-2 -Antagonist of Cell Death
BAK	BCL-2 -Antagonist / Killer Protein
BAX	BCL-2 -associated X Protein
BCL	B-Cell Lymphoma Protein
BCL2L11	BCL-2 -like 11 Apoptosis Facilitator
BER	Basenexzisionsreparatur
BH	BCL-2 -homology Domain
BHQ1	Black Hole Quencher 1
BID	BH3-interacting Domain Death Agonist
BIK	BCL-2 -interacting Killer
bp	(Anzahl der Nukleotid-) Basenpaare
bZIP	„Leucin-Zipper“-Basis
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	kutanen Organsystem nach METREPOL
CAMKK2	Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2
C _t	Threshold Cycle
C _v	Variationskoeffizient
C/EBP	CCAAT / Enhancer binding Protein
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding-Protein
CCAAT	(Nukleotid-Sequenz aus) Cytosin, Cytosin, Adenosin, Adenosin und Thymin
CCD	Charge-coupled Device
CDK	Cyclin-dependent Kinase (zyklinabhängige Kinase)
CDKN1A	CDK Inhibitor 1A

cDNA	complementary DNA
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CPT	Cell Preparation Tube
CR6	compensatory Response 6 (-Protein)
CREB	cAMP responsive Element binding (-Protein)
CSF	Colony-stimulating Factor
Cy 5	Cyanin-5
D	Dosis
DDB	damaged DNA binding (-Protein)
DDIT3	DNA damage inducible Transcript 3 (-Protein)
DNA	deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEO	Elektroendosmose
EF2	Elongationsfaktor 2
eIF2	eukaryotic Initiation Factor 2
ERK	extracellular Signal regulated Kinase
ESR	Elektronenspinresonanz
FAM	6-Carboxyfluoreszein
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>g</i>	Gramm
G	gastrointestinales Organsystem nach METREPOL
G1-Phase	gap 1 -Phase
G2-Phase	gap 2 -Phase
GADD45A	Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 A (-Protein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GGR	Global Genome Repair (-Teilpfad)
Gy	Gray
h	Stunde
H	hämatologisches Organsystem nach METREPOL
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histon-Deacetylase
HDL	High Density Lipoprotein
HEX	Hexachloro-6-Carboxyfluoreszin
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HL-60	human promyelocytic Leukemia Cells
HLTF	Helicase-like Transcription Factor
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HUGO	Human Genome Organisation

ID	Identifikationsnummer
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
LDL	Low Density Lipoprotein
<i>m</i>	männlich
M-Phase	Mitose-Phase
mA	Milliampere
MADH7	Mothers against decapentaplegic Homolog 7 (-Protein)
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
Max	Maximum
MCF-7	Metastasis Cellular Factor 7 (-Zelllinie)
MDM2	Mouse double Minute 2 Homolog (-Protein)
MEKK	MAPK-Kinase-Kinase
METREPOL	Medical Treatment Protocols for Radiation Accident Victims
MGB	Minor Groove Binder
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minimum
min	Minute
MKK7	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 7
ml	Milliliter
ML-1	myeloische Leukämie-Zelllinie 1
mM	Millimol
mm	Millimeter
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2
MMR	Mismatch Repair
M-Phase	Mitose-Phase
MyD118	myeloid Differentiation primary Response 118
n	Anzahl
N	neurovaskuläres Organsystem nach METREPOL
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1 (-Protein)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
Nr.	Nummer
NTC	Non-Template Control (Negativkontrolle)
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
p.r.	post radiationem (nach Bestrahlung)
PBL	peripherer Blutlymphozyt
PCNA	proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
pH	potentia Hydrogenii (Konzentration von Wasserstoffionen)
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PLK2	Polo-like Kinase 2
PMNC	periphere mononukleäre Zelle
Pol	Polymerase
PPD	Primer Probe Design
pRB	Retinoblastoma-Protein
PUMA	p53 upregulated Modulator of Apoptosis (-Protein)
Q-PCR	quantitative PCR
R	Korrelationskoeffizient
R ²	Variabilitätskoeffizient
RC	Response Category (Antwort-Kategorie)
RDD	„RNeasy“ DNase Dilution
RLT	„RNeasy“ Lysis Tissue
Rn	normalisiertes Reportersignal
RNA	ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonukleasen
ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin
RPA	Replikationsprotein A
RPE	„RNeasy“ Purification Ethanol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (-Medium)
RPS11	ribosomales Protein S11
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
RT Q-PCR	Realtime (im Echtzeitverfahren) Q-PCR
RW1	„RNeasy“ Washing Buffer 1
S	Svedberg
SAPK	stress-aktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung
SEARCH	System of Evaluation and Archiving in Radiation Accidents based on Case Histories
SOP	Standard Operating Procedure (Standardarbeitsanweisung)
S-Phase	Synthese-Phase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription (-Protein)
t	Zeit bzw. Zeitpunkt
TAE	TRIS-Acetate EDTA
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
Taq	Thermus aquaticus (-Polymerase)
TFR	Transferrin-Rezeptor
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLS	Translesion DNA Synthesis
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (-Puffer)

UBC	Ubiquitin C
UDS	unscheduled DNA Synthesis
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UniProt	Universal Protein Database
UPLC-TOFMS	Ultra-Performance liquid Chromatography - time-of-flight Mass Spectrometry (Ultraschnelle Flüssigchromatographie mit Flugzeitmassenspektrometer)
USA	United States of America (Vereinigten Staaten von Amerika)
USP	United States Pharmacopeia, hier: Einheit zur Messung der biologischen Aktivität
UV	ultraviolett
V	Volt
VIC	2'-Chloro-7'-Phenyl-1,4-Dichloro-6-Carboxyfluoreszein
VIF	Variance Inflation Factor
w	Weiblich
WBC	White Blood Cell / Leukozyt
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA	XP-Komplementgruppe A
XPC	XP-Komplementgruppe C
XPF	XP-Komplementgruppe F
XPG	XP-Komplementgruppe G

Gen	Zytopogenetische Bande	Sequence Accession ID	HGNC ID	NCBI GeneID	UniProt
ATF3	1q32.3	L19871 / NM_001674	785	467	P18847
BAX	19q13.3-q13.4	NM_138763	959	581	Q07812
CDKN1A	6p21.1	U03106 / NM_078467	1784	1026	P38936
DDB2	11p12-p11	NM_000107	2718	1643	Q92466
GADD45A	1p31.2	M60974 / NM_001924	4095	1647	P24522
PCNA	20p12.3	J04718 / NM_002592	8729	5111	P12004

Übersicht über die untersuchten Gene und deren Verzeichnisnummern im Internet:

- HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC): <http://www.genenames.org/>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Universal Protein Resource (UniProt): <http://www.uniprot.org/>

1 Einleitung

Nach Unfällen und anderen Ereignissen, die zu einer Exposition mit ionisierenden Strahlen führen, treten innerhalb von wenigen Tagen in Folge davon akute Schäden am Organismus auf, die unter dem Begriff der „akuten Strahlenkrankheit“ subsumiert werden. In diesem Zeitfenster fehlen geeignete Parameter zur Triagierung und individuellen Diagnostik sowie für eine zuverlässige Prognose. Eine unmittelbare Dosisabschätzung kann als frühzeitiger Hinweis auf den weiteren klinischen Verlauf dienen. Gegebenenfalls lassen sich Daten aus einer physikalischen Dosimetrie verwenden, doch sind diese gerade bei Großschadensereignissen oft nicht vorhanden. Aus diesem Grund kommen zur retrospektiven Dosisrekonstruktion biodosimetrische Untersuchungen, zu denen der Nachweis dizentrischer Chromosomenfragmente zählt, zur Anwendung. Dieses auch als „Dic-Assay“ bezeichnete Verfahren gilt als „Gold-Standard“ der Biodosimetrie und wird routinemäßig nach jedem Strahlenereignis eingesetzt. Hierbei wird die Anzahl dizentrischer Chromosomenfragmente in zuvor stimulierten Lymphozyten des peripheren Blutes bestimmt. Die Durchführung setzt eine große Erfahrung bei der mikroskopischen Begutachtung voraus und ist auch aufgrund der notwendigen Stimulation der Lymphozyten zeitaufwendig. Je nach Dosis und Fragestellung müssen mehrere Hunderte oder Tausende von Zellen in der Metaphase beurteilt werden. Da die Ergebnisse erst nach ein bis zwei Wochen zur Verfügung stehen, genügt dieses Verfahren nicht dem zeitlichen Anspruch einer frühzeitigen Triagierung großer, potentiell strahlenexponierter Personengruppen.

Einen alternativen Ansatz stellt die Analyse von strahlenbedingten Expressionsänderungen bestimmter Markergene dar, da diese sehr schnell, innerhalb weniger Stunden, nach Strahlenexposition auftreten. Durch mehrere Arbeitsgruppen weltweit wurde bereits ein direkter Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und dem Ausmaß der Genexpressionsänderungen gezeigt. Da diese zudem innerhalb von Stunden mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion mit großer methodischer Genauigkeit nachgewiesen werden können, stellt diese Methode ein attraktives biodosimetrisches Verfahren dar. Allerdings besteht noch Unklarheit über geeignete Kandidaten für die benötigten Markergene, da das Verfahren im Gegensatz zur dizentrischen Chromosomenanalyse relativ neu und die Anzahl entsprechender Studien vergleichsweise gering ist. Aufgrund der Seltenheit akzidenteller Expositionen ganzer Personengruppen wurden, wie bei der Einführung der dizentrischen Chromosomenanalyse, unterschiedliche In-vitro-Modelle entwickelt. Für den seit mehreren Jahrzehnten im Gebrauch befindlichen „Dic-Assay“ ist die Übereinstimmung dieser etablierten In-vitro-Modelle mit der In-vivo-Prozessierung dizentrischer Chromosomenfragmente nachgewiesen. Obwohl diese Erfahrungen für strahleninduzierte Genexpressionsänderungen bislang feh-

len, werden üblicherweise zur Simulation einer In-vivo-Bestrahlung die für den „Dic-Assay“ validierten In-vitro-Modelle verwendet. Hierzu wird peripheres Blut ex vivo als Vollblutkultur mit künstlichen Nährmedien und fetalem Kälberserum sowie Antibiotika versehen und anschließend bestrahlt.

Es ist bislang nicht hinreichend untersucht, ob die etablierten In-vitro-Modelle das geeignetste Verfahren darstellen, um bei der Suche nach potentiellen Markergenen eine In-Vivo-Situation nachzubilden. Anders als bei dem Nachweis dizentrischer Chromosomenfragmente muss vermutet werden, dass Änderungen der Genexpression sowohl präparationsbedingt als auch durch die artifizielle Umgebung, induziert werden könnten. Am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München wurde aus diesem Grund ein modifiziertes In-vitro-Modell entwickelt. Dieses erlaubt eine Untersuchung von Genexpressionsänderungen nach Ex-vivo-Bestrahlung mit geringstmöglichem präparativen Aufwand, unter weitgehender Belassung sämtlicher körpereigener Medien und ohne Zugabe körperfremder Substanzen. Um das Potential dieses Verfahrens zu prüfen, wurde die strahleninduzierte Expressionsänderung von Genen untersucht, die in etablierten In-vitro-Modellen eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung aufwiesen. Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen dieser mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion im Echtzeitverfahren durchgeführten Untersuchungen werden im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt.

2 Stand des Wissens

2.1 Notwendigkeit der Biodosimetrie

Die Erforschung der ionisierenden Strahlung und deren Anwendung für den Menschen stellten im Übergang vom 19. zum 20. Jahrhundert und in den darauf folgenden Jahrzehnten einen großen Fortschritt dar. Insbesondere die Entdeckung der Röntgenstrahlung durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahr 1895 war für die Diagnostik in der Medizin ein Quantensprung. Die kurz darauf von Antoine Henri Becquerel im Jahr 1896 entdeckte Radioaktivität ebnete den Weg zur Kernspaltung und der daraus folgenden Nutzbarmachung der Kernenergie. Früh erkannte man, dass die neue Technologie neben ungeahnten Möglichkeiten in der Energieversorgung sowie bei der medizinischen Diagnostik und Therapie auch ein großes Gefährdungspotential in sich birgt. Durch technische und organisatorische Maßnahmen kann dieses Risiko unter normalen Umständen minimiert werden. In Deutschland wird der Umgang mit der ionisierenden Strahlung unter anderem durch das Atomgesetz, das Strahlenschutzvorsorgegesetz, die Röntgenverordnung und die Strahlenschutzverordnung geregelt. Diese Vorschriften sehen, neben der Reduzierung der auf den Menschen wirkenden Strahlung, auch die Überwachung und Messung derselben vor. Trotz all dieser Sicherheitsmaßnahmen kann es zu Ereignissen kommen, bei denen Personen mit einer gesundheitsgefährdenden, rückwirkend nicht nachvollziehbar hohen Strahlendosis belastet werden. Die Biodosimetrie, als Verfahren zur retrospektiven Dosisrekonstruktion anhand der Veränderung biologischer Parameter, kommt insbesondere dann zur Anwendung, wenn keine physikalischen Messdaten vorliegen. Dies ist vor allem der Fall, wenn eine große Personengruppe betroffen ist. Im Folgenden sind einige Unglücke der jüngeren Geschichte exemplarisch aufgeführt.

Zu Beginn der sowjetischen Nuklearwaffenproduktion nach Ende des 2. Weltkrieges kam es über Jahre hinweg zu einer Verseuchung des Flusses Tetscha mit radioaktiven Abfällen aus der kerntechnischen Anlage Majak. Insgesamt gelangten 76 Millionen Kubikmeter strahlendes Material in die Wasserversorgung von über 40 Gemeinden und Kleinstädten (Kossenko et al. 2005, S. 591). Beim Kyschtym-Unfall am 29. September 1957 wurde durch eine Explosion in der gleichen Fabrik radioaktives Material über ein Gebiet von etwa 20.000 Quadratkilometern verteilt (Jones 2007, S. 3). Die größte Katastrophe in der zivilen Nutzung der Kernenergie war der Reaktorunfall im ukrainischen Kernkraftwerk Tschernobyl am 26. April 1986. Hierbei wurde ein Gebiet mit einer Ausdehnung von 140.000 Quadratkilometer, in dem 4,5 Millionen Menschen lebten, kontaminiert. Bis Ende 1987 wurden zur Sicherung des Reaktors etwa 300.000 Aufräumarbeiter, so genannte Liqui-

datoren, eingesetzt. Über 1.000 von ihnen erhielten innerhalb des ersten Tages nach dem Unglück schwere bis tödliche Strahlendosen von bis zu 20 Gray. Insgesamt wurden zirka 800.000 Menschen in den Folgejahren im Bereich des Kernkraftwerkes zu Aufräum- und Sicherungsarbeiten eingeteilt und somit einer oft unbekanntem Strahlenexposition ausgesetzt (Cherp et al. 2002, S. 32).

Nicht nur im industriellen Bereich besteht das Risiko einer radioaktiven Verstrahlung. Das Leben und die Gesundheit tausender Menschen sind auch durch den militärischen oder terroristischen Gebrauch nuklearer Waffen gefährdet (Weisdorf et al. 2006, S. 674). Die beiden Atombombenabwürfe über den japanischen Städten Hiroshima am 6. August und Nagasaki am 9. August 1945 zeigten deren verheerende Auswirkungen. Auch nach dem Ende des kalten Krieges ist die Bedrohung durch Nuklearwaffen nicht vorüber. Einige Staaten mit einem entsprechenden Arsenal sind innenpolitisch instabil, wodurch diese Waffen in die Hände von Terroristen fallen könnten. Auch wäre jederzeit der Einsatz von sogenannten schmutzigen Bomben möglich, bei denen konventioneller Sprengstoff mit radioaktivem Material kombiniert wird (Chaudhry 2008, S. 557; Dainiak et al. 2007, S. 17; Mettler und Voelz 2002, S. 1555). Wie leicht an entsprechendes Material zu kommen ist, beweist der Goiânia-Unfall in Brasilien vom 13. September 1987, bei dem aus einem leer stehenden Krankenhaus ein Behälter mit radioaktivem $^{137}\text{Caesiumchlorid}$ entwendet wurde. Fast 250 Menschen wurden versehentlich kontaminiert, vier von Ihnen starben (Anjos et al. 2002, S. 201).

All diese Beispiele zeigen, dass sowohl bei Unfällen mit als auch beim gezielten Einsatz von radioaktiven Stoffen tausende von Menschen binnen kürzester Zeit zu Schaden kommen können. Vor allem das Ausmaß eines terroristischen Anschlages wird allgemein als kritisch angesehen, weil hierfür keine Notfallpläne, wie zum Beispiel bei einem Unfall in einer industriellen Anlage, existieren (Chao 2007, S. 24). Aus diesem Grund wird gerade in den USA der Entwicklung von geeigneten biodosimetrischen Assays und Biomarkern höchste Priorität zugesprochen (Pellmar et al. 2005, S. 115).

2.2 Verschiedene Verfahren der Biodosimetrie

2.2.1 Zytogenetische Verfahren

Chromosomenaberrations-Analyse

Verschiedene Verfahren der Zytogenetik, also der Untersuchung von Chromosomen, kommen im Rahmen der Biodosimetrie zum Einsatz. Als „Gold-Standard“ in der retrospektiven Dosis-Abschätzung hat sich der Nachweis dizentrischer Chromosomenfragmente etabliert (Goans und Waselenko 2005, S. 505; Blakely et al. 2005, S. 494). Seinen Ursprung nahm dieses Verfahren, als im Jahr 1927 Hermann Joseph Muller die mutagene Eigenschaft von Röntgenstrahlen bei der Drosophila-Fliege entdeckte. Karl Sax postulierte im Jahr 1940 Chromosomenbrüche als Ursache für chromosomale Aberrationen und entdeckte als Erster deren linearen Zusammenhang mit der Höhe der Strahlendosis. Ursächlich für alle Arten von Chromosomenaberrationen sind Doppelstrangbrüche während der Interphase des Zellzyklus und deren fehlerhafte Reparatur (Nowak und Obe 1984, S. 335). In Abbildung 2.1 sind die im Folgenden beschriebenen Veränderungen schematisch dargestellt.

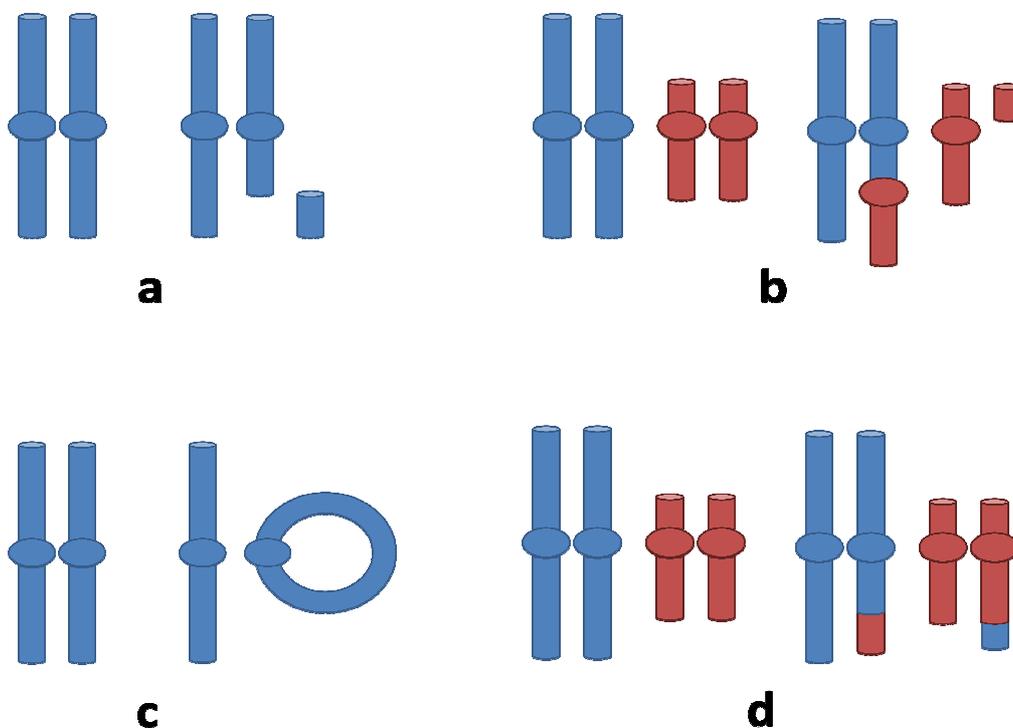


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines a) Chromosomen-Bruches mit einem azentrischen Fragment, b) einer dizentrischen Aberration ebenfalls mit einem azentrischen Fragment sowie c) einer Ringbildung und d) einer Translokation. Bis auf die Translokation sind alle diese Formen der Chromosomenaberrationen instabil. Jeweils links ist der normale Chromosomenaufbau abgebildet, rechts davon der veränderte.

Die mittels Lichtmikroskop am häufigsten zu beobachtenden radiogene Veränderungen sind Chromosomen-Brüche, dizentrische Aberrationen, azentrische Fragmente und Ringbildungen. Sie gelten als instabil, da sie zum Zelluntergang während der folgenden Zellteilung führen. Aus diesem Grund nimmt ihre Häufigkeit im lebenden Organismus mit der Zeit ab (Natarajan et al. 1998, S. 308). Translokationen, also der balancierte Austausch von Chromosomenfragmenten, sind hingegen stabile Aberrationen, die mit jeder Zellteilung vererbt werden und somit unter anderem für die radiogene Krebsentstehung verantwortlich sind (Garcia-Sagredo 2008, S. 365).

Der Nachweis dizentrischer Chromosomenfragmente mittels „Dic-Assay“ kann Dosen in einem Bereich von 10cG bis 10 Gy sicher nachweisen und gilt daher als Standardverfahren zur Ermittlung akzidenteller Strahlenbelastungen. Die hierfür verwendeten peripheren Blutlymphozyten (PBL) werden zunächst mittels verschiedener Agentien stimuliert (Abend 2000, S. 104). Je nach Fragestellung werden 1.000 bis 5.000 mit Giemsa gefärbte Metaphasen-Lymphozyten analysiert (Ramalho et al. 1995, S. 47). Aufgrund ihrer Zirkulation durch den Körper sind PBL gute Indikatoren sowohl für eine interne wie eine externe Bestrahlung, ebenso wie für eine lokale oder Ganzkörper-Exposition. Es lassen sich nur die Auswirkungen einer akuten oder kürzlich erfolgten Bestrahlung aufzeigen, da die Lymphozyten eine vergleichsweise kurzen Lebensdauer haben (Abend 2000, S. 105; Ramalho et al. 1995, S. 47). Liegt ein Ereignis längere Zeit zurück, so muss auf mathematische Verfahren zurückgegriffen werden, die den Rückgang der instabilen Aberrationen ausgleichen (Abend 2000, S. 105; Edwards et al. 2005, S. 396). Eine mikroskopische Aufnahme eines Chromosomensatzes mit dizentrischen Aberrationen ist in Abbildung 2.2 zu sehen.

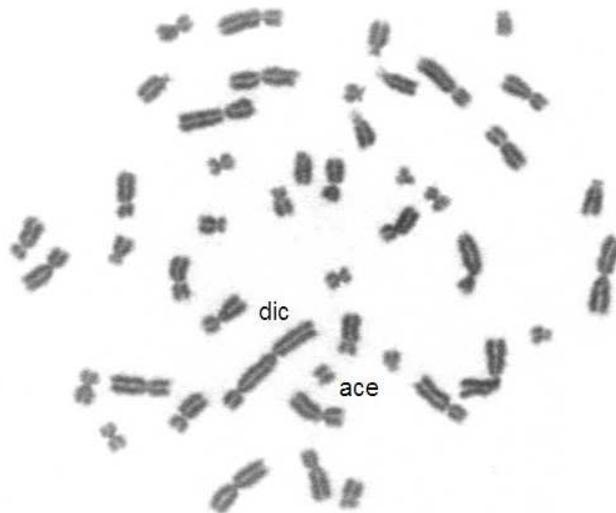


Abb. 2.2: Mikroskopisches Bild eines mit Giemsa gefärbten Chromosomensatzes. Deutlich zu erkennen sind ein dizentrisches Chromosom (dic) und das korrespondierende azentrische Fragment (ace). (Quelle: Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München)

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Eine Weiterentwicklung der konventionellen Chromosomen-Analyse stellt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) dar. Hierbei werden bestimmte Areale der Desoxyribonukleinsäure (DNA) beziehungsweise beim „Chromosome Painting“ ganze Chromosomen angefärbt. Durch die Verwendung von Mehr-Farben-Assays lassen sich strukturelle Veränderungen der Ziel-Chromosomen leicht durch ihr mehrfarbiges Muster erkennen (Abend 2000, S. 108; Bauchinger 1998, S. 89). Eine mikroskopische Aufnahme einer solchen Analyse ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Die FISH-Technik ist, wie auch die konventionelle Chromosomenanalyse, sehr zeitintensiv. Ihr Vorteil liegt darin, dass sie auch Translokationen nachweisen kann (Abend 2000, S. 109; Mitelman 2000, S. 248) und sich somit sowohl eine länger zurückliegende als auch die kumulative Strahlenbelastung eines Individuums ermitteln lässt (Bauchinger 1998, S. 91). Da gerade reziproke Translokationen ein hohes karzinogenes Potential beinhalten, lässt sich durch ihre Bestimmung eine Risikoabschätzung aufgrund individueller Strahlensensibilität durchführen (Terzoudi und Pantelias 2006, S. 519). Vor allem das Probandenalter, aber auch Faktoren wie das Rauchen, zeigen einen deutlichen Einfluss auf die Anzahl der Translokationen und müssen daher bei der Dosisabschätzung berücksichtigt werden (Edwards et al. 2005, S. 398).

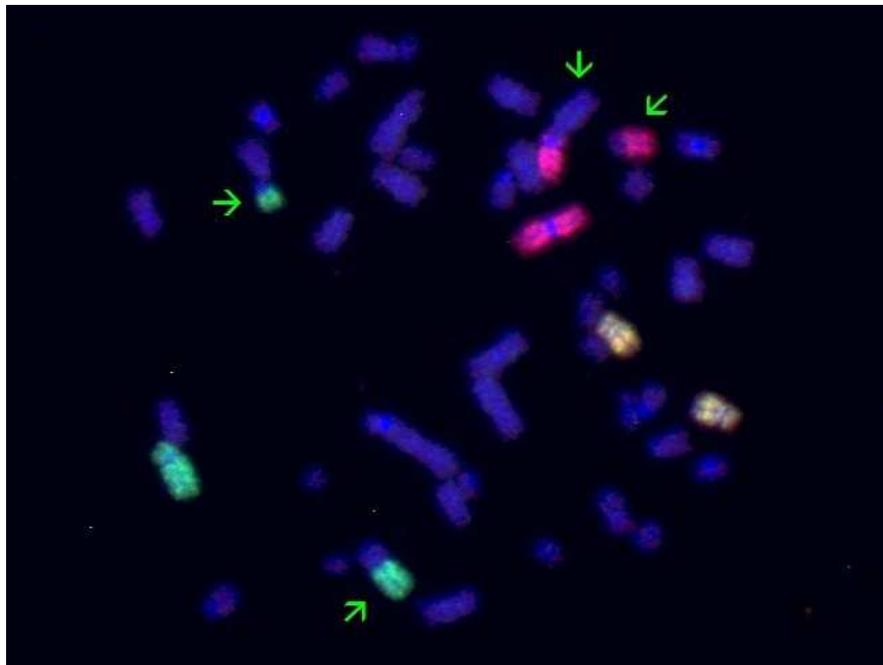


Abb. 2.3: Mikroskopisches Bild einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Durch diese spezielle Färbetechnik lassen sich auch Translokationen und somit weiter zurückliegende Expositionen nachweisen. In diesem Fall sind Chromosom 1 rot, Chromosom 4 grün und Chromosom 12 gelb (als Mischung aus grün und rot) gefärbt. Die grünen Pfeile weisen auf die Translokationen unter Beteiligung der Chromosomen 1 und 4. (Quelle: Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München)

Mikrokernanalyse

Neben der Chromosomenanalyse kann eine Dosisabschätzung auch durch eine Untersuchung der Morphologie des Zellkerns erfolgen. Bei der sogenannten Mikrokernanalyse werden die von William Henry Howell und Justin Marie Jolly erstmalig beschriebenen, pathologischen Zellkernfragmente untersucht. Sie bestehen aus Chromatin-Partikeln, die während der Anaphase des Zellzyklus erkennbar werden. Ursächlich hierfür sind Doppelstrangbrüche oder Fehlfunktionen des Spindelapparates, die die Chromosomen davon abhalten, während der Anaphase zu den Zellpolen zu wandern. Somit werden diese während der Telophase nicht Bestandteil der neuen Zellkerne (Garcia-Sagredo 2008, S. 369). Abbildung 2.4 zeigt beispielhaft einen Mikrokern in einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines Lymphozyten.

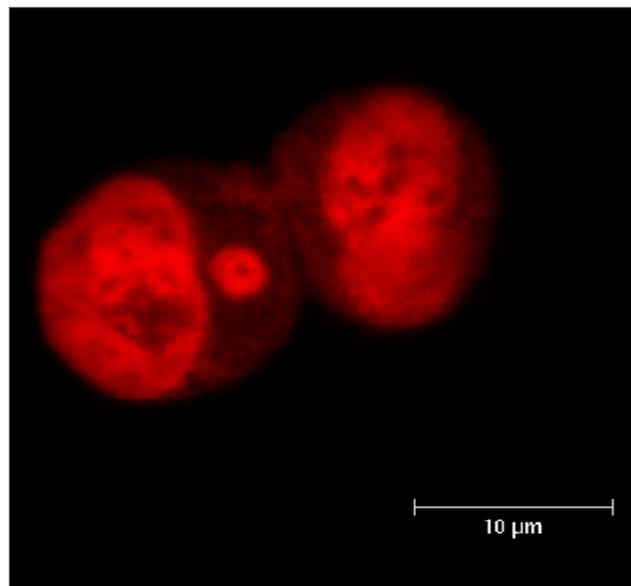


Abb. 2.4: Fluoreszenzmikroskopisches Bild zweier, aufgrund der Einwirkung ionisierender Strahlung, pathologisch veränderter Lymphozyten. In der linken Zelle ist ein Mikrokern zu erkennen, rechts im Bild befindet sich eine binukleäre Zelle. (Quelle: Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München)

Da für dieses Verfahren Lymphozyten während der Interphase untersucht werden, sind entsprechende Veränderungen schneller und einfacher zu erkennen, als bei der konventionellen Chromosomenanalyse (Streffer et al. 1998, S. 101). Allerdings zeigen sich bei der Mikrokernuntersuchung aufgrund unterschiedlich hoher Radiosensitivität von Individuen große Unterschiede (Abend 2000, S. 113; Thierens et al. 2000 S. 245). Die Kombination der Untersuchung von Mikrokernen, apoptotischen Zellkernen und von sogenannten sonstig abnormen Kernen erhöht die Sensitivität der Analyse und reduziert die interindividuellen Besonderheiten im Hinblick auf eine Dosisabschätzung (Abend et al. 2000, S. 257).

Eine Voll- beziehungsweise Teilautomatisierung aller in diesem Kapitel beschriebenen zytogenetischen Verfahren ist bereits heute möglich (Abend 2000, S. 113; Schunck et al. 2004, S. 388) und reduziert den Zeit- und Personalaufwand deutlich. Trotzdem bleiben diese Methoden zeitintensiv, so dass sie keine frühzeitige Dosisabschätzung ermöglichen.

2.2.2 Die Elektronenspinresonanz-Messung

Mithilfe der Elektronenspinresonanz (ESR) wird die resonante Absorption von Mikrowellen einer Probe in einem äußeren Magnetfeld gemessen. Geeignet hierfür sind Materialien mit einzelnen oder mehreren ungepaarten Elektronen. Diese finden sich zum Beispiel bei Radikalen in Kristallen, die durch ionisierende Strahlung entstanden sind. Der hierfür zugrundeliegende Effekt wurde im Jahr 1944 erstmalig von Jewgeni Konstantinowitsch Sawoiski beschrieben. Im Jahr 1972 wurde mittels dieses Verfahrens an Knochen von Hiroshima-Opfern erstmalig eine Dosimetrie durchgeführt (Regulla 2005, S. 118).

Zur retrospektiven Dosisabschätzung ist vitale Knochensubstanz wenig geeignet, da sie ständigen Umbauprozessen unterworfen ist. Zahnschmelz, der hauptsächlich aus Hydroxylapatit besteht, unterliegt diesen metabolischen Vorgängen nicht und konserviert die radiogen entstandenen Radikale dauerhaft. Für die ESR wird üblicherweise eine gewisse Menge des Schmelzes mechanisch vom Zahn abgetragen und zermahlen (Ilyinskikh et al. 1999, S. 474). Neben der bislang üblichen Zahnextraktion ist auch der hohe apparative Aufwand, der eine portable Anwendung unmöglich macht, nachteilig. Darüber hinaus hat die konventionelle ESR eine im Vergleich zur Chromosomenanalyse geringere Sensitivität. Dies liegt vornehmlich im geringen magnetischen Moment der einzelnen Radikale begründet, so dass eine gewisse Mindestmenge an Zahnschmelz und ein großes magnetische Außenfeld benötigt werden (Pass 1997, S. 1399). Mittlerweile wurde das Verfahren immer weiter entwickelt, so dass durch Verwendung anderer Frequenzbänder, allerdings unter Inkaufnahme einer schlechteren Sensitivität, auf eine Zahnextraktion verzichtet werden kann (Romanyukha et al. 2005, S. 151). Es gibt unterschiedliche Ansätze zur technischen Umsetzung der In-vivo-Messung. Sie reichen von flachen Magneten, die seitlich am Kopf des Probanden angelegt werden, bis zu Geräten in der Größe von Kernspintomographen (Swartz et al. 2006, S. 165).

2.2.3 Die Sequentialdiagnostik

Vor dem Hintergrund des Bedarfes einer multilateral abgestimmten Vorgehensweise im Falle eines strahlenbedingten Schadensereignisses, beauftragte die Europäische Kommission ein internationales Expertenteam zur Ausarbeitung von Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von strahlenexponierten Personen, die wegen einer akuten Strahlenkrankheit behandlungsbedürftig werden. Die im Jahr 2001 veröffentlichten „Medical Treatment Protocols for Radiation Accident Victims“ (METREPOL) sehen aufgrund klinischer und laborchemischer Parameter eine Einteilung in vier „Response Categories“ (RC) vor. Insgesamt 24 Einzel-Indikatoren aus den Hauptorgansystemen des neurovaskulären (N), des hämatologischen (H), des kutanen (C) und des gastrointestinalen (G) Organsystems werden hierbei semiquantitativ in je vier Schweregrade eingeteilt. Der höchste Einzelwert bestimmt sowohl die organspezifische als auch die globale RC und ist maßgeblich für die weiterführende Behandlung gemäß dieser Leitlinien (Friesecke et al. 2001, S. 121).

Response Category	N	H	C	G
Symptome	Übelkeit	Lymphozytopenie	Erythem	Durchfall
	Übergeben	Granulozytopenie	Hautjucken	Abdominalkrämpfe
	Anorexie	Thrombozytopenie	Ödembildung	
	Fatigue-Syndrom	Blutverlust	Blasenbildung	
	Fieber	Infektion	Hautablösung	
	Kopfschmerz		Ulzeration	
	Blutdruckabfall		Haarausfall	
	Neurolog. Defizite		Nagelausfall	
	Kognitive Defizite			

Tabelle 2.1: Auflistung der 24 Indikatoren nach METREPOL, eingeteilt in die vier Hauptkategorien des neurovaskulären (N), des hämatologischen (H), des kutanen (C) und des gastrointestinalen (G) Organsystems.

Spätere Publikationen betonen vor allem die Relevanz der Blutbildanalyse für prognostische Aussagen, da entsprechende Veränderungen bereits innerhalb von wenigen Stunden nach einer Ganzkörper-Bestrahlung quantitativ messbar sind. Eine retrospektive Auswertung der klinischen Verläufe von Strahlenunfallopfern ermöglicht die SEARCH-Datenbank (System of Evaluation and Archiving in Radiation Accidents based on Case Histories) der Universität Ulm. Sie enthält medizinische Daten von über 800 Fällen (Fliedner et al. 2007, S. 9). In Tabelle 2.2 ist die Kategorisierung des hämatopoetischen Systems gemäß METREPOL dargestellt.

Kategorie	# Granulozyten	# Lymphozyten	# Thrombozyten
H1	≥ 2	$\geq 1,5$	≥ 100
H2	< 2	$< 1,5$	< 100
H3	< 1	< 1	< 50
H4	$< 0,5$	$< 0,5$	< 20

Tabelle 2.2: Kategorisierung der Veränderungen des hämatopoetischen Systems nach Bestrahlung gemäß den Empfehlungen der METREPOL. # = Anzahl pro μl in Tausend

Die für den behandelnden Arzt entscheidende Frage ist, ob sich das blutbildende System durch eigene Kraft erholt oder ob weiterführende Therapien, wie zum Beispiel der Einsatz von Wachstumsfaktoren oder eine Knochenmarkspende, notwendig sind. Während die Kategorie H1 den Normalwerten eines gesunden Probanden entspricht, führt bereits eine Grenzwertunterschreitung bei einem der drei Parameter zu einer Eingruppierung in H2. Bei der Kategorie H3 zeigt sich der klassische Verlauf einer Strahlenkrankheit: Die Granulozytenzahl sinkt bis zum 10. Tag und hat ihren Nadir zwischen dem 20. und 30. Tag. Die Thrombozyten-Konzentration bleibt in den ersten 10 Tagen relativ konstant und sinkt erst danach ab, bis sie ihren Nadir zeitgleich mit den Granulozyten erreicht. Sowohl bei H3 als auch bei H4 fällt die Lymphozyten-Konzentration innerhalb der ersten beiden Tage rapide ab, wobei sie sich lediglich in der Gruppe H3 bereits nach wenigen Tagen langsam erholt. Nur bei der Kategorie H4 kommt es bereits zwischen dem vierten und sechsten Tag zu einem Abfall der Granulozyten-Konzentration sowie einem progressiven Sinken der Thrombozytenzahl innerhalb der ersten 10 Tage. Bei Kategorien H1 bis H3 sind die Blutbildveränderungen reversibel, so dass eine symptomatische Therapie und eine Infektionsprophylaxe ausreichend sind. Ein irreversibler Schaden des hämatopoetischen Systems liegt ausschließlich bei der Kategorie H4 vor. Die genannten spezifischen Blutbild-Veränderungen erlauben bereits nach kurzem Verlauf eine Differenzierung zu den drei anderen Kategorien (Fliedner et al. 2007, S. 10).

2.2.4 Untersuchung metabolischer und anderer Parameter

Sowohl in Tierversuchen als auch in Kohorten-Studien von Strahlenopfern wurden Veränderungen des Metabolismus nach Bestrahlung untersucht. So ließ sich bei Ratten ein temporärer Anstieg des Blutzucker- und Triglycerid-Spiegels, eine dauerhafte Erhöhung der LDL- sowie eine permanente Reduzierung der HDL-Konzentration nach einer Strahlenexposition nachweisen. Ebenso wurde eine

Erhöhung von Triglyceriden und Cholesterin in Lebergewebe, Thymus, Skelettmuskel und Knochenmark gefunden. Ein Anstieg der Glykogen-Konzentration wiederum fand sich nur in der Leber (Ahlers 1994, S. 538). Bei einigen Studien an Überlebenden von Atombombenabwürfen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Strahlenbelastung und nicht-karzinösen Erkrankungen. Insbesondere fand sich eine Erhöhung von Risikofaktoren für eine koronare Herzkrankheit, wie ein niedriger HDL-Spiegel, Hypertriglyceridämie, Steatosis hepatis (Akahoshi et al. 2003, S. 968) sowie eine Hypercholesterinämie (Wong et al. 1999, S. 736). Solche, teilweise dauerhaften Veränderungen des Metabolismus ermöglichen gegebenenfalls eine Abschätzung des individuellen Gesundheitsrisikos. Für eine retrospektive Dosisabschätzung beim Menschen wurde bislang aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität keiner der genannten Parameter verwendet.

Aussagekräftiger als die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Parameter, ist eine Dosisabschätzung durch die Bestimmung metabolischer Biomarker in Form von Stoffwechselabbauprodukten. Mittels einer ultraschnellen Flüssigchromatographie mit Flugzeitmassenspektrometer (UPLC-TOFMS) konnte an Mäusen nach einer Bestrahlung ein signifikanter Anstieg von 3-Hydroxy-2-Methyl-Benzoesäure-3-O-Sulfat, N-Hexanoylglycin als Abbauprodukt der Fettsäuren, β -Thymidin als Pyrimidin-Derivat und Taurin als Abbauprodukt von Cystein und Methionin nachgewiesen werden (Tyburski et al. 2008, S. 11). Andere Metaboliten wie Aminoessigsäure, Homovanillinsäure, Indoxylsulfat, Thymidin-Glykol, 8-Isoprostaglandin $F_{2\alpha}$, Thromboxan B_2 , 8-Hydroxyguanin, Hippursäure, Metanephine, Normetanephine, 5-Hydroxy-Indolessigsäure, Zitronensäure, 4-Hydroxyl-3-Methoxyl-Mandelsäure, 4-Hydroxy-3-Methoxy-Phenyl, Kreatinin und Inosin zeigten hingegen in verschiedenen Veröffentlichungen ein sehr unterschiedliches Verhalten (Tyburski et al. 2008, S. 12). In anderen Tierexperimenten und bei Studien an ganzkörperbestrahlten Tumorpatienten konnte eine signifikanter Abfall der Polyaminkonzentration in Erythrozyten gezeigt werden (Porciani et al. 2001, S. 187). Polyamine, wie Spermidin und Spermin, sind kleine polykationische Moleküle, die mit Ribonukleinsäuren interagieren und unter anderem mutagene Folgen von genotoxischem Stress reduzieren (Jung und Kim 2008, S. 1233). Mittels eines Flugzeitmassenspektrometers lassen sich eine Vielzahl weiterer Verbindungen, die für eine Biodosimetrie in Frage kommen, quantifizieren (Ménard et al. 2006, S. 1848). Bislang konnte aber mit keinem der genannten Stoffwechselabbauprodukte eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden.

2.2.5 Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray

Organismen haben im Laufe der Evolution verschiedene Antwortreaktionen, insbesondere Reparaturmechanismen, auf natürliche Strahlenschäden der DNA entwickelt. Diese äußern sich durch eine vermehrte Produktion von Stressproteinen und Reparaturenzymen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bei einem artifiziellen Strahlenunfall identisch und können daher als Grundlage für eine Dosimetrie dienen (Horneck 1998, S. 1631). Verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Veränderung der Genexpression sind etabliert. Dies ist zum einen die Mikroarray-Analyse, wie sie im Folgenden vorgestellt wird, zum anderen die quantitative Polymerase-Kettenreaktion, die in Kapitel 2.3 ausführlich beschrieben wird.

Ein Mikroarray besteht aus einer Nylonmembran, an der eine vorgegebene Anzahl verschiedener Abschnitte komplementärer DNA (cDNA) fixiert ist. Die Auswahl der Genabschnitte richtet sich dabei nach der jeweiligen Fragestellung. Die zu untersuchende cDNA wird zuvor aus Ribonukleinsäure (RNA) synthetisiert, die aus unterschiedlichen Geweben und zellulären Materialien gewonnen werden kann. Während der Synthese erfolgt gleichzeitig eine Markierung der cDNA. Es werden je nach Untersuchungs-Kit sowohl radioaktive (Voehringer et al. 2000, S. 2680) als auch fluoreszierende Marker (Cho et al. 2001, S. 571) verwendet. Die zu untersuchende cDNA bindet während des Versuchsablaufes an die entsprechenden cDNA-Abschnitte des Arrays. Mittels dieses Verfahrens können so mehrere tausend Gene gleichzeitig untersucht werden (Voehringer et al. 2000, S. 2680). Seit einigen Jahren stehen auch sogenannte „Whole-Genome-Arrays“ zur Verfügung, die es erlauben, in einem einzigen Versuchsansatz die Expression von weit über 40.000 Transkriptionsabschnitten des menschlichen Genoms aufzuzeigen (Kronick 2004, S. 20; Amundson 2008, S. 27). In Abbildung 2.5 ist beispielhaft die Fotodokumentation einer Mikroarray-Analyse gezeigt.

Das Mikroarray-Verfahren erlaubt lediglich eine semiquantitative Aussage über die Ausgangsmenge der zu untersuchenden cDNA, da sich nur die Differenz der Expression der Zielgene in Relation zu einer Kontrolle bestimmen lässt. Eine Messung der absoluten Genexpression und somit der individuellen Auswirkungen der ionisierenden Strahlung ist nicht möglich. Dieses Verfahren dient deswegen vornehmlich als Screening-Methode für die Identifikation möglicher Kandidaten von Marker-Genen (Snyder und Morgan 2004, S. 263). Die Bestimmung sowohl der differentiellen als auch der absoluten Genexpression, wie sie für eine tatsächliche Anwendung in der Biodosimetrie erforderlich ist, ermöglicht die quantitative Polymerase-Kettenreaktion im sogenannten „Realtime“-Verfahren. Diese ist ausführlich im folgenden Kapitel beschrieben.

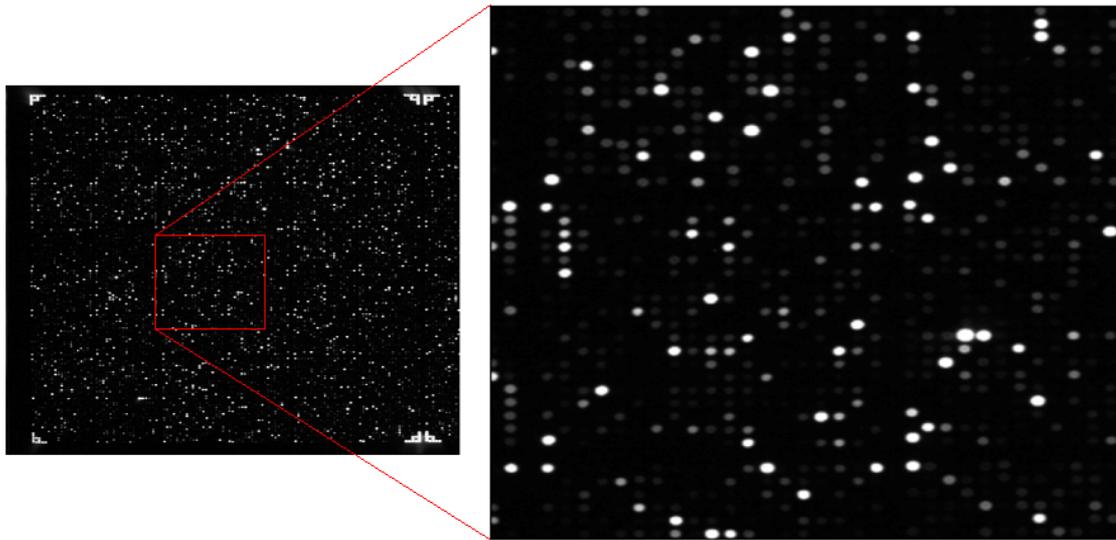


Abb. 2.5: Bild eines „Whole Genome“-Mikroarrays (links) und eine Vergrößerung hieraus (rechts). Die Helligkeit, der mittels Chemolumineszenz sichtbargemachten, punktförmigen Hybridisierungsprodukte korreliert mit der Anzahl der der an jener Stelle des Arrays gebundenen cDNA-Kopien und erlaubt somit eine semiquantitative Aussage über die Expression des jeweiligen Gens. (Quelle: Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München)

2.3 Funktionsweise der Polymerase-Kettenreaktion

2.3.1 Die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion, die im Jahr 1985 von Kary Mullis erfunden und seither vielfach weiterentwickelt wurde, ermöglicht die effiziente Vervielfältigung bestimmter Gen-Abschnitte ausgehend von sehr kleinen DNA-Mengen. Die hierfür zugrundeliegende Reaktion erfolgt durch die mehrmalige Wiederholung von drei Reaktionsschritten, die im Folgenden ausführlich beschrieben und in Abbildung 2.6 grafisch dargestellt werden. Diese sind:

1. die Denaturierung der DNA durch Erhitzen,
2. das sogenannte „Annealing“ (die Bindung von „Primern“ an die DNA) sowie
3. die Elongation (also die Verlängerung der „Primer“ komplementär zum DNA-Strang).

Zunächst wird die DNA durch Erhitzen auf eine Temperatur von 95 °C denaturiert. Hierdurch lösen sich die beiden Doppelstranghälften voneinander, was die Voraussetzung für die folgenden Re-

aktionsschritte darstellt. Im zweiten Schritt, dem „Annealing“ wird die Temperatur auf eine Höhe von 50 bis 60 °C reduziert. Dies ermöglicht ausgewählten Einzelstrang-Oligomeren, sogenannten „Primern“, die Bindung an komplementäre Sequenzen der DNA. Die Reaktionstemperatur muss ausreichend hoch sein, da sonst zu viele unspezifische Bindungen entstehen können. Anschließend erfolgt im dritten Schritt, der Elongation, ausgehend von den „Primern“ die Verlängerung der Kopie entlang des originalen DNA-Strangs mittels einer Polymerase. Hierfür ist meist wieder eine Temperaturerhöhung auf etwa 75 °C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, erforderlich. Die so entstandene doppelsträngige DNA steht im darauffolgenden Zyklus mit beiden Einzelsträngen als Matrize zur Verfügung. Durch regelmäßige Wiederholung der drei genannten Reaktionsschritte erfolgt eine exponentielle Amplifikation der ursprünglichen DNA-Menge um den Faktor 2^n , wobei n die Anzahl der durchlaufenen Zyklen angibt (Carroll 1993, S. 256S). Auf der folgenden Seite in Abbildung 2.6 sind die ersten beiden Zyklen mit einer Polymerase-Kettenreaktion mit den drei Reaktionsschritten schematisch dargestellt. Ab dem zweiten Zyklusdurchlauf liegen erstmalig Kopien des Genabschnittes in der exakt gewünschten Länge vor.

Zunächst wurde die aus dem Bakterium *Escherichia coli* gewonnene DNA-Polymerase I, die sogenannte Klenow-Polymerase, verwendet. Ihr großer Nachteil ist ihre Thermosensibilität, so dass nach jedem Erhitzungsschritt, der für die Denaturierung der neugebildeten DNA-Stränge erforderlich ist, erneut Polymerase zur Reaktion hinzugefügt werden muss. Hierdurch ist diese Methode sehr zeitaufwendig und fehleranfällig. Erst durch die Verwendung einer thermostabilen Polymerase aus dem hitzeresistenten Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) konnte dieses Problem endgültig gelöst und die PCR-Zyklen unterbrechungsfrei durchgeführt werden. Dies erhöhte die Spezifität und Sensitivität des Verfahrens und ermöglichte eine Automatisierung der PCR (Saiki et al. 1988, S. 487).

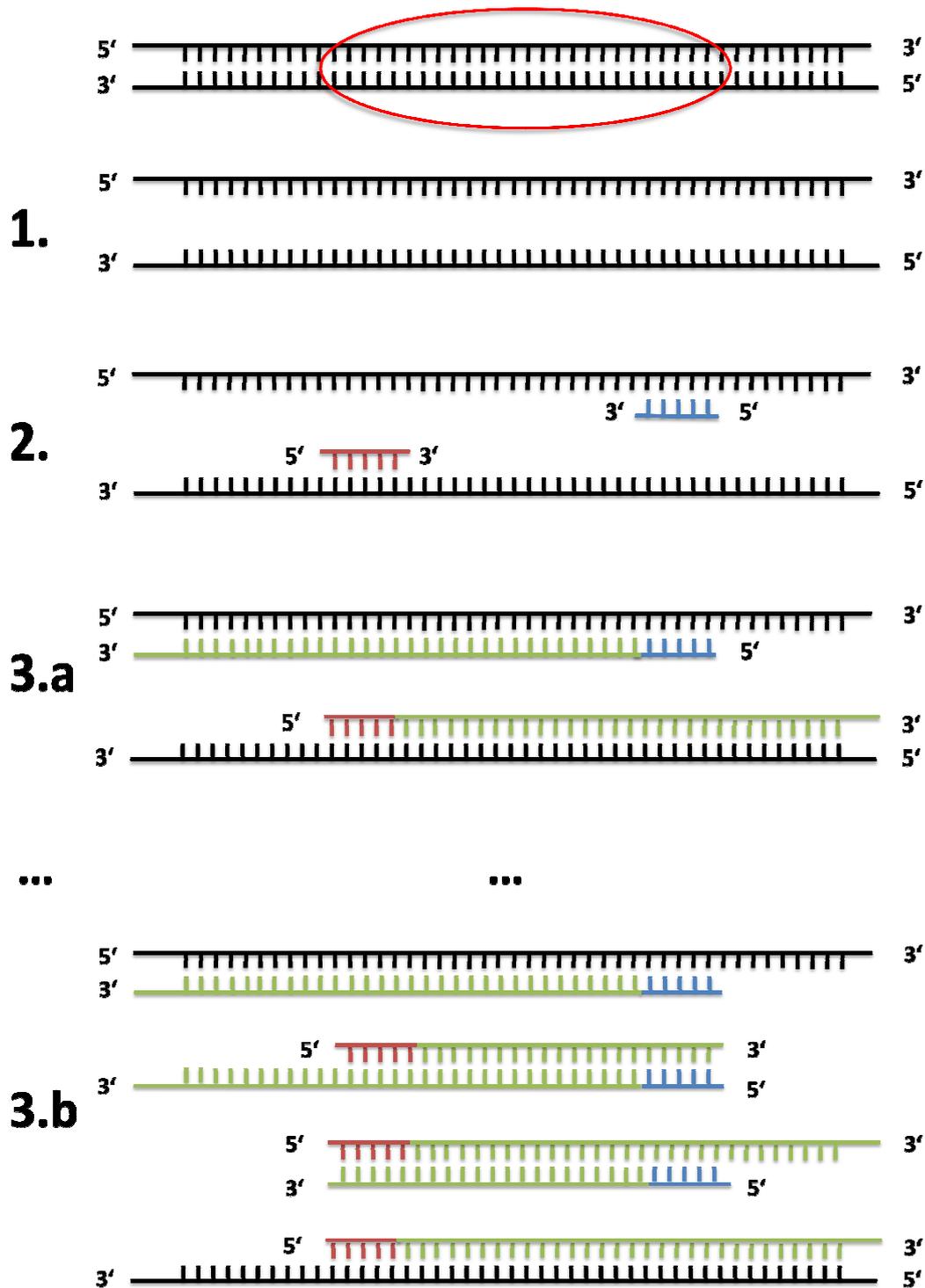


Abb. 2.6: Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die DNA liegt normalerweise als Doppelstrang vor. Der zu kopierende Abschnitt ist rot eingekreist. In Schritt 1 kommt es während der Temperaturerhöhung zur Denaturierung und zur Lösung der beiden Einzelstränge. In Schritt 2 binden je ein Vorwärts- und ein Rückwärts“-Primer“ an komplementären Nukleotid-Sequenzen der Einzelstränge an. Ab dieser Stelle erfolgt in Schritt 3a mittels einer Polymerase die Elongation bis zum Ende des Ausgangsstranges. Dies ändert sich ab dem folgenden Zyklus, dargestellt in Schritt 3b, bei dem die Polymerase erstmalig Kopien in der gewünschten Länge erstellt.

Die Identifikation des PCR-Produktes erfolgt mittels Längenbestimmung der kopierten Genabschnitte durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese. Hierbei wandern die DNA-Abschnitte wegen der elektrischen Ladung der Nukleinsäuren in unterschiedlichen Geschwindigkeiten in Richtung der Anode. Kurze DNA-Fragmente können sich dabei schneller durch die Poren des Agarosegels bewegen, so dass sie sich am Ende der Elektrophorese näher an der Anode befinden. Die eigentliche Identifikation erfolgt durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard. Es handelt sich hierbei um ein Gemisch aus verschiedenen DNA-Abschnitten mit bekannter Länge, welches sich während der Elektrophorese zu einer sogenannten DNA-Leiter aufbaut. Zur Kenntlichmachung stehen unterschiedliche DNA-Farbstoffe für die Elektrophorese zur Verfügung. Am gebräuchlichsten ist Ethidiumbromid, welches unter UV-Licht fluoresziert. Es weist DNA-Spuren ab einer Menge von 4 ng nach (Adkins und Burmeister 1996, S. 17).

Zur Quantifizierung lässt sich die cDNA-Konzentration nach Durchlauf des n-ten Zyklus der PCR (c_E) mittels Spektralphotometrie oder Fluoreszenzmessung bestimmen (Haque et al. 2003, S. 2). Mit folgender Formel kann hieraus die cDNA-Ausgangskonzentration (c_0) und somit die absolute Genexpression errechnet werden:

$$c_0 = c_E / 2^n$$

Die Bestimmung der Anfangskonzentration durch diese sogenannte Endpunktmethode ist relativ ungenau. Da die Reaktion ab einer bestimmten Zykluszahl eine Sättigung aufweist, steigt die Menge der kopierten DNA nicht unendlich exponentiell an. Ursächlich hierfür ist unter anderem sowohl der Verbrauch der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP), aus denen der neue cDNA-Strang synthetisiert wird, als auch der „Primer“ (Zimmermann und Mannhalter 1996, S. 270). Aufgrund der höheren Spezifität der Taq-Polymerase wird bei ihr das Plateau erst deutlich später als bei der Klenow-Polymerase erreicht (Saiki et al. 1988, S. 488). Auch bei einer Unterbrechung der Reaktion vor Erreichen des Plateaus zeigt die Methode eine sehr geringe Reproduzierbarkeit. Dies ist durch den exponentiellen Charakter des PCR begründet, bei dem kleinste Unterschiede in der Effizienz eine große Auswirkung auf die Endkonzentration des Amplikons haben können.

Die einfachste Möglichkeit den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Effekt zu umgehen und mittels einer konventionellen PCR eine quantitative Bestimmung der Genexpression durchzuführen, ist die Co-Amplifikation von kompetitiver DNA mit bekannter Ausgangskonzentration. Diese besitzt nahezu die gleiche Sequenz wie die zu messende DNA und wird mit dem gleichen exponen-

tiellen Faktor vervielfältigt. Durch einfache Dreisatzrechnung erhält man die Ausgangskonzentration der zu analysierenden DNA (Diviacco et al. 1992, S. 313). Allerdings ist die Herstellung der kompetitiven DNA recht aufwendig und ihr Einsatz durch die Einführung der im folgenden Kapitel beschriebenen, quantitativen PCR obsolet geworden.

2.3.2 Die quantitative PCR im Realtime-Verfahren (RT Q-PCR)

Bei der RT Q-PCR werden die Verfahren der DNA-Amplifikation und der Quantifizierung mittels Fluoreszenz in einem System kombiniert und so die von Zyklus zu Zyklus steigende Leuchtkraft des verwendeten Farbstoffes in Echtzeit gemessen. Hierdurch werden die Unzulänglichkeiten bei der Bestimmung der DNA-Anfangskonzentration mittels der im vorherigen Kapitel beschriebenen Endpunktmethode umgangen. Ermöglicht wird dies, indem man in einem Gerät sowohl einen Thermocycler für die Amplifikation als auch ein Spektrometer mit einer entsprechenden Auswertungssoftware integriert (Orlando et al. 1998, S. 263).

Es kommen verschiedene, sich in ihrer Funktionsweise stark unterscheidende Farbstoffe zum Einsatz, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden. Bei der einfachsten Methode wird ein Farbstoff verwendet, der ausschließlich an doppelsträngiger DNA bindet. Die drei anderen hier beschriebenen Verfahren beruhen auf einer Hybridisierung von speziellen Sonden, sogenannten „Probes“, am Amplikon. Diese setzen sich entweder aus einem fluoreszierenden „Reporter“ und einem die Fluoreszenz unterdrückendem „Quencher“ oder aus zwei interagierenden „Reportern“ zusammen (Bustin 2000, S. 174). Durch die Verwendung unterschiedlicher „Reporter“-Farbstoffe kann mittlerweile die Expression gleich mehrerer Gene in einem Versuchsansatz, als sogenannte Multiplex-PCR, durchgeführt werden (Lee et al. 1999, S. 349).

Interkalierende Farbstoffe

Die einfachste Methode beruht auf der Verwendung von Farbstoffen, wie zum Beispiel SYBR-Green, deren Fluoreszenz nach Einlagerung in doppelsträngiger DNA im Vergleich zum freien Zustand deutlich ansteigt. Bei der Denaturierung löst sich der Farbstoff erneut und die Leuchtkraft sinkt wieder. Die Fluoreszenz-Messung erfolgt aus diesem Grund am Ende jedes Polymerisations-schrittes. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass der Farbstoff völlig unspezifisch ist. Dadurch entsteht ein stärkeres Signal, womit auch kleinste cDNA-Mengen detektiert werden können. Allerdings ist

die Spezifität im Vergleich zu anderen Verfahren deutlich geringer, da der Farbstoff, im Gegensatz zu den komplementär bindenden Sonden, auch an unerwünschten Amplifikationsprodukten ansetzt (Bustin 2000, S. 176). Die Funktionsweise der interkalierenden Farbstoffe ist in Abbildung 2.7 grafisch dargestellt.

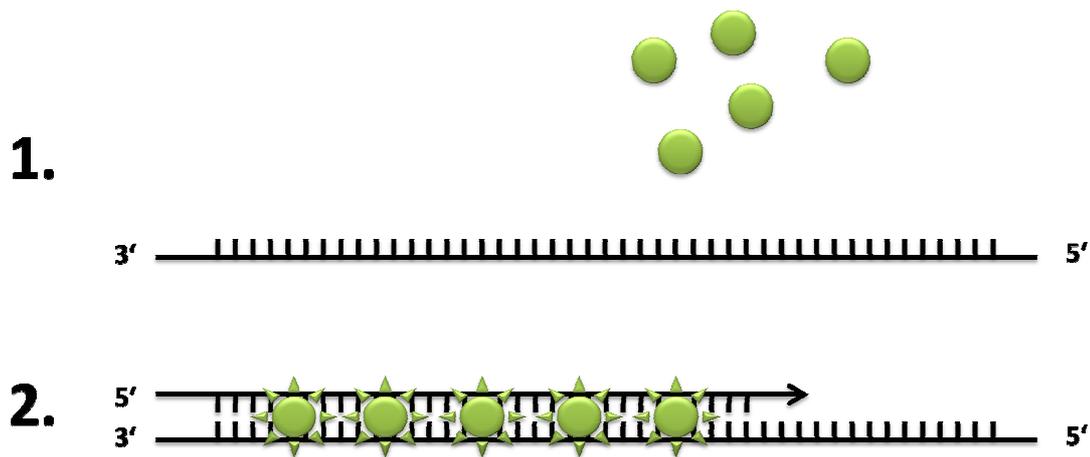


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer RT Q-PCR, bei der ein Farbstoff zum Einsatz kommt, der direkt mit der doppelsträngigen DNA interkaliert. 1) Ungebunden ist der Farbstoff wenig fluoreszierend. 2) Durch die Einlagerung in der doppelsträngigen cDNA fluoresziert er stärker. Durch die folgende Temperaturerhöhung und Denaturierung des cDNA-Doppelstranges löst sich auch der Farbstoff wieder. (Modifiziert nach Bustin 2000, S. 176)

„Molecular Beacon“

Bei dem als „Molecular Beacon“ bezeichneten Verfahren kommen Sonden zum Einsatz, die im Ruhezustand eine Schleifen- beziehungsweise Haarnadelstruktur einnehmen. Hierbei haben die an den entgegengesetzten Enden der Sonde liegenden „Reporter“ und „Quencher“ den geringstmöglichen Abstand zueinander, wodurch die Emission des „Reporters“ unterdrückt wird (Bustin 2000, S. 175). Der hierfür zugrundeliegende physikalische Effekt wird nach seinem Entdecker Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) genannt (Orlando et al. 2001, S. 262). Nachdem die Reaktionstemperatur im Anschluss an die Denaturierung der cDNA reduziert wird, lagern sich „Primer“ und Sonde an komplementären Abschnitten an. Dabei öffnet sich die Schleifenstruktur der Sonde, wodurch sich der Abstand von „Reporter“ und Quencher“ vergrößert und die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird. Die Intensität der Fluoreszenz gibt demnach die Menge an kopierter cDNA des vorangegangenen Zyklus wieder. Bei der darauffolgenden Polymerisation löst sich die Sonde

wieder vom cDNA-Strang und die beiden Enden schließen sich erneut. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der besonderen Struktur der Sonde. Da im Ruhezustand nicht immer die exakte Haarnadelstruktur eingenommen wird, kommt es zu einem hohen Hintergrundrauschen (Bustin 2000, S. 175).

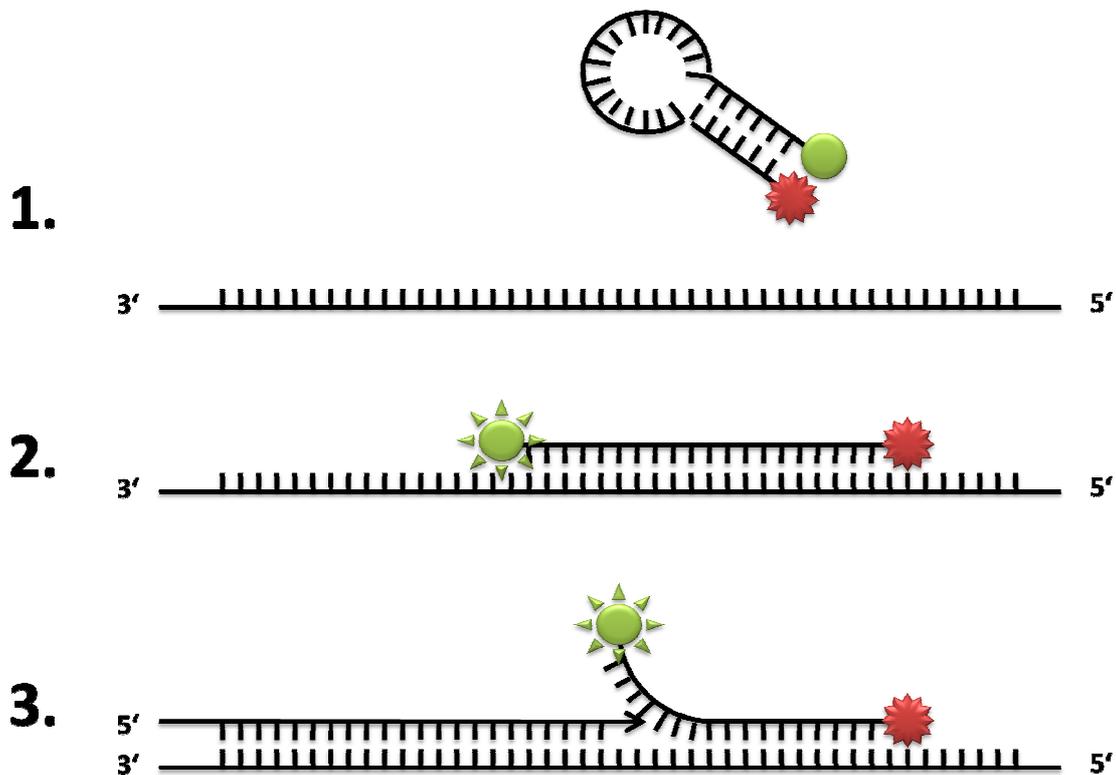


Abb. 2.8: Darstellung des „Molecular Beacon“-Prinzips, bei dem sich die „Reporter“- und „Quencher“-Farbstoffe am jeweiligen Ende der Sonde befinden. 1) Bei der ungebundenen Sonde unterdrückt der „Quencher“ das „Reporter“-Signal. 2) Legt sich die Sonde an das komplementäre cDNA-Stück an, so kann der „Reporter“ ohne Beeinflussung durch den „Quencher“ fluoreszieren. 3) Durch die Aktivität der Polymerase wird die Sonde wieder vom cDNA-Strang gelöst und die beiden Enden schließen sich erneut. (Modifiziert nach Bustin 2000, S. 175)

Hybridisierungs-Sonden

Ein im Vergleich zum „Molecular Beacon“ deutlich einfacheres Verfahren besteht in der Verwendung von sogenannten „LightCycler“- oder auch Hybridisierungs-Sonden. Hierbei kommen Paare aus zwei interagierenden Sonden zum Einsatz. Bei der ersten Sonde befindet sich am 3'-Ende ein Fluoreszenz-Donor, der durch Beleuchtung grünes Licht emittiert. Das Spektrum dieser Emission überlappt die Zielfrequenz des am 5'-Ende der zweiten Sonde befindlichen, fluoridierenden Farb-

stoffes. Während der Abkühlung eines PCR-Zyklus lagern sich die Sonden an den Zielabschnitt der cDNA an, so dass die beiden Farbstoffe direkt aneinander zu liegen kommen. Durch die Anregung der Fluoreszenz des zweiten Farbstoffes emittiert dieser rotes Licht, welches mit dem Spektrometer gemessen wird. Bei der nachfolgenden Elongation lösen sich die Sonden wieder von der cDNA und somit auch voneinander (Bustin 2000, S. 177).

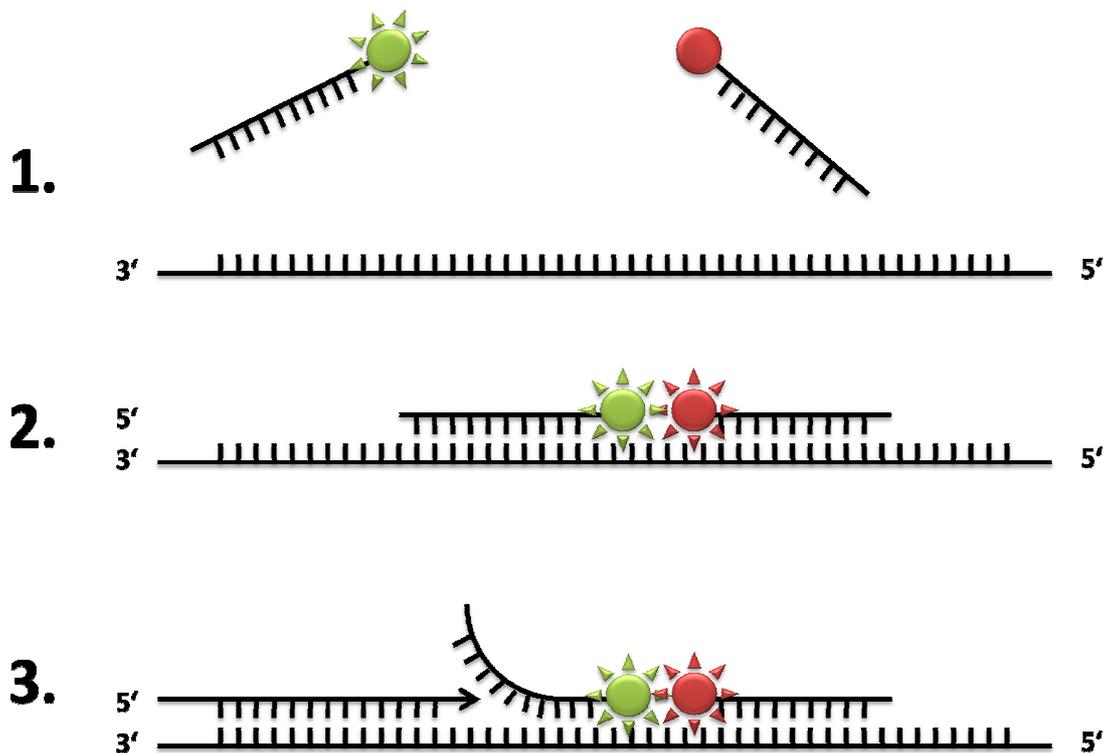


Abb. 2.9: Darstellung der Funktionsweise von Hybridisierungs-Sonden. 1) Es befinden sich zwei interagierende Farbstoffe auf unterschiedlichen Sonden. 2) Lagern diese komplementär am cDNA-Strang an, so regt die Fluoreszenz des „Donors“ den eigentlichen „Reporter“ an, Licht zu emittieren. 3) Durch die Polymerase werden beide Sonden wieder vom cDNA-Strang gelöst. (Modifiziert nach Bustin 2000, S. 176)

Hydrolyse-Sonden

Eine weitere Markierungsmethode nutzt Hydrolyse-, sogenannte „TaqMan“-Sonden. Dieses Verfahren wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet. Das Prinzip ähnelt dem des „Molecular-Beacon“, hat diesem gegenüber aber einige Vorteile. Auch hier wird eine Sonde verwendet, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden „Reporter“- und an ihrem 3'-Ende einen „Quencher“-Farbstoff besitzt. Durch die unmittelbare Nähe zueinander wird die Emission des „Reporters“

unterdrückt. Im Unterschied zum „Molecular-Beacon“-Verfahren wird jedoch während der Elongation die Sonde nicht nur vom DNA-Strang gelöst, sondern durch die 5'-Nuklease-Aktivität der eingesetzten Polymerase hydrolysiert. Durch den enzymatischen Abbau werden „Reporter“ und „Quencher“ getrennt, so dass die ansteigende Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Polymerase ist doppelstrangspezifisch, wodurch ungebundene Sonden intakt bleiben. Diese Methode bietet die höchste Spezifität aller Verfahren, da die Freisetzung des „Reporters“ erst durch eine erfolgreiche Elongation erfolgt und somit direkt von der Spezifität der „Primer“ abhängig ist. Durch die zusätzliche Hydrolysierung der Sonden ist die Geschwindigkeit der Polymerase während der Elongation verringert, so dass die Reaktionszeiten etwas länger als bei den anderen beschriebenen Verfahren sind. Die Emission des „Reporters“ wird durch den „Quencher“ aufgrund des etwas größeren Abstandes zwischen beiden auf der intakten Hydrolyse-Sonde etwas schwächer unterdrückt als bei den Sonden der „Molecular Beacon“-Methode (Bustin 2000, S. 178).

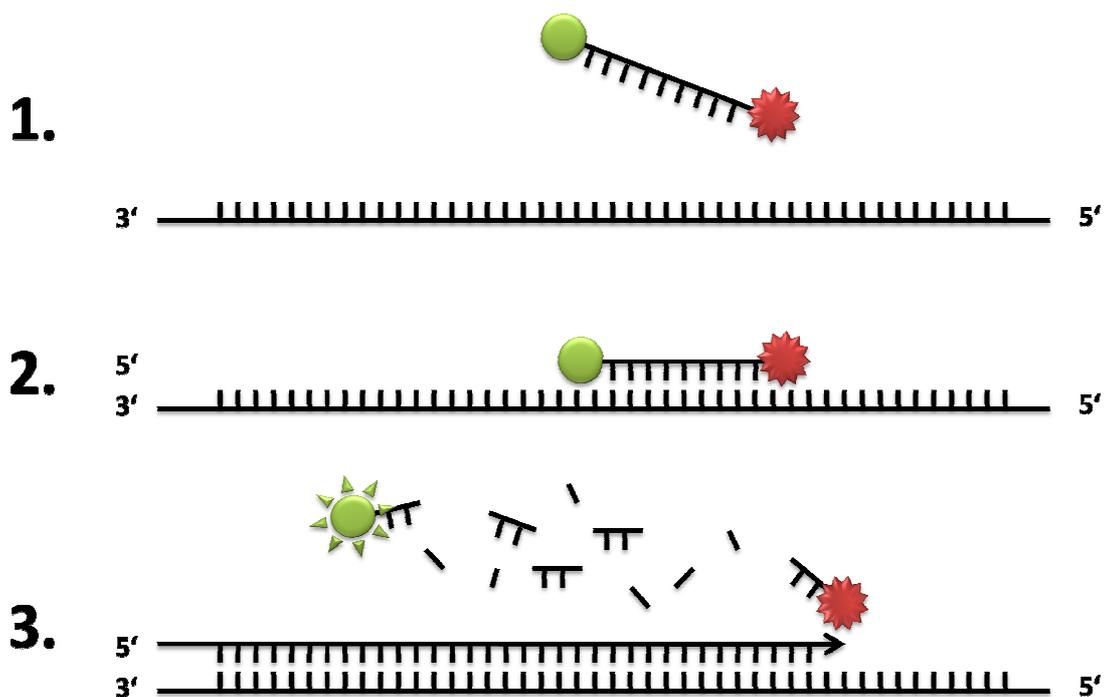


Abb. 2.10: Darstellung der Funktionsweise von Hydrolyse-Sonden. 1) + 2) Es befinden sich zwei interagierende Farbstoffe auf der gleichen Sonde. Die Nähe des „Quenchers“ unterdrückt die fluoreszierende Eigenschaft des „Reporters“. 3) Durch die Polymerase wird die Sonde hydrolysiert. Der nun freie „Reporter“ kann ungehindert emittieren. (Modifiziert nach Bustin 2000, S. 178)

2.3.3 Eigenschaften von Primer-Probe-Designs (PPD)

Ausschlaggebend für eine hohe Spezifität der RT Q-PCR sind die verwendeten Primer. Sie sollten „Intron-Spanning“ und somit spezifisch für cDNA sein, um die Amplifikation von DNA-Kontaminationsprodukten zu verhindern. Darüber hinaus können unspezifische Bindungen an der cDNA durch die Verwendung von „Primern“ mit einem relativ instabilen 3'-Ende reduziert werden. Diese „Primer“ besitzen lediglich eine oder zwei Guanin- oder Cytosin-Basen innerhalb der letzten fünf Nukleotide. Entscheidend für Spezifität der RT Q-PCR ist die richtige Konzentration der „Primer“ im Reaktionsansatz: Ist sie zu hoch, kann es zu einer Anhäufung von unspezifischen cDNA-Kopien kommen. Eine zu niedrige Konzentration ist hingegen für die Spezifität des Verfahrens nicht von Bedeutung. Sie führt allerdings zu einer vorzeitigen Plateauphase im Amplifikationsplot (Bustin 2000, S. 179).

Die optimale Konzentration der Sonden, im Englischen „Probes“, ist abhängig von ihrer Hintergrund-Fluoreszenz. Diese ist bei den Hybridisierungs- und „Molecular Beacon“-Sonden geringer als bei den Hydrolyse-Sonden, so dass bei Letzteren eine zu hohe Konzentration die Sensitivität des Verfahrens reduziert. Bei der Verwendung aller genannten Sonden ist es entscheidend, dass sie am spezifischen cDNA-Abschnitt binden müssen, bevor die Polymerase ihn erreicht. Dies ist möglich, da das Temperaturoptimum für eine Bindung der Sonden etwa 10 °C höher als das der „Primer“ ist und dieses somit beim Abkühlen nach der Denaturierung zuerst erreicht wird (Bustin 2000, S. 179). Moderne Sonden sind am 3'-Ende mit einem sogenannten „Minor Groove Binder“ (MGB) versehen. Dieser MGB erhöht die Stabilität der Bindungskräfte zwischen Sonde und cDNA. Aus diesem Grund können die Sonden deutlich kürzer aufgebaut sein, wodurch sich ihre Sensitivität und Spezifität weiter steigern lässt. Hierdurch sinkt die benötigte Konzentration, was zu weniger Hintergrundfluoreszenz führt (Kutyavin et al. 2000, S. 661).

Mittlerweile sind gebrauchsfertige Ansätze aus „Primern“ und Sonden, sogenannte „Primer-Probe-Designs“ (PPD) mit optimalen Konzentrationen und Mischungsverhältnissen kommerziell erhältlich. Diese verfügen über eine, vom jeweiligen Hersteller garantierte Bindungsspezifität, so dass aufwendige Vorversuche entfallen können. Oftmals ist bei diesen Ansätzen das Temperaturoptimum für die Bindung der „Primern“ an die DNA identisch mit dem für die enzymatische Funktion der Polymerase, wodurch sich ein Temperaturwechsel innerhalb jedes PCR-Zyklus erübrigt.

2.3.4 Normalisierung mittels Haushaltsgenen

Wie die konventionelle PCR ist auch die RT Q-PCR aufgrund des exponentiellen Charakters sehr anfällig gegenüber externen Einflussfaktoren. Diese reichen von Verfahrensvariationen über Pipettier-Fehlern zu verschiedenen Ausgangsmengen und -qualitäten der cDNA beziehungsweise der ursprünglichen RNA sowie zu Unterschieden bei der Effizienz der Enzyme. Um diese Faktoren zu eliminieren, werden die Rohdaten der Genexpressionsanalyse üblicherweise normalisiert. Hierfür werden in aller Regel als endogene Kontrollen sogenannte „House keeping Genes“ oder Haushaltsgene verwendet. Sie werden von den Zellen stets in einer kontinuierlichen Menge exprimiert und bleiben aus diesem Grund in ihrer Konzentration gegenüber externen Einflüssen, insbesondere einer Bestrahlung, im zeitlichen Verlauf konstant (Banda et al. 2008, S. 127).

Der Vorteil bei der Verwendung von Haushaltsgenen gegenüber dem in Kapitel 2.3.1 vorgestellten Prinzip der kompetitiven DNA ist, dass diese nicht aufwendig synthetisiert werden müssen. Darüber hinaus kann ein Haushaltsgen zur Normalisierung beliebig vieler Zielgene genutzt werden (Orlando 1998, S. 264). Abhängig vom verwendeten genotoxischen Stressor und der zu untersuchenden Zelllinie kommen unterschiedliche Haushaltsgene in Betracht. Die Gebräuchlichsten sind 18S-rRNA, β -Aktin, β -2 Mikroglobulin, Cyclophilin, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), β -Glucuronidase, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), Phosphoglycerokinase, das saure ribosomale Protein und der Transferrin-Rezeptor (TFR) (Banda et al. 2008, S. 133).

2.4 Beschreibung der untersuchten Gene

2.4.1 „Activating Transcription Factor 3“ (ATF3)

ATF3 ist eines der Proteine, welches unmittelbar als Teil der zellulären Antwort auf eine Vielzahl unterschiedlicher Stressoren vermehrt gebildet wird. Es gehört zu der ATF / „cAMP responsive Element binding“ (CREB) -Proteinfamilie. Diese umfasst eine ganze Gruppe von Proteinen, die durch eine sogenannte „Leucin-Zipper“-Basis (bZIP) gekennzeichnet und ausnahmslos an verschiedenen Stressreaktionen beteiligt sind (Hai und Hartman 2001, S. 2; Yan und Boyd 2006, S. 926). Eine Übersicht der im Folgenden beschriebenen vielfältigen Regulationsmechanismen, wie auch der verschiedenen Funktionen von ATF3, ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

Das Protein ATF3 wird normalerweise nur in niedriger Konzentration exprimiert. Durch unterschiedliche extrazelluläre Reize wie genotoxische Stressoren, aber auch Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TGF- β kann diese innerhalb von Stunden sehr stark ansteigen (Liang et al. 1996, S. 1695; Hai und Hartman 2001, S. 3). Inwieweit der Tumorsuppressor p53 für die Expression von ATF3 nach Einwirkung radiogener Stressoren benötigt wird, ist nicht eindeutig geklärt. Einige Studien konnten zeigen, dass UV-Strahlung und genotoxische Chemikalien die Expression von ATF3 auch ohne p53 aktivieren können. Im Zusammenspiel mit ionisierender Strahlung ist es allerdings auf ein funktionsfähiges p53 angewiesen (Fan et al. 2002, S. 7489). Darüber hinaus existieren auch p53-unabhängige Signalwege und Steuerkreisläufe für ATF3 (Liang et al. 1996, S. 1701). Diese alternative Regulation wird vorwiegend über p38 (Harper et al. 2005, S. 3471) und teilweise über die „c-Jun-NH₂-terminale Kinase / stress-aktivierte Proteinkinase“ (JNK/SAPK) initiiert. Hierdurch werden das Nibrin-Protein und die „AT-mutated“ (ATM) -Proteinkinase aktiviert. Diese führt über eine Phosphorylierung von ATF2 (Kool et al. 2003, S. 4236) beziehungsweise c-Jun (Liang et al. 1996, S. 1700) zur Aktivierung des ATF3-Promotors. Ebenfalls ist eine Regulation über die „extracellular Signal regulated Kinase“ (ERK) möglich (Tamura et al. 2005, S. 2590). ERK, JNK/SAPK und p38 sind die drei Hauptregulationspfade, die von der „Mitogen activated Protein Kinase“ (MAPK) über die „MAPK-Kinase-Kinase 1 (MEKK1) gesteuert (Fan et al. 2002, S. 7489) und unter anderem durch Anisomycin aktiviert werden können (Lu et al. 2007, S. 561). Weitere Aktivatoren sind die „eukaryotic Initiation Factor 2“ (eIF2) -Kinase (Jiang et al. 2004, S. 1365), Interleukin 1 β (IL-1 β) (Hartman et al. 2004, S. 5721) und Homocystein (Cai et al. 2000, S. 2140).

ATF3 liegt zumeist als Heterodimer mit anderen Proteinen oder als Homodimer vor. Als Letzteres ist es vorwiegend ein Transkriptions-Repressor, auch wenn der Name auf aktivierende Funktionen schließen lässt. So wirkt es sowohl indirekt, über eine Herunterregulation von Zyklin D1, als auch direkt tumorsuppressiv indem es unmittelbar das Zellwachstum hemmt (Lu et al. 2006, S. 10478). Darüber hinaus steuert es die Expression diverser anderer Gene wie zum Beispiel von Fibronectin, Decorin, Thrombospondin 2 und vom pro-apoptotischen Protein Par-4 (Perez et al. 2001, S.1135). Daneben ist ATF3 auch in weitere anti-karzinogene Prozesse involviert, indem es unter anderem den Promoter des proinvasiven Gens „Matrix Metalloproteinase 2“ (MMP-2, auch 72-kDa Typ IV Kollagenase) herunter reguliert (Yan et al. 2002, S. 10804). Als Heterodimer mit anderen Mitgliedern der ATF/CREB-Familie wie ATF2, dem „Activator Protein 1“ (AP-1, auch JunB, Jun/Fos) sowie dem „DNA damage inducible Transcript 3“ (DDIT3, auch Chop10) wirkt es unter anderem für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und für Selectin-E als Transkriptions-Aktivator (Hai und Hartman 2001, S. 3).

Unabhängig von Transkriptionsregulationen führt ATF3 selbst zu einer Erhöhung der p53-Konzentration in den Zellen. Dies geschieht, indem ATF3 am Carboxyl-Ende von p53 bindet und es so stabilisiert. Auf diese Art wird sowohl die „Mouse double Minute 2 Homolog“ (MDM2) - abhängige Ubiquitinierung und proteasomale Degradation verhindert als auch der ebenfalls MDM2-gesteuerte Export von p53 aus dem Zellkern unterbunden. Ein Fehlen beziehungsweise ein Defekt von ATF3 mindert die p53-abhängigen Funktionen wie die Zellzykluskontrolle beim Übergang von der G2- zur M-Phase und die Apoptose-Regulation (Yan et al. 2005, S. 2433). ATF3 wirkt zusätzlich inhibierend auf den Übergang von der G1- zur S-Phase. Dies geschieht unter anderem durch eine Hemmung der Phosphorylierung des zellwachstumshemmenden Retinoblastoma-Proteins (pRB) (Lu et al. 2006, S. 10478).

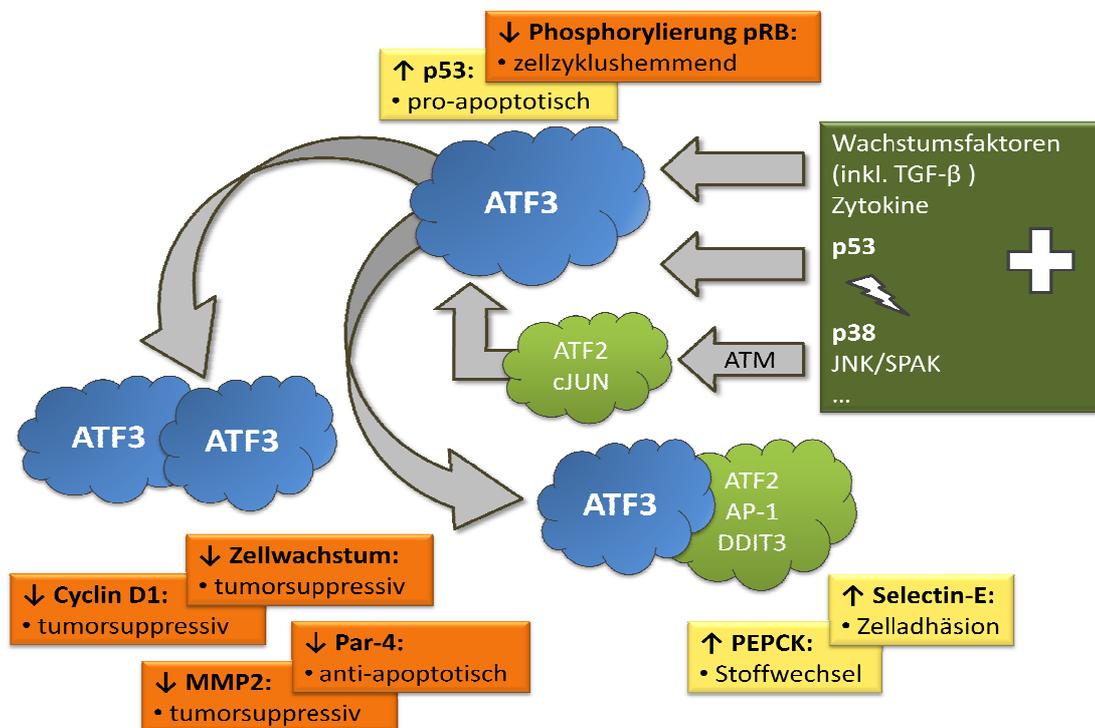


Abb. 2.11: Die Expression von ATF3 kann sowohl direkt durch genotoxische Stressoren (dargestellt durch den Blitz) als auch durch p53 sowie diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine erhöht werden. Die über ATM vermittelte, indirekte Hochregulation über eine erhöhte Aktivität von ATF2 und cJUN wird vor allem durch p38 und im geringeren Ausmaß von JNK/SPAK initiiert. ATF3 erhöht die Konzentration von p53 und hemmt die Phosphorylierung von pRB. Als Homodimer wirkt es anti-apoptotisch und tumorsuppressiv. Als Heterodimer mit ATF2, AP-1 und DDIT3 tritt es als Transkriptionsfaktor auf.

2.4.2 „BCL-2 -associated X Protein“ (BAX)

Eine große Gruppe von Genen, die regulativ auf die Apoptose einwirken, ist die der „B-Cell Lymphoma 2“-Familie (BCL-2), zu denen auch BAX gehört. Deren Mitglieder können in drei Fraktionen untergliedert werden. Dies sind zum einen die pro-apoptotischen Proteine mit mehreren Bindungs-Domänen, zu denen unter anderem BAX und das „BCL-2 -Antagonist / Killer Protein“ (BAK) gehören. Die zweite Gruppe umfasst die anti-apoptotischen Proteine wie BCL-2 und BCL-x_L, die ebenfalls mehrere Domänen besitzen. Die letzte Gruppe bilden Proteine mit nur einer Domäne, zu denen das „p53 upregulated Modulator of Apoptosis“ (PUMA), der „BH3-interacting Domain Death Agonist“ (BID), der „BCL-2 -like 11 Apoptosis Facilitator“ (BCL2L11), der „BCL-2 -interacting Killer“ (BIK) und der „BCL-2 -Antagonist of Cell Death“ (BAD) gehören (Kuwana und Neumeyer, 2003, S. 693). Alle genannten Proteine bilden Dimere mit sich selbst oder anderen Proteinen derselben Familie und können so die Apoptose initiieren oder hemmen (Basu und Haldar 1998, S. 1100). Sowohl die unterschiedlichen Aktivierungswege wie auch die Funktionen von BAX, wie sie im Folgenden beschrieben werden, sind in Abbildung 2.12 schematisch dargestellt.

Die Expression von BAX wird sowohl von p73 als auch von p53 hoch reguliert (Flinterman et al. 2005, S. 5945). Eine indirekte Regulation des normalerweise im Zytosol durch BCL-2 in inaktiven Komplexen gebundenen BAX (Wolter et al. 1997, S. 1286) erfolgt über eine p53-abhängige Anhäufung von PUMA. Aktiviertes BAX hingegen bildet mit dem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten BAK Komplexe (Letai 2005, S. 2648), die eine erhöhte Permeabilität und letztlich eine Zerstörung der Membran bewirken. Das hierdurch freiwerdende Cytochrom C führt über die Aktivierung von Caspasen zu einer „mitochondrialen“ Apoptose (Sun et al. 2009, S. 12). Darüber hinaus scheint BAX über p27 einen Einfluss auf den Zellzyklus zu haben. Reduziert sich die BAX-Konzentration durch Migration zur äußeren Mitochondrienmembran, so steigt der p27-Spiegel und der Übergang von der G1- zur S-Phase verzögert sich (Brady et al. 1996, S. 6991).

BCL-2 und BCL-x_L greifen in zweifacher Hinsicht hemmend in diesen beschriebenen Prozess ein, indem sie sowohl BAX als auch dessen Aktivatoren BID und BCL2L11 in inaktiven Komplexen binden (Kuwana und Neumeyer 2003, S. 694). Umgekehrt ist aktiviertes BAX in der Lage, sowohl die BAX-Komplexe mit BCL-2- beziehungsweise BCL-x_L als auch die mit BID und BCL2L11 zu lösen. Somit liegt eine mehrfache Feedbackschleife von BAX vor (Cui et al. 2008, S. 1474). Letztlich ist die Konzentration von BAX und das Verhältnis von BAX zu BCL-2 der Schlüsselfaktor für

die mitochondriale Apoptose (Chen et al. 2007, S. 4309).

Daneben existieren auch p53-unabhängige Weg der Aktivierung von BAX. Zum einen löst das „Nijmegen Breakage Syndrome 1“ (NBS1) -Protein einen gleichfalls inaktiven Komplex zwischen Ku70 und BAX (Iijima et al. 2008, S. 1706). Darüber hinaus können BCL-2 und BCL-x_L auch durch BAD und BIK inhibiert werden, so dass diese ebenfalls indirekt an der Aktivierung von BAX beteiligt sind (Kuwana und Neumeyer 2003, S. 694). Eine BCL-2-unabhängige Blockierung von BAX kann durch Sauerstoffradikale erfolgen. Die durch Wasserstoffperoxid aktivierte „Phosphatidylinositol-3 Kinase“ (PI3K) kann mittels der Proteinkinase B das im Zytoplasma befindliche BAX modifizieren, so dass es nicht in die äußere Mitochondrienmembran wandert (Sadidi et al. 2009, S. 583).

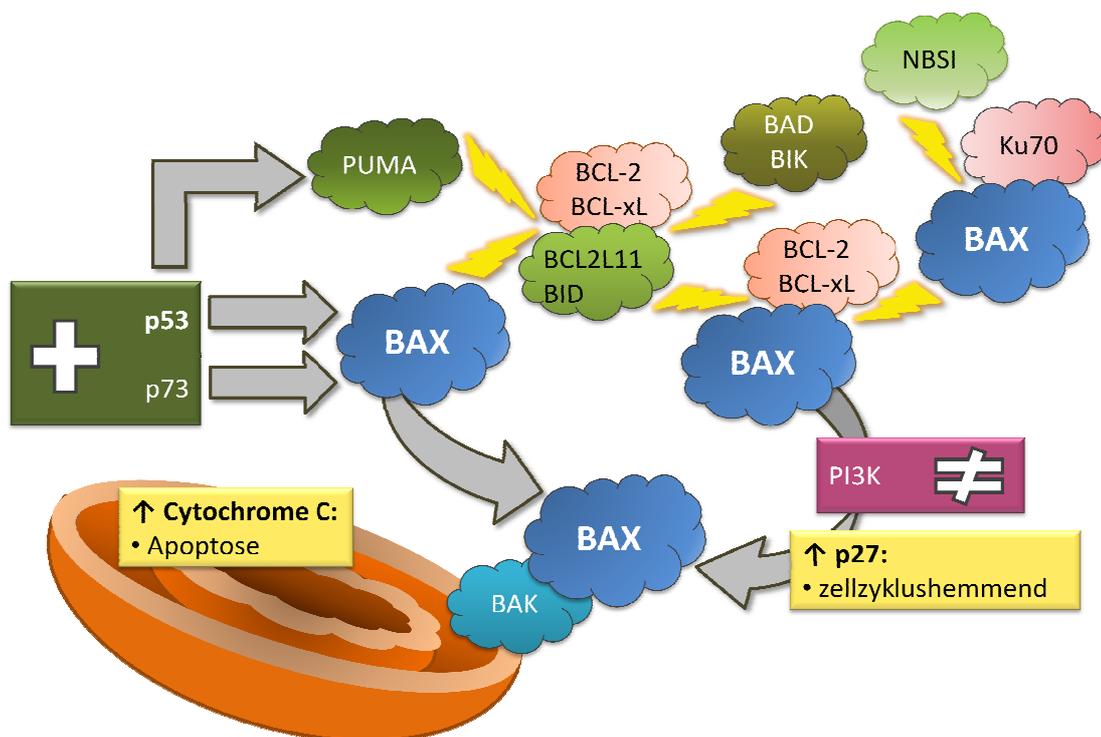


Abb. 2.12: BAX liegt im Zytosol in einem inaktiven Komplex mit BCL-Proteinen vor. Seine Expression kann sowohl durch p53, wie auch p73 erhöht werden. In Abhängigkeit von p53 wird es sowohl über PUMA, wie auch durch sich selbst aktiviert. Eine p53-unabhängige Regulation erfolgt über NBS1 sowie BAD und BIK. Freies BAX migriert zur äußeren Mitochondrienmembran. Hier bindet es an BAK und erhöht so die Membran-Permeabilität. Das ausströmende Cytochrom C führt zur Apoptose. Gleichzeitig erhöht sich mit dem Verbrauch von BAX die Konzentration an freiem p27, wodurch der Zellzyklus in der G1-Phase unterbrochen wird. Die Migration von BAX kann durch PI3K verhindert werden.

2.4.3 „Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1 A” (CDKN1A) / p21

Das Protein p21 wird aufgrund seiner Funktion als zyklinabhängiger Kinase (CDK) -Inhibitor auch als CDKN1A bezeichnet. Es ist das wichtigste Mitglied der „Cip“-Familie und wird deswegen auch Cip1 genannt. Alle Mitglieder dieser Familie, zu der auch p27 und p57 gehören, besitzen eine spezielle Bindungsstelle für Zyklin/CDK -Komplexe am Amino-Ende (Gartel und Tyner 2002, S. 639). An seinem Carboxyl-Ende weist CDKN1A Bindungsstellen sowohl für das „proliferating Cell Nuclear Antigen” (PCNA) (Xiong et al. 1993, S. 1572) als auch für das „Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45” (GADD45) -Protein auf (Dotto 2000, S. 47). Die Auswirkungen des Zusammenspiels mit den beiden genannten Proteinen sind in den Kapiteln 2.4.5 und 2.4.6 beschrieben.

Die Expression von CDKN1A wird hauptsächlich durch p53 vor allem in Folge einer DNA-Schädigung erhöht (Macleod et al. 1995, S.935). Durch den Einfluss von Ribonukleotid-Biosynthese-Inhibitoren kann eine p53-abhängige Expressionserhöhung auch ohne vorhergehenden genotoxischen Stress erfolgen (Linke et al. 1996, S. 934). Unabhängig von p53 induzieren Sauerstoffradikale und verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie IL-3 und IL-6 sowie der „Transforming Growth Factor β ” (TGF- β), der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Histon-Deacetylase (HDAC) -Inhibitoren und γ -Interferon die Expression von CDKN1A (Gartner und Tyner 2002, S. 641). Weitere Transkriptionsfaktoren sind AP-2, E2F-Proteine, „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT) -Proteine sowie „CCAAT / Enhancer binding Proteins“ (C/EBP α und C/EBP β) (Gartel und Tyner 1999, S. 284). Triptolide, das „Apoptosis-stimulating Protein of p53“ (ASPP), c-Jun sowie das Protein E1A unterdrücken die Expression von CDKN1A (Gartel und Tyner 2002, S. 641). Der Abbau von CDKN1A erfolgt sowohl Ubiquitin-abhängig (Maki und Howley 1997, S. 355) wie -unabhängig (Sheaff et al. 2000, S. 403). Darüber hinaus ist die Caspase 3 in der Lage CDKN1A zu spalten (Zhang et al. 1999, S. 1131).

Die vermehrte Expression von CDKN1A inhibiert CDK2, was zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in der G1-Phase führt (El-Deiry et al. 1994, S. 1173). Normalerweise bindet in dieser Phase pRB an den Elongationsfaktor 2 (EF2) (Nevins et al. 1995, S. 233). Durch die ausbleibende Phosphorylierung von pRB aufgrund des fehlenden CDK2 bleibt EF2 gebunden und ist somit nicht in der Lage, den Übergang zur S-Phase einzuleiten (Brugarolas et al. 1999, S. 1003). Der gleiche Mechanismus findet auch zu gewissen Teilen beim Austritt aus der S-Phase (Ogryzko et al. 1997, S. 4877) und aus der G2-Phase (Niculescu et al. 1998, S. 629) statt. Durch diese Unterbrechung des Zellzyklus ermöglicht CDKN1A eine DNA-Reparatur und verhindert auf diese Weise eine p53-

abhängige Apoptose (Gartel und Tyner 2002, S. 645). Darüber hinaus übt CDKN1A einen hemmenden Einfluss auf die durch MAPK vermittelte Apoptose aus. Desweiteren bindet es sowohl an GADD45A als auch an PCNA und kann diese hierdurch regulieren (Dotto 2000, S. 47). Ebenfalls ist CDKN1A in der Lage eine p53-unabhängige Apoptose sowohl durch die Caspase 3 (Suzuki et al. 1998, S. 931) als auch die Caspasen 8 und 10 (Xu und El-Deiry 2000, S. 179) zu verhindern. Eine hohe Konzentration von CDKN1A verhindert somit sowohl eine p53-abhängige, wie auch eine p53-unabhängige Apoptose (Gartel und Tyner 2002, S. 640). Die wesentlichen Wege zur Aktivierung von CDKN1A und seine Hauptfunktionen sind in Abbildung 2.13 zusammengefasst.

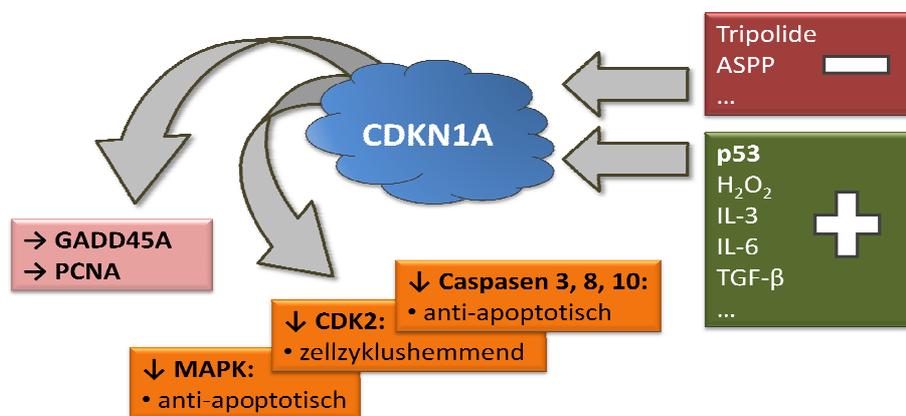


Abb. 2.13: CDKN1A inhibiert die CDK2-abhängige Phosphorylierung von pRB und verhindert so letztlich den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus. Sowohl über die Hemmung der Caspasen 3, 8 und 10 als auch über MAPK wirkt es anti-apoptotisch. Darüber hinaus interagiert es mit GADD45A und PCNA, worauf in den dortigen Abschnitten eingegangen wird. Die Expression von CDKN1A kann sowohl durch p53 als auch durch p53-unabhängige Faktoren erhöht werden. Unter anderem durch Tripolide und ASPP wird sie gehemmt.

2.4.4 „Damaged DNA binding Protein 2“ (DDB2) / p48

DDB2 bildet als Protein p48 zusammen mit DDB1 (p125) einen heterodimeren DDB-Komplex, der in der Lage ist, ein weites Spektrum von DNA-Schäden zu erkennen (Wittschieben und Wood 2003, S. 1065). Die wichtigsten sind die durch UV-Strahlen induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin(6-4)-Pyrimidon-Photoproducte (6-4PP). Diese Veränderungen werden durch den sogenannten „Global Genome Repair“ (GGR)-Teilpfad der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) korrigiert (Reardon und Sancar 2003, S. 2539). Eine Mutation des DDB2-kodierende Genes führt aufgrund der hieraus resultierenden gestörten DNA-Reparatur zur Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum (XP) Typ E (Nichols et al. 1996, S. 24317).

Der Tumorsuppressor p53 ist Transkriptionsfaktor einiger Gene der NER darunter auch der XP-Komplementgruppe C (XPC) und von DDB2 (Fitch et al. 2003, S. 819). Umgekehrt reguliert DDB2 auch die Konzentration von p53, so dass es nach Strahlenexposition zu einem sprunghaften Anstieg der Konzentrationen beider Proteine kommt (Itoh et al 2003, S. 7552). Somit ist DDB2 indirekt in die p53-abhängige Apoptose involviert (Itoh et al. 2007, S. 1579). Posttranslational wird die Konzentration von DDB2 durch proteasomalen Abbau reguliert (Fitch et al. 2003, S. 824).

DDB führt selbst keine Exzision der beschädigten DNA durch. Seine Aufgabe liegt darin, die entsprechende Position der CPD zu markieren (Hanawalt 2002, S. 8950). Im Folgenden kommt es zu einer Interaktion von DDB und dem Replikationsprotein A (RPA), wodurch sich die Bindungsfähigkeit an der DNA für beide Proteine erhöht (Otrin et al. 1997, S. 1164). DDB bildet im nächsten Schritt mit XPA und der geschädigten DNA einen Dreifach-Komplex (Reardon und Sancar 2003, S. 2544). Als Teil des E3-Ligasekomplexes modifiziert es XPC und andere DDB. Hierdurch werden diese mit Ubiquitin-Proteinen versetzt, wodurch sich deren Bindungskräfte an der DNA erhöhen (Sugasawa et al. 2005, S. 387). Darüber hinaus interagiert DDB mit der Histon-Acetyltransferase „CREB-binding-Protein“ (CBP). Hierdurch werden die vier Haupt-Histone acetyliert und lösen auf diese Weise die Chromatin-Struktur im Rahmen der DNA-Reparatur (Datta et al. 2001, S. 90). DDB übt auch Einfluss auf die Expression verschiedener Gene aus. Durch Interaktion mit dem Protein E2F1 werden Gene reguliert, die für die DNA-Replikation und den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus benötigt werden (Hayes et al. 1998, S. 248).

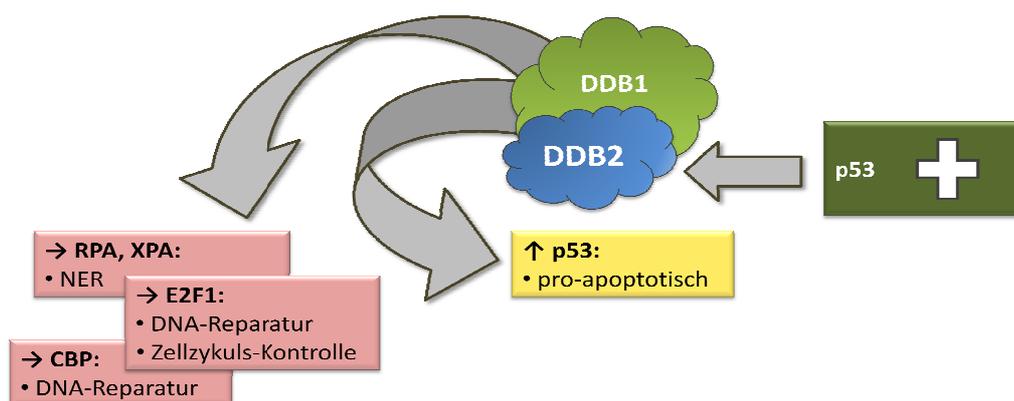


Abb. 2.14: Als Heterodimer mit DDB1 dient DDB2 vor allem der Erkennung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und ermöglicht so über RPA und XPA die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER). Darüber hinaus unterstützt es die DNA-Reparatur über die CBP-abhängige Histon-Acetylierung. Durch Aktivierung von E2F1 reguliert DDB2 die Transkription von Genen, die für die DNA-Reparatur und die Zellzykluskontrolle verantwortlich sind. Mit p53 bildet es einen Regulationskreislauf, da beide Proteine gegenseitig ihre Expression beeinflussen.

2.4.5 „Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 45 A” (GADD45A)

Die Familie der GADD45-Proteine besteht aus den drei Mitgliedern GADD45A, -B und -G. Die beiden zuletzt genannten wurden in der Vergangenheit auch als „myeloid Differentiation primary Response 118“ (MyD118) und „compensatory Response 6“ (CR6) bezeichnet (Liebermann und Hoffman 2007, S. 329). Die relativ kleinen, vorwiegend im Zellkern lokalisierten GADD45-Proteine ähneln sich stark in ihrem Aufbau (Carrier et al. 1994, S. 32676). Die im Folgenden beschriebenen Funktionen und Aktivierungswege von GADD45A sind in Abbildung 2.15 zusammengefasst.

Die Gene der GADD45-Familie können direkt durch genotoxischen Stress aktiviert werden. (Wang et al. 1999, S. 3710). Die Expression von GADD45A erhöht sich sowohl durch UV-Licht wie auch durch Röntgen-Strahlung. Es ist das einzige röntgenstrahlensensible Gen, dessen Induktion nicht durch die Proteinkinase C (PKC) vermittelt wird (Papathanasiou et al. 1991, S. 1015). Darüber hinaus ist es auch das einzige Gen der GADD45-Familie, welches durch p53 induziert wird (Guilouf et al. 1995, S. 2697), wofür allerdings zusätzlich Ataxia-Telangiectasia (AT) -Proteinkinasen erforderlich sind (Kastan et al. 1992, S. 587). Im Weiteren verfügt es ebenso über verschiedene p53-unabhängige Aktivierungswege: Zusammen mit GADD45B wird es auch durch IL-6 und TGF- β aktiviert (Zhang W. et al. 1999, S. 4899). In Knochenmarkzellen steigert sich die Expression aller drei GADD45-Proteine durch eine Erhöhung von IL-3 sowie vom Granulozyten- und Granulozyten-/Makrophagen- „Colony-stimulating Factor“ (G-CSF und GM-CSF) (Zhang W. et al. 1999, S. 4903).

Jedes der GADD45-Proteine ist in der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur, der Apoptose und weiteren Antwortreaktionen in Folge von physiologischem und umweltbedingtem Stress involviert. Sie interagieren hierbei mit anderen Proteinen wie PCNA, CDK1, CDKN1A, MEKK4, „Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kinase 7“ (MKK7) und p38 (Hoffman und Liebermann 2009, S. 27). Die GADD45-Proteine bilden darüber hinaus untereinander auch Homo- und Hetero-Oligomere, deren Funktion allerdings noch nicht geklärt ist (Kovalsky et al. 2001, S. 39330). Im Zusammenspiel mit PCNA fördern die GADD45-Proteine die NER (Smith et al. 2000, S. 3709) und die Basenexzisionsreparatur (BER) (Jung et al. 2007, S. 7517). GADD45A ist vor allem in der p53-abhängigen Zellzyklusunterbrechung beteiligt: Durch die Interaktion mit CDK1 wird die Kinaseaktivität des p34 / Zyklin B1 -Komplexes inhibiert, der für den Übergang der Zellen von der G2- zur M-Phase des Zellzyklus verantwortlich ist. GADD45A interagiert darüber hinaus mit CDKN1A und erhöht des-

sen Fähigkeit für eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G1-Phase (Fan et al. 1999 S. 6573). Sowohl GADD45A als auch -B zeigen anti-apoptotische Eigenschaften nach UV-Bestrahlung. Dies wird zum einen über die Aktivierung des GADD45A-p38- „Nuclear Factor kappa B“ (NF- κ B) - gesteuerten Signalpfades, zum anderen durch die Inhibierung des pro-apoptotischen MEKK4-JNK Pfades vermittelt (Gupta et al. 2006, S. 17552). Darüber hinaus ist GADD45A bei der DNA-Reparatur beteiligt, indem es direkt mit den Histonen am beschädigten DNA-Strang interagiert und so den Zugang zum Chromatin für die Topoisomerase II erleichtert (Carrier et al. 1999, S. 1683). GADD45A und -G können auch unter bestimmten Voraussetzungen pro-apoptotische Wirkung haben, indem sie JNK/SAPK aktivieren (Zerbini et al. 2004, S. 13618). GADD45B hingegen fördert die TGF- β -abhängige Apoptose über eine Aktivierung von p38 (Yoo et al. 2003, S. 43001).

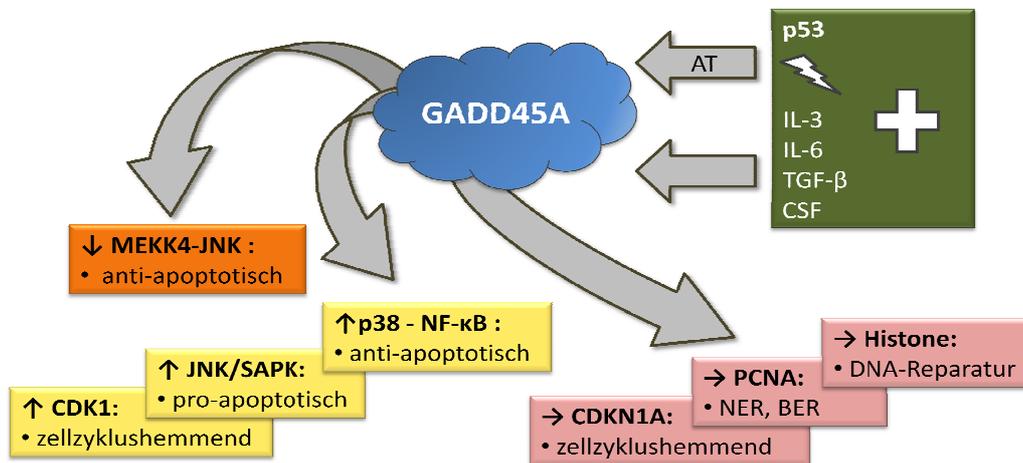


Abb. 2.15: Die Expression von GADD45A wird sowohl durch p53 wie auch direkt durch genotoxische Stressoren (dargestellt durch den Blitz) induziert. In beiden Fällen sind Ataxia-Telangiectasia (AT) - Proteinkinasen erforderlich. Darüber hinaus gibt es eine p53-unabhängige Aktivierung. Durch die Inhibierung von CDK1 hemmt es den Zellzyklus in der G2-Phase. Über eine Interaktion mit Histonen ist es sowohl direkt als auch indirekt über die Interaktion mit PCNA an der DNA-Reparatur beteiligt. Durch das Zusammenspiel mit CDKN1A unterstützt es eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G1-Phase. Über p38 und MEKK4 übt GADD45A anti-apoptotische Eigenschaften aus, über JNK/SAPK hingegen pro-apoptotische.

2.4.6 „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA)

Das ringförmige PCNA -Protein besitzt selbst keine bekannte enzymatische Funktion, agiert aber mit zahlreichen anderen Proteinen. Seine Hauptfunktion ist es, die doppelsträngige DNA zu umschließen und so als Gleithaken für verschiedene DNA-Polymerasen während der Replikation zu dienen (Kelman und Hurwitz 1998, S. 236). PCNA wirkt auf diese Weise bei unterschiedlichen

Formen der DNA-Synthese und -Reparatur mit: Freies PCNA hat eine entscheidende Rolle für die Funktion der Polymerase δ (Waga et al. 1994, S. 575) im Rahmen der sogenannten „unscheduled DNA Synthesis“ (UDS). Hierbei werden die kurzen Lücken in der DNA, wie sie im Rahmen der NER, der BER und der „Mismatch Repair“ (MMR) entstehen, geschlossen (Soria et al. 2006, S. 2879). Ubiquitiniertes PCNA hingegen steigert die „Translesion DNA Synthesis“ (TLS) der Polymerase η (Soria et al. 2006, S. 2835). Diese ist, ebenso wie die Polymerase δ (Waga et al. 1994, S. 575) und die Polymerase ϵ (Jónsson und Hübscher 1997, S. 971) ebenfalls an der regulären DNA-Synthese beteiligt. Darüber hinaus interagiert PCNA mit der Polymerase γ , die für die Synthese der mitochondrialen DNA verantwortlich ist (Paunesku et al. 2001, S. 1016). Bei der RNA-Synthese unterstützt PCNA die Funktion der Fen1-Nuklease (Jónsson und Hübscher 1997, S. 971). Eine schematische Zusammenfassung der beschriebenen Funktionen findet sich in Abbildung 2.16.

PCNA liegt normalerweise inaktiv in quartären Komplexen mit Zyklinen, Zyklinkinasen und CDKN1A vor (Zhang et al. 1993, S. 902). Es existieren ebenso reine PCNA/CDKN1A-Komplexe (Waga et al. 1994, S. 577). Beide Komplexe verhindern zum einen direkt die PCNA-abhängige UDS, zum anderen aber auch indirekt die TLS, indem die hierfür erforderliche Ubiquitinierung von PCNA unterbunden wird (Soria et al. 2006, S. 2835). Dies liegt unter anderem daran, dass CDKN1A und die Polymerase δ zusammen mit dem Replikationsfaktor C (RFC) um dieselbe Bindungsstelle von PCNA konkurrieren (Oku et al. 1998, S. 357). Diese werden ebenfalls von GADD45-Proteinen genutzt (Vairapandi et al. 2000, S. 16818), die den funktionalen Einfluss von PCNA auf die NER (Smith et al. 2000, S. 3709) und die BER (Jung et al. 2007, S. 7517) erhöhen.

Die Ubiquitinierung von PCNA stellt den entscheidenden Modifikationsschritt im Rahmen der TLS dar. Sie führt zu einer Anhäufung und Stabilisierung von PCNA an der Schadstelle (Solomon et al. 2004, S. 455) und erhöht die Affinität von PCNA zur Polymerase η (Kannouche et al. 2004, S. 491). Die Ubiquitinierung ist Folge des genotoxischen Stresses und erfolgt unabhängig vom Zellzyklus. Sie entsteht aufgrund kurzzeitiger Exposition von DNA-Einzelsträngen und deren Mantelprotein RPA im Rahmen der Exzision von DNA-Schäden. Die NER selbst hat keinen direkten Einfluss auf diesen Weg der Aktivierung von PCNA. Vielmehr ist die verzögerte DNA-Synthese an der Schadstelle der auslösende Faktor hierfür (Soria et al. 2006, S. 2836). Die Expression von PCNA wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren, unter anderem TNF (Yu et al. 2000, S. 2), aber auch von p53, AP-1 und CREB (Paunesku et al. 2001, S. 1016) reguliert.

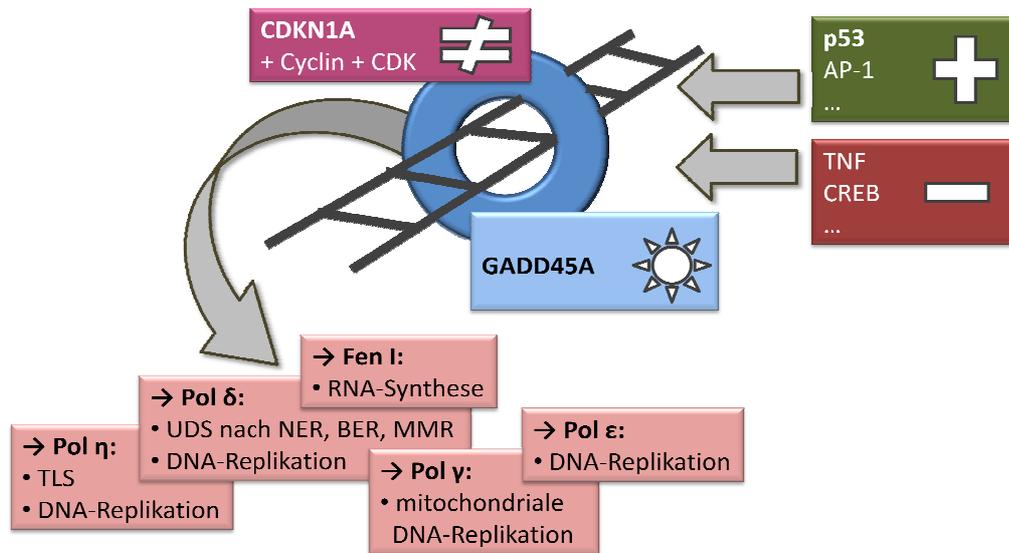


Abb. 2.16: Das ringförmige PCNA (blau dargestellt), dient als Gleithaken für verschiedene Polymerasen (Pol) und Enzyme. Seine Funktion bei der DNA-Reparatur wird hierbei von GADD45A unterstützt. Durch Bildung dualer und quartärer Komplexe mit CDKN1A wird PCNA blockiert. Seine Expression wird unter anderem durch p53, TGF- β , AP-1, TNF und CREB reguliert.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

3.1.1 Reagenzien und deren Bezugsquellen

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

- „High Capacity cDNA Archive Kit“ (Part-Nr.: 4322171) bestehend aus:
 - Reverse Transkriptase „MultiScribe RT“,
 - Randomisierte Primer,
 - Gemisch verschiedener Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) sowie Pufferlösung.
- „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Part-Nr.: 4304447) bestehend aus:
 - DNA-Polymerase „AmpliTaq Gold“,
 - „AmpErase UNG“ (Uracil-N-Glykosylase),
 - dNTP mit Desoxyuraciltriphosphat (dUTP) statt Desoxythymidintriphosphat (dTTP),
 - 5-Carboxy-X-Rhodamin (ROX) als passiver Referenzfarbstoff sowie Pufferlösung.
- „Eukaryotic 18S-rRNA Endogenous Control“ (Part-Nr.: 4310893E) bestehend aus:
 - Sonden mit 2'-Chloro-7'-Phenyl-1,4-Dichloro-6-Carboxyfluoreszein (VIC) als „Reporter“ und 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) als „Quencher“ sowie Vorwärts- und Rückwärts-„Primer“.
- „TaqMan Gene Expression Assays“ der sechs Zielgene, bestehend aus jeweils:
 - 250 nM 6-Carboxyfluoreszein (FAM) -gefärbte MGB-Sonden,
 - je 900 nM folgender Vorwärts- und Rückwärts-„Primer“:
 - ATF3 (Part-Nr.: Hs00231069_m1),
 - BAX (Part-Nr.: Hs00180269_m1),
 - CDKN1A (Part-Nr.: Hs00355782_m1),
 - DDB2 (Part-Nr.: Hs00172068_m1),
 - GADD45A (Part-Nr.: Hs00169255_m1) sowie
 - PCNA (Part-Nr.: Hs00427214_g1).

QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

- „RNeasy Mini Kit“ (Cat.-Nr.: 74106) bestehend aus:
 - „RNeasy“-Mini-Spinsäulen mit Silicagel-Membran,
 - Reaktionsgefäße „Collection Tubes 1,5 ml“ und „Collection Tubes 2,0 ml“,
 - „RNeasy Lysis Tissue Buffer“ (RLT-Puffer),
 - „RNeasy Washing Buffer 1“ (RW1-Puffer),
 - „RNeasy Purification Ethanol Buffer“ (RPE-Puffer) sowie
 - Ribonuklease (RNase) -freies Wasser.
- Desoxyribonuklease (DNase) mit „RNeasy DNase Dilution Buffer“ (RDD-Puffer)
- „HotStarTaq Plus Master Mix Kit“ (Cat.-Nr.: 203643) bestehend aus:
 - DNA Polymerase „HotStarTaq Plus“,
 - Puffersystem „CoralLoad“ sowie
 - RNase-freies Wasser.

Biohit Deutschland GmbH, Rosbach, Deutschland

- RNase „ZAP“ -Spray

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

- „Rotigarose“, Agarose in niedriger Elektroendosmose (NEEO), Ultra-Qualität
- „Rotiphorese 10x TAE Puffer“ (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)
- Ethidiumbromid, 10 mg / ml

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

- „RNA Inspector Kit“, bestehend aus: β -Actin Vorwärts- und Rückwärts-,Primern“

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

- DNA-Längenstandard „100 bp DNA Ladder“

Diverse Hersteller

- RNase-freies Wasser
- Incidin Plus 1,5 %
- „Hank’s Balanced Salt Solution Buffer“ (HBSS-Puffer) ohne CaCl_2 und MgCl_2
- „Hank’s Balanced Salt Solution Buffer“ (HBSS-Puffer) mit CaCl_2 und MgCl_2
- β -Mercaptoethanol
- Ethanol für die Molekularbiologie, Volumentanteil 99 %
- Ethanol für die Molekularbiologie, Volumentanteil 70 %

Eigene Herstellung

- Puffer 2, bestehend aus:
 - Kaliumchlorid (KCl), 50 mM / l,
 - Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 0,01 mM / l (pH 8,0),
 - Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS), 10 mM / l (pH 8,3),
 - Tween 20, Volumenanteil 0,0003 % sowie
 - aqua dest..
- Ladepuffer bestehend aus:
 - 5 ml RNase-freies Wasser,
 - 5 ml Glycerin sowie
 - Xylencyanol FF, Volumentanteil 0,05 %.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Reaktionsgefäße „Safe-Lock Tubes 1,5 ml“
- Reaktionsgefäße „Safe-Lock Biopure Tubes 1,5 ml“
- Dualfilter-Pipettenspitzen „ep T.I.P.S“ in den Größen 0,5-10 μl , 2-100 μl und 20-1000 μl

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

- Mikrotiterplatte „96-Well Optical Reaction Plate“
- Selbstklebende Abdeckfolie „Optical Adhesive Covers“
- Hitzebeständige Lochabdeckung „Optical Cover Compression Pads“
- Verschlussdeckel „Micro Amp Optical Caps“

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

- „BD Vacutainer CPT“ (Cell Preparation Tubes) 8 ml, bestehend aus:
 - Mind. 120 USP-Einheiten Natrium-Heparin in 1,0 ml in phosphatgepufferter Salzlösung,
 - 3,0 g Polyestergerel sowie
 - 2,0 ml Polysaccharid-Natrium-Diatrizoat-Lösung (Ficoll Hypaque).
- Reaktionsgefäße „Falcon Tubes“ in den Größen 15 ml und 50 ml
- Einmalpipetten „Falcon“ in den Größen 5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml

Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland

- MiniTray-Reaktionsplatten „MicroWell“

3.1.3 Laborgeräte und deren Hersteller**Richard Seifert & Co. GmbH & Co. KG, Ahrensburg, Deutschland**

- Röntgenstrahlen-Emitter „Isovolt 320/10“ mit 3 mm Beryllium-Fenster

Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Thermocycler „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“, bestehend aus:

- „GeneAmp PCR System 9600“ (dem eigentliche Thermocycler),
- „GeneAmp 5700 Sequence Detector“ (mit Lichtquelle und CCD-Sensor) sowie
- „GeneAmp 5700 Sequence Detection Software“ auf einer Bedienerkonsole.

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Thermomixer „Comfort“
- Zentrifuge „5415R“
- Elektrische Pipetten „Research pro“ in den Größen 0,5-10 µl, 5-100 µl und 50-1000 µl
- Kolbenhubpipette „Reference“ in den Größen 5-100 µl und 50-1000 µl

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

- Nano Drop Spectrophotometer „ND-1000“
- Breitformat-Gelsystem „Mini ExM“ inklusive einseitigem Kamm mit 20 Slots à 1 mm Dicke
- Gel-Dokumentationsgerät „Chemi-Smart CN-3000WL“

W. C. Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

- Sterilbank „HeraSafe“
- Zentrifuge „Megafuge 3 S-R“

Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland

- Vortexer „reax top“
- Vortexer „reax 2000“

QBiogene, Heidelberg, Deutschland

- Arbeitsbank „Tamer Template“

Weitere Hersteller

- Kühlgerät -20 °C „profiline“ von der Firma Liebherr
- Kühlgerät 2-8 °C „glassline“ von der Firma Liebherr
- Tischzentrifuge „Microcentrifuge“ von der Firma Carl Roth
- Präzisionswaage „BP4100S“ von der Firma Sartorius
- Flockeneisbereiter „MF22“ der Firma Scotsman

3.2 Blutprobengewinnung und Bestrahlung

Als Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen diente menschliches Vollblut von 30 Personen. Bei ihnen handelte es sich um 15 Frauen und 15 Männer, im Alter von 16 bis 56 Jahren. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 28 Jahren. Alle Personen waren anamnestisch gesund und ohne bekannte Vorbestrahlung. Zusätzlich wurde ein männlicher Proband nach Strahlentherapie aufgrund eines Schilddrüsenkarzinoms zu Vergleichszwecken in die Studie mit aufgenommen.

Proband	Geschlecht	Alter	Proband	Geschlecht	Alter
1	w	16	17	w	29
2	m	19	18	m	33
3	w	22	19	m	28
4	m	19	20	w	56
5	m	25	21	w	24
6	w	31	22	m	30
7	w	29	23	w	23
8	w	28	24	m	30
9	m	30	25	m	32
10*	m	30	26	m	33
11	m	29	27	w	31
12	m	30	28	m	24
13	m	28	29	m	27
14	w	29	30	w	25
15	w	28	31	w	29
16	w	29	-	-	-

Tabelle 3.1: Alter- und Geschlechtsverteilung der 31 Probanden. Proband 10* war anamnestisch vorbehandelt und nahm daher nur zu Vergleichszwecken an den Untersuchungen teil. (w = weiblich, m = männlich.)

Von jedem Probanden wurde venöses Vollblut in 12 CPT-Vacutainer à 8 ml der Firma Becton Dickinson abgenommen. Jedes dieser Röhrchen bestand aus zwei von einem Separationsgel auf Polyesterbasis getrennten Kammern. In der oberen Kammer befand sich Natriumheparin als Antikoagulanzen, in der unteren eine „Ficoll Hypaque“-Dichtegradientenflüssigkeit. Nach Aufnahme des vorgegebenen Blutvolumens in die obere Kammer erfolgte bei Raumtemperatur eine Zentrifugation

mit 1934 g über 20 Minuten. Hierdurch wurden die Erythrozyten und Granulozyten unterhalb des danach erhärteten Gels konzentriert und von den oberhalb verbliebenen peripheren mononukleären Zellen (PMNC) getrennt. Das Plasma in der oberen Kammer des Röhrchens enthielt somit hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten, aus denen später die RNA für die weiteren Analysen gewonnen wurde. In Abbildung 3.1 ist ein CPT-Vacutainer vor und nach Zentrifugation dargestellt.

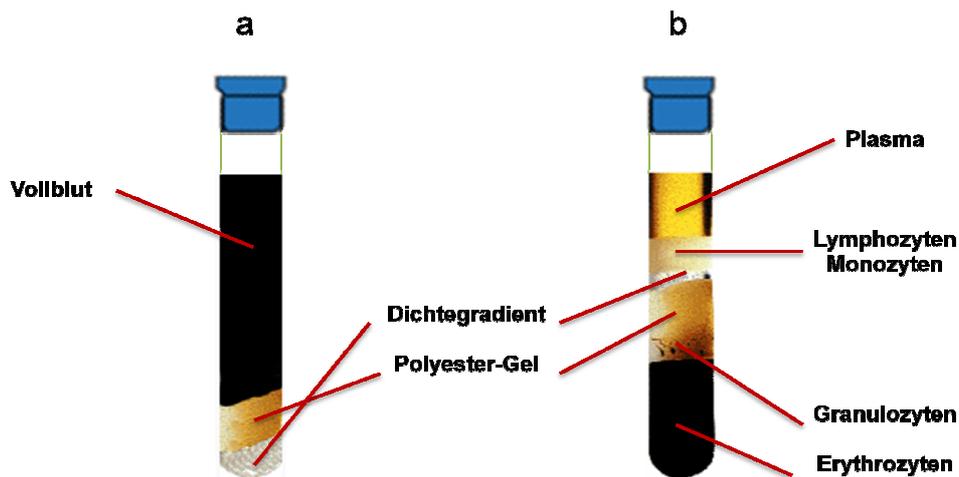


Abb. 3.1: Verteilung der einzelnen Blutbestandteile in einem 8 ml „Cell Preparation Tube“ (CPT) - Vacutainer (a) vor und (b) nach Zentrifugation. Zu sehen ist die Trennung der peripheren mononukleären Zellen von den Granulozyten und Erythrozyten durch das Separationsgel. (Grafik modifiziert nach Herstellerabbildung)

Anschließend wurden die zentrifugierten Vollblutproben in drei Gruppen à vier CPT-Vacutainer aufgeteilt. Eine Fraktion diente als Kontrolle und wurde im Folgenden nicht bestrahlt. Die beiden anderen Fraktionen wurden einer 240 kV Röntgenstrahlung mit 0,5 Gy beziehungsweise 2 Gy Gesamtdosis bei einer Dosisleistung von 1 Gy / min mit 13 mA ausgesetzt. Als Strahlenquelle diente der Röntgenstrahlen-Emitter „Isovolt 320/10“ mit einem 3 mm dicken Beryllium-Fenster der Firma Richard Seifert. Nach der Bestrahlung wurden die zentrifugierten Vollblutproben bis zur Unterbrechung der Zellaktivitäten nach maximal 48 Stunden durch die nachfolgend beschriebene RNA-Isolation bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Bei 25 Probanden wurde zusätzlich ein Differentialblutbild bestimmt, um den Einfluss der PMNC-Subpopulationen auf die Genexpression zu analysieren. Dieser Erweiterung der Aufgabenstellung erfolgte nach Auswertung der ersten 5 Probanden aufgrund unerwartet hoher interindividueller

Schwankungen bei der Genexpression. Diese Werte sowie die demografischen Daten der Probanden dienten in der späteren Auswertung als unabhängige Variablen. Die Blutbildanalysen wurden vom klinischen Labor des Fachsanitätszentrums München, Neuherbergstrasse 11, 80937 München, durchgeführt.

3.3 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

3.3.1 Die RNA-Isolation

Die zu untersuchende Genaktivität in den PMNC wurde zu bestimmten Zeitpunkten (t) durch die RNA-Isolation unterbrochen. So wurden nach 20 Minuten beziehungsweise 8, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung (post radiationem = p.r.) sowohl aus der unbestrahlten Kontrollfraktion wie auch von den mit 0,5 Gy und 2 Gy bestrahlten Proben je ein CPT-Vacutainer für die nachstehend beschriebenen Laborarbeiten vorbereitet. Sämtliche Tätigkeiten erfolgten gemäß einer Standardarbeitsanweisung (Standard Operating Procedure = SOP) des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr unter Verwendung des „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen. Diese ließen sich in drei Arbeitsschritte zusammenfassen:

1. Lysierung der PMNC sowie anschließende Bindung von RNA, DNA und Proteinen an einer Silicagel-Membran,
2. Auswaschen von Proteinen, DNA, kleineren RNA-Spezies sowie möglichen anderen Verunreinigungen durch ein Säulenaufreinigungsverfahren mittels Hochsalzpuffersystemen und anschließendes
3. Lösen der RNA von der Membran mittels RNase-freiem Wassers.

In Schritt 1 wurde das Plasma aus den CPT-Vacutainern in „Falcon-Tubes“ überführt. Am Separationsgel anhaftende PMNC wurden mit 3 ml HBSS-Puffer (ohne CaCl_2 und MgCl_2) resuspendiert und ebenfalls der Lösung in den „Falcon-Tubes“ hinzugefügt. Nachfolgend wurde die Lösung mit 150 g für 15 Minuten zentrifugiert und der Plasma/Puffer-Überstand anschließend dekantiert. Die PMNC wurden durch Zugabe von 600 μl eines β -Mercaptoethanol/RLT-Puffer -Gemisches lysiert und mittels manuellem Aufmischens durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Durch den Guanidinsalz enthaltenden, stark denaturierenden Puffer wurden dabei vorhandene RNasen inakti-

viert. Die nachfolgende Zugabe von 600 µl Ethanol führte zum Ausfällen der Nukleinsäuren und Proteinen. Die Lösung wurde im Anschluss in 2,0 ml „Collection Tubes“ umgesetzt. Diese verfügten jeweils über eine Mini-Spinsäule mit Silicagel-Membran, an der die Nukleinsäuren und Proteine anbinden konnten. Danach wurden diese mit 8.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Der zweite Schritt, das anschließende Auswaschen der Proteine, DNA und kleinerer RNA-Spezies von der Membran, erfolgte in mehreren Etappen. Zunächst wurde 700 µl RW1-Puffer der Lösung hinzugegeben und diese im Weiteren ebenfalls mit 8.000 g für jeweils 15 Sekunden zentrifugiert. Für die Dauer von 15 Minuten hinzugefügte 80 µl DNase verdaute eventuell vorhandene Rest-DNA. Die verbliebene RNA wurde durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer sowie erneuter Zentrifugation mit oben genannten Parametern weiter aufgereinigt. Letzte Proteinverunreinigungen wurden in einem abschließenden Aufreinigungsschritt mittels 500 µl RPE-Puffer und einer letzten Zentrifugation bei 10.000 g für 2 Minuten von der Silicagel-Membran entfernt.

Im dritten Schritt wurde die nun gereinigte RNA in zwei Stufen mit je 30 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation für die Dauer von je 1 Minute mit 8.000 g beziehungsweise 10.000 g von der Silicagel-Membran gelöst und in einem 1,5 ml „Collection Tube“ aufgefangen. Die im nächsten Kapitel beschriebenen Qualitätskontrollen wurden unmittelbar nach der Isolation durchgeführt. Die abschließende Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C .

3.3.2 Qualitätskontrolle der RNA

Mit Hilfe des Nano Drop „ND-1000 Spectrophotometers“ der Firma Peqlab wurde die Lichtabsorption der RNA-Lösung bei drei unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt. Für die Messung wurde je 1 µl von jeder RNA-Probe verwendet. Mit Hilfe der werkseitig installierten Software konnte so bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration der Nukleinsäuren in der Lösung ermittelt werden. Für die Berechnung der Konzentration von Salzen wurde die Absorption bei 230 nm und von Proteinen bei 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und bei 280 nm wurde der Grad der Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt. Bei einem Quotienten von unter 1,9 musste von einer Protein-Verunreinigung ausgegangen werden. Die in Kapitel 3.3.1 beschriebene

RNA-Aufreinigung hätte in diesem Fall wiederholt werden müssen. Dies war bei keiner der durchgeführten Qualitätskontrollen nötig. Die Ergebnisse der Spektralphotometer sind in Anhang 8.1 zusammengefasst.

Um eine Degradation der RNA auszuschließen, erfolgte eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung. Hierfür wurde auf Basis von 100 ml TAE-Puffer ein 1 %iges Agarose-Gel hergestellt. Noch im flüssigen Zustand wurden 10 µl Ethidiumbromid zugegeben. Während der Erstarrung wurden mittels Gelkamm Probenaschen erzeugt. Die fertige Gelplatte wurde in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer bedeckt. In den „Wells“ einer „Mini-Tray“-Reaktionsplatte wurde mit einem Ladepuffer aus eigener Herstellung jeweils 1 µg jeder RNA-Probe auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Dieser Puffer bestand aus in Glycerin und RNase-freiem Wasser gelöstem Xylencyanol. Die Proben wurden mittels Kolbenhubpipette vermischt und vollständig in die vorgesehene Probenasche der Gelplatte gegeben. Die Elektrophorese dauerte 45 Minuten bei einer angelegten Stromspannung von 100 V. Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte unter UV-Licht im Gel-Dokumentationsgerät „Chemi-Smart CN-3000WL“ von der Firma Peqlab. Die Subtypen der rRNA sollten sich hierbei als zwei scharfe Banden darstellen. Die Intensität der 28S-Bande im Vergleich zur 18S-Bande erreichte optimalerweise ein Verhältnis von 2:1. Beispielhaft ist dies in Abbildung 3.2 an Proband 16 gezeigt. Falls sich eine Bande verschmiert dargestellt hätte, wären alle Proben dieses Probanden aufgrund der Degradation der RNA verworfen worden. Dies war allerdings in keinem Fall notwendig.

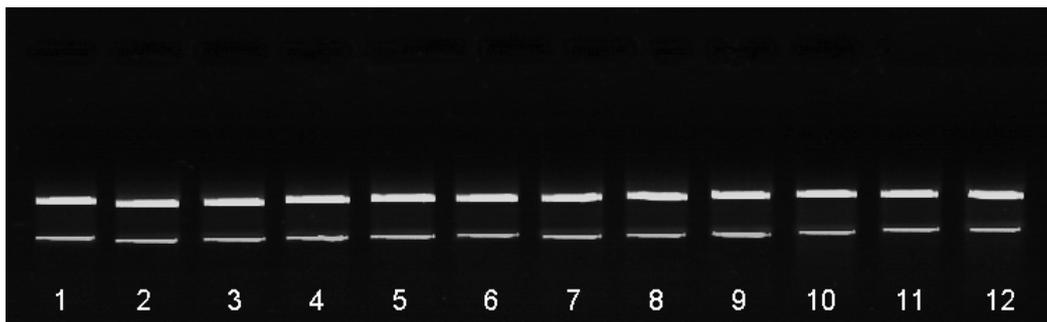


Abb. 3.2: Fotodokumentation der Agarose-Gel-Elektrophorese mit Ethidiumbromid-Färbung der 12 Proben des Probanden 16. Die obere stärkere Bande stellt 28S-, die untere schwächere 18S-rRNA dar.

Um eine mögliche Verunreinigung mit DNA auszuschließen, wurde für jede RNA-Probe eine konventionelle PCR mit anschließender Gel-Elektrophorese durchgeführt. Als Zielgen hierfür diente das ubiquitär vorkommende β -Aktin-Gen. Für jeden Probanden wurde ein 15-facher Ansatz der Synthese-Chemie hergestellt: je ein Ansatz für die 12 zu untersuchenden RNA-Proben sowie je ein Ansatz für eine DNA-Positivkontroll-Probe, für eine Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser und einen Überschuss im Umfang einer Probe. Die Zusammensetzung der Synthese-Chemie ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Als „Master Mix“ kam der „HotStarTaq Plus Master Mix“ von der Firma Qiagen zum Einsatz. Dieser beinhaltet die DNA Polymerase „HotStarTaq Plus“ sowie ein Puffersystem und wurde bis zur Verwendung bei maximal 8 °C im Kühlschrank gelagert. Die tiefgefrorenen Primer sowie die RNA- und DNA-Proben wurden langsam auf zerstoßenem Eis aufgetaut und anschließend für 30 Sekunden mit einem Vortexer homogenisiert.

Reagenz	Volumen je Reaktion in μl	Volumen je Proband in μl
„Primer Actin sense“	1	15
„Primer Actin antisense“	1	15
RNase-freies Wasser	22	330
Master Mix	25	375
Gesamt	49	735

Tabelle 3.2: Benötigte Reagenzien für die PCR aller 12 Proben eines Probanden zuzüglich Positiv- und Negativ-Kontrolle sowie ein Überschuss.

Jeweils 49 μl der Synthese-Chemie wurden in vorbereitete Reaktionsgefäße verteilt, in die anschließend je 1 μl der zu untersuchenden RNA-Probe beziehungsweise der Kontroll-Lösungen hinzugegeben wurde. Danach wurde das Reaktionsgemisch mittels Vortexer homogenisiert und kurz anzentrifugiert. Die PCR verlief im Thermocycler „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems Applera nach voreingestelltem Protokoll in drei Phasen. In der ersten Phase erfolgte für 15 Minuten bei 95 °C die Aktivierung der Polymerase als sogenannter „Hot Start“. In Phase 2 wechselten sich die drei eigentlichen Reaktionsschritte der PCR minütlich ab: Die Temperatur betrug während der Denaturierung 94 °C, beim „Annealing“ 66 °C und bei der Elongation 72 °C. Diese Abfolge wiederholte sich 30-mal, so dass Phase 2 insgesamt 90 Minuten dauerte. Schließlich wurde die Reaktion in Phase 3 durch Herabkühlen auf 4 °C beendet.

Anschließend erfolgte eine Gel-Elektrophorese ähnlich der zum Ausschluss einer RNA-Degradation. Allerdings wurden nun pro „Well“ 7 µl des PCR-Ansatzes und 3 µl Ladepuffer vermischt. Zusätzlich wurde für die Validierung eine so genannte DNA-Leiter, ein Längenstandard aus einer vorgegebenen Mischung von DNA mit bestimmten Masseanteilen, erzeugt. Hierfür wurden 6 µl RNase-freies Wasser, 1 µl „100 bp DNA Ladder“ und 3 µl Ladepuffer vermengt. Wären DNA-Spuren in einer der 12 Proben nachgewiesen worden, hätte die RNA-Aufreinigung wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben wiederholt werden müssen. Dies war bei keinem Probanden der Fall. In Abbildung 3.3 ist das regelrechte Ergebnis der Elektrophorese von Proband 16 beispielhaft dargestellt.



Abb. 3.3: Fotodokumentation der Agarose-Gel-Elektrophorese nach einer PCR mit β -Aktin-Primern. Links ist die sogenannte DNA-Leiter zu sehen. Es folgen die Positiv-Kontrolle (+ Ko.), die Negativ-Kontrolle (- Ko.) und die 12 RNA-Proben (1 bis 12) von Proband 16. Die Einheit bp gibt die Anzahl der Basenpaare als DNA-Längenstandard wieder. Wie zu erkennen ist, wurde bei keiner der 12 Proben eine DNA-Kontamination festgestellt.

Alle beschriebenen Testverfahren zur Qualitätskontrolle der RNA wurden anhand von Standardarbeitsanweisungen durchgeführt. In Tabelle 3.3 sind die Verfahren nochmals zusammengefasst.

Testverfahren	Qualitätsmerkmal	Schlussfolgerung
Licht-Absorption bei 260 nm und 280 nm	Verhältnis > 1,9	Keine oder nur geringe Protein-Kontamination
Elektrophorese der RNA	Scharfe, nicht „verschmierte“ 28S- und 18S-Bande im Verhältnis 2:1	Keine oder nur geringe RNA-Degradation
β -Aktin PCR und Elektrophorese	Keine Banden	Keine oder nur geringe DNA-Kontamination

Tabelle 3.3: Übersicht über die Kriterien der durchgeführten Qualitätskontrollen der RNA-Isolation.

3.3.3 Die cDNA-Synthese

Bei der späteren RT Q-PCR wurde eine spezifisch für die Amplifikation von DNA ausgelegte Polymerase verwendet. Aus diesem Grund musste die aus den PMNC isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Konzentration der RNA war bereits im Rahmen der Qualitätskontrolle, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, mittels Spektralphotometer bestimmt worden. Aus jedem Ansatz dieser wässrigen Lösung wurden je 5 µg RNA entnommen und auf ein Volumen von 50 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mittels reverser Transkription unter Verwendung des „High Capacity cDNA Archive Kit“ der Firma Applied Biosystems Aplaera gemäß einer Standardarbeitsanweisung, wie sie im Folgenden beschrieben wird.

Das Pipettieren der Synthese-Chemie erfolgte unter besonderen hygienischen Bedingungen um eine Kontamination der Synthese-Chemie mit RNA oder DNA zu verhindern. Die gesamte Vorbereitung des Reaktionsansatzes wurde in einem separaten Laborraum unter sterilen Bedingungen und nach Wechsel der Einmalhandschuhe sowie Anlegen eines Einmalkittels durchgeführt. Es wurden nur ständig in diesem Raum befindliche Geräte und hier entsiegelte Verbrauchsmaterialien verwendet. Bis auf die im Kühlschrank gelagerte reverse Transkriptase „MultiScribe-RT“ wurden alle für den Ansatz benötigten tiefgefrorenen Reagenzien langsam auf zerstoßenem Eis aufgetaut und kurz für 30 Sekunden mittels eines Vortexers resuspendiert. Die entsprechenden Volumina wurden gemäß der Aufzählung in Tabelle 3.4 in ein steriles, einzelverpacktes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zunächst wurde zu RNase-freiem Wasser eine Pufferlösung (RT-Puffer) und eine Lösung aus vier gleichen Teilen dNTP gegeben und anschließend die „Random Primers“, ein Gemisch aus verschiedenen Hexamer-Oligonukleotiden, hinzugefügt. Nach dem Zusatz der empfindlichen reversen Transkriptase wurde auf einen vorsichtigen, erschütterungsfreien Umgang mit der fertigen Synthese-Chemie geachtet. Die Pipettierbank wurde anschließend mittels UV-Strahlung desinfiziert.

Reagenz	Volumen je Reaktion in μl	Volumen je Proband in μl
RNase-freies Wasser	21	252
RT-Puffer	10	120
dNTP-Mix	4	48
Random Primers	10	120
MultiScribe-RT	5	60
Gesamt	50	600

Tabelle 3.4: Benötigte Reagenzien für die Umsetzung der RNA aller 12 Proben eines Probanden (je 50 μl RNA-Lösung) in cDNA.

Für die folgenden Arbeitsschritte wurde vom Steril-Labor in den regulären Arbeitsraum gewechselt. Von der Synthese-Chemie wurden je 50 μl in jedes „Well“ einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und 50 μl der verdünnten RNA-Probe hinzugegeben. Der Ansatz wurde mittels Kolbenhubpipette vorsichtig vermischt. Die Platte wurde mit „Micro Amp Optical Caps“ verschlossen und für 1 Minute bei 256 g zentrifugiert um eventuelle Luftblasen aus dem Ansatz zu lösen und das Gemisch am Boden der Mikrotiterplatte zu sammeln.

Die cDNA-Synthese startete im Thermocycler „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems Applied Biosystems zunächst mit einer 10-minütigen Inkubation bei 25 °C, bei der sich die randomisierten „Primer“ an die RNA anlagerten. Danach wurde die Temperatur für 120 Minuten auf 37 °C, dem Temperaturoptimum der reversen Transkriptase, erhöht. Hierbei kam es zu einer Verlängerung der „Primer“ komplementär zum RNA-Strang. Idealerweise erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA im Verhältnis von 1:1. Direkt im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde die Mikrotiterplatte aus dem Thermocycler entnommen und auf zerstoßenem Eis herunter gekühlt um, die Synthese zu stoppen. Danach wurde die cDNA aus den „Wells“ entnommen, in „Collection Tubes“ pipettiert und bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Qualitätskontrolle der cDNA

Zur Qualitätsbestimmung der cDNA-Synthese erfolgte bei allen 31 Probanden eine RT Q-PCR, wie sie ausführlich in Kapitel 3.4 beschrieben wird. Als Marker diente in diesem Fall 18S, das als Teil der rRNA stets in konstanter Menge in den Zellen vorkommt. Mit Hilfe der grafischen Darstellung der Amplifikationsplots konnten Degradationen der RNA vor der cDNA-Synthese beziehungsweise eine fehlerhafte cDNA-Synthese-Reaktion nachgewiesen werden. Gefordert wurden sich regelrecht aufbauende Amplifikationsplots mit einer in einem vordefinierten Bereich liegenden Exponentialphase und einem anschließenden Plateau. Bei Abweichungen hiervon hätte die cDNA-Synthese aus der jeweiligen RNA-Probe wiederholt werden müssen. Im ungünstigsten Fall, bei degradiertem RNA, wäre der entsprechende Proband von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen worden. Beides war bei keinem der 31 Probanden notwendig.

3.4 Vorbereitungen für die RT Q-PCR

3.4.1 Definition des „Threshold Cycle“ (C_t)

Für die Auswertung der RT Q-PCR wurde der sogenannte „Threshold Cycle“ (C_t) -Wert verwendet. Er bezeichnete jenen PCR-Zyklus, bei dem erstmalig die durch den Thermocycler gemessene Fluoreszenz des „Reporter“-Farbstoffes einen bestimmten Grenzwert überschritt. Die Herleitung des C_t-Wertes und Folgerungen hieraus, werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

Bei der grafischen Darstellung, wie sie exemplarisch anhand eines Vorversuches in Abbildung 3.4 erfolgte, wurde die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle Number) auf der x-Achse und das normalisierte Reportersignal (R_n) auf der y-Achse aufgetragen. Der R_n-Wert entsprach dem Quotienten der Emissions-Intensität des „Reporter“-Farbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität eines passiven Referenzfarbstoffs. Hierdurch ließen sich durch Pipettierfehler verursachte Volumenschwankungen in den „Wells“ ausgleichen. Bei dem verwendeten „TaqMan Universal PCR Master Mix“ von Applied Biosystems Applera war der fluoreszierende Farbstoff ROX bereits als Referenz enthalten. Die während der ersten Zyklen gemessenen R_n-Werte wurden von der Software des Thermocyclers als Hintergrundfluoreszenz definiert und im weiteren Verlauf automatisch von den exponentiell steigenden R_n-Werten abgezogen.

Für alle cDNA-Proben einer Versuchsreihe galt die Annahme, dass beim Überschreiten eines bestimmten Grenzwertes der Fluoreszenz, unabhängig von der jeweiligen Zyklusnummer, sich stets die gleiche Menge an freiem Reporter-Farbstoff und demnach auch eine identische Menge an neu-synthetisierter cDNA im entsprechenden „Well“ befinden musste. Der C_t -Wert kennzeichnete exakt jenen Zyklusdurchlauf, bei dem dieser Grenzwert durch die gemessene Fluoreszenz der jeweiligen Probe erreicht wurde. Unter der Annahme einer 100 %-igen Effizienz der Reaktion verdoppelte sich mit jedem Zyklus neben der Stärke des Fluoreszenzsignals auch die cDNA-Menge. Im Umkehrschluss bedeutete dies, dass ein um 1 höherer C_t -Wert der halben cDNA-Ausgangsmenge vor der RT Q-PCR entsprach. Den Zusammenhang spiegelt folgende Formel wieder:

$$\text{cDNA}(C_{t1}) = 1/2^{(\Delta C_t)} * \text{cDNA}(C_{t2})$$

Der Grenzwertwert wurde bei den folgenden Messungen mit einem R_n von 0,1 so gewählt, dass der Schnittpunkt mit dem Amplifikationsplot, wie in Abbildung 3.4 zu sehen, in dessen exponentiellen Bereich lag. Im gezeigten Beispiel betrug der C_t -Wert 23,7.

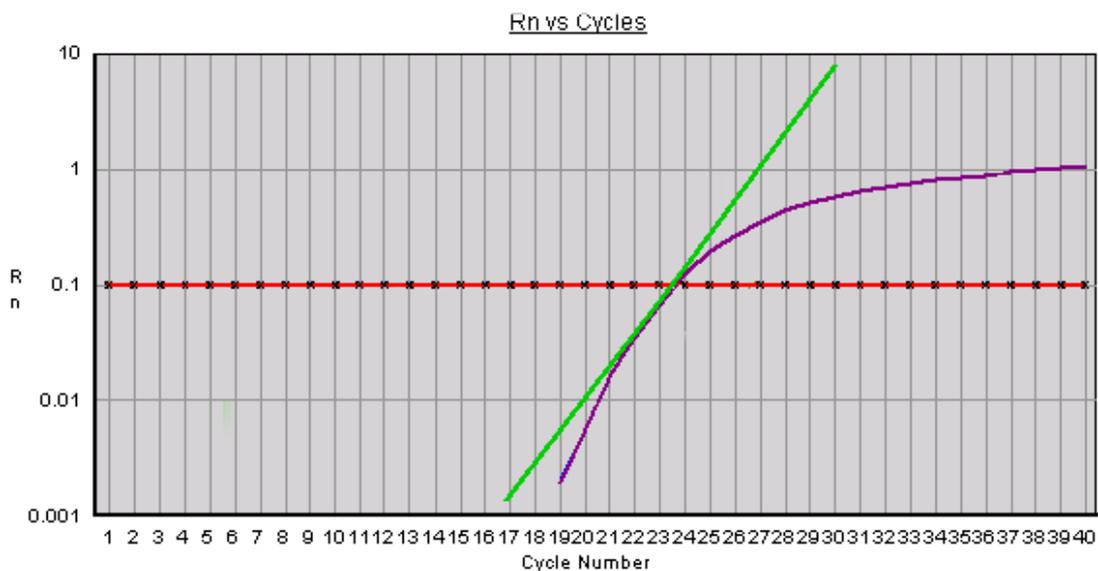


Abb. 3.4: Auf der x-Achse ist linear die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle Number) und auf der y-Achse logarithmisch die korrespondierende Fluoreszenzdifferenz (R_n) dargestellt. Die violette Kurve stellt einen Amplifikationsplot aus einem Vorversuch dar. Die grüne Gerade ist der idealisierte Verlauf der Amplifikation unter der theoretischen Annahme einer 100 %igen Effizienz der Replikation zu jedem Zeitpunkt der Reaktion. Der Grenzwert für die Fluoreszenz, als rote Linie dargestellt, wurde so gewählt, dass er den Amplifikationsplot im exponentiellen Bereich kreuzte. (Amplifikationsplot erstellt mittels „Sequence Detector System“ von Applied Biosystems Applera.)

3.4.2 Funktionsweise von Standardreihen und deren Herstellung

Zur Beschreibung des lineardynamischen Bereiches der RT Q-PCR sowie zur internen Qualitätssicherung wurden Standardreihen mit bekannten 18S-cDNA-Konzentrationen verwendet. Diese wurden zuvor durch wiederholte Verdünnung aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg cDNA in 10 µl Pufferlösung aus RNA von HL-60 Zellen gemäß einer Standardarbeitsanweisung hergestellt. In Abbildung 3.5 sind beispielhaft die Amplifikationsplots von 5 Standardproben einer Standardreihe dargestellt.

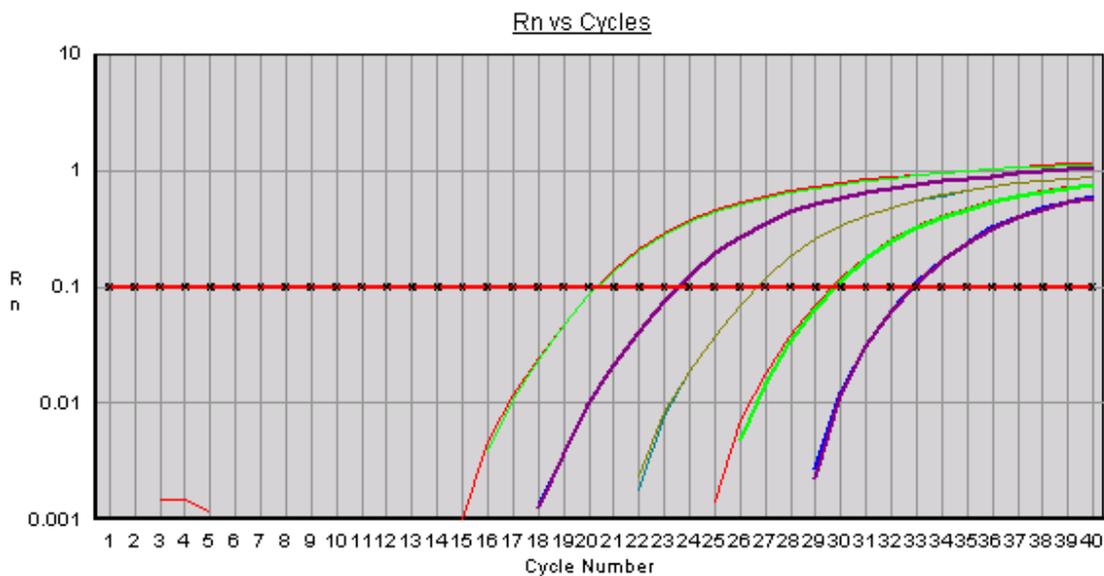


Abb. 3.5: Amplifikationsplots einer Standardreihe mit 5 Standardproben. Auf der x-Achse ist linear die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle Number) und auf der y-Achse logarithmisch die korrespondierende Fluoreszenzdifferenz (Rn) dargestellt. Der Abstand zwischen den jeweiligen Kurven auf Höhe des manuell festgelegten Grenzwertes beträgt 3 C_t -Werte, was jeweils einem Unterschied in der cDNA-Ausgangskonzentration im Verhältnis von $1 : 2^3 = 1:8$ entspricht. Die beiden äußeren Amplifikationsplots umfassen somit zuverlässig einen Teil des lineardynamischen Bereichs. (Amplifikationsplots erstellt mittels „Sequence Detector Software“ von Applied Biosystems Applera.)

Durch Vorversuche wurden drei Standardreihen ausgewählt, bei denen zu erwarten war, dass sie in den Hauptversuchen die Amplifikationsplots der zu untersuchenden Gene umfassen würden. Diese in Tabelle 3.5 dargestellten Standardreihen stellten sicher, dass sich der exponentielle Bereich der Amplifikationsplots der Zielgene auf Höhe des vordefinierten Fluoreszenz-Grenzwertes im lineardynamischen Bereich aufbauen würde. Aufgrund der bekannten cDNA-Ausgangskonzentrationen

der Standardproben bestand ebenfalls die Möglichkeit mittels der gemessenen C_t -Werte und Dreisatzrechnung, die absolute cDNA-Ausgangskonzentration der Zielgene in jeder Probe exakt zu berechnen.

Nr.	cDNA-Konzentration in ng / 10 μ l	Nr.	cDNA-Konzentration in ng / 10 μ l	Nr.	cDNA-Konzentration in ng / 10 μ l
5	0,03125	6	0,015625	7	0,0078125
8	0,00390625	9	0,001953125	10	0,0009765625
11	0,00048828125	12	0,00024414063	13	0,00012207031
14	0,000061035156	15	0,000030517578	16	0,000015258789
17	0,0000076293945	18	0,0000038146973	19	0,0000019073486

Tabelle 3.5: Darstellung der drei verwendeten Standardreihen mit dazugehörigen cDNA-Konzentrationen. Die Nummer jeder Standardprobe entspricht ihrer jeweiligen Verdünnungsstufe (n) ausgehend von der Ausgangs-cDNA-Konzentration von 1ng/10 μ l. Die Konzentration der Verdünnungsstufen ergibt sich aus dem Wert 2^{-n} , wobei n der Nummer (Nr.) der jeweiligen Stufe entspricht.

3.4.3 Verdünnung der cDNA-Proben für die RT Q-PCR

Für eine exakte Bestimmung der Aktivität der zu untersuchenden Gene musste in den Proben die Ausgangskonzentration der Gesamt-cDNA für die später durchzuführende RT Q-PCR optimal eingestellt werden. Idealerweise sollten sich die Amplifikationsplots im lineardynamischen Bereich exponentiell aufbauen. Vorangegangene Experimente derselben Arbeitsgruppe des Institutes für Radiobiologie der Bundeswehr hatten gezeigt, dass dies für die zu untersuchenden Gene bei einer Verdünnung von 10 ng Gesamt-cDNA in 10 μ l Lösung der Fall war. Aufgrund der hohen Konzentration von 18S-cDNA in den Proben erfolgte deren Bestimmung bei einer Verdünnung auf 0,01 ng pro 10 μ l.

Für die Verdünnung der cDNA-Stammlösung in die benötigten Konzentrationen wurde der sogenannte Puffer 2 aus eigener Herstellung verwendet. Dieser enthielt, in destilliertem Wasser gelöst, definierte Mengen KCl, EDTA- und TRIS-Puffer sowie Tween 20. Die exakte Zusammensetzung ist der Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Reagenz	Menge
KCl	0,7455 g in 100ml aqua dest.
EDTA (pH 8,0)	4 µl
TRIS (pH 8,3)	2 ml
Tween 20	0,6 µl
aqua dest.	96,94 ml
Gesamt	200 ml

Tabelle 3.6: Benötigte Reagenzien für die Herstellung von 200 ml „Puffer 2“.

3.5 Durchführung der RT Q-PCR

3.5.1 Allgemeine Versuchsgrundlagen

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Labortätigkeiten zur Vorbereitung und Durchführung der RT Q-PCR erfolgten gemäß Standardarbeitsanweisungen. Es wurden gebrauchsfertige PDDs mit vom Hersteller garantierten Bindungsspezifitäten der Primer und Sonden für die zu untersuchenden Gene von der Firma Applied Biosystems Applera bezogen. Für die Expressionsmessung der Zielgene wurden MGB-Sonden mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff FAM am 5'-Ende verwendet. Die Sonden zur Bestimmung von 18S waren am 5'-Ende mit dem ebenfalls grün fluoreszierenden Farbstoff VIC als „Reporter“ und am 3'-Ende mit TAMRA als „Quencher“ versehen.

Bei der cDNA-Synthese wurde, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, die gesamte vorhandene RNA idealerweise in dieselbe Menge cDNA umgeschrieben. Abweichungen bei der Gesamt-cDNA-Konzentration zwischen einzelnen Proben sowie der Einfluss externer Faktoren auf die RT Q-PCR waren trotzdem theoretisch möglich. Um diese Größen zu eliminieren, wurden die C_t -Werte der Zielgene mit denen eines Haushaltsgens, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, normalisiert. Hierfür wurden allerdings nicht die bekannten C_t -Werte von 18S aus der Qualitätskontrolle in Kapitel 3.3.4 verwendet, sondern jeweils gleichzeitig mit den Zielgenen neu ermittelte Werte. So konnte sichergestellt werden, dass sowohl für das Haushaltsgen als auch für die Zielgene identische Versuchsbedingungen herrschten.

3.5.2 Aufbereitung der cDNA-Proben

Für die Versuchsdurchführung wurden je fünf Standardproben einer Standardreihe, deren bekannte cDNA-Konzentrationen in Kapitel 3.4 aufgeführt sind, verwendet. Diese sowie die cDNA-Proben der Zielgene und von 18S wurden zunächst auf zerstoßenem Eis langsam aufgetaut und anschließend bei 95 °C für 5 Minuten im Thermomixer inkubiert. Hierdurch kam es zu einem Aufbrechen der Sekundärstrukturen und zur Homogenisierung der cDNA in der Lösung. Aufgrund der vorgegebenen Anzahl von „Wells“ auf der später verwendeten Mikrotiterplatte, wurden die cDNA-Proben jedes Probanden für die anschließende Reaktion in zwei Gruppen aufgeteilt und wie in Tabelle 3.7 ersichtlich durchnummeriert.

Probe	t p.r. [h]	D [Gy]	Probe	t p.r. [h]	D [Gy]
1	0,3	0	7	24	0
2	0,3	0,5	8	24	0,5
3	0,3	2	9	24	2
4	8	0	10	48	0
5	8	0,5	11	48	0,5
6	8	2	12	48	2

Tabelle 3.7: Nummerierung der 12 cDNA-Proben der Probanden für die spätere Aufteilung auf zwei 96-Well-Mikrotiterplatten. (t = Zeit p.r. in h, D = Dosis in Gy)

3.5.3 Ansatz der Synthese-Chemie

Um Ungenauigkeiten oder Verunreinigungen beim Pipettieren zu erkennen, erfolgte für jede cDNA-Probe eine Doppelbestimmung der Genexpression. Aus Gründen der Qualitätssicherung wurde mit einem dreifachen Reaktionsansatz gearbeitet und der Überschuss verworfen. Als zusätzliche Qualitätskontrolle wurde eine Negativkontrolle (Non-Template Control = NTC) bei jedem Versuch bestimmt, bei der statt einer cDNA-Lösung RNase-freies Wasser verwendet wurde. Darüber hinaus wurde zur Kompensation von Benetzungsverlusten aufgrund der Verwendung von elektronischen Pipetten für jeden Ansatz stets eine Reserve im Umfang einer zusätzlichen Reaktion in das Gesamtvolumen eingerechnet.

Zur Vermeidung einer Kontamination mit RNA oder DNA, erfolgte der Ansatz der Synthese-Chemie unter den gleichen hygienischen Bedingungen wie bei der in Kapitel 3.3.3 beschriebenen cDNA-Synthese. Die tiefgefrorenen PPD wurden langsam auf zerstoßenem Eis aufgetaut und zusammen mit dem sonst bei 4 °C gelagerten „Master Mix“ aus dNTP, DNA-Polymerase, Uracil-N-Glykosylase und Puffern für die folgenden Arbeitsschritte aufbewahrt. Vor den jeweiligen Pipettierschritten wurden die PPD-Lösungen für 30 Sekunden mit einem Vortexer homogenisiert. Der „Master Mix“ hingegen wurde aufgrund der empfindlichen Enzyme lediglich leicht mit der Hand geschüttelt. Sämtliche Reagenzien wurden, wie in den Tabellen 3.8 und 3.9 beschrieben, nacheinander in separaten Reaktionsgefäßen zusammengefügt. Die fertige Synthese-Chemie wurde bis zum nächsten Arbeitsschritt wieder kühl und lichtgeschützt auf zerstoßenem Eis gelagert.

Reagenz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen je Reaktion in µl	Volumen für 39 Reaktionen in µl
RNase-freies Wasser			3,5	136,5
Master Mix	2	1	15	585
PPD „18S“	20	1	1,5	58,5
Gesamt			20	780

Tabelle 3.8: Auflistung der benötigten Reagenzien für den Ansatz einer Synthese-Chemie für 39 Reaktionen. Dieser diente zur Genexpressionsbestimmung der 5 Standardproben, einer Negativkontrolle und der 18S-cDNA in 6 Proben eines einzelnen Probanden inklusive einer Reserve. Für jede der 12 Reaktionen und der Reserve wurde der dreifache Ansatz für eine Doppelbestimmung inklusive Überschuss zusammengestellt.

Reagenz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen je Reaktion in µl	Volumen für 21 Reaktionen in µl
RNase-freies Wasser			3,5	73,5
Master Mix	2	1	15	315
PPD „Gen I - VI“	20	1	1,5	31,5
Gesamt			20	420

Tabelle 3.9: Auflistung der benötigten Reagenzien für den Ansatz einer Synthese-Chemie für 21 Reaktionen. Dieser diente zur Genexpressionsbestimmung eines einzelnen Zielgenes von 6 der 12 Proben eines Probanden inklusive einer Reserve. Für jede der 6 Reaktionen und der Reserve wurde der dreifache Ansatz für die Doppelbestimmung inklusive Überschuss zusammengestellt. Für jedes der 6 Zielgene waren die Volumenangaben gleich. Die PDD der 6 Gene waren: I=ATF3, II=BAX, III=CDKN1A, IV=DDB2, V=GADD45A, VI=PCNA.

3.5.4 Ablauf der eigentlichen Reaktion

Das Zusammenführen von cDNA und Synthese-Chemie erfolgte wieder im gleichen Laborraum, in dem bereits die cDNA-Proben vorbereitet wurden. Hierzu wurden 60 µl der Synthese-Chemie in Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde jeweils 30 µl der entsprechenden Untersuchungsprobe hinzugegeben und der Gesamtansatz durch kurzes Vortexen homogenisiert. Hieraus wurden je 30 µl zur Doppelbestimmung in zwei benachbarte „Wells“ einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipetiert und der verbliebene Überschuss von 30 µl verworfen. Insgesamt wurden pro Proband zwei Mikrotiterplatten verwendet, auf denen die fertigen Untersuchungsproben, wie aus Tabelle 3.10 auf der folgenden Seite ersichtlich, verteilt wurden. Auf die erste Mikrotiterplatte wurden die cDNA-Proben 1 bis 6, auf die zweite die cDNA-Proben 7 bis 12 aufgetragen. Zusätzlich wurde mit jeder Mikrotiterplatte eine aus 5 Proben bestehende Standardreihe gemäß der Beschreibung aus Kapitel 3.4.2 und ein NTC als Negativkontrolle analysiert. Die Platten wurden mit einer „Optical Adhesive Cover“-Folie verschlossen und bei 256 g für 1 Minute zentrifugiert, um den gesamten Ansatz am Boden der Platte zu sammeln und Luftblasen zu lösen.

Die Reaktionen der RT Q-PCR erfolgten gemäß voreingestelltem Protokoll am Thermocycler „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems Applied Biosystems vollautomatisch in drei Phasen. In Phase 1 wurde zur Aktivierung der Uracil-N-Glykosylase der Ansatz für 2 Minuten bei 50 °C inkubiert. Dieses Enzym eliminierte im Vorfeld entstandene, unerwünschte cDNA-Amplifikationen durch selektiven Abbau. In Phase 2 wurde durch eine 10-minütige Erhöhung der Temperatur auf 95 °C die Polymerase im „Hot Start“ aktiviert. Die Reaktionsabläufe in Phase 3 wiederholten sich 40-mal, wobei sich zwei Temperaturschritte abwechselten: Im ersten Schritt wurde bei 95 °C die cDNA für 1 Minute denaturiert. Im zweiten Schritt kam es bei 60 °C für die Dauer von ebenfalls 1 Minute zur Anlagerung von „Primern“ und Sonden, dem sogenannten „Annealing“, sowie zur komplementären Elongation des neuen DNA-Stranges. Nach jedem Zyklus erfolgte automatisch eine Messung der Fluoreszenz der durch die 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase von den „Quenchern“ abgespaltenen „Reporter“.

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	NTC	NTC
B	N-1	N-1	N-2	N-2	N-3	N-3	N-4	N-4	N-5	N-5	N-6	N-6
C	I-1	I-1	I-2	I-2	I-3	I-3	I-4	I-4	I-5	I-5	I-6	I-6
D	II-1	II-1	II-2	II-2	II-3	II-3	II-4	II-4	II-5	II-5	II-6	II-6
E	III-1	III-1	III-2	III-2	III-3	III-3	III-4	III-4	III-5	III-5	III-6	III-6
F	IV-1	IV-1	IV-2	IV-2	IV-3	IV-3	IV-4	IV-4	IV-5	IV-5	IV-6	IV-6
G	V-1	V-1	V-2	V-2	V-3	V-3	V-4	V-4	V-5	V-5	V-6	V-6
H	VI-1	VI-1	VI-2	VI-2	VI-3	VI-3	VI-4	VI-4	VI-5	VI-5	VI-6	VI-6

2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	NTC	NTC
B	N-7	N-7	N-8	N-8	N-9	N-9	N-10	N-10	N-11	N-11	N-12	N-12
C	I-7	I-7	I-8	I-8	I-9	I-9	I-10	I-10	I-11	I-11	I-12	I-12
D	II-7	II-7	II-8	II-8	II-9	II-9	II-10	II-10	II-11	II-11	II-12	II-12
E	III-7	III-7	III-8	III-8	III-9	III-9	III-10	III-10	III-11	III-11	III-12	III-12
F	IV-7	IV-7	IV-8	IV-8	IV-9	IV-9	IV-10	IV-10	IV-11	IV-11	IV-12	IV-12
G	V-7	V-7	V-8	V-8	V-9	V-9	V-10	V-10	V-11	V-11	V-12	V-12
H	VI-7	VI-7	VI-8	VI-8	VI-9	VI-9	VI-10	VI-10	VI-11	VI-11	VI-12	VI-12

Tabelle 3.10: Das dargestellte Pipettierschema zeigt die Verteilung der Untersuchungsproben eines Probanden auf 2 Mikrotiterplatten. Die 5 Standardproben (S1 - S5) und der NTC werden in die erste Reihe (A) pipettiert. Die 18S-Proben für die Normalisierung (N) finden sich jeweils in der zweiten Reihe (B) und die Proben für die Genexpressionsbestimmung in den folgenden Reihen (C-H). Die Aufschlüsselung Gene im Einzelnen: I=ATF3, II=BAX, III=CDKN1A, IV=DDB2, V=GADD45A, VI=PCNA. Die Ziffern 1 - 12 hinter den Genen stehen für die jeweilige cDNA-Probe gemäß der Benennung in Tabelle 3.7.

3.5.5 Darstellung der Messwerte in Amplifikationsplots

Zur Auswertung der Rohdaten der RT Q-PCR wurde die Software des „Sequence Detector Systems“ von Applied Biosystems Applera verwendet, welche auf der Bedienerkonsole des Thermocyclers installiert war. Diese erstellte, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, Amplifikationsplot, wobei die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle Number) auf der x-Achse und das normalisierte Reportersignal (Rn-Wert) auf der y-Achse dargestellt wurden. In allen Versuchsreihen befanden sich die Amplifikationsplots von 18S und die der Zielgene innerhalb des durch die jeweilige Standardreihe abgebildeten lineardynamischen Bereichs. Dies war möglich, da im Rahmen von Vorversuchen die optimalen Konzentrationen der drei verwendeten Standardreihen ermittelt wurden. In Abbildung 3.6 ist diese Bedingung exemplarisch anhand der zweiten Reaktionsplatte von Proband 21 dargestellt.

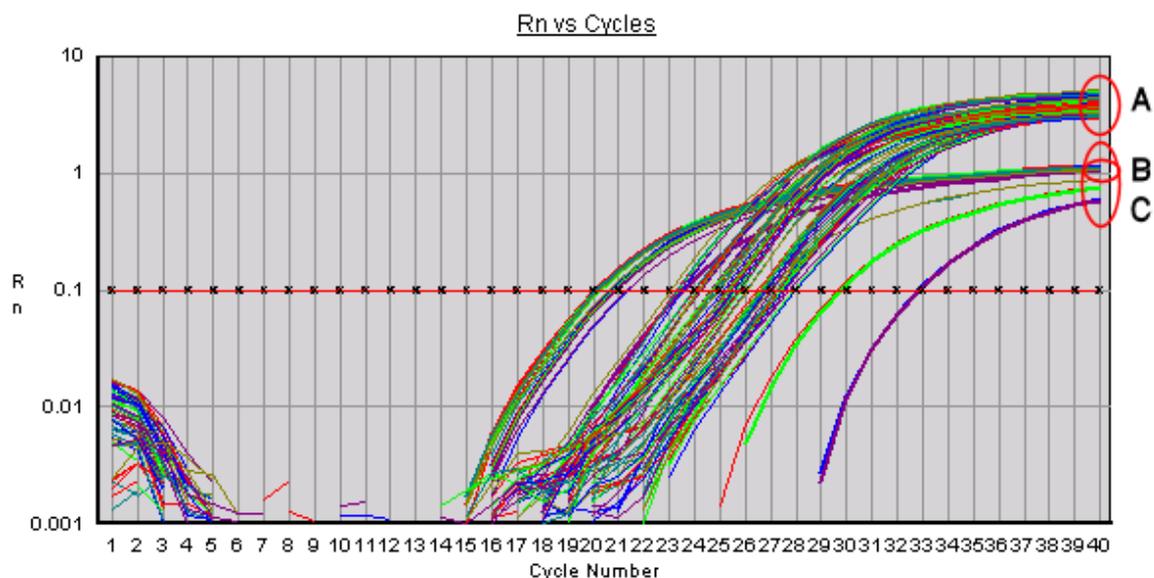


Abb. 3.6: Amplifikationsplots der zweiten Reaktionsplatte von Proband 21. Auf der x-Achse sind linear die Anzahl der PCR-Zyklen und auf der y-Achse logarithmisch die dazu korrespondierenden Fluoreszenzwerte aufgetragen. Alphabetisch bezeichnet sind die Amplifikationsplots der Zielgene (A), von 18S (B) und der Standardreihe (C). Aufgrund der Verwendung von MGB-Sonden für die Analyse der Zielgene erreichen diese ein höheres Plateau. Bei den ersten PCR-Zyklen ist das, in Kapitel 3.4.1 beschriebene, automatisierte Herausrechnen der Hintergrundfluoreszenz zu sehen. (Amplifikationsplots erstellt mittels „Sequence Detector Software“ von Applied Biosystems Applera.)

3.6 Auswertung der Messergebnisse der RT Q-PCR

3.6.1 Quantifizierung mittels Standardkurve

Die Software des Thermocyclers erstellte für jeden Versuchsdurchlauf eine sogenannte Standardkurve, bei der die cDNA-Ausgangskonzentrationen der jeweils verwendeten Standardreihe auf der x-Achse und die korrespondierenden C_t -Werte der Amplifikationsplots auf der y-Achse aufgetragen wurden. Erwartet wurde aufgrund des linearen Zusammenhangs eine Korrelation von -1 . Die Korrelation diente auch als ein Gradmesser für die Genauigkeit der Pipettier-Arbeiten, da sich eine Abweichung bei den Doppelbestimmungen unmittelbar auf diese ausgewirkt hätte. Die Software des Thermocyclers berechnete darüber hinaus mit Hilfe der Standardreihen die absolute cDNA-Konzentration der Zielgene in den jeweiligen Proben. In Abbildung 3.7 ist die Standardkurve der ersten Reaktionsplatte des Probanden 21 exemplarisch dargestellt.

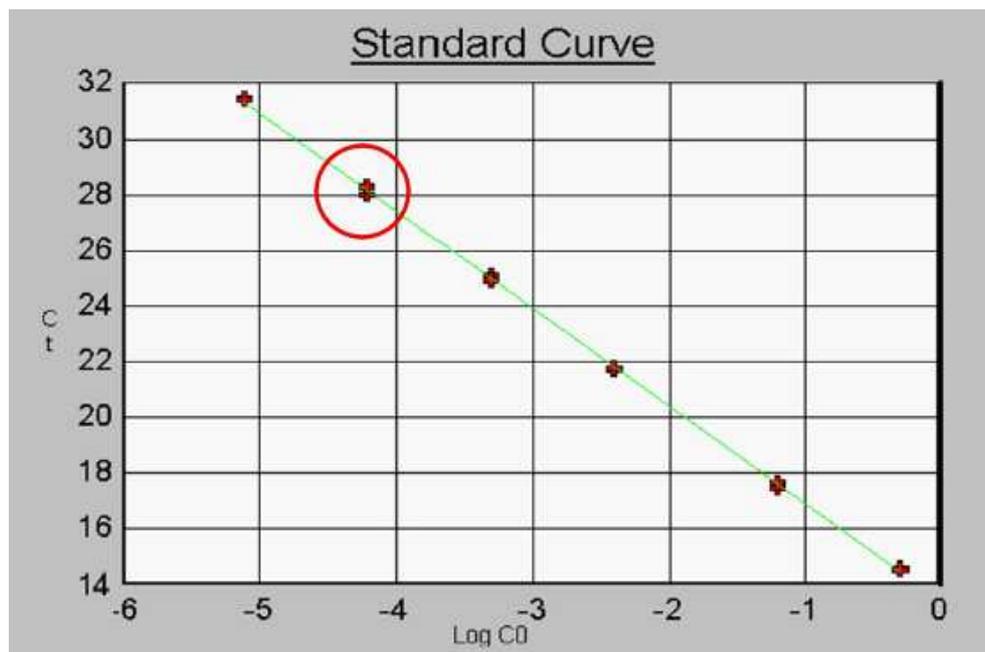


Abb. 3.7: Standardkurve der ersten Reaktionsplatte des Probanden 21. Auf der x-Achse sind die cDNA-Ausgangskonzentrationen der Standardproben (C_0) und auf der y-Achse der jeweils korrespondierende C_t -Wert aufgetragen. Mit einer Korrelation von $-0,9998$ konnte gezeigt werden, dass die hier verwendete Standardreihe den linear-dynamischen Bereich umfasste. An der Stelle der roten Markierung erkennt man einen Unterschied zwischen den Doppelbestimmungen, der durch geringe, aber vernachlässigbare Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang verursacht wurde. (Standardkurve erstellt mittels „Sequence Detector Software“ von Applied Biosystems Applera.)

Aus der Steigung der Standardkurve ließ sich die Effizienz der Amplifikationen jedes einzelnen Versuchsdurchlaufes errechnen. Der Betrag der Steigung gab die Anzahl der Zyklen an, die benötigt wurden, um die vorhandene cDNA-Menge eines Gens zu verzehnfachen. Den Zusammenhang zwischen Steigung und Effizienz der Reaktion spiegelt folgende Formel wieder:

$$\text{Effizienz} = 10^{-1 / \text{Steigung}}$$

Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben, wurden für alle Messungen Doppelbestimmungen durchgeführt, um Verunreinigungen oder Ungenauigkeiten beim Pipettieren zu erkennen. Unterschiede von bis zu 0,5 C_t-Werten wurden toleriert, andernfalls wurde die RT Q-PCR für alle 12 Messwerte des entsprechenden Gens zuzüglich 18S dieses Probanden wiederholt. Dies war bei 15 der insgesamt 1440 durchgeführten Bestimmungen der Fall. Aufgrund dieser Maßnahme betrug die durchschnittliche Abweichung bei den Doppelbestimmungen 0,09 C_t-Werte.

3.6.2 Berechnung der normalisierten Genexpression

Methodische Fehler im Verlauf der RT Q-PCR ließen sich eliminieren, indem die C_t-Werte der Zielgene mit den C_t-Werten von 18S, wie in Kapitel 3.5.1 erläutert, normalisiert wurden. Hierzu wurde die Differenz für jeden Einzelwert der Doppelbestimmung des Zielgenes mit dem Mittelwert von 18S der gleichen Probe, der sogenannte „Δ Approach“, gebildet. Aufgrund der Doppelbestimmung ergaben sich somit für jede cDNA-Probe zwei Werte. Als Berechnungsgrundlage diente folgende Formel:

$$\Delta \text{ Approach} = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ 18S}}$$

Aus diesen Werten ließ sich die normalisierte Genexpression mit Hilfe unten stehender Formel berechnen. Die Ergebnisse gaben die cDNA-Menge der Zielgene im Verhältnis zur 18S-cDNA-Menge in einem dimensionslosen Werte wieder. Aus den beiden Werten der Doppelbestimmung wurde im Folgenden der Mittelwert bestimmt.

$$\text{normalisierte Genexpression} = 2^{-(\Delta \text{ Approach})}$$

Die notwendigen Berechnungen erfolgten mittels Tabellenkalkulation mit Hilfe der Software Excel 2007 der Firma Microsoft. Für die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse wurde die Software Sigma Plot 2000 Version 6.0 der Firma SPSS Science verwendet.

3.6.3 Berechnung der differentiellen Genexpression

Um unterschiedlich hohe Ausgangs-Expressionen der einzelnen Gene ausgleichen und die strahlenbedingten Veränderungen des Expressionsniveaus besser veranschaulichen zu können, war die Berechnung der relativen Veränderung der Genexpression erforderlich. Hierfür wurde der „ Δ Approach“ einer bestrahlten Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Bestrahlung in Relation zur unbestrahlten Kontrolle des gleichen Zeitpunktes, dem Kalibrator, gesetzt.

$$\Delta\Delta \text{ Approach} = \Delta \text{ Approach}_{\text{Probe}} - \Delta \text{ Approach}_{\text{Kalibrator}}$$

Alternativ wäre es möglich gewesen, die Differenz aus den vom Thermocycler automatisch berechneten, absoluten cDNA-Ausgangskonzentrationen zu bilden. Für die folgende Berechnung der differentiellen Genexpression waren beide Verfahren gleichwertig. Die Festlegung auf die Verwendung des „ Δ Approach“ erfolgte willkürlich. Die Berechnung der differentiellen Genexpression für die eigentliche relative Beschreibung der Expressionsänderungen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{differentielle Genexpression} = 2^{-(\Delta\Delta \text{ Approach})}$$

Dieses Vorgehen ermöglichte darüber hinaus, den möglichen Einfluss von sich verändernden Zellaktivitäten im In-vitro-Modell auf die Genexpression auszugleichen. Bei einer differentiellen Genexpression von 1 war von einer unveränderten Expression des untersuchten Gens relativ zum Kontrollwert auszugehen. Entsprechend den Empfehlungen der Herstellerfirma Applied Biosystems Applied Biosystems wurde der Vertrauensbereich zwischen 0,5 und 2 festgelegt. Das Überschreiten des oberen Schwellenwertes, also bei einer Verdoppelung der Genexpression, wurde als „Hochregulation“ definiert. Entsprechend wurde als „Herunterregulation“ ein Unterschreiten des unteren Schwellenwertes bei einer Halbierung der Genexpression relativ zur Kontrolle bestimmt. Expressionsänderungen innerhalb des Vertrauensbereiches wurden als nicht differentiell exprimierend beschrieben.

Für alle Berechnungen wurde, wie auch bei der normalisierten Genexpression, die Tabellenkalkulation Excel 2007 der Firma Microsoft und die Statistik-Software Sigma Plot 2000 Version 6.0 der Firma SPSS Science verwendet.

3.6.4 Weitere Berechnungen und statistische Auswertungen

Alle weiteren Analysen bezüglich der Kolinearität zwischen der Genexpression der Zielgene und die Entwicklung unterschiedlicher univariater und multivariater linearer Regressionsmodelle zur Erklärung der unterschiedlichen Genexpressionen erfolgten mit Hilfe der Software SAS Version 9 der Firma SAS. Diese Berechnungen wurden durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr durchgeführt und sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse dienten allerdings als Grundlagen für die Diskussion und sind daher an entsprechenden Stellen in Kapitel 4 und im Anhang dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der demographischen Daten und des Blutbildes

Unter den 30 Probanden befanden sich zu gleichen Teilen Frauen und Männer im Alter von 16 bis 56 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 28 Jahre. In den folgenden Auswertungen wurde ein zusätzlicher Proband (Nr. 10), der aufgrund seiner strahlentherapeutischen Vorbehandlung nur zu Vergleichszwecken an der Studie teilnahm, ausgenommen. Um möglicherweise die Ursachen von interindividuellen Unterschieden bei der Genexpression aufklären zu können, wurde nach der Analyse der ersten 5 Probanden von allen weiteren Untersuchungsteilnehmern zusätzlich ein differentiell Blutbild direkt im Anschluss an die Blutentnahme erstellt. Die Gesamtzahl der Leukozyten pro μl reichte von 2.940 bis 10.100 und betrug im Mittel 5.975. In Abbildung 4.1 sind die Altersstruktur und die Verteilung der Leukozytenkonzentration grafisch dargestellt. Die Einzelwerte des differentiellen Blutbildes sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

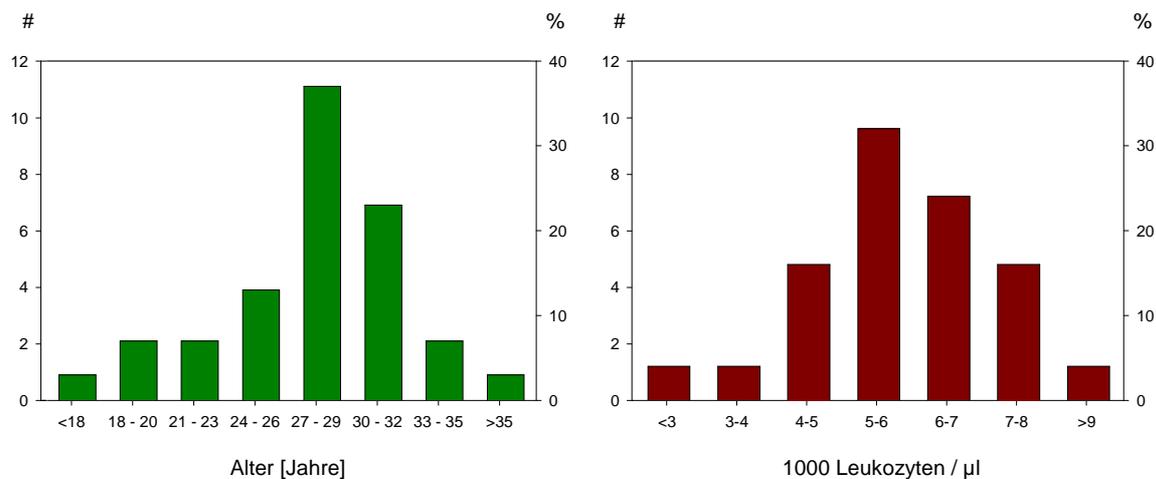


Abb. 4.1: Altersverteilung der 30 Probanden (grün dargestellt) sowie die Verteilung der Leukozytenzahl im differentiellen Blutbild bei 25 Probanden (rot dargestellt). Die Fragestellung ob die Ursache der beobachteten interindividuellen Unterschiede in der Höhe der Genexpression unter anderem durch Blutbildfaktoren erklärt werden könnte, ergab sich erst nach Analyse der ersten 5 Probanden.

Nr.	WBC	# Neutr	% Neutr	# Lym	% Lym	# Mono	% Mono	# Eos	% Eos	# Baso	% Baso
6	5,15	3,26	63,30	1,24	24,00	0,53	10,30	0,07	1,36	0,06	1,07
7	7,28	4,44	61,00	2,05	28,10	0,54	7,37	0,15	2,05	0,10	1,40
8	4,74	2,91	61,30	1,41	29,70	0,31	6,57	0,05	1,05	0,07	1,39
9	5,56	3,72	66,90	1,07	19,30	0,61	11,00	0,10	1,73	0,06	1,11
11	6,89	4,31	62,50	1,80	26,10	0,48	7,00	0,23	3,32	0,07	1,08
12	5,59	4,06	72,60	1,20	21,50	0,20	3,53	0,11	1,93	0,02	0,39
13	10,10	6,22	61,80	2,23	22,20	0,51	5,07	0,98	9,72	0,13	1,26
14	6,50	4,30	66,20	1,62	25,00	0,31	4,83	0,18	2,76	0,08	1,16
15	5,29	2,94	55,60	1,87	35,40	0,33	6,20	0,07	1,25	0,08	1,50
16	7,64	5,48	71,80	1,65	21,60	0,42	5,43	0,03	0,43	0,06	0,79
17	4,48	1,85	41,30	1,97	44,00	0,51	11,30	0,11	2,39	0,04	0,95
18	6,57	3,63	55,40	2,53	38,50	0,26	3,97	0,10	1,50	0,05	0,70
19	5,01	2,46	49,10	2,19	43,80	0,23	4,49	0,07	1,40	0,06	1,25
20	6,63	3,73	56,20	2,13	32,20	0,52	7,82	0,20	2,95	0,05	0,81
21	7,22	4,55	63,00	1,97	27,30	0,50	6,93	0,14	1,91	0,06	0,82
22	6,99	3,99	57,10	2,21	31,70	0,48	6,89	0,21	3,04	0,09	1,26
23	4,99	2,62	52,50	1,67	33,40	0,35	6,91	0,28	5,51	0,08	1,65
24	7,99	4,69	58,70	2,58	32,20	0,47	5,82	0,19	2,34	0,07	0,93
25	5,47	3,04	55,50	1,82	33,20	0,46	8,31	0,11	2,06	0,05	0,91
26	6,67	3,54	53,10	2,36	35,30	0,47	7,04	0,23	3,49	0,07	1,05
27	5,61	2,50	44,60	2,48	44,10	0,46	8,22	0,14	2,50	0,03	0,53
28	4,64	1,77	38,10	2,40	51,70	0,28	6,02	0,14	2,98	0,05	1,16
29	5,45	2,99	54,80	1,77	32,40	0,37	6,81	0,27	4,96	0,06	1,08
30	3,98	2,26	56,80	1,25	31,40	0,37	9,31	0,04	1,09	0,06	1,39
31	2,94	1,20	40,90	1,35	45,80	0,24	8,11	0,11	3,69	0,04	1,45

	WBC	# Neutr	% Neutr	# Lym	% Lym	# Mono	% Mono	# Eos	% Eos	# Baso	% Baso
Ø	5,98	3,53	57,22	1,87	31,98	0,41	6,93	0,18	2,77	0,06	1,09
Max	10,10	6,22	72,60	2,58	51,70	0,61	11,30	0,98	9,72	0,13	1,65
Min	2,94	1,20	38,10	1,07	19,30	0,20	3,53	0,03	0,43	0,02	0,39
SD	1,46	1,19	8,87	0,43	8,44	0,11	1,97	0,18	1,85	0,02	0,30

Tabelle 4.1: Differentielles Blutbild von 25 der 30 Probanden. Gezeigt wird die absolute (#) in 1000/ μ l und die relative (%) Verteilung der Leukozyten. (WBC = White Blood Cells (Gesamtzahl der Leukozyten), Neutr = Neutrophile Granulozyten, Lym = Lymphozyten, Mono = Monozyten, Eos = Eosinophile Granulozyten und Baso = Basophile Granulozyten, Ø = Mittelwert, Max = Maximum, Min = Minimum, SD = Standardabweichung.)

4.2 Darstellung der Messergebnisse der RT Q-PCR

4.2.1 Beschreibung der Rohdaten

Die Software des Thermocyclers „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ erstellte, wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, Standardkurven für jede RT Q-PCR. Hierfür wurden die bekannten Werte der cDNA-Ausgangskonzentrationen der verwendeten Standardproben auf der x-Achse und die jeweils korrespondierenden C_t -Werte auf der y-Achse aufgetragen. Die beiden Parameter korrelierten durchschnittlich zu 99,97 %, was die hohe Genauigkeit des Verfahrens unterstrich. Die höchste Korrelation betrug 99,996 % bei der zweiten Reaktionsplatte von Proband 22, die niedrigste 99,643 % bei der zweiten Platte von Proband 13. Einen wesentlichen Einfluss auf die Korrelation hatten die geringen Abweichungen bei den Doppelbestimmungen. Sie betrug für alle cDNA-Proben durchschnittlich 0,09 C_t -Werte bei einer Standardabweichung von 0,08.

Im Idealfall hätte sich während jedes Reaktionszyklus die Kopienzahl der cDNA eines Genes verdoppeln müssen, was einer Effektivität der Gesamtreaktion von 100% entsprochen hätte. Die Steigung der Standardkurve hätte gemäß der Berechnungsformel aus Kapitel 3.6.1 in diesem Fall $-3,322$ betragen. Bei den insgesamt 62 Durchläufen dieser Versuchsreihe betrug die Steigung im Mittel $-3,452$. Die Kopienzahl erhöhte sich demnach im Schnitt um den Faktor 1,949 pro Zyklus, was einer durchschnittlichen Effektivität der Reaktionen von 97,46 % entsprach. Alle Ergebnisse der Auswertungen der Standardkurven sind in Anhang 8.2 tabellarisch zusammengefasst.

4.2.2 Ergebnisse der normalisierten Genexpression

Um methodische Fehler zu eliminieren, wurden die C_t -Werte der Zielgene mit den C_t -Werten der 18S-rRNA gemäß der Formel aus Kapitel 3.6.2 normalisiert. Das Ergebnis zeigte dimensionslos das Verhältnis der cDNA-Ausgangskonzentrationen der Zielgene zu der von 18S. In Tabelle 4.2 sind die minimalen, maximalen und durchschnittlichen Werte sowie die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten (C_v) der normalisierten Genexpression für jedes untersuchte Gen aufgelistet. Die Ergebnisse von Proband 10 sind hierbei nicht eingeflossen, da er aufgrund einer Vorerkrankung nur zu Vergleichszwecken an den Untersuchungen teilgenommen hat. Die Einzelwerte aller Probanden sind aus Anhang 8.3 ersichtlich.

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	$\bar{\phi}$	Min	Max	SD	C_v
ATF3	0	0,3	6,6	1,1	67,5	12,7	192%
	0,5	0,3	6,5	1,1	66,3	12,0	185%
	2	0,3	6,7	1,2	55,4	11,1	166%
	0	8	17,5	2,5	95,2	19,2	110%
	0,5	8	21,8	2,5	94,7	23,3	107%
	2	8	28,1	2,8	211,1	39,9	142%
	0	24	39,1	1,4	366,4	64,7	165%
	0,5	24	53,0	8,6	269,8	56,2	106%
	2	24	62,4	7,7	427,8	79,0	127%
	0	48	50,8	2,0	564,6	98,5	194%
	0,5	48	57,9	14,6	532,3	93,5	161%
	2	48	51,4	8,2	452,2	79,4	154%
BAX	0	0,3	145,8	93,5	282,6	49,6	34%
	0,5	0,3	141,1	77,2	247,4	44,7	32%
	2	0,3	139,5	82,1	244,0	47,9	34%
	0	8	131,7	78,3	234,1	38,2	29%
	0,5	8	145,2	86,9	292,4	42,6	29%
	2	8	141,6	80,5	286,7	46,9	33%
	0	24	106,2	27,1	198,1	32,4	31%
	0,5	24	110,9	27,3	171,4	29,5	27%
	2	24	114,3	29,0	177,4	35,2	31%
	0	48	82,6	21,2	129,9	26,0	31%
	0,5	48	88,3	20,9	150,7	27,2	31%
	2	48	84,6	20,1	142,1	29,8	35%
CDKN1A	0	0,3	37,6	13,8	197,7	35,9	95%
	0,5	0,3	35,1	14,5	170,9	28,8	82%
	2	0,3	32,6	12,8	129,9	23,8	73%
	0	8	77,2	20,6	438,5	84,2	109%
	0,5	8	96,1	23,2	476,5	100,1	104%
	2	8	124,1	19,4	815,2	156,1	126%
	0	24	112,9	9,1	956,0	165,7	147%
	0,5	24	126,7	25,7	496,7	103,8	82%
	2	24	136,4	23,5	554,8	116,8	86%
	0	48	56,1	6,2	324,2	56,8	101%
	0,5	48	60,4	24,2	249,3	44,9	74%
	2	48	67,2	26,1	227,7	42,9	64%
DDB2	0	0,3	20,1	9,2	36,0	6,6	33%
	0,5	0,3	18,7	10,4	31,1	5,7	30%
	2	0,3	17,7	8,3	32,2	6,3	36%
	0	8	16,0	7,9	25,5	3,9	24%
	0,5	8	18,1	11,5	34,0	4,5	25%
	2	8	18,8	10,3	33,7	5,8	31%
	0	24	14,4	3,3	27,7	4,7	33%
	0,5	24	14,4	3,4	25,4	4,2	29%
	2	24	14,4	3,4	25,5	4,4	31%
	0	48	12,5	3,3	22,0	3,7	30%
	0,5	48	13,8	4,0	21,1	3,5	25%
	2	48	13,8	3,2	24,5	4,5	33%
GADD45A	0	0,3	7,3	4,4	14,6	2,2	30%
	0,5	0,3	6,8	4,2	10,5	1,6	24%
	2	0,3	6,6	4,0	10,1	1,7	26%
	0	8	7,2	4,3	13,7	2,4	33%
	0,5	8	13,1	6,3	38,2	7,3	56%
	2	8	16,8	6,7	53,1	11,9	71%
	0	24	7,5	1,3	51,3	8,5	113%
	0,5	24	10,1	2,4	35,7	6,6	65%
	2	24	12,4	2,9	64,1	11,5	93%
	0	48	6,3	0,9	48,9	8,1	129%
	0,5	48	10,0	2,5	61,1	10,4	104%
	2	48	11,2	2,2	61,2	10,3	92%
PCNA	0	0,3	37,3	21,6	69,0	8,8	24%
	0,5	0,3	34,5	21,5	56,0	7,8	23%
	2	0,3	33,0	21,1	57,2	8,4	25%
	0	8	27,2	16,7	44,7	5,2	19%
	0,5	8	31,4	19,0	54,6	6,3	20%
	2	8	33,3	21,5	65,7	9,6	29%
	0	24	22,9	6,8	33,0	5,4	24%
	0,5	24	21,6	4,9	33,3	5,6	26%
	2	24	22,2	5,2	31,3	5,1	23%
	0	48	15,6	5,0	23,4	4,4	28%
	0,5	48	16,7	4,3	32,2	5,5	33%
	2	48	15,2	3,5	23,5	4,2	28%

Tabelle 4.2: Statistische Auswertung der normalisierten Genexpression (Werte mit Faktor 1000 multipliziert), aufgeschlüsselt nach Zielgen, Strahlendosis und Zeitpunkt der Messung nach Bestrahlung. (D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h, $\bar{\phi}$ = Mittelwert, Max = Maximum, Min = Minimum, SD = Standardabweichung, C_v = Variationskoeffizient).

In der Höhe der Werte der normalisierten Genexpression gab es deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Genen. Die niedrigsten Werte wurden bei DDB2, GADD45A und PCNA gemessen. Sie lagen zwischen 0,001 und 0,069 je nach Strahlendosis und Zeitabstand zur Bestrahlung. Die höchsten Werte fanden sich bei ATF3, BAX und CDKN1A mit Maximalwerten von bis zu 0,956 beziehungsweise Durchschnittswerten von bis zu 0,146. Auffällig waren große interindividuellen Schwankungen mit Variationskoeffizienten von bis zu 194 % vor allem bei ATF3 und etwas weniger ausgeprägt bei CDKN1A. Die ebenfalls in Anhang 8.3 dargestellten Werte von Proband 10 lagen fast aller innerhalb des Bereiches der Standardabweichung. Teilweise etwas größere Unterschiede fanden sich lediglich bei GADD45A.

In Abbildung 4.2 auf der folgenden Seite wurde der zeitliche Verlauf der normalisierten Genexpression nach 20 Minuten sowie nach 8, 24 und 48 Stunden dargestellt, aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen verwendeten Strahlendosen. Die Werte bei einer Strahlendosis von 0 Gy entsprachen hierbei denen der nicht bestrahlten Kontrollgruppe. Bei der Auswertung der Verlaufskurven zeigte sich, dass bei ATF3 und CDKN1A die normalisierte Genexpression zunächst bis zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Bestrahlung anstieg. Bei ATF3 blieben die Werte bis 48 Stunden konstant, bei CDKN1A fielen sie hingegen nach 48 Stunden fast auf die Ausgangswerte zurück. Bei GADD45A wurde das Maximum der normalisierten Genexpression bereits nach 8 Stunden erreicht. Die Werte fielen nach 24 Stunden leicht ab, blieben aber auch nach 48 Stunden über den Ausgangswerten. Im Gegensatz dazu waren die Werte bei BAX, DDB2 und PCNA ab dem ersten Zeitpunkt bereits rückläufig. Bei keinem der sechs Gene zeigte sich nach 20 Minuten ein großer Unterschied bezüglich der Strahlendosis in der Expression. Im weiteren zeitlichen Verlauf änderten sich die Kurven der nichtbestrahlten Kontrollen in ähnlicher Weise, wie die Kurven der bestrahlten Proben. Lediglich bei GADD45A war die Höhe der normalisierten Genexpression der Kontrollgruppen konstant. Dass sich bei fünf von sechs Genen auch der nicht bestrahlte Kontrollwert veränderte, wurde als Anzeichen für eine sich im zeitlichen Verlauf verändernde Aktivität der PMNC bezüglich der Genexpression im In-vitro-Modell angesehen. Dieses unphysiologische Verhalten war bei den verschiedenen Genen allerdings, wie gezeigt, sehr unterschiedlich ausgeprägt.

In Abbildung 4.3 auf Seite 70 werden die Veränderungen der normalisierten Genexpression bei unterschiedlichen Strahlendosen veranschaulicht. Die Kurven stellen die zuvor beschriebenen Sachverhalte in ähnlicher Weise dar: Es liegen große Unterschiede bei der Höhe der normalisierten Genexpression zwischen den Genen vor. Darüber hinaus ist der Einfluss der sich verändernden Zellaktivitäten aufgrund der unterschiedlich hohen Expressionsniveaus zu den verschiedenen Zeitpunkten bei den unbestrahlten Kontrollen sehr gut erkennbar. Ebenfalls sehr deutlich wird die Tatsache, dass nur bei GADD45A die Höhe der normalisierten Genexpression der unbestrahlten Kontrollgruppe über die Zeit konstant blieb.

Die Werte der unbestrahlten Kontrollen dienten in den folgenden Kapiteln als Kalibrator für die Genexpression der bestrahlten Proben. Hierdurch konnte zum einen die im zeitlichen Verlauf verändernde Aktivität der PMNC bei der Expression einzelner Gene ausgeglichen werden. Zum anderen ließ sich mit Ihnen der Einfluss der unterschiedlich hohen Ausgangs-Expression der verschiedenen Gene kompensieren und somit eine bessere Aussage über ihr Potential als mögliche Markergene treffen.

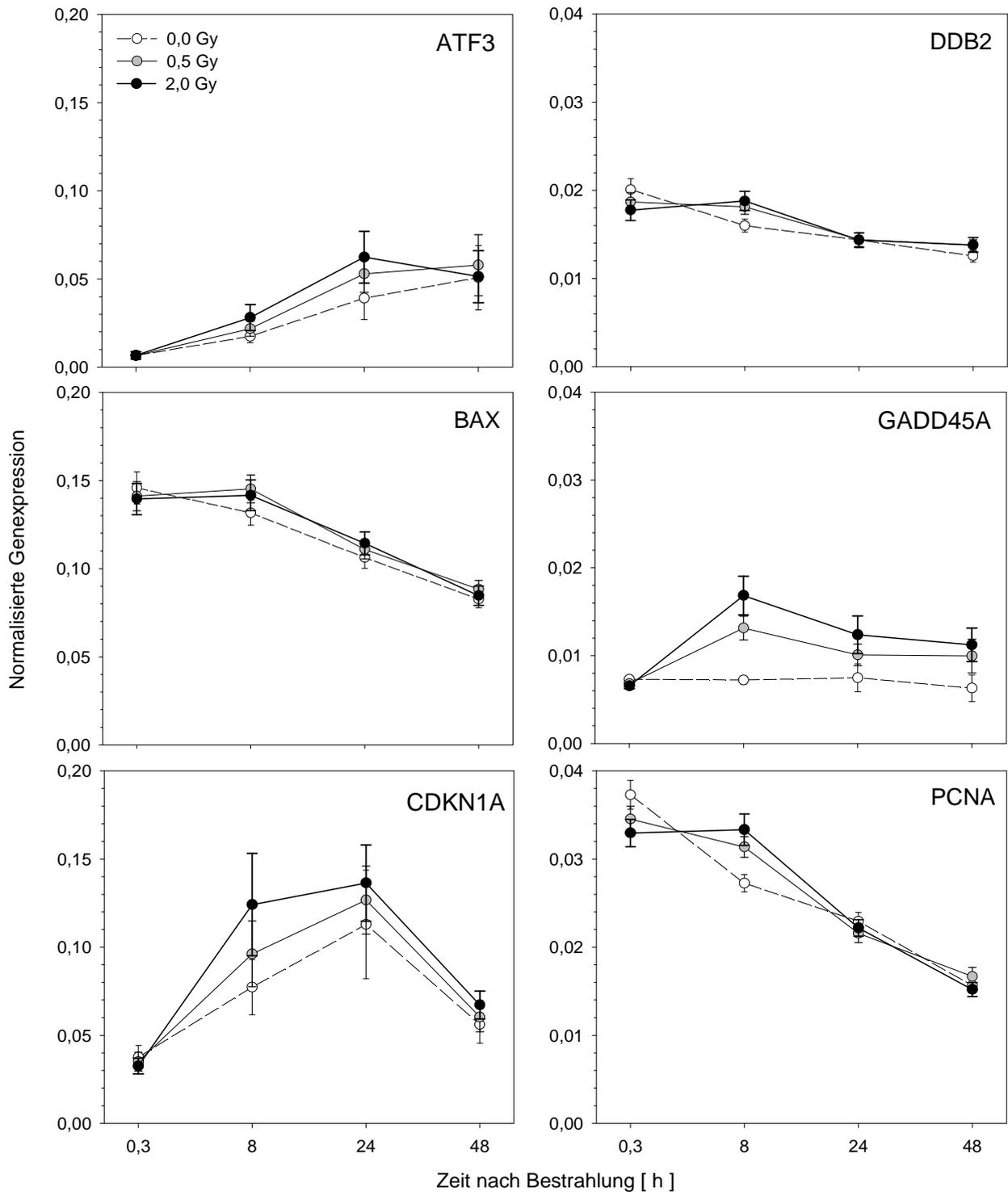


Abb. 4.2: Zeitlicher Verlauf der normalisierten Genexpression, aufgeschlüsselt in die nicht bestrahlte Kontrollgruppe sowie die mit 0,5 Gy und 2,0 Gy bestrahlte Gruppen. Aufgezeigt sind die durchschnittlichen Werte aller Probanden sowie der jeweilige Standardfehler. Die in der linken Abbildungshälfte dargestellten Gene exprimieren durchschnittlich fünfmal so stark wie die in der rechten Hälfte. Darüber hinaus sind Unterschiede im Kurvenverlauf ersichtlich: bei ATF3, CDKN1A und GADD45A steigt die normalisierte Genexpression zunächst an, bei BAX, DDB2 und PCNA ist sie durchgängig abfallend. Bei allen Genen, außer bei GADD45A, sind diese Veränderungen der Expression auch bei den Kontrollwerten (0 Gy) zu erkennen.

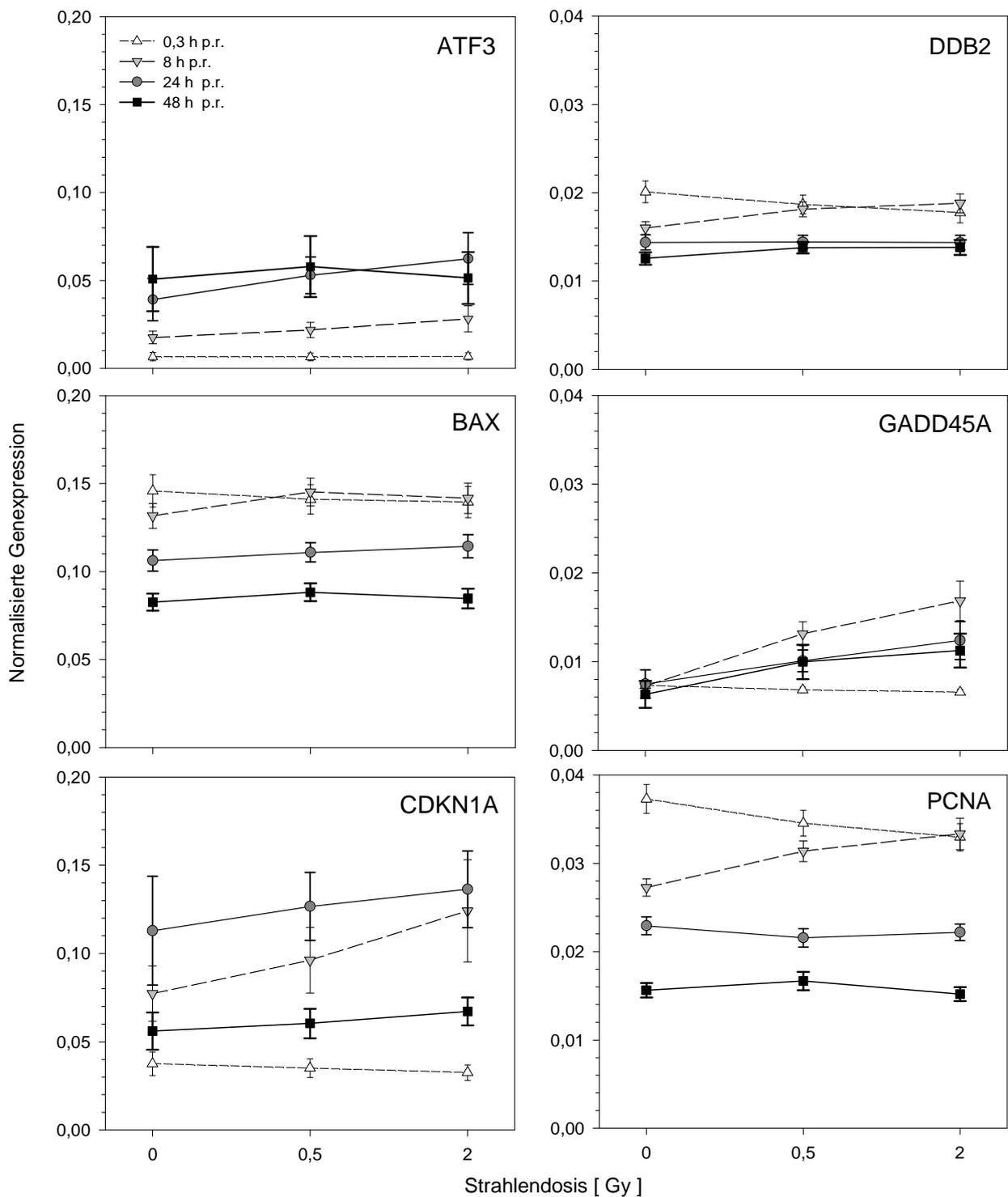


Abb. 4.3: Veränderung der normalisierten Genexpression bei steigender Strahlendosis, aufgeschlüsselt in die verschiedenen Zeitintervalle nach Bestrahlung. Aufgezeigt sind die durchschnittlichen Werte aller Probanden sowie der jeweilige Standardfehler. Wie auch in Abb. 4.2 erkennt man, dass die in der linken Abbildungshälfte dargestellten Gene durchschnittlich fünfmal so stark exprimiert sind wie die in der rechten Hälfte. Die Werte der nichtbestrahlten Kontrolle differieren, außer bei GADD45A, deutlich.

4.2.3 Ergebnisse der differentiellen Genexpression

Die Ergebniswerte der normalisierten Genexpression zeigten im vorhergehenden Kapitel neben ausgeprägten interindividuellen Abweichungen vor allem große Unterschiede in der Höhe der Ausgangs-Expression der einzelnen Gene. Um die tatsächlichen Veränderungen des Expressionsniveaus beurteilen zu können, erfolgte eine relative Betrachtung mittels der Berechnung der differentiellen Genexpression. Darüber hinaus konnten im gleichen Schritt auch die, ebenfalls im Kapitel 4.2.2 aufgezeigten, nicht-strahlenbedingten Einflüsse, insbesondere die Auswirkungen von unphysiologischen Veränderungen der Zellaktivität im Kultivierungsmilieu bezüglich der Expression einzelner Gene, im gewissen Maße ausgeglichen werden. Für die Berechnung wurden die normalisierten Genexpressionswerte der bestrahlten Proben in Relation zu denen der zeitlich korrespondierenden Proben der unbestrahlten Kontrollen gesetzt. Die Definitionen der Begriffe „Hoch-“ und „Herunterregulation“ sowie des Vertrauensbereiches sind ebenso wie die Berechnungsformel für die differentielle Genexpression im Kapitel 3.6.3 beschrieben.

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	$\bar{\phi}$	Min	Max	SD	C_v
ATF3	0,5	0,3	1,08	0,67	1,75	0,26	24%
	2	0,3	1,15	0,55	2,41	0,34	30%
	0,5	8	1,27	0,50	3,29	0,58	46%
	2	8	1,58	0,61	7,54	1,28	81%
	0,5	24	1,89	0,74	8,26	1,32	70%
	2	24	2,04	0,80	8,80	1,46	72%
	0,5	48	1,52	0,66	7,78	1,27	84%
	2	48	1,42	0,43	6,09	1,08	76%
BAX	0,5	0,3	0,98	0,75	1,25	0,13	13%
	2	0,3	0,96	0,71	1,23	0,12	13%
	0,5	8	1,11	0,80	1,49	0,16	14%
	2	8	1,08	0,67	1,49	0,20	19%
	0,5	24	1,06	0,80	1,40	0,14	13%
	2	24	1,08	0,83	1,64	0,17	16%
	0,5	48	1,08	0,69	1,37	0,16	15%
	2	48	1,03	0,55	1,54	0,18	17%
CDKN1A	0,5	0,3	1,00	0,64	1,47	0,17	17%
	2	0,3	0,94	0,54	1,50	0,21	22%
	0,5	8	1,26	0,73	2,22	0,39	31%
	2	8	1,57	0,79	6,12	1,00	64%
	0,5	24	1,55	0,52	4,51	0,83	54%
	2	24	1,58	0,58	4,63	0,91	58%
	0,5	48	1,37	0,64	5,11	0,86	63%
	2	48	1,58	0,58	4,24	0,85	54%
DDB2	0,5	0,3	0,94	0,68	1,33	0,14	15%
	2	0,3	0,89	0,53	1,10	0,13	15%
	0,5	8	1,15	0,76	1,56	0,17	15%
	2	8	1,18	0,80	1,87	0,21	18%
	0,5	24	1,02	0,66	1,23	0,12	12%
	2	24	1,02	0,75	1,40	0,16	16%
	0,5	48	1,12	0,73	1,39	0,15	13%
	2	48	1,11	0,50	1,82	0,22	20%
GADD45A	0,5	0,3	0,96	0,61	1,42	0,16	17%
	2	0,3	0,94	0,40	1,65	0,24	26%
	0,5	8	1,81	0,78	4,03	0,75	41%
	2	8	2,25	1,04	4,60	1,05	47%
	0,5	24	1,54	0,70	3,04	0,54	35%
	2	24	1,76	1,00	3,79	0,68	39%
	0,5	48	1,68	1,03	2,68	0,43	26%
	2	48	2,01	1,01	3,39	0,64	32%
PCNA	0,5	0,3	0,94	0,72	1,39	0,14	15%
	2	0,3	0,89	0,49	1,19	0,14	16%
	0,5	8	1,16	0,91	1,62	0,18	16%
	2	8	1,24	0,72	2,76	0,35	28%
	0,5	24	0,95	0,62	1,27	0,18	19%
	2	24	0,98	0,76	1,51	0,16	16%
	0,5	48	1,09	0,43	1,64	0,28	26%
	2	48	1,02	0,43	2,73	0,37	36%

Tabelle 4.3: Auswertung der differentiellen Genexpression aufgeschlüsselt nach Zielgen, Strahlendosis und Zeitpunkt der Messung nach Bestrahlung. (D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h, $\bar{\phi}$ = Mittelwert, Max = Maximum, Min = Minimum, SD = Standardabweichung, C_v = Variationskoeffizient).

Die höchsten Einzelwerte für die differentielle Genexpression fanden sich mit 8,8 bei ATF3, mit 6,1 bei CDKN1A und mit 4,6 bei GADD45A. Auch im Durchschnitt aller Probanden waren die Werte bei diesen Genen am höchsten. Allerdings lagen sie mit 2,0 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung bei ATF3, mit 1,6 bei CDKN1A zum gleichen Zeitpunkt und mit 2,3 bei GADD45A nach 8 Stunden deutlich unter den Erwartungen. In Tabelle 4.3 sind für alle Zielgene die minimalen, maximalen und durchschnittlichen Werte der differentiellen Genexpression sowie die jeweilige Standardabweichung und der dazugehörige Variationskoeffizient aufgeführt. Die interindividuellen Schwankungen waren deutlich geringer als bei der normalisierten Genexpression, so dass der C_v lediglich bei ATF3 und CDKN1A auf Werte von über 50 % stieg. Wie schon im vorhergehenden Kapitel wurde Proband 10 bei der statistischen Bewertung nicht berücksichtigt. Vergleicht man dessen Werte, die wie die Ergebnisse aller anderen Probanden in Anhang 8.4 verzeichnet sind, mit den durchschnittlichen Ergebnissen der Tabelle 4.3, so fanden sich keine besonderen Abweichungen. Lediglich nach 48 Stunden war bei ATF3, CDKN1A und PCNA die differentielle Genexpression bei beiden Strahlendosen teilweise über den Werten der übrigen Probanden. Bei allen anderen Werten lagen die Ergebnisse innerhalb oder nur knapp außerhalb des Bereichs der Standardabweichung.

Insgesamt waren in 10 von 1440 Fällen nach Bestrahlung einzelne Gene herunter reguliert. Dies war fünfmal bei ATF3, je einmal bei DDB2 und GADD45A sowie dreimal bei PCNA der Fall. Eine Hochregulation zeigte sich in 123 Fällen und zwar 37-mal bei ATF3, 29-mal bei CDKN1A, 55-mal bei GADD45A und zweimal bei PCNA. Die meisten Hochregulationen fanden sich bei GADD45A bei einer Strahlendosis von 2 Gy und 48 Stunden nach Bestrahlung. Hier waren bei 16 der 30 Probanden die Werte für die differentielle Genexpression über dem oberen Grenzwert von 2, was einer Sensitivität des Verfahrens von 53,33 % entsprach. Die höchste Sensitivität für ATF3 wurde mit 36,66 % nach 24 Stunden und für CDKN1A mit 26,66 % nach 48 Stunden, jeweils nach einer Bestrahlung mit 2 Gy, erzielt. Eine genaue Aufschlüsselung zeigen die folgenden Tabellen.

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	#	%	PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	#	%	PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	#	%
ATF3	0,5	0,3	0	0	CDKN1A	0,5	0,3	0	0	GADD45A	0,5	0,3	0	0
	2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	1	3,33
	0,5	8	1	3,33		0,5	8	0	0		0,5	8	0	0
	2,0	8	0	0		2,0	8	0	0		2,0	8	0	0
	0,5	24	0	0		0,5	24	0	0		0,5	24	0	0
	2,0	24	0	0		2,0	24	0	0		2,0	24	0	0
	0,5	48	0	0		0,5	48	0	0		0,5	48	0	0
	2,0	48	4	13,33		2,0	48	0	0		2,0	48	0	0
BAX	0,5	0,3	0	0	DDB2	0,5	0,3	0	0	PCNA	0,5	0,3	0	0
	2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	0	0
	0,5	8	0	0		0,5	8	0	0		0,5	8	0	0
	2,0	8	0	0		2,0	8	0	0		2,0	8	0	0
	0,5	24	0	0		0,5	24	0	0		0,5	24	0	0
	2,0	24	0	0		2,0	24	0	0		2,0	24	0	0
	0,5	48	0	0		0,5	48	0	0		0,5	48	1	3,33
	2,0	48	0	0		2,0	48	1	3,33		2,0	48	1	3,33

Tabelle 4.4: Übersicht der herunterregulierten Gene. (D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h, # = Anzahl der Probanden, bei denen die Genexpression der jeweiligen Probe herunter reguliert war, % = relative Häufigkeit im Vergleich zur Gesamtzahl der Probanden.)

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	#	%	PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	#	%	PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	#	%
ATF3	0,5	0,3	0	0	CDKN1A	0,5	0,3	0	0	GADD45A	0,5	0,3	0	0
	2,0	0,3	1	3,33		2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	0	0
	0,5	8	3	9,99		0,5	8	2	6,66		0,5	8	6	20
	2,0	8	4	13,33		2,0	8	5	16,66		2,0	8	13	43,33
	0,5	24	10	33,33		0,5	24	6	20,00		0,5	24	5	16,66
	2,0	24	11	36,66		2,0	24	6	20,00		2,0	24	8	26,66
	0,5	48	3	9,99		0,5	48	2	6,66		0,5	48	7	23,33
	2,0	48	5	16,66		2,0	48	8	26,66		2,0	48	16	53,33
BAX	0,5	0,3	0	0	DDB2	0,5	0,3	0	0	PCNA	0,5	0,3	0	0
	2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	0	0		2,0	0,3	0	0
	0,5	8	0	0		0,5	8	0	0		0,5	8	0	0
	2,0	8	0	0		2,0	8	0	0		2,0	8	1	3,33
	0,5	24	0	0		0,5	24	0	0		0,5	24	0	0
	2,0	24	0	0		2,0	24	0	0		2,0	24	0	0
	0,5	48	0	0		0,5	48	0	0		0,5	48	0	0
	2,0	48	0	0		2,0	48	0	0		2,0	48	1	3,33

Tabelle 4.5: Übersicht der hochregulierten Gene. (D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h, # = Anzahl der Probanden, bei denen die Genexpression der jeweiligen Probe hoch reguliert war, % = relative Häufigkeit im Vergleich zur Gesamtzahl der Probanden.)

In der folgenden Abbildung ist der zeitliche Verlauf der differentiellen Genexpression dargestellt. Die grafische Darstellung erfolgte logarithmisch, um eine Verdoppelung und eine Halbierung der Genexpression proportional darstellen zu können.

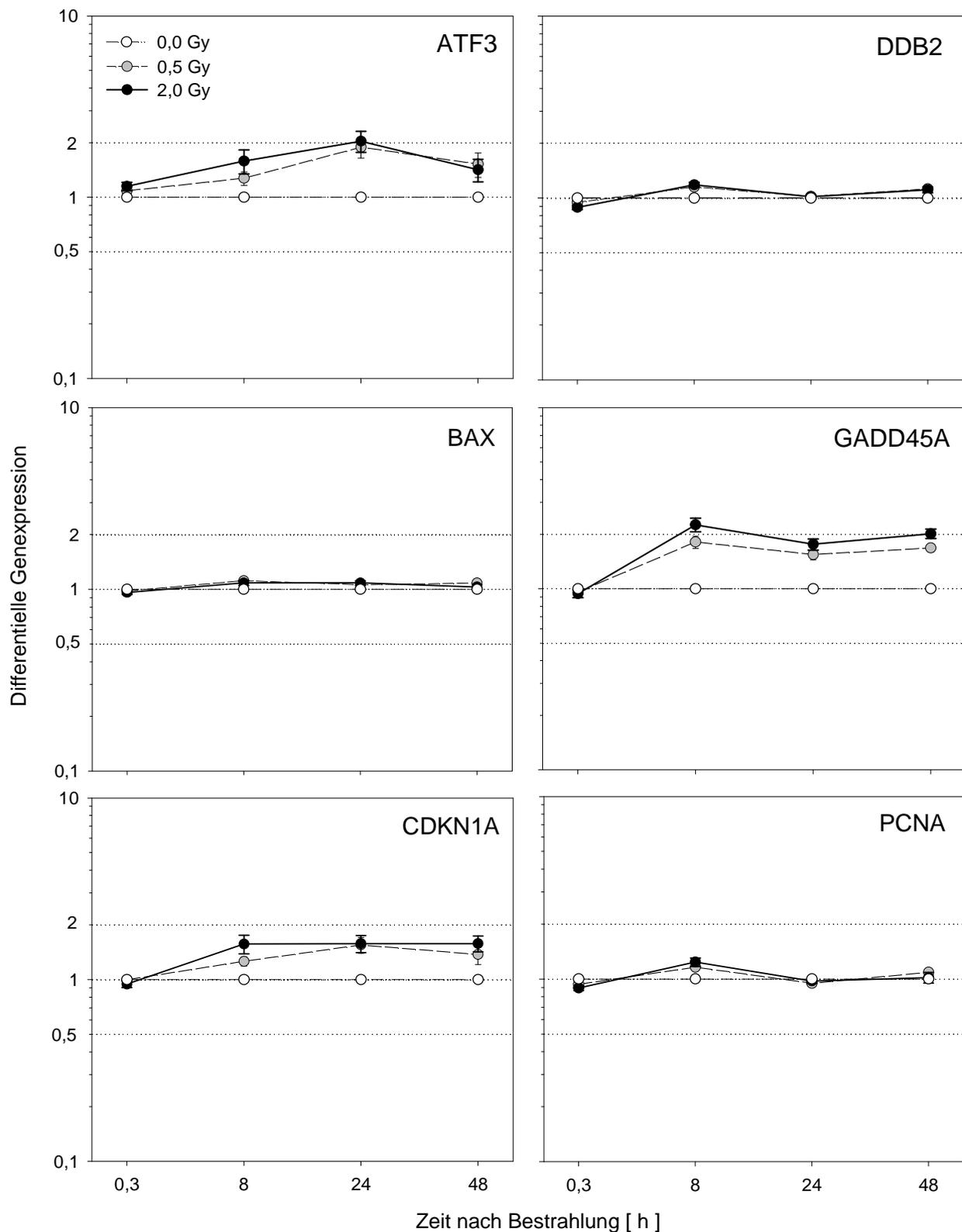


Abb. 4.4: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der differentiellen Genexpression. Aufgezeigt sind die durchschnittlichen Werte aller Probanden sowie der jeweilige Standardfehler. Die gepunkteten Linien in Höhe von 0,5 und 2 markieren die Grenzen des sogenannten Vertrauensbereichs. Das Überschreiten des Grenzwertes ist als Hochregulation, das Unterschreiten als Herunterregulation definiert. Bei ATF3, CDKN1A und GADD45A erkennt man bis 8 bzw. 24 h nach Bestrahlung einen Anstieg der Expression. Die übrigen Gene bleiben nahezu unverändert.

In Abbildung 4.4 wurde die differentielle Genexpressionsänderung im zeitlichen Verlauf, getrennt für Strahlendosen von 0,5 Gy und 2,0 Gy, dargestellt. Bei CDKN1A und GADD45A konnte ein deutlicher Anstieg der Expression bis 8 Stunden nach Bestrahlung mit anschließend relativ konstantem Verlauf beobachtet werden. Bei ATF3 erreichten die Werte ihr Maximum erst nach 24 Stunden und fielen danach wieder deutlich ab. Nur bei GADD45A lagen die Werte der mit 2 Gy bestrahlten Proben über denen, die einer Dosis von 0,5 Gy ausgesetzt waren. Darüber hinaus konnte man erkennen, dass bei allen drei genannten Genen die Durchschnittswerte nur teilweise oberhalb des Grenzwertes von 2 für eine Hochregulation der Gene lagen. Bei BAX, DDB2 und PCNA blieb die differentielle Genexpression nahezu konstant bei einem Wert von 1. Bei keinem Gen, weder bei einer Strahlendosis von 0,5 Gy noch von 2 Gy, war die Expression bereits nach 20 Minuten wesentlich verändert.

Die gleichen Beobachtungen waren aus Abbildung 4.5 auf der folgenden Seite ableitbar, in der die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der verschiedenen Gene dargestellt wurden. Nur bei GADD45A fand sich bei den durchschnittlichen Werten eine gewisse Dosisabhängigkeit, da hier die differentielle Genexpression bei einer Erhöhung der Strahlendosis von 0 über 0,5 bis 2 Gy kontinuierlich anstieg. Bei ATF3 und CDKN1A ließen sich zumindest die bestrahlten von den unbestrahlten Proben unterscheiden, wenngleich eine Differenzierung nach der Höhe der Strahlendosis nicht möglich war. BAX, DDB2 und PCNA ließen keine Beurteilung der Strahlenexposition zu.

GADD45A zeigte in dieser Versuchsreihe von allen Genen die höchsten Werte für die differentielle Genexpression. Dies lag vor allem daran, dass durch den im Kapitel 4.2.2 beschriebenen, konstanten Verlauf der Höhe der normalisierten Genexpression bei den Kontrollwerten eine deutlich größere Differenz zu den Werten der bestrahlten Proben bestand. Da dies bei ATF3 und CDKN1A nicht der Fall war, fiel hier die differentielle Genexpression niedriger aus. Umgekehrt führten die gleichermaßen fallenden Werte der normalisierten Genexpression der Kontroll- wie der bestrahlten Gruppen bei BAX, DDB2 und PCNA dazu, dass diese Gene bei der Berechnung der differentiellen Genexpression nicht als herunterreguliert eingestuft wurden.

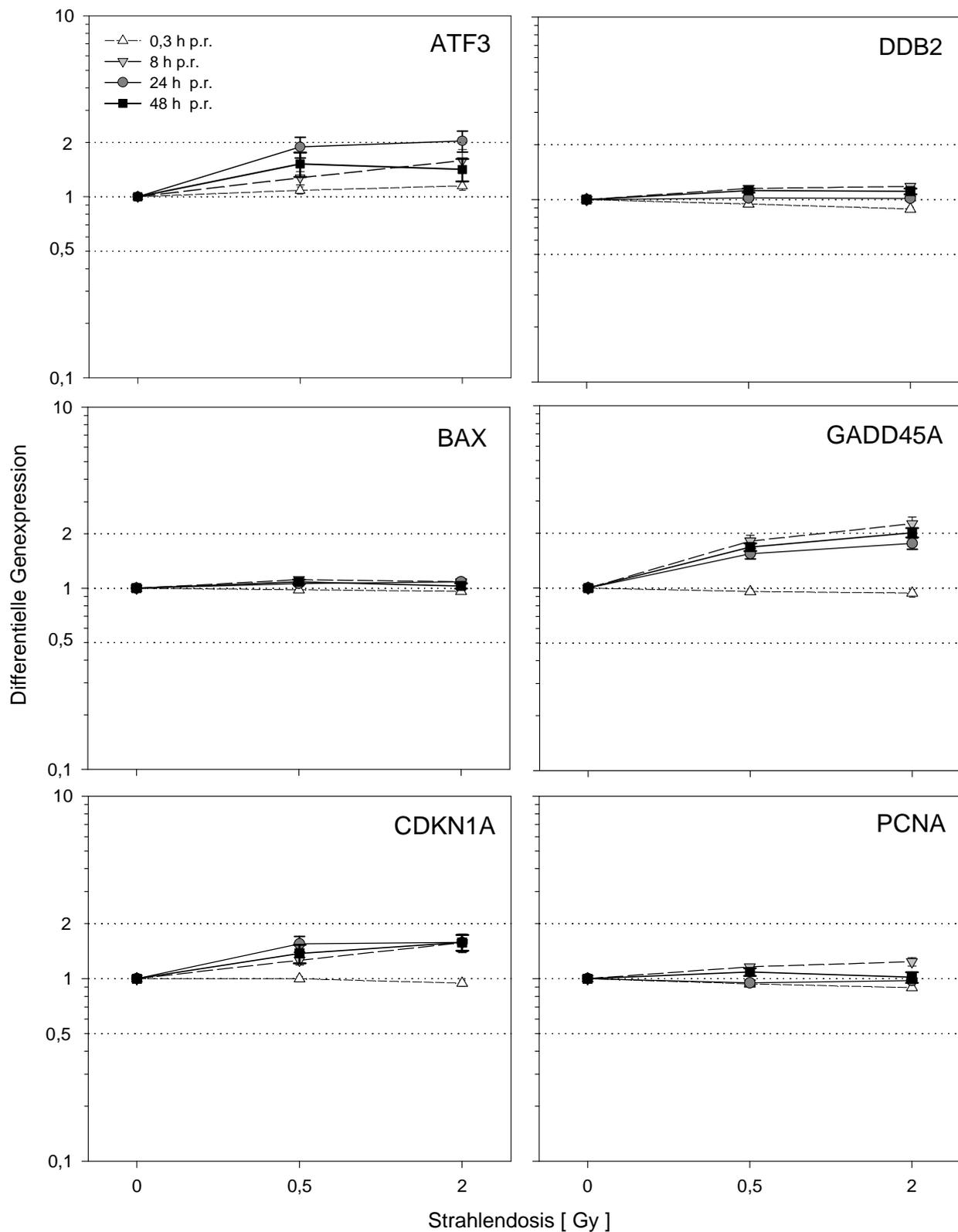


Abb. 4.5: Darstellung der Veränderung der differentiellen Genexpression gegen die Strahlendosis. Aufgezeigt sind die durchschnittlichen Werte aller Probanden sowie der Standardfehler. Die gepunkteten Linien in Höhe von 0,5 und 2 markieren die Grenzen des sogenannten Vertrauensbereichs. Liegen die Werte darüber, spricht man von Hochregulation, liegen sie darunter, von Herunterregulation. Vor allem bei GADD45A lässt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen.

4.2.4 Kolinearität zwischen den Zielgenen

Bei der grafischen Auswertung der normalisierten Genexpression fiel auf, dass sich die Kurvenverläufe bei einzelnen Genen trotz unterschiedlicher Expressionsniveaus ähnelten. So stieg die normalisierte Genexpression nach Bestrahlung bei ATF3, CDKN1A und GADD45A zunächst gemeinsam an. Dagegen fielen die Werte der anderen Gene mehr oder weniger einheitlich stark ab. Dies legte den Schluss nahe, dass sich die Expression einzelner Gene gegenseitig beeinflussen könnten, zumindest diese aber durch gleiche oder ähnliche Faktoren reguliert werden. Mittels der Berechnung des Korrelationskoeffizienten (R) konnte eine eventuell vorhandene Kolinearität zwischen jeweils zwei Genen zu jedem der vier untersuchten Zeitpunkte nach Bestrahlung verifiziert werden. Hierzu wurden die Werte für die normalisierte Genexpression jedes Probanden von jedem Zielgen mit denen der jeweils anderen Gene zum selben Zeitpunkt und bei der gleichen Strahlendosis zueinander in Bezug gesetzt. Somit ergaben sich für jedes Genpaar 360 Einzelwerte: Für jeden der vier untersuchten Zeitpunkte wurden 90 Wertpaare, nämlich die Werte der 30 nicht bestrahlten Kontrollen und je 30 Werte der mit 0,5 Gy und 2 Gy bestrahlten Proben, verglichen.

Die Werte der normalisierte Genexpression der einzelnen Gene korrelierten sehr unterschiedlich miteinander. Tatsächlich fanden sich zwischen ATF3 und CDKN1A zu allen Messzeitpunkten Korrelationswerte zwischen 91,3 % und 97,7 %. Auch bei anderen Genpaaren fanden sich teilweise vergleichbar hohe Korrelationswerte, allerdings nicht durchgängig zu allen Zeitpunkten. Die geringsten Wechselbeziehungen fanden sich 24 Stunden nach der Bestrahlung mit einem R von unter 10 % zwischen PCNA auf der einen und ATF3, CDKN1A und GADD45A auf der anderen Seite. Insgesamt lagen die Korrelationskoeffizienten bei Genen mit vergleichbarem Expressionsverhalten nach 24 Stunden zwischen 56,1 % und 91,8 %. Die Werte bei Genen mit unterschiedlichen Tendenzen korrelierten zum gleichen Zeitpunkt hingegen lediglich zu 1,1% bis 51,3 % miteinander. Bei den anderen Zeitpunkten fanden sich ähnliche, aber nicht so deutlich ausgeprägte Unterschiede. In Tabelle 4.6 wurden alle Korrelationswerte, aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen Zeitpunkten, in einer Korrelationsmatrix zusammengefasst und in Anhang 8.5 diese Ergebnisse grafisch dargestellt.

0,3 h	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
ATF3	R = 100%	R = 59,4% p < 0,0001	R = 93,9% p < 0,0001	R = 37,8% p = 0,0002	R = 18,8% p = 0,076	R = 25,4% p = 0,016
BAX	R = 59,4% p < 0,0001	R = 100%	R = 68,8% p < 0,0001	R = 79,4% p < 0,0001	R = 49,6% p < 0,0001	R = 73,7% p < 0,0001
CDKN1A	R = 93,9% p < 0,0001	R = 68,8% p < 0,0001	R = 100%	R = 51,1% p < 0,0001	R = 26,6% p = 0,011	R = 35,9% p = 0,001
DDB2	R = 37,8% p = 0,0002	R = 79,4% p < 0,0001	R = 51,1% p < 0,0001	R = 100%	R = 50,1% p < 0,0001	R = 82,9% p < 0,0001
GADD45A	R = 18,8% p = 0,076	R = 49,6% p < 0,0001	R = 26,6% p = 0,011	R = 50,1% p < 0,0001	R = 100%	R = 57,9% p < 0,0001
PCNA	R = 25,4% p = 0,016	R = 73,7% p < 0,0001	R = 35,9% p = 0,0005	R = 82,9% p < 0,0001	R = 57,9% p < 0,0001	R = 100%

8 h	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
ATF3	R = 100%	R = 65,8% p < 0,0001	R = 97,7% p < 0,0001	R = 50,6% p < 0,0001	R = 69,7% p < 0,0001	R = 37,4% p = 0,0003
BAX	R = 65,8% p < 0,0001	R = 100%	R = 62,3% p < 0,0001	R = 74,5% p < 0,0001	R = 58,9% p < 0,0001	R = 68,5% p < 0,0001
CDKN1A	R = 97,7% p < 0,0001	R = 62,3% p < 0,0001	R = 100%	R = 46,2% p < 0,0001	R = 69,3% p < 0,0001	R = 50,2% p < 0,0001
DDB2	R = 50,6% p < 0,0001	R = 74,5% p < 0,0001	R = 46,2% p < 0,0001	R = 100%	R = 33,0% p = 0,002	R = 78,8% p < 0,0001
GADD45A	R = 69,7% p < 0,0001	R = 58,9% p < 0,0001	R = 69,3% p < 0,0001	R = 50,2% p < 0,0001	R = 100%	R = 50,5% p < 0,0001
PCNA	R = 37,4% p = 0,0003	R = 68,5% p < 0,0001	R = 33,0% p = 0,002	R = 78,8% p < 0,0001	R = 50,5% p < 0,0001	R = 100%

24 h	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
ATF3	R = 100%	R = 51,3% p < 0,0001	R = 91,8% p < 0,0001	R = 24,3% p = 0,021	R = 84,6% p < 0,0001	R = 9,2% p = 0,390
BAX	R = 51,3% p < 0,0001	R = 100%	R = 45,8% p < 0,0001	R = 82,5% p < 0,0001	R = 50,7% p < 0,0001	R = 56,1% p < 0,0001
CDKN1A	R = 91,8% p < 0,0001	R = 45,8% p < 0,0001	R = 100%	R = 25,2% p = 0,017	R = 81,1% p < 0,0001	R = 3,9% p = 0,717
DDB2	R = 24,3% p = 0,021	R = 82,5% p < 0,0001	R = 25,2% p = 0,017	R = 100%	R = 29,4% p = 0,005	R = 72,5% p < 0,0001
GADD45A	R = 84,6% p < 0,0001	R = 50,7% p < 0,0001	R = 81,1% p < 0,0001	R = 29,4% p = 0,005	R = 100%	R = 1,1% p = 0,916
PCNA	R = 9,2% p = 0,390	R = 56,1% p < 0,0001	R = 3,9% p = 0,717	R = 72,5% p < 0,0001	R = 1,1% p = 0,916	R = 100%

48 h	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
ATF3	R = 100%	R = 26,6% p = 0,011	R = 91,3% p < 0,0001	R = 10,6% p = 0,320	R = 89,7% p < 0,0001	R = 30,3% p = 0,004
BAX	R = 26,6% p = 0,011	R = 100%	R = 27,1% p = 0,010	R = 75,7% p < 0,0001	R = 28,1% p = 0,007	R = 50,4% p < 0,0001
CDKN1A	R = 91,3% p < 0,0001	R = 27,1% p = 0,010	R = 100%	R = 19,6% p = 0,064	R = 83,9% p < 0,0001	R = 27,6% p = 0,009
DDB2	R = 10,6% p = 0,320	R = 75,7% p < 0,0001	R = 19,6% p = 0,064	R = 100%	R = 15,7% p = 0,141	R = 40,3% p < 0,0001
GADD45A	R = 89,7% p < 0,0001	R = 28,1% p = 0,007	R = 83,9% p < 0,0001	R = 15,7% p = 0,141	R = 100%	R = 25,1% p = 0,017
PCNA	R = 30,3% p = 0,004	R = 50,4% p < 0,0001	R = 27,6% p = 0,009	R = 40,3% p < 0,0001	R = 25,1% p = 0,017	R = 100%

Tabelle 4.6: Korrelationsmatrix der normalisierten Genexpression der sechs Zielgene, aufgeschlüsselt nach den Zeitpunkten 0,3 h, 8 h, 24 h und 48 h nach Bestrahlung. R ist der Korrelationskoeffizient, p ist die Überschreitungswahrscheinlichkeit. Alle Werte über 90% sind in Fettdruck hinterlegt.

4.3 Einfluss der Bestrahlung auf die Höhe der Genexpression

Bereits in Kapitel 4.1.3 konnte mittels Auswertung der grafischen Verläufe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für einige der Zielgene vermutet werden. Im Folgenden wurde untersucht, wie groß der tatsächliche Einfluss der Bestrahlung auf Höhe der Genexpression ist. Hierfür wurde mittels eines univariaten linearen Regressionsmodells die Beziehung der normalisierten Genexpression jedes einzelnen Zielgenes zur Strahlendosis untersucht und daraus der Variabilitätskoeffizienten (R^2) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 und in Anhang 8.6 dargestellt.

t p.r. [h]	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
0,3h	0,0%	0,2%	0,4%	2,0%	2,1%	3,6%
8h	2,1%	0,4%	2,5%	4,1%	15,9%	8,4%
24h	1,7%	0,9%	0,5%	0,0%	4,2%	0,1%
48h	0,0%	0,0%	0,9%	1,1%	3,3%	0,5%

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Berechnung des Variabilitätskoeffizienten (R^2) in % für die Dosis-Wirkungs-Beziehung mittels eines univariaten linearen Regressionsmodells aufgeschlüsselt nach Zielgenen und Zeitpunkt nach Bestrahlung. Der einzige Wert über 10%, R^2 von GADD45A nach 8 Stunden, ist in Fettdruck hinterlegt.

Aus R^2 ließen sich Aussagen ableiten, in welchem Umfang die gemessene Variabilität der normalisierten Genexpression durch die Strahlendosis erklärt werden konnte. Das größte R^2 fand sich bei GADD45A 8 Stunden nach Bestrahlung. Somit begründete das Ausmaß der ionisierenden Bestrahlung in diesem Fall zu 15,9 % die Höhe der normalisierten Genexpression. Die übrigen Werte, auch die der anderen Gene, lagen teilweise deutlich darunter. Aus dieser Erkenntnis stellte sich die Frage, welche Faktoren neben der Strahlendosis einen Einfluss auf die normalisierte Genexpression hätten haben können.

Um zu untersuchen, ob eventuell die Verknüpfung mehrerer Gene zu aussagekräftigere Ergebnissen hätte führen können, wurden durch weitere Mitarbeiter dieser Arbeitsgruppe multivariate Analysen durchgeführt. Es fand hierbei der sogenannte „Max R-Square Improvement“-Algorithmus Anwendung. Dieser kombinierte aus allen zur Verfügung gestellten Variablen jeweils jene, die in einem uni-, bi- oder trivariaten Modell die zugrundeliegende Variabilität am besten erklären konnten. Durch die gleichzeitige Betrachtung des „Variance Inflation Factor“ (VIF) wurde ein Maß der Kollinearität der erklärenden Variablen des Modells ermittelt. Ein Wert von über 10 wäre ein Hinweis darauf, dass sich die im Modell befindlichen Variablen quasi selbst erklärt hätten und damit redun-

dant waren. In Folge dessen wäre, gemäß dem Prinzip der sogenannten Sparsamkeit folgend, dem Modell mit der geringeren Anzahl an Variablen der Vorzug gegeben worden. Im Folgenden wurden die Werte der normalisierten Genexpression einzelner Gene in einem multivariaten Regressionsmodell kombiniert. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

0,3 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
PCNA	-0,02	0,0722	1,0	-0,03	0,0299	2,2	-0,04	0,0159	2,4
BAX				0,00	0,1903	2,2	0,01	0,0820	4,0
CDKN1A							-0,01	0,2486	2,1
ATF3									
GADD45A									
DDB2									
R ²		3,6%			5,5%			7,0%	

8 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
GADD45A	0,04	<0,0001	1,0	0,05	<0,0001	1,5	0,05	<0,0001	1,6
BAX				-0,01	0,0304	1,5	-0,01	0,0007	2,2
PCNA							0,04	0,0050	1,9
DDB2									
CDKN1A									
ATF3									
R ²		15,9%			20,4%			27,4%	

24 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
GADD45A	0,02	0,0536	1,0	0,04	0,0156	2,9			
CDKN1A				-0,00	0,1096	2,9			
ATF3									
BAX									
DDB2									
PCNA									
R ²		4,2%			7,0%				

48 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
GADD45A	0,02	0,0892	1,0	0,08	<0,0001	5,1	0,08	<0,0001	5,2
ATF3				-0,01	0,0002	5,1	-0,01	<0,0001	9,2
CDKN1A							0,01	0,0415	6,1
BAX									
DDB2									
PCNA									
R ²		3,3%			17,8%			21,7%	

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der Ergebnisse der „Max R-Square Improvement“-Analyse durch Kombination einzelner Gene auf Grundlage multivariater linearer Regressionsmodelle. 24 h nach Bestrahlung brachte das trivariate Modell im Vergleich zum bivariaten keine Erhöhung von R², so dass die Statistik-Software SAS diesen Wert nicht darstellte. (VIF = „Variance inflation factor“)

Zum Zeitpunkt 20 Minuten nach Bestrahlung konnte R^2 des univariaten Modells, welches mit PCNA bei 3,6 % lag, durch die Kombination mit BAX auf 5,5 % gesteigert werden. Erweiterte man die Analyse zu einem trivariaten Modell unter Hinzunahme von CDKN1A, ließ sich die Variabilität der Expression dieser drei Gene zu 7,0 % durch die Strahlendosis erklären. Der VIF betrug hierbei maximal 4,0 und lag somit unter dem zu berücksichtigenden Grenzwert von 10. Insgesamt fanden sich die höchsten Werte für R^2 8 Stunden nach Bestrahlung: War R^2 für GADD45A im univariaten Modell noch bei 15,9 %, so erhöhte er sich mittels der Verknüpfung mit BAX auf 20,4 % und mit PCNA auf 27,4 %. Nach 24 Stunden erhöhte sich R^2 mit GADD45A alleine von 4,2 % auf 7,0 % bei der Kombination von GADD45A mit CDKN1A. Eine Erweiterung um ATF3 erbrachte keine zusätzliche Erhöhung des Variabilitätskoeffizienten, so dass zu diesem Zeitpunkt das bivariate Regressionsmodell die bestmögliche Erklärung der Variabilität erzielte. Die größte Steigerung von R^2 fand sich nach 48 Stunden, wo sich der Wert sich von 3,3 % auf 17,8 % erhöhte, indem man die normalisierten Genexpressionen von GADD45A und ATF3 kombinierte. Im trivariaten Modell mit CDKN1A stieg der Wert nochmals auf 21,7 % an, wobei sich hier mit einem VIF von 9,23 für ATF3 eine gewisse Redundanz abzeichnete. Diese spiegelte sich auch in der hohen Kolinearität der drei Gene, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, wieder. Zu diesem Zeitpunkt lag die Korrelation zwischen ATF3 und CDKN1A, der Tabelle 4.6 zu entnehmen, bei 91,3 % und zwischen ATF3 und GADD45A bei 89,7 %.

Insgesamt ließ sich feststellen, dass sich durch die Kombination mit anderen Genen die Werte für R^2 auch von GADD45A in multivariaten Modellen steigern ließ, obwohl die anderen Gene für sich genommen in den univariaten Modellen, wie in Tabelle 4.7 ersichtlich, in einem deutlich geringeren Maße den Einfluss der Strahlendosis auf die Variabilität der normalisierten Genexpression hatten erklären können. Trotzdem blieben auch die Ergebnisse der multivariaten Regressionsmodelle hinter den Erwartungen zurück. Im folgenden Kapiteln wurden aus diesem Grund nach weiteren Einflussfaktoren auf die Genexpression gesucht, die eventuell in der Lage waren, die vorliegende Variabilität der Genexpression nach einer Bestrahlung erklären zu können.

4.4 Bedeutung nicht-strahlenbedingter Variablen

Im vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass sich die Variabilität der normalisierten Genexpression mittels eines univariaten linearen Regressionsmodells nur zu maximal 15,9 % durch die Strahlendosis erklären ließ. Im Folgenden wurde mit Hilfe uni- und multivariater Regressionsmodelle untersucht, in wie weit andere Faktoren als die Strahlendosis eine Erklärung für die Variabilität der normalisierten Genexpression geben konnten. Die Höhe der normalisierten Genexpression wurde hierbei als abhängige, die übrigen in Tabelle 4.9 aufgelisteten Parameter als unabhängige Variablen definiert.

Unabhängige Variablen	Abhängige Variablen
Zeitintervall nach Bestrahlung	Norm. Genexpression von ATF3
Alter	Norm. Genexpression von BAX
Geschlecht	Norm. Genexpression von CDKN1A
Anzahl der Leukozyten*	Norm. Genexpression von DBB2
Absolute Anzahl der neutro. Granulozyten*	Norm. Genexpression von GADD45A
Absolute Anzahl der eosino. Granulozyten*	Norm. Genexpression von PCNA
Absolute Anzahl der baso. Granulozyten*	
Absolute Anzahl der Lymphozyten*	
Absolute Anzahl der Monozyten*	
Relative Anzahl der neutro. Granulozyten*	
Relative Anzahl der eosino. Granulozyten*	
Relative Anzahl der baso. Granulozyten*	
Relative Anzahl der Lymphozyten*	
Relative Anzahl der Monozyten*	

Tabelle 4.9: Auflistung der Variablen für lineare Regressionsmodelle: links die unabhängigen und rechts die abhängigen Variablen. * im peripheren Vollblut nach Blutentnahme. (neutro. = neutrophil, eosino. = eosinophil, baso. = basophil, norm. = normalisiert.)

4.4.1 Auswirkungen der Inkubationszeit und des In-vitro-Modells

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, veränderte sich die normalisierte Genexpression im zeitlichen Verlauf, teilweise auch bei den unbestrahlten Kontrollproben. Dies legte den Schluss nahe, dass die Inkubationszeit aufgrund der sich im zeitlichen Verlauf verändernden zellulären Aktivitäten im In-vitro-Modell einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Expression von einigen Genen hät-

te haben können. Als Ausgangspunkt zur Berechnung des Variabilitätskoeffizienten wurde ein univariates lineares Regressionsmodell angenommen, wobei in diesem Fall die Inkubationszeit als unabhängige Variable verwendet wurde. Die Ergebnisse wurden in folgender Tabelle zusammengefasst.

D [Gy]	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
0	7,3%	28,7%	0,2%	20,2%	0,4%	54,9%
0,5	10,7%	26,8%	0,3%	16,0%	0,2%	53,1%
2	6,8%	23,6%	0,1%	10,6%	0,2%	50,3%

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Berechnung des Variabilitätskoeffizienten (R^2) in % mittels eines univariaten linearen Regressionsmodells mit der Inkubationszeit als unabhängige Variable, aufgeschlüsselt nach Zielgenen und Dosis. Alle Werte über 10% sind in Fettdruck hinterlegt.

Das höchste R^2 fand sich bei PCNA mit Werten zwischen 50,3 % und 54,9 %. Damit ließ sich die Variabilität der Höhe der normalisierten Genexpression bei diesem Gen zu über 50 % durch die Inkubationszeit erklären. Auch bei BAX und DDB2 zeigte sich ein deutlicher sowie bei ATF3 ein mäßiger Einfluss des zeitlichen Verlaufs auf deren Expressionsverhalten. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der Beobachtungen aus Kapitel 4.2.2, bei denen Veränderungen der normalisierten Genexpression auch bei den unbestrahlten Kontrollen während der Lagerungsdauer beobachtet wurde. Eine grafische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 4.10 findet sich in Anhang 8.7. Somit kann eine Beeinflussung der Expression durch die Kultivierungsbedingungen im Sinne einer Dämpfung für zumindest bei drei der genannten Gene im modifizierten In-vitro-Modell angenommen werden.

4.4.2 Einfluss der demographischen Parameter und des differentiellen Blutbildes

Neben der Inkubationszeit kamen in diesem Versuchsmodell noch weitere Faktoren in Betracht, die einen Einfluss auf die Höhe der normalisierten Genexpression hätten ausüben können. Im Einzelnen wurden das Alter und das Geschlecht der Probanden sowie verschiedene Parameter aus der Analyse des differentiellen Blutbildes berücksichtigt. Diese waren die Gesamtzahl der Leukozyten sowie die absolute und relative Anzahl der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, wie auch der Lymphozyten und der Monozyten. Zunächst wurde wieder ein univariates lineares Regressionsmodell als Ausgangspunkt zur Berechnung des Variabilitätskoeffizienten angenommen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 4.11 aufgeführt.

Variable	t p.r. [h]	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
Alter	0,3	12,0%	17,2%	13,2%	2,0%	0,6%	0,7%
	8	5,1%	7,2%	4,2%	0,1%	0,7%	0,4%
	24	10,3%	13,9%	5,6%	1,4%	2,9%	0,0%
	48	7,3%	9,3%	1,0%	3,8%	2,3%	0,3%
Geschlecht	0,3	2,7%	0,1%	2,8%	0,3%	2,4%	1,4%
	8	1,8%	0,0%	0,9%	0,0%	0,1%	0,1%
	24	3,4%	9,7%	2,3%	9,6%	2,0%	5,9%
	48	4,1%	4,8%	2,4%	5,3%	4,5%	4,1%
# Leukos	0,3	1,3%	0,7%	0,1%	1,7%	0,5%	2,5%
	8	0,1%	0,1%	0,0%	0,9%	0,7%	9,1%
	24	0,5%	5,2%	0,0%	7,2%	0,2%	1,5%
	48	1,5%	6,2%	0,3%	3,9%	1,7%	0,2%
# Neutros	0,3	0,0%	1,3%	0,8%	4,4%	1,5%	3,5%
	8	0,5%	0,8%	0,6%	2,2%	4,1%	10,3%
	24	0,3%	3,4%	0,9%	5,0%	0,5%	1,8%
	48	0,0%	10,5%	0,5%	7,2%	0,2%	2,4%
% Neutros	0,3	4,6%	2,6%	9,2%	9,4%	3,0%	5,1%
	8	6,6%	2,6%	5,4%	3,6%	12,2%	6,2%
	24	7,3%	0,3%	8,2%	1,0%	6,7%	2,0%
	48	4,5%	13,0%	8,9%	11,7%	2,3%	8,7%
# Eos	0,3	1,8%	1,7%	1,3%	1,5%	1,5%	1,2%
	8	2,0%	0,4%	1,6%	0,1%	0,4%	0,4%
	24	2,1%	0,4%	2,4%	0,3%	2,4%	1,1%
	48	1,6%	0,1%	1,6%	1,0%	1,5%	0,0%
% Eos	0,3	2,6%	2,3%	3,0%	1,7%	1,3%	1,4%
	8	4,5%	1,0%	4,1%	0,2%	1,5%	0,0%
	24	4,6%	0,0%	5,4%	0,0%	4,6%	0,1%
	48	2,6%	2,6%	3,0%	4,4%	1,7%	1,3%
# Basos	0,3	0,9%	1,0%	0,1%	0,8%	0,9%	2,2%
	8	0,0%	2,1%	0,0%	5,9%	0,1%	7,5%
	24	0,4%	4,2%	0,2%	7,7%	0,0%	9,1%
	48	0,7%	9,0%	0,3%	6,7%	0,8%	4,7%
% Basos	0,3	1,9%	0,0%	0,1%	0,0%	0,7%	0,0%
	8	0,0%	0,6%	0,0%	2,8%	0,6%	0,0%
	24	0,1%	0,1%	0,3%	0,3%	0,0%	4,4%
	48	0,0%	1,9%	0,1%	1,5%	0,0%	3,3%
# Lymphos	0,3	13,3%	0,8%	14,8%	3,0%	1,2%	0,0%
	8	9,9%	4,1%	7,2%	4,5%	8,6%	0,0%
	24	14,8%	9,3%	12,4%	9,3%	12,3%	0,1%
	48	13,8%	0,0%	16,0%	0,0%	11,4%	6,4%
% Lymphos	0,3	7,8%	5,1%	13,8%	11,6%	4,1%	6,4%
	8	9,9%	5,6%	7,8%	7,7%	14,3%	8,8%
	24	11,0%	0,4%	12,0%	0,0%	10,6%	0,8%
	48	7,7%	6,9%	13,5%	5,7%	5,4%	8,1%
# Monos	0,3	7,8%	20,8%	12,1%	15,2%	5,7%	13,9%
	8	13,8%	16,0%	11,4%	17,2%	5,8%	19,8%
	24	10,5%	7,1%	15,0%	1,6%	14,1%	2,9%
	48	6,4%	1,6%	12,2%	1,6%	10,0%	0,0%
% Monos	0,3	15,6%	13,4%	14,9%	6,4%	3,2%	2,9%
	8	14,7%	13,1%	11,5%	11,4%	2,7%	2,8%
	24	16,4%	27,4%	17,3%	18,5%	18,2%	9,6%
	48	14,3%	13,1%	15,7%	11,8%	19,0%	0,1%

Tabelle 4.11: Auflistung der Variabilitätskoeffizienten (R^2) der sechs Zielgene in %, aufgeschlüsselt nach dem jeweiligen Zeitpunkt nach Bestrahlung (t) und nach den demographischen Daten und Blutbildparametern. Alle Werte über 10% sind in Fettdruck hinterlegt. (# = absolute Anzahl, % = relative Anzahl, Leukos = Leukozyten, Neutros = Neutrophile Granulozyten, Eos = Eosinophile Granulozyten, Basos = Basophile Granulozyten, Lymphos = Lymphozyten, Monos = Monozyten.)

Der höchste Wert für R^2 fand sich für die relative Anzahl der Monozyten als unabhängige Variable 24 Stunden nach Bestrahlung bei BAX. Der Anteil der Monozyten am differentiellen Blutbild aus Vollblut, welches zum gleichen Zeitpunkt wie die Blutproben für die Genexpressionsanalyse abgenommen wurde, konnte demnach die Höhe der Variabilität der Expression dieses Gens zum genannten Zeitpunkt zu 27,4 % erklären. Ein ähnlich hoher Wert mit 20,8 % zeigte sich ebenfalls bei BAX für die absolute Anzahl der Monozyten 20 Minuten nach Bestrahlung. Das Alter der Probanden hat, den Ergebnissen der Tabelle 4.11 zufolge, zumindest bei ATF3, BAX und CDKN1A ebenfalls einen gewissen Einfluss auf die Höhe der normalisierten Genexpression. Weiterhin ergaben sich teilweise höhere Werte für R^2 sowohl bei der absoluten wie auch der relativen Anzahl der Lymphozyten. Bei den übrigen Blutbildparametern fanden sich fast durchgängig niedrige Werte, so dass diese vermutlich nur einen geringen Einfluss auf die Genexpression hatten. In Anhang 8.8 sind die einzelnen Variablen grafisch gegeneinander aufgetragen.

Im Weiteren wurde untersucht, ob die nicht-strahlenbedingten Faktoren die Höhe der normalisierten Genexpression, unabhängig von der Kultivierungszeit und somit von Effekten der In-vitro-Situation, beeinflusst haben könnten. Hierzu wurde der Variabilitätskoeffizient ausschließlich von den unbestrahlten Kontrollproben zum ersten Messzeitpunkt berechnet. Die abhängige Variable in diesem univariaten Modell war weiterhin die normalisierte Genexpression. Die unabhängigen Variablen wurden auf das Probandenalter sowie jeweils die absolute und relative Anzahl der Lymphozyten und Monozyten beschränkt. Diese Einflussfaktoren hatten in der Gesamtauswertung über alle Dosisbereiche zum Zeitpunkt 20 Minuten nach Bestrahlung in Tabelle 4.11 die höchsten Werte für R^2 gezeigt. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst und in Anhang 8.9 grafisch dargestellt.

Variable	ATF3	BAX	CDKN1A	DDB2	GADD45A	PCNA
Alter	11,0%	0,0%	10,3%	0,0%	1,0%	0,3%
# Lymphos	12,7%	1,1%	13,6%	3,4%	0,2%	0,0%
% Lymphos	7,6%	4,4%	13,2%	12,0%	3,0%	6,6%
# Monos	8,2%	16,9%	11,2%	11,1%	3,9%	10,6%
% Monos	15,8%	10,4%	13,5%	3,3%	0,0%	0,5%

Tabelle 4.12: Einfluss verschiedener unabhängiger Variablen auf die Höhe der normalisierten Genexpression der unbestrahlten Kontrollproben ungefähr 20 Minuten nach Blutentnahme. Dargestellt sind die Variabilitätskoeffizienten (R^2) der sechs Zielgene aufgeschlüsselt nach Probandenalter und Blutbildparametern. Alle Werte über 10% sind in Fettdruck hinterlegt. (# = absolute Anzahl, % = relative Anzahl, Lymphos = Lymphozyten, Monos = Monozyten.)

Es zeigte sich in dieser Auswertung, dass sich die interindividuellen Schwankungen in der Höhe der normalisierten Genexpression der unbestrahlten Blutproben teilweise durch das Probandenalter, vor allem aber durch die absolute Anzahl der Monozyten und Lymphozyten sowie deren relative Häufigkeit, begründen ließen. Das Alter konnte bei ATF3 und CDKN1A die Variabilität zu 11,0 % beziehungsweise zu 10,3 % erklären. Bei der absoluten Anzahl der Lymphozyten ergaben sich bei diesen Genen mit 12,7 % und 13,6 % die höchsten R^2 -Werte. Die relative Anzahl der Lymphozyten zeigte mit 13,2 % bei CDKN1A und mit 12,0 % bei DDB2 den größten Einfluss. Am deutlichsten war die absolute Anzahl der Monozyten im Blutbild in der Lage, die interindividuellen Schwankungen der normalisierten Genexpression in den unbestrahlten Blutproben zu erklären. Bis auf GADD45A lagen hier die Werte für R^2 zwischen 8,2 % und 16,9 %. Die relative Häufigkeit der Monozyten erklärte die Variabilität von ATF3, BAX und CDKN1A zu 15,8 %, 10,4 % beziehungsweise 13,5 %. Zusammengefasst ließ sich feststellen, dass die genannten Parameter einen Einfluss vor allem auf die Höhe der normalisierten Genexpression von ATF3 und CDKN1A in den unbestrahlten Blutproben haben. GADD45A blieb hingegen von ihnen unbeeinflusst. Somit scheinen, zumindest bei einigen Genen, nicht-strahlenbedingte Faktoren die Genexpression bereits mit dem Zeitpunkt der Blutentnahme beeinflusst zu haben.

Um zu untersuchen, ob sich eventuell durch die Kombination mehrerer Einflussfaktoren die Variabilität in der Höhe der normalisierten Genexpression nach Bestrahlung noch besser erklären lassen könnte, wurden multivariate Analysen nach dem „Max R-Square Improvement“ Verfahren, wie in Kapitel 4.3, durchgeführt. Im Folgenden wurde die Analyse wegen ihrer gegensätzlichen Beobachtungsverläufe auf GADD45A und PCNA beschränkt. GADD45A zeigte in der vorliegenden Arbeit das größte Potential für eine biodosimetrische Anwendung, da zum einen sich bei diesem Gen die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Strahlendosis mittels des univariaten linearen Regressionsmodells von allen sechs untersuchten Genen am besten erklären ließ. Zum anderen zeigten bei GADD45A die durch das In-vitro-Verfahren verursachten zellulären Aktivitätsänderungen, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, den geringsten Einfluss. Im Gegensatz hierzu erklärte bei PCNA die Inkubationszeit die Variabilität der normalisierten Genexpression zu über 50 %. Darüber hinaus lagen die Werte der differentiellen Genexpression durchschnittlich bei ungefähr 1, was auf eine geringe strahlenbedingte Beeinflussbarkeit zumindest in diesem Modell hinweist. Die Ergebnisse beider Regressionsanalysen finden sich in den Tabellen 4.13 und 4.14 auf den folgenden Seiten.

0,3 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
# Monos	4,36	0,0395	1,0	5,23	0,0161	1,1			
% Eos				-2,20	0,1031	1,1	-5,82	0,0026	2,2
Geschlecht							1,25	0,0149	1,3
# Basos							43,68	0,0046	2,1
% Lymphos									
% Neutros									
R ²	5,7%			9,1%			14,5%		

8 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
% Lymphos	-0,32	0,0008	1,0						
% Neutros				0,33	0,0003	1,1	0,33	0,0003	1,1
% Monos				0,95	0,0172	1,1	0,91	0,0232	1,1
Alter							-0,10	0,4160	1,0
% Basos									
# Monos									
R ²	14,3%			19,0%			19,7%		

24 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
% Monos	2,07	0,0001	1,0	2,54	<0,0001	1,1	2,42	<0,0001	1,1
% Neutros				0,42	0,0002	1,1	0,42	0,0002	1,1
Alter							-0,32	0,0322	1,0
% Lymphos									
% Basos									
# Monos									
R ²	18,2%			32,3%			36,5%		

48 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
% Monos	2,30	<0,0001	1,0	2,66	<0,0001	1,1	2,53	<0,0001	1,1
% Neutros				0,33	0,0100	1,1	0,32	0,0084	1,1
Alter							-0,34	0,0439	1,0
% Lymphos									
% Basos									
# Monos									
R ²	19,0%			26,2%			30,3%		

Tabelle 4.13: Zusammenfassung der Ergebnisse der „Max R-Square Improvement“-Analyse bei GADD45A durch Kombination einzelner unabhängiger Variablen auf Grundlage multivariater linearer Regressionsmodelle. (VIF = „Variance inflation factor“, # = absolute Anzahl, % = relative Anzahl, Neutros = Neutrophile Granulozyten, Basos = Basophile Granulozyten, Eos = Eosinophile Granulozyten, Lymphos = Lymphozyten, Monos = Monozyten.)

0,3 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
# Monos	28,46	0,0010	1,0	-151,48	0,0118	58,6	-190,82	0,0015	62,2
% Eos				-8,91	0,0776	1,1	-19,91	0,0018	1,8
# Basos							150,96	0,0058	2,0
% Monos									
# Leukos									
% Lymphos									
R ²	13,9%			28,4%			35,8%		

8 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
# Monos	28,1	<0,0001	1,0	25,95	0,0002	1,0	23,73	0,0012	1,2
% Neutros				0,13	0,1306	1,0	0,12	0,1833	1,1
# Basos							37,25	0,3111	1,2
% Eos									
% Monos									
# Leukos									
R ²	19,8%			22,4%			23,5%		

24 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
% Monos	0,87	0,0069	1,0	0,98	0,0020	1,0			
% Basos				-4,85	0,0183	1,0			
Geschlecht							2,16	0,0767	1,06
# Monos							12,89	0,0265	1,19
# Basos							-94,82	0,0017	1,17
% Neutros									
R ²	9,6%			16,4%			21,0%		

48 h p.r.	Bestes univariates Modell			Bestes bivariates Modell			Bestes trivariates Modell		
	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF	Schätzwert	p-Wert	VIF
% Neutros	-0,16	0,0101	1,0						
% Lymphos				0,20	0,0023	1,0	0,34	0,0011	2,7
Geschlecht				2,92	0,0077	1,0	3,47	0,0022	1,1
# Neutros							1,27	0,0793	2,6
# Monos									
% Eos									
R ²	8,7%			16,7%			20,3%		

Tabelle 4.14: Zusammenfassung der Ergebnisse der „Max R-Square Improvement“-Analyse bei PCNA durch Kombination einzelner unabhängiger Variablen auf Grundlage multivariater linearer Regressionsmodelle. (VIF = „Variance inflation factor“, # = absolute Anzahl, % = relative Anzahl, Leukos = Leukozyten, Neutros = Neutrophile Granulozyten, Basos = Basophile Granulozyten, Eos = Eosinophile Granulozyten, Lymphos = Lymphozyten, Monos = Monozyten.)

Bei GADD45A ließ sich, wie in Tabelle 4.13 auf Seite 87 dargestellt, 20 Minuten nach Bestrahlung die Variabilität der Genexpression mit einem R² von 5,7 % durch die absolute Anzahl der Monozyten erklären. Durch eine Verknüpfung mit der relativen Anzahl der eosinophilen Granulozyten konnte R² auf 9,1 % erhöht werden. Kombinierte man hingegen die relative Anzahl der eosinophilen Granulozyten mit zwei anderen Variablen, nämlich mit dem Geschlecht und der absoluten An-

zahl an basophilen Granulozyten in einem trivariate Modell, erreichte R^2 den höchsten Wert mit 14,5 %. Ein vergleichbares Bild zeigten die Ergebnisse nach 8 Stunden, bei denen im bi- und trivariaten Modell ebenfalls andere Variablen verwendet wurden, wie im univariaten. Der höchste Wert des Variabilitätskoeffizienten fand sich mit 19,7 % durch die Kombination der relativen Anzahl der Lymphozyten und Monozyten mit dem Probandenalter. Das univariate Modell, mit der relativen Anzahl der Lymphozyten als unabhängige Variable, ergab ein R^2 von 14,3 %. Nur zu diesem Zeitpunkt war die Höhe der Strahlendosis, wie in Tabelle 4.7 auf Seite 79 dargestellt, mit einem Wert von 15,9 % in der Lage, bei GADD45A die Variabilität der normalisierten Genexpression besser zu erklären. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden war im univariaten Modell, wie bereits aus Tabelle 4.11 auf Seite 84 zu erkennen, die relative Anzahl der Monozyten die ausschlaggebende Variable. Durch das Hinzufügen der relativen Anzahl der neutrophilen Granulozyten stiegen die Werte auf 32,3 % und 26,2 %. Mit der Kombination des Alters wurden mit 36,5 % nach 24 Stunden und 30,3 % nach 48 Stunden die höchsten Koeffizienten berechnet.

Bei PCNA zeigte sich in Tabelle 4.14 ein ähnliches Bild, wenngleich die entsprechenden Variabilitätskoeffizienten im multivariaten Regressionsmodell zumeist etwas niedriger waren. Nur 20 Minuten nach der Bestrahlung ergaben sich höhere Werte für R^2 als bei GADD45A. Im trivariaten Modell erzielte der Variabilitätskoeffizient einen Wert von 35,8 %, allerdings lag hier, wie auch beim bivariaten Modell der VIF mit 62,2 beziehungsweise 58,6 deutlich über dem Richtwert für 10, so dass hier von einer Kolinearität zwischen den Variablen auszugehen war. 8 Stunden nach Bestrahlung wurden in allen drei Regressionsmodellen die gleichen Variablen wie zuvor verwendet: die absolute Anzahl der Monozyten, die relative Anzahl der neutrophilen und die relative Anzahl der basophilen Granulozyten. Auch im bivariaten Modell fand sich ein erhöhter VIF, so dass der hier errechnete Wert von 22,4 % nur über eine bedingte Aussagekraft verfügte. Bei allen übrigen Werten für den Variabilitätskoeffizienten lag der VIF bei beiden Zeitpunkten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung, weit unter 10. Insgesamt waren alle Werte für R^2 bei PCNA deutlich über den Ergebnissen, die durch die Verwendung der Höhe der Strahlendosis als unabhängige Variable errechnet wurden. Bei ihnen war das maximale R^2 , wie in Tabelle 4.7 zu sehen, 8 Stunden nach Bestrahlung bei 8,4 %.

Insgesamt ist eine Beeinflussung der normalisierten Genexpression aller sechs im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene im verwendeten In-vitro-Modell anzunehmen. Entsprechende Hinweise auf Grundlage eines univariaten Modells sind in Tabelle 4.11 auf Seite 84 bereits dargestellt und in entsprechenden Abschnitten ausführlich beschrieben worden.

5 Diskussion

5.1 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Verwendung von In-vitro-Modellen sind einige kritische Punkte zu beachten. Ein entscheidender Faktor ist, dass die Zellen außerhalb ihres natürlichen Umfeldes möglicherweise abweichende und untypische Reaktionen zeigen können. Dabei ist von nicht unwesentlicher Bedeutung, dass das periphere Blut lediglich ein Kompartiment darstellt und die globalen Einflussfaktoren des Organismus bei In-vitro-Versuchen gänzlich unberücksichtigt bleiben. Da die Möglichkeiten für In-vivo-Studien an strahlenexponierten Personen stark begrenzt sind, müssen die genannten Einschränkung bei der Interpretation von Ergebnissen aus In-vitro-Modellen in Kauf genommen werden. Gleichwohl gilt es, eine weitere Limitierung der Aussagekraft durch die Verwendung eines möglichst physiologischen In-vitro-Modells zu vermeiden.

Zur Simulation der In-vivo-Situation für eine Genexpressionsanalyse nach einer Exposition mit ionisierenden Strahlen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche In-vitro-Modelle entwickelt. Bei den derzeit etablierten Verfahren wird Vollblut verwendet, welches bis zu 48 Stunden nach Bestrahlung und länger in einem Brutschrank bei 37° C kultiviert wird. Die Lagerungszeit ist limitiert, da die Erythrozyten sehr viel Glucose verstoffwechseln und in der Folge der pH-Wert des Systems sinkt. Zur Stabilisierung wird deshalb ein Kultivierungsmedium mit einem speziellen Puffersystem verwendet, welches ursprünglich in den 1960er Jahren im Roswell Park Memorial Institute (RPMI) in Buffalo, New York, entwickelt und nach dieser Einrichtung benannt wurde. Mittels einer CO₂-Begasung über eine Membran im Kulturbedeälter kann durch Gasaustausch mittels des erwähnten Puffersystems der pH-Wert über einen längeren Zeitraum stabil gehalten werden. Allerdings wird das körpereigene Serum durch die Zugabe des künstlichen Mediums so verdünnt, dass der Zusatz von nicht-menschlichem Serum notwendig wird. Das hierfür verwendete Hitze-inaktivierte, fetale Kälberserum enthält neben Antibiotika eine von der jeweiligen Charge abhängige, unterschiedlich große und wenig definierte Menge verschiedenster Wachstumsfaktoren und Zytokine. Ein Einfluss dieser Faktoren auf die Genexpression steht zwar außer Frage, wurde aber bislang noch nicht hinreichend untersucht.

Um die genannten artifiziellen Einschränkungen vermeiden zu können, wurde im Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München ein System entwickelt, bei dem ein etabliertes Modell

in den entscheidenden Faktoren modifiziert wird. Hierfür wird venöses Vollblut in kommerziell erhältliche CPT-Vacutainer abgenommen. Durch Zentrifugation werden die maßgeblich für die Instabilität des Systems verantwortlichen Erythrozyten unterhalb eines Separationsgels konzentriert. Gleichzeitig verbleiben die mononukleären Zellen oberhalb davon in ihrem eigenen Plasma und können frei von weiteren künstlichen Zusätzen gelagert werden. Auf diese Weise ist es möglich mit geringstem präparativen Aufwand In-vitro-Untersuchungen von Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung unter weitestgehender Belassung sämtlicher körpereigener Stoffe und ohne Zugabe körperfremder Substanzen durchzuführen. In vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind, wurden in diesem System Änderungen des pH-Wertes, der Vitalität der Zellen und der Glucosemenge unter anderem gegen die Inkubationszeit gemessen. Diese Parameter zugrundelegend blieb das System bei Raumtemperatur über 48 Stunden weitgehend stabil. In Tabelle 5.1 sind die wichtigsten Merkmale der etablierten Modelle und des eigenen gegenübergestellt.

Kriterium	Vollblut in RPMI bei 37 °C	PMNC in CPT bei Raumtemp.
Interzelluläre Interaktion	++	+
Aufbewahrung im physiologischen Medium	-	++
Lagerung bei physiologischen Umweltbedingungen	+	-
Geringe artifizielle Beeinträchtigung durch kurzes Aufbereitungsverfahren	++	+

Tabelle 5.1: Auflistung der Vor- und Nachteile der etablierten In-vitro-Modelle (links) und des eigenen (rechts). Der entscheidende Nachteil der etablierten Modelle (hier fett gedruckt), nämlich die Aufbewahrung in einem unphysiologischem Medium, entfällt bei dem modifizierten Modell. (++ = erfüllt das Kriterium sehr gut, + = erfüllt das Kriterium gut, - = erfüllt das Kriterium nicht.)

Die Überprüfung des Potentials des neuen In-vitro-Modells erfolgte durch zwei parallel durchgeführte Versuchsansätze mittels einer gnostischen und einer agnostischen Fragestellung. Der gnostische Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wurde, setzte die Annahme voraus, dass die sechs untersuchten Zielgene, ATF3, BAX, DDB2, CDKN1A, GADD45A und PCNA, tatsächlich geeignete Kandidaten für biodosimetrische Marker darstellen. Begründet wurde diese Annahme durch zahlreiche, in späteren Kapiteln zitierte Veröffentlichungen, in denen die Regulation der strahleninduzierten Expressionsänderung dieser sechs Gene über den p53-Signaltransduktionsweg hinreichend aufgezeigt wurde. Die für die genannten Gene in etablierten In-vitro-Modellen nachgewiesene Dosis-Wirkungsbeziehung sollte im modifizierten Verfahren bestätigt werden. Darüber

hinaus wurde als weitere Fragestellung der Einfluss der zellulären Subpopulationen auf die gemessene Genexpressionsänderung analytisch mit Hilfe multivariater linearer Regressionsmodellanalysen untersucht. Als Grundlage hierfür dienten Differentialblutbilder der Probanden aus einer gleichzeitig erfolgten, separaten Blutentnahme.

Der agnostische Ansatz, der zeitgleich durch weitere Mitarbeiter des Instituts verfolgt wurde und nicht Teil dieser Arbeit ist, ging von der Annahme aus, dass es möglicherweise andere und besser geeignete Kandidaten für Markergene geben könnte. Die abschließenden Ergebnisse dieser Fragestellung, unter Verwendung eines „Whole Genome Microarray“ neue Kandidatengene zu identifizieren, stehen derzeit noch aus.

5.2 Besonderheiten der Methodik

Die verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien stammten alle von kommerziellen Herstellern. Es kamen ausschließlich industriell hergestellte, gebrauchsfertige PPD zum Einsatz, deren Bindungsspezifität vom Hersteller Applied Biosystems Applera garantiert wurden. Sämtliche Labortätigkeiten erfolgten nach ausführlicher Einarbeitung und unter strenger Einhaltung von Standardarbeitsanweisungen. Diese waren Grundlage für die Zertifizierung des Qualitätsmanagementsystems des Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München durch den TÜV Süd gemäß DIN EN ISO 9001:2000 im Jahr 2008. Ebenfalls Bestandteil entsprechender Arbeitsanweisungen waren durchgängige Qualitätskontrollen bei der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese sowie die Validierung der Standardkurven aller durchgeführten RTQ-PCR. Durch strikte Einhaltung der vorgegebenen Hygiene-Vorschriften konnten Kontaminationen mit Fremd-DNA bei sämtlichen Versuchsdurchläufen verhindert werden.

Für die Doppelbestimmung des C_t -Wertes jeder einzelnen cDNA-Probe wurde ein dreifacher Ansatz verwendet, um stets ein ausreichendes Volumen, trotz möglicher Benetzungsverluste beim Pipettieren, zu garantieren. Es wurden Unterschiede bei der differentiellen Genexpression von bis zu 0,5 C_t -Werten toleriert. Bei 15 der 1440 durchgeführten Bestimmungen musste die RT Q-PCR aufgrund größerer Abweichungen wiederholt werden. In diesen Fällen wurde die Messung für alle Dosisbereiche und Messzeitpunkte des betroffenen Genes des jeweiligen Probanden zuzüglich der 18S-Bestimmung wiederholt. In Folge dieser Maßnahme betrug die durchschnittliche Abweichung der Doppelbestimmung 0,09 C_t -Werte.

Mittels gleichzeitig untersuchter Standardkurven ließ sich die Effizienz der jeweiligen RT Q-PCR errechnen, die durchschnittlich 97,46 % betrug. Innerhalb des durch die verwendeten Standardreihen umschlossenen, etwa sechslogarithmische Stufen umfassenden, lineardynamischen Bereichs korrelierten die gemessenen C_t -Werte mit den bekannten cDNA-Konzentrationen der Standardproben im Mittel zu 99,97 %. Diese Zahlen sind Indikatoren für die hohe Zuverlässigkeit des Verfahrens und dokumentieren die Präzision während aller Arbeitsschritte.

5.3 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen der etablierten Modelle

Für die Gene ATF3, CDKN1A und GADD45A konnte im untersuchten In-vitro-Modell ein Anstieg der Transkription nach Bestrahlung bis auf das zweifache der Kontrollwerte gezeigt werden. Gleichzeitig wurde nahezu keine Änderungen der Genexpression über Kontrollniveau für BAX, DDB2 oder PCNA gemessen. Dies stellt eine erhebliche Abweichung im Vergleich zu Ergebnissen von Studien dar, bei denen entweder Vollblut- oder Lymphozytenkulturen aus etablierten In-vitro-Modellen verwendet wurden. In diesen Veröffentlichungen wurden Änderungen der Genexpression um das bis zu 10-fache im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen beschrieben. Eine Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse mit denen aus Studien, die ebenfalls die Genexpression in Blutzellen gesunder Probanden untersuchten, erfolgt in Abbildung 5.1 und in den anschließenden Kapiteln. Die Ursachen für die deutliche Abweichung der Ergebnisse der eigenen Arbeit werden in den weiteren Kapiteln ausführlich diskutiert. In Tabelle 5.2 sind die Charakteristiken verschiedener Arbeiten, die die strahlenbedingten Genexpressionsänderungen auch an anderen Zelltypen untersuchten, wiedergegeben. Hierdurch lassen sich mögliche Ursachen unterschiedlicher Ergebnisse ableiten.

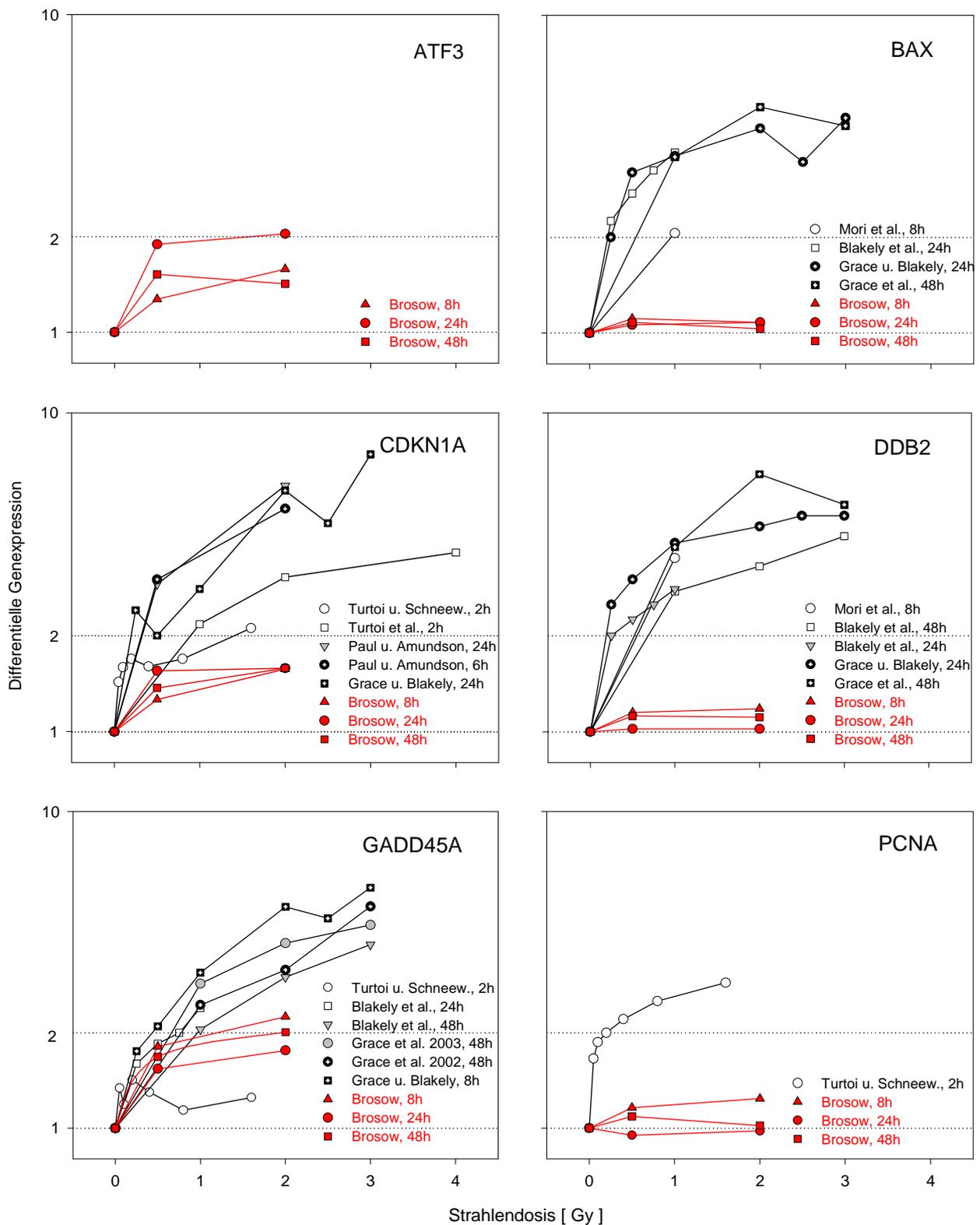


Abb. 5.1: Dosis-Wirkungs-Beziehung der 6 untersuchten Gene im Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Studien. Die untere horizontale Linie auf Höhe des Wertes 1 auf der y-Achse markiert eine unveränderte Genexpression nach Bestrahlung. Die Hochregulation eines Gens wurde für eine differentielle Expression über einem Wert von 2 festgelegt und durch die obere horizontale Linie markiert. Die jeweilige Studie ist in der Legende aufgeführt, wobei die Ergebnisse der eigenen Arbeit in roter Farbe dargestellt sind. Es wurden nur solche Veröffentlichungen für einen Vergleich herangezogen, bei denen die Genexpressionsänderung an Blutzellen gesunder Probanden untersucht wurde.

Zelltyp	Verfahren	#	Strahlung	Dosis	t.p.r.	Gene	Kontrolle	Farbstoff	Autor
* PBL	In-vitro	2	α	0,1, 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 Gy	2 h	BRC3, CD69, CDKN1A, DUSP8, EGFR1, EGFR4, GADD45A, GRAP, LAP1B, IFNG, ISG20L1, c-JUN, MDM2, PCNA, PLK2, RND1, TNFSF9, TRAF4	185	FAM/MGB	Turtol und Schneeweiss, 2009
* PBL	In-vitro	6	γ	1, 2 und 4 Gy	2 h	CDKN1A, CD6, EGFR1, EGFR4, IFN- γ , ISG20L1, c-JUN, MDM2, PLK2, RND1, TNFSF9, OCLIN, SERHL2, STARD13	185	FAM/MGB	Turtol et al., 2008
* Vollblut	In-vitro	10	γ	0,5, 2, 5 und 8 Gy	6 und 24 h	CDKN1A, FDXR, SESN1, BRC3 und PTP1	β -Aktin und GAPDH	FAM/BHQ1	Pauli und Amundson 2008
* Vollblut	In-vitro	3	γ	0,25, 0,50, 1, 2 und 3 Gy	24 h	BAX, BCL-2, GADD45A, CDKN1A, DDR2	185	FAM/TAMRA	Grace und Blakely, 2007
* Vollblut	In-vitro	20	γ	0,25 und 2,5 Gy	24 h	BAX, BCL-2, GADD45A, CDKN1A, DDR2	185	FAM/TAMRA	Grace und Blakely, 2007
Fibroblasten	In-vivo	11	γ	0,04, 1, 2 und 8 Gy	1, 2, 6 und 24 h	CDKN1A, GADD45A, IER5, PLK3, C/EB1	β -Aktin und GAPDH	SVBR Green	Kis et al., 2006
Gliom-Tumorzellen	In-vitro	-	X	5 Gy	4 h	ATF3, GADD45A, GADD153 (DDIT3)	GAPDH	-	Heminger et al., 2006
Milz, Dickdarm, Niere, Lunge, Leber (Mäuse)	In-vivo	4	X	7,5 Gy	5 h	p53, BAX, CDKN1A	Mikroglobulin	FAM/MGB	di Masi et al., 2006
Knochenmarkzellen (Mäuse)	In-vivo	5	γ	6,5 Gy	6 h	SIRT1, DDA3, MCM5, CDC6, IER3, Apat1, Pim-2, BAX	GAPDH	-	Dai et al., 2006
* PBL	In-vitro	10	X	1 Gy	8 h	DDR2, TNFRSF10B und BAX	UBC, GAPDH und β -2-Mikroglobulin	SVBR Green	Mori et al., 2005
CD4+, CD8+, CD19+, CD56+, NK-Zellen	In-vitro	10	X	1 Gy	8 h	DDR2, TNFRSF10B und BAX	UBC, GAPDH und β -2-Mikroglobulin	SVBR Green	Mori et al., 2005
TK6-Zellen	In-vitro	2	γ	0,5, 1, 5, 10 und 20 Gy	4 und 24 h	SAIT, GADD45A, TK, ODC, p55CDC, c-MYC, SAMDc, XPC, KU80, XRCC1	185	SVBR Green	Akerman et al., 2005
CD4+	In-vitro	1	X	0,01, 0,1 und 1 Gy	2, 8, 24 und 48 h	DDR2	-	SVBR Green	Mori et al., 2004
Haut	In-vitro	X	X	0,01, 0,1 und 1 Gy	1, 4 und 24 h	β -2-Mikroglobulin, Zyklin B, Zyklin D, GADD45A, CDKN1A, p53	β -Aktin	SVBR Green	Goldberg et al., 2004
PBL (NHL)	In-vivo	8	X	1,5	6 und 24 h	CDKN1A, GADD45A und DDR2, FCGRLA, C-X-C, CXCL10	185	FAM, HEX und Texas Red	Amundson et al., 2004
PBL (NHL)	In-vivo	1	X	1,5, 3, 4,5, 6, 7,5 und 9 Gy	6 und 24 h	CDKN1A, GADD45A und DDR2, FCGRLA, C-X-C, CXCL10	185	FAM, HEX und Texas Red	Amundson et al., 2004
MCF-7	In-vitro	-	X	2 und 6 Gy	12, 24, 48 und 72 h	PSME3, JSRF3G, GLUT-1, CDKN1A, MRP8 und PKC1-1.	185	FAM	Staufen et al., 2003
* Vollblut	In-vitro	1	γ	1, 2 und 3 Gy	48 h	GADD45A, DDR2, BAX, MnsOD	185	FAM/TAMRA	Grace et al., 2003
* Vollblut	In-vitro	3	γ	1, 2 und 3 Gy	48 h	DDR2, GADD45A, BCL-2	185	FAM/TAMRA	Blakely et al., 2003
* Vollblut	In-vitro	3	γ	0,25, 0,50, 0,75 und 1 Gy	24 h	DDR2, GADD45A, BAX	185	FAM/TAMRA	Blakely et al., 2003
Vollblut (Mäuse)	In-vivo	5-12	γ	0,25 Gy	12, 24, 48 und 72 h	CDKN1A	185	FAM/TAMRA	Blakely et al., 2003
* Vollblut	In-vitro	1	γ	1, 2 und 3 Gy	48 h	GADD45A	185	FAM/TAMRA	Grace et al., 2002

Tabelle 5.2: Übersicht von Studien, bei denen mittels RT Q-PCR Genexpressionsanalysen von Zellen oder Gewebeproben nach einer Bestrahlung durchgeführt wurden. Ausgewählt wurden nur Studien, die auch die Gene der eigenen Arbeit beinhalten. Bei den mit * markierten und fett gedruckten Veröffentlichungen wurden Blutzellen von gesunden Probanden verwendet, deren Ergebnisse direkt mit denen dieser Studie verglichen werden konnten. (PBL = periphere Blutzellen, - = keine Angabe, # = Anzahl der untersuchten Probanden, α = α -Strahlung, γ = γ -Strahlung, X = Röntgenstrahlung.)

5.3.1 Studien zur Expressionsänderung von ATF3

ATF3 ist in seiner Funktionalität sehr vielfältig. Es beeinflusst direkt das Zellwachstum und wirkt somit tumorsuppressiv. Seine Hauptfunktion hat es als Transkriptionsfaktor, wobei es als Homodimer inhibierend und als Heterodimer aktivierend wirkt (Lu et al. 2006, S. 10476; Hai und Hartman 2001, S. 3). In zahlreichen, hier nicht detailliert wiedergegebenen Veröffentlichungen konnte anhand von Mikroarray-Untersuchungen für ATF3 eine deutliche strahlenbedingte Genexpressionsänderung in peripheren Blutzellen gezeigt werden. Bisher wurden lediglich in einer Arbeit entsprechende Veränderungen der Genexpression mittels RT Q-PCR untersucht. In dieser Studie an menschlichen Gliom-Tumorzellen von K. Heminger aus dem Jahr 2006 wurde die Expression von verschiedenen Genen auch an der nicht mit 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) vorbehandelten Kontrollgruppe nach einer Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestimmt. Hier zeigte ATF3 eine differentielle Genexpression von ungefähr 2 bei einer Messung 4 Stunden nach Bestrahlung (Heminger et al. 2006, S. 821). Bei der eigenen Arbeit fand sich mit 2,0 der höchste Wert der differentiellen Genexpression 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit 2 Gy. Aufgrund der unterschiedlichen Fragestellung und der verschiedenen Zelltypen sind die Ergebnisse mit der eigenen Studie aber nicht unmittelbar vergleichbar.

5.3.2 Studien zur Expressionsänderung von BAX

Bei BAX, welches vor allem in der Apoptose-Regulierung von Bedeutung ist (Basu und Haldar 1998, S. 1100), konnte in der eigenen Arbeit lediglich eine minimale Änderung der Genexpression nachgewiesen werden. Hiervon weichen deutlich die Ergebnisse von verschiedenen Veröffentlichungen der Forschungsgruppen von M.B. Grace und von W.F. Blakely ab, die ebenfalls die Genexpression an Blutzellen gesunder Probanden untersuchten. Bei diesen Studien kam es bereits im niedrigen Dosisbereich zu einem deutlichen Anstieg der differentiellen Genexpression sowohl nach 24 wie auch nach 48 Stunden. Bei höheren Dosen ab 1 Gy, spätestens ab 2 Gy war hingegen eine Diskriminierung der Strahlendosis aufgrund der Höhe der differentiellen Genexpression nicht mehr möglich. Die höchsten Werte der differentiellen Genexpression fanden sich zum einen mit 4,5 bei einer Dosis von 3 Gy nach 24 Stunden in der Studie von M.B. Grace und W.F. Blakely aus dem Jahr 2007 (Grace und Blakely 2007, S. 1149). Ebenfalls einen Wert von 4,5 zeigte die Studie von M.B. Grace aus dem Jahr 2003 bei der gleichen Dosis, allerdings erst 48 Stunden nach Bestrahlung (Grace et al. 2003, S. 1472). Deutlich niedriger fiel die differentielle Genexpression in der Studie

von M. Mori aus dem Jahr 2005 aus. Hier wurde lediglich die Expression 8 Stunden nach Bestrahlung mit 1 Gy bestimmt. Sie lag aber mit 2,1 noch deutlich höher, als der höchste Wert der eigenen Studie mit 1,1 nach 8 Stunden bei einer Bestrahlung mit 0,5 Gy (Mori et al, S. 1498).

Die im Folgenden beschriebenen Studien untersuchten die Genexpression an anderen Zellpopulationen, so dass deren Ergebnisse nicht direkt mit denen der eigenen Arbeit verglichen werden konnten. Bei der bereits erwähnten Studie von M. Mori wurde vor allem nach einer unterschiedlich hohen Strahlensensibilität der Lymphozyten-Subpopulationen gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass BAX nach Bestrahlung am stärksten bei CD19+ und CD8+ Lymphozyten exprimiert wurde. Die Genexpression war hier um mehr als das Dreifache gegenüber der nicht bestrahlten Kontrolle erhöht, wohingegen sie bei der Gesamtpopulation, wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, lediglich etwas mehr als verdoppelt war (Mori et al. 2005, S. 1498). Ebenfalls nicht in den direkten Vergleich wurde eine Studie aus dem Jahr 2006 von einer Forschergruppe um A. di Masi aufgenommen, bei der aus Organewebe von Mäusen die Genexpression bestimmt wurde. Hier fand sich eine große organspezifische Variabilität: Im Dickdarm war die Expression 5 Stunden nach einer In-vivo-Bestrahlung mit 7,5 Gy, verglichen mit einer unbestrahlten Kontrolle, um das 5,7-fache erhöht. In der Milz war sie um das 4,7-fache gesteigert, wohingegen sie in der Lunge nur noch um das 2,9-fache erhöht war. Bei den anderen Organen war die Expressionsänderung nicht signifikant (di Masi et al. 2006, S. 56). Im gleichen Jahr hat die Arbeitsgruppe um J.M. Dai aus Knochenmark isolierte RNA von Mäusen, die zuvor einer Ganzkörperbestrahlung von 6,5 Gy ausgesetzt waren, untersucht. BAX war hier nach 6 Stunden um das 2,5 -fache hochreguliert (Dai et al. 2006, S. 518).

5.3.3 Studien zur Expressionsänderung von CDKN1A

Eines der Gene, dessen strahlenabhängige Veränderung der Genexpression in der Vergangenheit am besten untersucht wurde, ist CDKN1A. Sein Protein p21 ist wesentlich für die inhibitorische Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich (Gartel und Tyner 2002, S. 639). Die Expression zeigte in dieser Arbeit nur eine mäßige, strahlenabhängige Änderung. Die Ergebnisse anderer Studien an Blutzellen gesunder Probanden zu diesem Gen konnten hingegen einen teilweise deutlich höheren Dosiswirkungseffekt nachweisen. Eine Veröffentlichung von A. Turtoi und F.H. Schneeweis aus dem Jahr 2009 zeigte Ergebnisse, die am ehesten mit denen der eigenen Arbeit in Einklang zu bringen waren: Obwohl die Werte im niedrigen Dosisbereich zunächst stark anstiegen, lagen sie bei einer Dosis von 1,6 Gy nur knapp über dem Grenzwert von 2 (Turtoi und Schneeweis 2009,

S. 407). Auch in der Studie von A. Turtoi aus dem Jahr 2008 sind die Werte nur unwesentlich höher. Hier erreichte die differentielle Genexpression bei einer Dosis von 4 Gy ihr Maximum bei 3,6. Ursächlich hierfür war vermutlich der deutlich frühere Messzeitpunkt im Gegensatz zu allen übrigen, im Folgenden dargestellten Studien (Turtoi et al. 2008, S. 380). Vor allem die Studie von S. Paul und S.A. Amundson aus dem Jahr 2008 zeigte bei einer Dosis von 2 Gy zu allen Messzeitpunkten Werte von über 5 bei der differentiellen Genexpression (Paul und Amundson 2008, S. 1239). Auffällig war bei der Studie von M.B. Grace und W.F. Blakely, wie auch bei der Studie von A. Turtoi und F.H. Schneeweis ein mehr oder weniger starker, vorübergehender Rückgang der differentiellen Genexpression bei steigenden Strahlendosen (Grace und Blakely 2007, S. 1149; Turtoi und Schneeweis 2009, S. 407). Die differentielle Genexpression bei der eigenen Studie war bereits bei 0,5 Gy mit maximal 1,6 nach 24 Stunden deutlich niedriger als bei allen anderen Studien und blieb bei einer Erhöhung der Dosis auf 2 Gy annähernd konstant.

Verschiedene Studien an anderen Zellkulturen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So untersuchte T. Staßen im Jahr 2003 die Genexpression von Zellen der Metastasis Cellular Factor 7 -Linie (MCF-7) und zeigte für CDKN1A 12 Stunden nach Bestrahlung einen deutlichen Anstieg der differentiellen Genexpression bei 2 Gy auf 2,5 und bei 6 Gy auf 3,1. Nach 48 Stunden lagen die Werte bei 2,4 beziehungsweise 6,7 sowie nach 72 Stunden bei 1,4 und 5,0 (Staßen et al. 2003, S. 322). Im Jahr 2006 berichtete E. Kis von einer durchschnittlichen differentiellen Genexpression von 3,6 bei deutlichen interindividuellen Unterschieden zwischen den Fibroblastenlinien verschiedener Probanden. Auffällig war, dass lediglich im unteren und mittleren Dosisbereich von 0,04 bis 1 Gy eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden konnte, danach blieb die Expression bis 8 Gy nahezu konstant. Darüber hinaus wurde der zeitliche Verlauf nach einer Bestrahlung von 2 Gy untersucht. CDKN1A stieg bis auf ein Maximum von ungefähr dem Vierfachen der unbestrahlten Probe nach 2 Stunden an und fiel im weiteren Verlauf wieder auf Werte von zwischen 1 beziehungsweise knapp über 2 zurück (Kis et al. 2006, S. 1510). In der bereits bei BAX erwähnten Studie von A. di Masi aus dem Jahr 2006 zeigte sich auch bei CDKN1A eine deutliche organspezifische Expressionsänderung. Sie betrug in der Milz das 9,8- und in der Lunge das 9,7-fache im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (di Masi et al. 2006, S. 56). Die Gruppe um Z. Goldberg bestrahlte Stanzbiopsien aus menschlicher Haut mit 0,01, 0,1 und 1 Gy. CDKN1A zeigte hierbei eine Stunde nach Bestrahlung einen Anstieg der Expression, der aber im weiteren zeitlichen Verlauf wieder unter die Ausgangswerte abfiel. Auffällig war, dass die höchste differentielle Genexpression bei der niedrigsten Dosis von 0,01 Gy gefunden wurde (Goldberg et al. 2004, S. 571). Bei einer In-vivo-Studie von S.A. Amundson und ihrer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2004 zeigte sich bei insge-

samt acht Patienten im Verlauf der Strahlentherapie für CDKN1A ein sehr inhomogenes Bild. Bei einem Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom war die differentielle Genexpression mit 26,0 bereits nach der ersten Fraktion, mit einem zwischenzeitlichen Absinken der Expression im weiteren Therapieverlauf, am deutlichsten erhöht. Obwohl die Mehrzahl der Blutzellen der Probanden nicht tumorös verändert waren, schien die Grunderkrankung einen gewissen Einfluss auf das Ergebnis gehabt zu haben (Amundson et al. 2004, S. 6371).

5.3.4 Studien zur Expressionsänderung von DDB2

DDB2, welches für die Reparatur von DNA-Schäden essentiell ist (Nichols et al. 1996, S. 24317), gehört ebenfalls zu der Gruppe von Genen, die bei dieser Arbeit kaum Veränderung der differentiellen Genexpression gezeigt hatten. Anders sehen die Ergebnisse vergleichbarer Studien aus, bei denen bereits mit der geringsten verwendeten Dosis der Grenzwert von 2 überstiegen wurde. Studien von M.B. Grace, W.F. Blakely und M. Mori zeigten eine deutliche differentielle Genexpression, die bereits bei 0,25 Gy einsetzte. Allerdings stagnierte diese im weiteren Verlauf, so dass bei Dosen über 1 Gy keine eindeutige Diskriminierung der Höhe der Bestrahlung aufgrund der Werte der differentiellen Genexpression möglich war. Bei der Studie von M.B. Grace aus dem Jahr 2003 kam es sogar zu einem Rückgang von 6,1 auf 5,2 bei einer Dosiserhöhung von 2 auf 3 Gy (Grace et al. 2003, S. 1472; Blakely et al. 2003, S. 1490; Mori et al. 2005, S. 1498). In der eigenen Arbeit wurde bei einer Dosis von 2 Gy nach 8 Stunden das Maximum der differentiellen Genexpression mit 1,2 erreicht.

Studien, die die Expression von DDB2 aufgrund anderer Fragestellungen untersucht haben, zeigten gleichfalls eine deutliche strahlenbedingte Änderung. Bei der bereits erwähnten Studie von M. Mori und weiteren Autoren aus dem Jahr 2005 zeigte sich im Gegensatz zu BAX bei DDB2 im Durchschnitt kaum ein Unterschied zwischen den Lymphozyten Subpopulationen. Die differentielle Genexpression lag in einem Bereich von ungefähr 4 im Vergleich zu 3,5 bei der Gesamtpopulation. Wie bei BAX traten hierbei aber starke interindividuelle Schwankungen auf (Mori et al. 2005, S. 1498). Bereits ein Jahr zuvor hatte der gleiche Autor mit Kollegen an isolierten CD4+ T-Lymphozyten aus peripheren mononukleären Zellen eines Probanden den zeitlichen Verlauf der DDB2-Expression untersucht. Während sich bei den beiden niedrigeren Dosen kaum eine Veränderung der Genexpression zeigte, hatte sich diese bei einer Dosis von 1 Gy bereits nach 2 Stunden verdoppelt. Ihr Maximum erreichte sie nach 8 Stunden mit einer mehr als Verzehnfachung gegenüber dem Aus-

gangswert. Selbst nach 48 Stunden war sie noch um mehr als das Sechsfache erhöht (Mori et al. 2004, S. 1956). Bei der ebenfalls schon erwähnten In-vivo-Studie von S.A. Amundson aus dem gleichen Jahr zeigte sich eine stark karzinomabhängige Expressionsänderung von DDB2. War sie bei den Lymphomen um das Vier- bis Fünffache erhöht, zeigte sie bei den Myelomen keine Änderung aufgrund der Bestrahlung (Amundson et al. 2004, S. 6371).

5.3.5 Studien zur Expressionsänderung von GADD45A

Zusammen mit CDKN1A ist GADD45A das Gen, dessen strahlenbedingte Transkriptionsregulierung bislang am besten untersucht wurde. Seine Funktionen reichen von einer indirekten Beteiligung an der DNA-Reparatur, über eine Regulierung des Zellzyklus bis hin zur Beeinflussung der Apoptose (Hoffman und Liebermann 2009, S. 27). Es liegen mehrere Veröffentlichungen vor, deren Ergebnisse sich mit denen dieser Arbeit vergleichen lassen. Bei allen erhöhte sich die differentielle Genexpression bereits bei niedrigen Dosen bis 0,5 Gy deutlich. Allerdings stagnierte der Anstieg bei der eigenen Arbeit trotz steigender Strahlendosis, wohingegen er sich bei allen anderen Veröffentlichungen weiterhin erhöhte. Sowohl in der Studie von M.B. Grace aus dem Jahr 2002 als auch in der Studie von M.B. Grace und W.F. Blakely aus dem Jahr 2007 stiegen die Werte auf über 5, wohingegen bei der eigenen Studie das Maximum bei 2,3 lag (Grace et al. 2002, S. 1018; Grace und Blakely 2007, S. 1149). Auffällig ist ein Ausbleiben einer weiteren Expressionserhöhung bei der bereits erwähnten Studie von A. Turtoi und F.H. Schneeweis, was sich erneut auf den frühen Messzeitpunkt zurück führen ließ (Turtoi und Schneeweis 2009, S. 407).

Darüber hinaus wurde die strahlenabhängige Expression von GADD45A noch in weiteren Studien untersucht. Bei der bereits vorgestellten In-Vivo-Studie von S.A. Amundson aus dem Jahr 2004 zeigte sich beim Patienten mit dem Non-Hodgkin-Lymphom lediglich eine differentielle Genexpression von 1,2. Die im Vergleich zu anderen Studien äußerst geringe differentielle Genexpression von GADD45A rührte von einer sehr hohen basalen Ausgangskonzentration. Im Vergleich zwischen allen acht Probanden schwankte die differentielle Genexpression zwischen 1,2 und ungefähr 7,0 (Amundson et al. 2004, S. 6371). Bei der ebenfalls schon erwähnten Studie von Z. Goldberg wurde die Genexpression von GADD45A bei einer Strahlendosis von 0,01 Gy nach 4 Stunden zunächst herunter reguliert, stieg aber nach 24 Stunden erneut auf die Hälfte der Ausgangswerte. Bei 0,1 Gy stieg sie zunächst sprunghaft um mehr als das Vierfache an, sank allerdings nach 24 Stunden wieder um die Hälfte ab. Lediglich bei einer Dosis von 1 Gy fand sich ein langsamer, konstanter

Anstieg im zeitlichen Verlauf. Nachdem die Expression eine Stunde nach Bestrahlung zunächst herunter reguliert war, war sie nach 24 Stunden mehr als doppelt so hoch, wie bei der unbestrahlten Probe (Goldberg et al. 2004, S. 571). Bei der Untersuchung an lymphoblastoiden TK6-Zellen fand die Arbeitsgruppe um G.S. Akerman im Jahre 2005 bei GADD45A einen deutlichen Unterschied in der Genexpression zwischen Mikroarray-Analyse und RT Q-PCR. So war diese beim Mikroarray nach 4 Stunden bei einer Strahlendosis von 20 Gy fünffach erhöht, bei der RT Q-PCR hingegen 10-fach (Akerman et al. 2005, S. 195). In der bereits zitierten Studie an Gliom-Tumorzellen aus dem Jahr 2006 von K. Heminger zeigte GADD45A ähnlich wie ATF3 eine differentielle Genexpression von ungefähr 2 (Heminger et al. 2006, S. 821). Auch in der Studie an menschlichen Fibroblasten von E. Kis aus dem gleichen Jahr war die Expression von GADD45A nach Bestrahlung erhöht. Es fanden sich allerdings bei den hierfür untersuchten fünf Zelllinien deutliche interindividuelle Unterschiede. Bei einer Bestrahlung mit 2 Gy stieg die Expression nach 2 Stunden auf Werte zwischen 2 und 3, um im weiteren Verlauf auf etwa 1,5 zu sinken. Nur bei einer Zelllinie stieg die Expression nach 24 Stunden wieder auf das Dreifache an. An den gleichen Zelllinien wurde auch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beim Vergleich der Expressionen 2 Stunden nach Bestrahlung bei Strahlendosen von 0,04 bis 8 Gy aufgezeigt. Wie schon bei anderen Studien konnte lediglich im unteren und mittleren Dosisbereich bis 2 Gy ein linearer Zusammenhang nachgewiesen werden (Kis et al. 2006, S. 1510).

5.3.6 Studien zur Expressionsänderung von PCNA

PCNA ist sowohl an der Reparatur von DNA-Schäden, wie auch bei der regulären DNA-Synthese beteiligt (Kelman und Hurwitz 1998, S. 236). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch PCNA, das in anderen Veröffentlichungen mittels Mikroarray als vermehrt exprimiert beschrieben wurde, nicht die erwarteten Ergebnisse zeigen. In einer Studie an Blutzellen gesunder Probanden wurden die Ergebnisse der Mikroarray-Untersuchungen mittels RT Q-PCR validiert. Im Gegensatz zu dieser Studie von A. Turtoi und F.H. Schneeweis aus dem Jahr 2009 blieb bei der eigenen Arbeit ein Anstieg der differentiellen Genexpression aus. Bei der angesprochenen Studie erreichte sie bereits nach 2 Stunden bei einer Strahlendosis von 1,6 Gy eine Höhe von 2,9 (Turtoi und Schneeweis 2009, S. 407).

5.4 Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse

5.4.1 Auswirkung des modifizierten In-vitro-Modells

Um der körpereigenen, physiologischen Umgebung möglichst nahe zu kommen, wurde im modifizierten In-vitro-Modell auf Zugabe von Fremdstoffen verzichtet. Im Gegenzug mussten, um die Stabilität des Systems zu bewahren, die Erythrozyten separiert und die mononukleären Zellen bei Raumtemperatur gelagert werden. Obwohl sich das System in Vorversuchen als stabil erwies, schien es auf die normalisierte Expression der verschiedenen Gene einen unterschiedlichen Einfluss ausgeübt zu haben. Zwar konnte bei der Auswertung der differentiellen Genexpression eine Hochregulation der Gene gezeigt werden, allerdings fiel der Anstieg deutlich niedriger aus, als bei vergleichbaren Studien unter Verwendung etablierter Modelle. Insofern können die eigenen Ergebnisse als Hinweis auf ein prinzipiell strahleninduzierbares, aber gedämpftes biologisches System interpretiert werden. Die ermittelten Genexpressionsänderungen lassen folglich keinen Bezug zur tatsächlichen Höhe der Genexpression in einer In-vivo-Situation zu. Gleichwohl lässt sich mittels des hier vorgestellten Modells vermuten, dass grundsätzliche Rückschlüsse auf strahleninduzierte Gene möglich sind. Allerdings werden, aufgrund des Dämpfungseffekts, nur besonders stark hochregulierte Gene mit entsprechend ausgeprägter differentieller Expression nachgewiesen.

Parallel zu dieser Arbeit wurden am selben In-vitro-Modell durch die gleiche Arbeitsgruppe des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr mittels „Whole Genome Microarray“ Transkriptionsänderungen sämtlicher Gene des menschlichen Genoms unter dem Gesichtspunkt eines agnostischen Ansatzes untersucht. Hierbei wurden weniger Gene mit einer differentiellen Expressionsänderung wie in vergleichbaren Studien bei Verwendung etablierter In-vitro-Modelle gefunden. Dies unterstreicht die Annahme eines gedämpften biologischen Systems. Von den 3089 im „Whole Genome Microarray“ differentiell exprimierten Genen waren ungefähr ein Drittel bislang nicht annotiert. Es wurden 96 Gene, darunter 57 ohne Annotation, ausgewählt, bei denen die Genexpression nach Bestrahlung eine hohe Änderung bei konstantem zeitlichem Verlauf aufwies. Sechs dieser Gene, darunter auch ein bislang noch nicht annotiertes, wurden an einer zweiten, unabhängigen Probandengruppe mittels RT Q-PCR bei Verwendung des modifizierten In-vitro-Modells untersucht. Die Expression der in Tabelle 5.3 aufgelisteten Gene war hierbei nach Bestrahlung um das bis zu Fünffache hoch reguliert. Darunter befand sich auch das Gen für β -Aktin, welches in der Vergangenheit oft als vermeintliches Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet wurde. Die genannten Gene werden zurzeit in einem etablierten In-vitro-Modell überprüft. Abhängig von den Ergebnissen kön-

nen diese an zukünftigen, akzidentell Strahlenexponierten zur Anwendung kommen und so gegebenenfalls in vivo validiert werden.

Gen	Protein
PLK2	Polo-like Kinase 2
RPS11	Ribosomales Protein S11
ACTB	β -Aktin
HLTF	Helicase-like Transcription Factor
LOC653314	(bisher nicht annotiert)
CAMKK2	Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2

Tabelle 5.3: Übersicht von 6 ausgewählten Genen, die in einer von weiteren Mitarbeiter des Instituts für Radiobiologie der Bundeswehr durchgeführten Mikroarray-Analyse mittels des modifizierten In-vitro-Modells als potentielle Markergene identifiziert wurden. Diese Gene werden zurzeit in einem etablierten In-vitro-Modell validiert.

5.4.2 Effekt der verwendeten Strahlenart

Neben den Unterschieden in der Lagerung der Blutzellproben existieren weitere Besonderheiten, die die Vergleichbarkeit der in Tabelle 5.2 aufgezeigten Studien beeinflussen. Während sich einige der vorliegenden Studien auf die Untersuchung der Auswirkungen von ionisierender Strahlung in einem Bereich zwischen 1 und 50 cGy fokussierten, verglichen die meisten Studien die Veränderung der Genexpression zwischen 1 und 10 Gy. Neben dem Dosisbereich ist auch ein Einfluss durch die Art der ionisierenden Strahlung auf die Höhe der Genexpressionsänderung nicht auszuschließen. Die Mehrheit der zitierten Studien verwendete Röntgen- beziehungsweise γ -Strahlung. Nur eine einzige Studie untersuchte die Auswirkung von α -Strahlung. Eine Übersicht über die verwendete Strahlenart und das jeweilige Dosis-Spektrum ist der Tabelle 5.2 zu entnehmen.

Dass die Strahlenart einen Einfluss auf die Dosis-Wirkungs-Kurve verschiedener biodosimetrischer Verfahren haben kann, zeigte eine Studie von E. Schmid und weiteren Mitarbeitern aus dem Jahr 2002. So konnte hier gezeigt werden, dass Neutronenstrahlung bei gleicher Äquivalenzdosis mehr dizentrische Chromosomenaberrationen in menschlichen Lymphozyten hervorruft als γ -Strahlung (Schmid et al. 2002, S. 453). Ebenfalls deutliche Unterschiede fand die Arbeitsgruppe um Woloschak bereits 1990 beim Vergleich der Expression der Proteinkinase C in Fibroblasten von Hamstern bei Röntgen-, γ - und Neutronen-Strahlung. Bei den beiden erstgenannten Strahlenarten

kam es zu einer raschen Erhöhung der Expression, wohingegen sie bei der Neutronenstrahlung deutlich abfiel (Woloschak et al. 1990, S. 3964). M. Kühne und weitere Mitarbeiter verglichen im Jahr 2005 die Auswirkungen von Röntgen- und γ -Strahlung bei menschlichen Fibroblasten. Es konnte gezeigt werden, dass die charakteristische Röntgenstrahlung bei gleicher Dosis deutlich mehr Doppelstrangbrüche verursachte als γ -Strahlung und auch die Rate der fehlerhaften Reparatur deutlich erhöht war (Kühne et al. 2005, S. 673). Dass die unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit verschiedener Strahlenarten trotz des gleichen Strahlungswichtungsfaktors sich auch auf die Genexpression auswirken kann, zeigte eine Studie der Arbeitsgruppe um S. Kimura im Jahr 2006. Dabei fanden sich bei Hefekulturen, die mit Röntgen- beziehungsweise mit γ -Strahlung behandelt wurden, nicht nur Unterschiede in der Anzahl der differentiell exprimierten Gene, sondern auch im zeitlichem Verlauf der Expressionsänderungen (Kimura et al. 2006, S. 53). Entsprechende Vergleichsstudien an peripheren Blutzellen gesunder menschlicher Probanden fehlen, so dass diesbezüglich bislang keine abschließende Aussage getroffen werden kann.

5.4.3 Einfluss von pathologischen Zelltypen

Die meisten Studien, die sich mit der Genexpression nach Einwirkung genotoxischer Stressoren beschäftigten, verwendeten aufgrund ihrer einfachen Kultivierbarkeit von Tumorzelllinien. Die myeloische Leukämie-Zelllinie 1 (ML-1) besitzt eine Wildtyp p53 Funktion, so dass an ihr Untersuchungen von p53-regulierbaren Genen durchgeführt werden können. Die p53 Aktivität entspricht dem physiologischen Niveau, so dass es zu keiner artifiziellen Über- oder Unterregulation der Zielgene kommt. Darüber hinaus gehen ML-1 Zellen nach genotoxischem Stress rasch in eine Apoptose über, was wiederum zur Induktion von hiermit assoziierten Genen, wie BAX, führt (Amundson et al. 1999, S. 3666). Trotzdem müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden, da sie nicht automatisch Rückschlüsse auf das Verhalten gesunder Zellen erlauben. Gerade bei der Geschwindigkeit der Genexpressionsänderung zeigen sich große Unterschiede zwischen Tumorzelllinien und Lymphozyten aus peripherem Vollblut gesunder Probanden. S.A. Amundson geht davon aus, dass die Stressreaktion bei sich schnell teilenden Zellen rascher anläuft, als bei sich nicht teilenden Zellen (Amundson et al. 2000, S. 344).

In-vivo-Studien an Patienten, die sich in Vorbereitung auf eine Knochenmarkstransplantation einer Ganzkörperbestrahlung unterziehen, lassen unter Umständen Rückschlüsse auf die Antwortreaktionen gesunder Menschen auf eine Strahlenexposition zu. Die Problematik an diesen Studien lässt

sich in der Arbeit von S.A. Amundson aus dem Jahre 2004 erkennen. Bei den insgesamt 8 Patienten mit unterschiedlichen lymphatischen und myeloischen Erkrankungen zeigten sich hohe interindividuelle Unterschiede in der Höhe der differentiellen Genexpression. Gerade bei der Expression von DDB2 konnte hier eindeutig ein Zusammenhang mit der Grunderkrankung festgestellt werden. Bei den anderen Genen ließ sich dies teilweise auf den unterschiedlich beeinträchtigten Aktivitätszustand des Tumorsuppressors p53 zurückführen (Amundson et al. 2004, S. 6371). Letztlich stellen solche Untersuchungen ebenfalls nur ein Modell dar, das Rückschlüsse auf zu erwartende Antworten bei Gesunden ermöglicht und dessen Ergebnisse sorgfältig zu interpretieren sind.

5.4.4 Einfluss von Lymphozyten-Subpopulationen

Bei Blutproben gesunder Probanden hat eine unterschiedlich hohe Strahlensensibilität der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen möglicherweise einen Einfluss auf deren Genexpression. So konnte die Arbeitsgruppe um H. Louagie im Jahr 1999 zeigen, dass bei einer Strahlentherapie von Tumorpatienten die Konzentration von B-Lymphozyten am stärksten zurückgeht, gefolgt von CD4+ und CD8+ Lymphozyten. Natürliche Killerzellen sind nach dieser Studie gegenüber ionisierender Strahlung am unempfindlichsten (Louagie et al. 1999, S. 768). Im Jahr 2005 untersuchten M. Mori und weitere Mitarbeiter den direkten Einfluss der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen auf die Genexpression, insbesondere von BAX und DDB2. Beide Gene waren vor allem bei B- und CD8+ Lymphozyten nach Bestrahlung am stärksten hochreguliert (Mori et al. 2005, S. 1498). Mitarbeiter der eigenen Arbeitsgruppe konnten allerdings in noch nicht publizierten Studien zeigen, dass eine vollständige Diskriminierung zwischen bestrahlter und unbestrahlter Blutprobe im Dosisbereich größer als 0,1 Gy auch durch die Gesamtpopulation von Lymphozyten möglich ist. Für eine biodosimetrische Anwendung wäre somit eine aufwendige Subtypenisolation nicht notwendig.

5.4.5 Einfluss der Monozyten-Konzentration

Im Gegensatz zum Einfluss der Lymphozyten-Subpopulationen, die für eine biodosimetrische Anwendung eine vermutlich vernachlässigbare Auswirkung hat, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Effekt der Monozyten vermuten. In der Literatur lassen sich hierauf allerdings nur wenige Hinweise finden. Studien, deren Ergebnisse in Kapitel 5.3 mit denen der eigenen Arbeit verglichen wurden, verwendeten entweder peripheres Vollblut von gesunden Probanden oder

hieraus isolierte Lymphozyten. In keiner dieser Studien wurde die differentielle Genexpression an einer gemischten Population von Lymphozyten und Monozyten untersucht. Es fand sich lediglich eine Studie von der Arbeitsgruppe um H.J. van der Vliet aus dem Jahr 1997, die die Expression von BAX in Leukozyten-Subpopulationen untersuchte. In dieser In-vitro-Studie an unbestrahlten Blutproben von sieben gesunden Probanden zeigten sich nur marginale Unterschiede zwischen Monozyten und Lymphozyten, ausschließlich bei den Granulozyten war die Expression von BAX etwas geringer (van der Vliet et al. 1997, S. 326). Eine Erklärung, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig beschriebenen Beeinflussung der Genexpression bei PMNC durch die relative Monozyten-Konzentration, lässt sich hieraus nicht ableiten. Vergleichbare Studien zu den übrigen fünf Genen fehlen.

In einer Studie von M.A. Chaudhry aus dem Jahr 2008 zeigten sich starke zelltyp-abhängige Unterschiede der strahleninduzierten Expression bei der Untersuchung von verschiedenen anderen Genen bei vier Tumorzelllinien, darunter das TGF- β -regulierte Gen „Mothers against decapentaplegic Homolog 7“ (MADH7). Ursächlich für die unterschiedlichen Expressionsmuster der verschiedenen Zelllinien wurden differierende intrazelluläre Funktionen angesehen (Chaudhry 2008, S. 5). Über TGF- β ist bekannt, dass es eine ganze Kaskade von zellulären Ereignissen auslösen kann. Wie bereits in Kapitel 2.4 ausführlich beschrieben, ist es auch für eine p53-unabhängige Aktivierung der Expression von ATF3, CDKN1A und GADD45A verantwortlich, den drei Genen, die im Rahmen der vorliegenden Studie die höchste differentielle Genexpression zeigten. Darüber hinaus gibt es auch Anzeichen für einen gewissen Einfluss bei der Regulation der übrigen Gene: BAX (Teramoto et al. 1998, S. 56), DDB2 (Kannan et al. 2000, S. 77) und PCNA (Wildemann et al. 2003, S. 150).

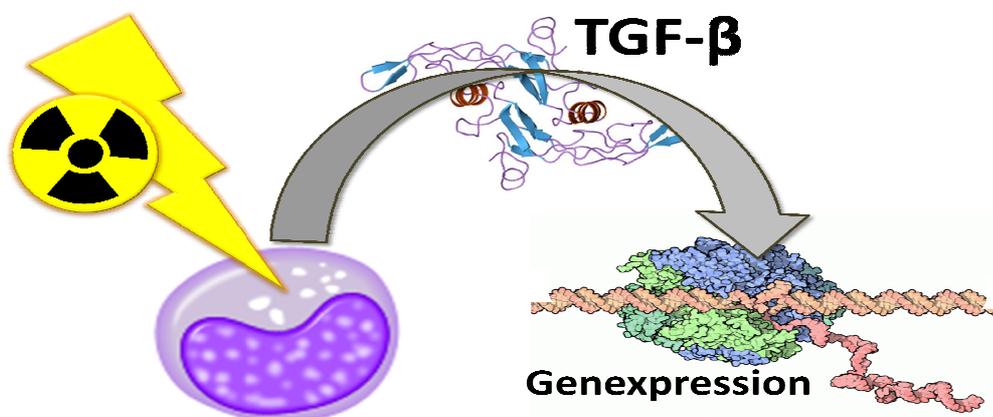


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der strahleninduzierten Beeinflussung der Genexpression von durch Monozyten produziertem TGF- β (Illustration erstellt unter Verwendung lizenzfreier Einzelgrafiken.)

Bei TGF- β handelt es sich um ein hauptsächlich von Monozyten produziertes Zytokin (Cavaillon 1994, S. 445). Tabelle 5.4 stellt in einer Übersicht mehrere von Monozyten sezernierte Peptide dar und zeigt, welche ebenfalls von Lymphozyten ausgeschüttet werden können. Von den drei hauptsächlich von Monozyten produzierten Peptiden hat lediglich TGF- β einen Einfluss auf die Expression der sechs im Rahmen dieser Studie untersuchten Gene. Für IL-15 und den „Macrophage Colony Stimulating Factor“ (M-CSF) konnte hierfür hingegen in der Literatur kein eindeutiger Hinweis gefunden werden.

Peptid	Monozyten	B-Lymphoz.	T-Lymphoz.
IL-1	x	x	X
IL-6	x	x	X
IL-8	x		X
IL-10	x		X
IL-15	x		
IL-19	x	x	
IFN- α/β	x	x	
TFN- α/β	x		X
GM-CSF	x		X
G-CSF	x		X
M- SF	x		
TGF-β	x		

Tabelle 5.4: Übersicht über Zytokine, Interferone und Wachstumsfaktoren, die durch Monozyten sezerniert werden. Einige dieser Peptide werden auch von Lymphozyten produziert. (IL = Interleukin, IFN = Interferon, TNF = Tumornekrosefaktor, TGF = Transforming Growth Factor, CSF = Colony Stimulating Factor. Zusammenfassende Darstellung nach Cavaillon 1994, S. 445-453.)

Eine Ganzkörperbestrahlung führt nach kürzester Zeit zu Veränderungen des Blutbildes. Bereits im Jahr 1977 konnte M. Rotman bei Tumorpatienten unter Strahlentherapie eine Monozytose beobachten (Rotman et al. 1977, S. 119). Auch vor einer akzidentiellen Bestrahlung kann es zu einer Erhöhung der Monozytenzahl und somit zu einer vermehrten Zytokinausschüttung kommen. So tritt bekanntermaßen eine Monozytose bei Infekten, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und Nekrosen auf (Feldman und Ruehl 1984, S. 446). Eine leichte Monozytose kann auch als unspezifische Stressantwort durch Erhöhung des Glukokortikoidspiegels ausgelöst werden (Anderson et al. 1999, S. 410). Des Weiteren ist regelmäßig bei polytraumatisierten Patienten eine Erhöhung der Monozyten-Konzentration zu beobachten (Kampalath et al. 2003, S. 1580), was zu einem kumulativen Effekt auf die Genexpression bei akzidentiellen Strahlenopfern führen könnte. Darüber hinaus

ist zu vermuten, dass unmittelbar durch die Bestrahlung die Monozyten vermehrt Zytokine ausschütten. So konnte in einer Studie einer chinesischen Arbeitsgruppe an Tumorpatienten eine vermehrte Konzentration von TGF- β im Serum während der Strahlentherapie nachgewiesen werden (Zhao et al. 2009, S. 1387). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen der Monozyten-Konzentration, die eine Assoziation mit den Genexpressionsanalysen nach Bestrahlung zeigten, erlauben keine Rückschlüsse auf einen Kausalzusammenhang. Dennoch sind sie als ein interessanter Nebenfund zu werten, der die besondere Bedeutung von zytokinproduzierenden Zellen im Rahmen einer Strahlenexposition im Einklang mit Hinweisen aus der Literatur unterstreicht.

6 Zusammenfassung

Strahleninduzierte Genexpressionsänderungen treten kurz nach Exposition auf und können mittels quantitativer PCR schnell nachgewiesen werden. Sie sind deshalb ein vielversprechender Ansatz für ein durchsatzstarkes biodosimetrisches Verfahren. Eine frühzeitige Dosisabschätzung ist gerade bei einer Triage großer, potentiell strahlenexponierter Personengruppen von immensem Nutzen. Weil akzidentelle Expositionen von Personengruppen seltene Ereignisse sind, werden für Experimente zur Suche nach geeigneten Kandidaten für die benötigten Markergene verschiedene In-vitro-Modelle verwendet. Hierbei ist unklar, ob diese artifiziellen Systeme die In-vivo-Situation tatsächlich widerspiegeln. Am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München wurde ein alternatives In-vitro-Modell entwickelt. Es erlaubt mit geringstmöglichem präparativem Aufwand die Untersuchung von Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung unter weitgehender Belassung körpereigener Medien und ohne Zugabe körperfremder Substanzen. Um das Potential dieses Verfahrens zu prüfen, wurden sechs p53-abhängige Gene, die bereits mittels etablierter Modelle eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigten, auf ihre strahleninduzierte Transkriptionsänderung getestet.

Bei drei Genen, ATF3, CDKN1A und GADD45A, stieg im eigenen Modell die Expression nach Bestrahlung auf das bis zu Zweifache der unbestrahlten Kontrolle. Für die übrigen Gene, BAX, DDB2 und PCNA, wurden nur geringe Erhöhungen gemessen. Insgesamt fielen alle beobachteten Genexpressionsänderungen niedriger aus, als bei vergleichbaren Studien mit etablierten Modellen. Ursächlich hierfür muss die Lagerung der mononukleären Zellen nach Bestrahlung bei Raumtemperatur angesehen werden. Die Aufbewahrung bei einer unphysiologischen Temperatur war erforderlich, um die Zugabe von Fremdstoffen zu verhindern. Insofern können die Ergebnisse als Hinweis auf ein im Prinzip strahleninduzierbares, aber gedämpftes biologisches System interpretiert werden. Aufgrund dieses Dämpfungseffekts werden nur besonders stark hochregulierte Gene und deren differentielle Genexpression nachgewiesen. Als Nebenbefund wurde der Einfluss der zytokinproduzierenden Monozyten auf die strahleninduzierte Genexpression gezeigt. Ob dies als Faktor bei einer Dosisabschätzung zu berücksichtigen ist, sollte in zukünftigen Studien überprüft werden.

Mittels „Whole Genome Microarrays“ wurden bereits in einer weiteren Studie unter Verwendung des gleichen modifizierten In-vitro-Modells andere, entsprechend ausgeprägt exprimierende Gene identifiziert und mittels RT Q-PCR quantifiziert. Die möglichen neuen Kandidatengene sollen im nächsten Schritt mittels eines etablierten In-vitro-Modells überprüft und abhängig von den Ergebnissen für zukünftig akzidentell Strahlenexponierte zur Verfügung stehen.

7 Literaturverzeichnis

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

Abend M.: Zellbiologische und molekulare Testverfahren zur Messung der Strahlenempfindlichkeit bei genetischer Prädisposition. In: "Bedeutung der genetischen Prädisposition und der genomischen Instabilität für die individuelle Strahlenempfindlichkeit (Konsequenzen für den Strahlenschutz)", *Strahlenschutzkommission beim Bundesamt für Strahlenschutz, Bonn, 2000, Band 45, S. 100-124.*

Adkins S., Burmeister M.: Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem* 240 (1996): 17-23

Ahlers I.: Changes in whole-body metabolic parameters associated with radiation. *Adv Space Res* 14 (1994): 531-539

Akahoshi M., Amasaki Y., Soda M., Hida A., Imaizumi M., Nakashima E., Maeda R., Seto S., Yano K.: Effects of radiation on fatty liver and metabolic coronary risk factors among atomic bomb survivors in Nagasaki. *Hypertens Res* 26 (2003): 965-970

Akerman G.S., Rosenzweig B.A., Domon O.E., Tsai C.A., Bishop M.E., McGarrity L.J., Macgregor J.T., Sistare F.D., Chen J.J., Morris S.M.: Alterations in gene expression profiles and the DNA-damage response in ionizing radiation-exposed TK6 cells. *Environ Mol Mutagen* 45 (2005): 188-205

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

Amundson S.A., Grace M.B., McLeland C.B., Epperly M.W., Yeager A., Zhan Q., Greenberger J.S., Fornace A.J. Jr.: Human in vivo radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. *Cancer Res* 64 (2004): 6368-6371

Amundson S.A.: Functional genomics in radiation biology: a gateway to cellular systems-level studies. *Radiat Environ Biophys* 47 (2008): 25-31

Anderson B.H., Watson D.L., Colditz I.G.: The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Vet Res Commun* 23 (1999): 399-413

Anjos R.M., Umisedo N.K., Facure A., Yoshimura E.M., Gomes P.R., Okuno E.: Goiânia: 12 years after the ¹³⁷Cs radiological accident. *Radiat Prot Dosimetry* 101 (2002): 201-204

Banda M., Bommineni A., Thomas R.A., Luckinbill L.S., Tucker J.D.: Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutat Res* 649 (2008): 126-34

Basu A., Haldar S.: The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 4 (1998): 1099-1109

Bauchinger M.: Retrospective dose reconstruction of human radiation exposure by FISH/chromosome painting. *Mutat Res* 404 (1998): 89-96

Blakely W.F., Miller A.C., Grace M.B., McLeland C.B., Luo L., Muderhwa J.M., Miner V.L., Prasanna P.G.: Radiation biodosimetry: applications for spaceflight. *Adv Space Res* 31 (2003): 1487-1493

Blakely W.F., Salter C.A., Prasanna P.G.: Early-response biological dosimetry - recommended countermeasure enhancements for mass-casualty radiological incidents and terrorism. *Health Phys* 89 (2005): 494-504

Brady H.J., Gil-Gómez G., Kirberg J., Berns A.J.: Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 15 (1996): 6991-7001

Brugarolas J., Moberg K., Boyd S.D., Taya Y., Jacks T., Lees J.A.: Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999): 1002-1007

Bustin S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25 (2000): 169-193

Cai Y., Zhang C., Nawa T., Aso T., Tanaka M., Oshiro S., Ichijo H., Kitajima S.: Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and promoter response element. *Blood* 96 (2000): 2140-2148

Carrier F., Georgel P.T., Pourquier P., Blake M., Kontny H.U., Antinore M.J., Gariboldi M., Myers T.G., Weinstein J.N., Pommier Y., Fornace A.J. Jr: Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 19 (1999): 1673-1685

Carrier F., Smith M.L., Bae I., Kilpatrick K.E., Lansing T.J., Chen C.Y., Engelstein M., Friend S.H., Henner W.D., Gilmer T.M., Kastanll M.B., Fornace A.J. Jr.: Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem* 269 (1994): 32672-32677

Carroll W.L.: Introduction to recombinant-DNA technology. *Am J Clin Nutr* 58 (1993): 249S-258S

Cavaillon J.M.: Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48 (1994): 445-453

Chao N.J.: Accidental or intentional exposure to ionizing radiation: biodosimetry and treatment options. *Exp Hematol* 4 (2007): 24-27

Chaudhry M.A.: Analysis of gene expression in normal and cancer cells exposed to gamma-radiation. *J Biomed Biotechnol* 2008 (2008): 1-7

Chaudhry M.A.: Biomarkers for human radiation exposure. *J Biomed Sci* 15 (2008): 557-563

Chen C., Cui J., Lu H., Wang R., Zhang S., Shen P.: Modeling of the role of a Bax-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision. *Biophys J* 92 (2007): 4304-4315

Cherp A., Baverstock K., Fleshtor F., Gray P.: "The Human Consequences of the Chernobyl Nuclear Accident - A Strategy for Recovery". *Bericht im Auftrag von UNDP und UNICEF in Unterstützung von UN-OCHA und WHO, New York, 2002*

Cho Y.J., Meade J.D., Walden J.C., Chen X., Guo Z., Liang P.: Multicolor fluorescent differential display. *Biotechniques* 30 (2001): 562-572

Cui J., Chen C., Lu H., Sun T., Shen P.: Two independent positive feedbacks and bistability in the Bcl-2 apoptotic switch. *PLoS One* 3 (2008): 1469-1478

Dai J.M., Sun D.C., Lin R.X., Yang J., Lou S., Wang S.Q.: Microarray analysis of differentially expressed genes in mouse bone marrow tissues after ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 82 (2006): 511-521

Dainiak N., Berger P., Albanese J.: Relevance and feasibility of multi-parameter assessment for management of mass casualties from a radiological event. *Exp Hematol* 35 (2007): 17-23

Datta A., Bagchi S., Nag A., Shivanov P., Adami G.R., Yoon T., Raychaudhuri P.: The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res* 486 (2001): 89-97

di Masi A., Antoccia A., Dimauro I., Argentino-Storino A., Mosiello A., Mango R., Novelli G., Tanzarella C.: Gene expression and apoptosis induction in p53-heterozygous irradiated mice. *Mutat Res* 594 (2006): 49-62

Diviacco S., Norio P., Zentilin L., Menzo S., Clementi M., Biamonti G., Riva S., Falaschi A., Giacca M.: A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* 122 (1992): 313-320

Dotto G.P.: p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471 (2000): 43-56

Edwards A.A., Lindholm C., Darroudi F., Stephan G., Romm H., Barquinero J., Barrios L., Caballin M.R., Roy L., Whitehouse C.A., Tawn E.J., Moquet J., Lloyd D.C., Voisin P.: Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiat Prot Dosimetry* 113 (2005): 396-402

El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M., Velculescu V.E., Canman C.E., Jackman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y., Wiman K.G., Mercer W.E., Kastan M.B., Kohn K.W., Elledge S.J., Kinzler K.W., Vogelstein B.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54 (1994): 1169-1174

Fan F., Jin S., Amundson S.A., Tong T., Fan W., Zhao H., Zhu X., Mazzacurati L., Li X., Petrik K.L., Fornace A.J. Jr., Rajasekaran B., Zhan Q.: ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene* 21 (2002): 7488-7496

Fan W., Richter G., Cereseto A., Beadling C., Smith K.A.: Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest. *Oncogene* 18 (1999): 6573-6582

Feldman B.F., Ruehl W.W.: Interpreting absolute WBC counts. *Mod Vet Pract* 65 (1984): 446-449

Fitch M.E., Cross I.V., Turner S.J., Adimoolam S., Lin C.X., Williams K.G., Ford J.M.: The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 2 (2003): 819-826

Fliedner T.M., Graessle D., Meineke V., Dörr H.: Pathophysiological principles underlying the blood cell concentration responses used to assess the severity of effect after accidental whole-body radiation exposure: an essential basis for an evidence-based clinical triage. *Exp Hematol* 35 (2007): 8-16

Flinterman M., Guelen L., Ezzati-Nik S., Killick R., Melino G., Tominaga K., Mymryk J.S., Gäken J., Tavassoli M.: E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem* 280 (2005): 5945-5959

Friesecke I., Beyrer K., Fliedner T.M.: How to cope with radiation accidents: the medical management. *Br J Radiol* 74 (2001): 121-122

Garcia-Sagredo J.M.: Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta* 1779 (2008): 363-375

Gartel A.L., Tyner A.L.: Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* 246 (1999): 280-289

Gartel A.L., Tyner A.L.: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1 (2002): 639-649

Goans R.E., Waselenko J.K.: Medical management of radiological casualties. *Health Phys* 89 (2005): 505-512

Goldberg Z., Schwietert C.W., Lehnert B., Stern R., Nami I.: Effects of low-dose ionizing radiation on gene expression in human skin biopsies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8 (2004): 567-574

Grace M.B., Blakely W.F.: Transcription of five p53- and Stat-3-Inducible genes after ionizing radiation. *Rad Meas* 42 (2007): 1147-1151

Grace M.B., McLeland C.B., Blakely W.F.: Real-time quantitative RT-PCR assay of GADD45 gene expression changes as a biomarker for radiation biodosimetry. *Int J Radiat Biol* 78 (2002): 1011-1021

Grace M.B., McLeland C.B., Gagliardi S.J., Smith J.M., Jackson W.E. 3rd, Blakely W.F.: Development and assessment of a quantitative reverse transcription-PCR assay for simultaneous measurement of four amplicons. *Clin Chem* 49 (2003): 1467-1475

Guillouf C., Graña X., Selvakumaran M., De Luca A., Giordano A., Hoffman B., Liebermann D.A.: Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* 85 (1995): 2691-2698

Gupta M., Gupta S.K., Hoffman B., Liebermann D.A.: Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition. *J Biol Chem* 30 (2006): 17552-17558

Hai T., Hartman M.G.: The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273 (2001): 1-11

Hanawalt P.C.: Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21 (2002): 8949-8956

Haque K.A., Pfeiffer R.M., Beerman M.B., Struewing J.P., Chanock S.J., Bergen A.W.: Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnol* 3 (2003): 1-10

Harper E.G., Alvares S.M., Carter W.G.: Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J Cell Sci* 118 (2005): 3471-3485

Hartman M.G., Lu D., Kim M.L., Kociba G.J., Shukri T., Buteau J., Wang X., Frankel W.L., Guttridge D., Prentki M., Grey S.T., Ron D., Hai T.: Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 24 (2004): 5721-5732

Hayes S., Shiyonov P., Chen X., Raychaudhuri P.: DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol Cell Biol* 18 (1998): 240-249

Heminger K., Jain V., Kadakia M., Dwarakanath B., Berberich S.J.: Altered gene expression induced by ionizing radiation and glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose in a human glioma cell line: implications for radio sensitization. *Cancer Biol Ther* 5 (2006): 815-823

Hoffman B., Liebermann D.A.: Gadd45 modulation of intrinsic and extrinsic stress responses in myeloid cells. *J Cell Physiol* 218 (2009): 26-31

Horneck G.: Biological monitoring of radiation exposure. *Adv Space Res* 22 (1998): 1631-1641

Ilyinskikh N.N., Ilyinskikh I.N., Porovskiy V.A., Natarajan A.T., Suskov I.I., Smirenniy L.N., Ilyinskikh E.N.: Biodosimetry results obtained by various cytogenetic methods and electron spin resonance spectrometry among inhabitants of a radionuclide contaminated area around the siberian chemical plant (Tomsk-7). *Mutagenesis* 14 (1999): 473-478

Itoh T., Iwashita S., Cohen M.B., Meyerholz D.K., Linn S.: Ddb2 is a haploinsufficient tumor suppressor and controls spontaneous germ cell apoptosis. *Hum Mol Genet* 16 (2007): 1578-1586

Itoh T., O'Shea C., Linn S.: Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48 (DDB2) and p53. *Mol Cell Biol* 23 (2003): 7540-7553

Jiang H.Y., Wek S.A., McGrath B.C., Lu D., Hai T., Harding H.P., Wang X., Ron D., Cavener D.R., Wek R.C.: Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 24 (2004): 1365-1377

Jones S.: Windscale and Kyshtym: a double anniversary. *J Environ Radioact* 99 (2007): 1-6

Jónsson Z.O., Hübscher U.: Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* 19 (1997): 967-975

Jung H.J., Kim E.H., Mun J.Y., Park S., Smith M.L., Han S.S., Seo Y.R.: Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells. *Oncogene* 26 (2007): 7517-7525

Jung I.L., Kim I.G.: Polyamine as a signaling molecule for controlling an adaptive mutation. *Biochemistry (Mosc)* 73 (2008): 1228-1234

Kampalath B., Cleveland R.P., Chang C.C., Kass L.: Monocytes with altered phenotypes in posttrauma patients. *Arch Pathol Lab Med* 127 (2003): 1580-1585

Kannan K., Amariglio N., Rechavi G., Givol D.: Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* 470 (2000): 77-82

Kannouche P.L., Wing J., Lehmann A.R.: Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* 14 (2004): 491-500

Kastan M.B., Zhan Q., el-Deiry W.S., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B., Fornace A.J. Jr.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71 (1992): 587-597

Kelman Z., Hurwitz J.: Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci* 23 (1998): 236-238

Kimura S., Ishidou E., Kurita S., Suzuki Y., Shibato J., Rakwal R., Iwahashi H.: DNA microarray analyses reveal a post-irradiation differential time-dependent gene expression profile in yeast cells exposed to X-rays and gamma-rays. *Biochem Biophys Res Commun* 46 (2006): 51-60

Kis E., Szatmári T., Keszei M., Farkas R., Esik O., Lumniczky K., Falus A., Sáfrány G.: Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66 (2006): 1506-1514

Kool J., Hamdi M., Cornelissen-Steijger P., van der Eb A.J., Terleth C., van Dam H.: Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. *Oncogene* 22 (2003): 4235-4242

Kossenko M.M., Thomas T.L., Akleyev A.V., Krestinina L.Y., Startsev N.V., Vyushkova O.V., Zhidkova C.M., Hoffman D.A., Preston D.L., Davis F., Ron E.: The Techa River Cohort: study design and follow-up methods. *Radiat Res* 164 (2005): 591-601

Kovalsky O., Lung F.D., Roller P.P., Fornace A.J. Jr.: Oligomerization of human Gadd45a protein. *J Biol Chem* 276 (2001): 39330-39339

Kronick M.N.: Creation of the whole human genome microarray. *Expert Rev Proteomics* 1 (2004): 19-28

Kühne M., Urban G., Frankenberg D., Löbrich M.: DNA double-strand break misrejoining after exposure of primary human fibroblasts to CK characteristic X rays, 29 kVp X rays and ⁶⁰Co gamma rays. *Radiat Res* 164 (2005): 669-676

Kutyavin I.V., Afonina I.A., Mills A., Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Belousov E.S., Singer M.J., Walburger D.K., Lokhov S.G., Gall A.A., Dempcy R., Reed M.W., Meyer R.B., Hedgpeth J.: 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28 (2000): 655-661

Kuwana T., Newmeyer D.D.: Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 15 (2003): 691-699

Lee L.G., Livak K.J., Mullah B., Graham R.J., Vinayak R.S., Woudenberg T.M.: Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. *Biotechniques* 27 (1999): 342-349

Letai A.: Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest* 115 (2005): 2648-2655

Liang G., Wolfgang C.D., Chen B.P., Chen T.H., Hai T.: ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* 271 (1996): 1695-1701

Liebermann D.A., Hoffman B.: Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells Mol Dis* 39 (2007): 329-335

Linke S.P., Clarkin K.C., Di Leonardo A., Tsou A., Wahl G.M.: A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 10 (1996): 934-947

Louagie H., Van Eijkeren M., Philippe J., Thierens H., de Ridder L.: Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 75 (1999): 767-771

Lu D., Chen J., Hai T.: The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 401 (2007): 559-567

Lu D., Wolfgang C.D., Hai T.: Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses Ras-stimulated tumorigenesis. *J Biol Chem* 281 (2006): 10473-10481

Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T.: p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9 (1995): 935-944

Maki C.G., Howley P.M.: Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* 17 (1997): 355-363

Ménard C., Johann D., Lowenthal M., Muanza T., Sproull M., Ross S., Gulley J., Petricoin E., Coleman C.N., Whiteley G., Liotta L., Camphausen K.: Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. *Cancer Res* 66 (2006): 1844-1850

Mettler F.A. Jr., Voelz G.L.: Major radiation exposure--what to expect and how to respond. *N Engl J Med* 346 (2002): 1554-1561

Mitelman F.: Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 462 (2000): 247-253

Mori M., Benotmane M.A., Tirone I., Hooghe-Peters E.L., Desaintes C.: Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets. *Cell Mol Life Sci* 62 (2005): 1489-1501

Mori M., Benotmane M.A., Vanhove D., van Hummelen P., Hooghe-Peters E.L., Desaintes C.: Effect of ionizing radiation on gene expression in CD4+ T lymphocytes and in Jurkat cells: unraveling novel pathways in radiation response. *Cell Mol Life Sci* 61 (2004):1955-1964

Natarajan A.T., Santos S.J., Darroudi F., Hadjidikova V., Vermeulen S., Chatterjee S., Berg M., Grigorova M., Sakamoto-Hojo E.T., Granath F., Ramalho A.T., Curado M.P.: 137Cesium-induced chromosome aberrations analyzed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiânia radiation accident victims. *Mutat Res* 400 (1998): 299-312

Nevins J.R., Leone G., DeGregori J., Jakoi L.: Role of the Rb/E2F Pathway in Cell Growth Control. *J Cell Physiol* 173 (1997): 233-236

Nichols A.F., Ong P., Linn S.: Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb- phenotype. *J Biol Chem* 271 (1996): 24317-24320

Niculescu A.B. 3rd, Chen X., Smeets M., Hengst L., Prives C., Reed S.I.: Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18 (1998): 629-643

Nowak C., Obe G.: On the origin of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro. I. Experiments with Neurospora endonuclease and polyethylene glycol. *Hum Genet* 66 (1984): 335-343

Ogryzko V.V., Wong P., Howard B.H.: WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17 (1997): 4877-4882

Oku T., Ikeda S., Sasaki H., Fukuda K., Morioka H., Ohtsuka E., Yoshikawa H., Tsurimoto T.: Functional sites of human PCNA which interact with p21 (Cip1/Waf1), DNA polymerase delta and replication factor C. *Genes Cells* 3 (1998): 357-369

Orlando C., Pinzani P., Pazzagli M.: Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 35 (1998): 255-269

Otrin V.R., McLenigan M., Takao M., Levine A.S, Protić M.: Translocation of a UV-damaged DNA binding protein into a tight association with chromatin after treatment of mammalian cells with UV light. *J Cell Sci* 110 (1997): 1159-1168

Papathanasiou M.A., Kerr N.C., Robbins J.H., McBride O.W., Alamo I. Jr., Barrett S.F., Hickson I.D., Fornace A.J Jr.: Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 11 (1991): 1009-1016

Pass B.: Collective radiation biodosimetry for dose reconstruction of acute accidental exposures: a review. *Environ Health Perspect* 105 (1997): 1397-1402

Paul S., Amundson S.A.: Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71 (2008): 1236-1244

Paunesku T., Mittal S., Protić M., Oryhon J., Korolev S.V., Joachimiak A., Woloschak G.E.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 77 (2001): 1007-1021

Pellmar T.C., Rockwell S., Radiological/Nuclear Threat Countermeasures Working Group: Priority list of research areas for radiological nuclear threat countermeasures. *Radiat Res* 163 (2005): 115-123

Perez S., Vial E., van Dam H., Castellazzi M.: Transcription factor ATF3 partially transforms chick embryo fibroblasts by promoting growth factor-independent proliferation. *Oncogene* 20 (2001): 1135-1141

Porciani S., Lanini A., Balzi M., Faraoni P., Becciolini A.: Polyamines as biochemical indicators of radiation injury. *Phys Med* 17 (2001): 187-188

Ramalho A.T., Curado M.P., Natarajan A.T.: Lifespan of human lymphocytes estimated during a six year cytogenetic follow-up of individuals accidentally exposed in the 1987 radiological accident in Brazil. *Mutat Res* 331 (1995): 47-54

Reardon J.T., Sancar A.: Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev* 17 (2003): 2539-2551

Regulla D.F.: ESR spectrometry: a future-oriented tool for dosimetry and dating *Appl Radiat Isot* 62 (2005): 117-127

Romanyukha A.A., Schauer D.A., Thomas J.A., Regulla D.F.: Parameters affecting EPR dose reconstruction in teeth. *Appl Radiat Isot* 62 (2005): 147-154

Rotman M., Ansley H., Rogow L., Stowe S.: Monocytosis: a new observation during radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2 (1977): 117-121

Sadidi M., Lentz S.I., Feldman E.L.: Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie* 91 (2009): 577-585

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988): 487-491

Schmid E., Regulla D., Guldbakke S., Schlegel D., Roos M.: Relative biological effectiveness of 144 keV neutrons in producing dicentric chromosomes in human lymphocytes compared with 60 Co gamma rays under head-to-head conditions. *Radiat Res* 157(2002): 453-460

Schunck C., Johannes T., Varga D., Lörch T., Plesch A.: New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signals. *Cytogenet Genome Res* 104 (2004): 383-389

Sheaff R.J., Singer J.D., Swanger J., Smitherman M., Roberts J.M., Clurman B.E.: Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 5 (2000): 403-410

Smith M.L., Ford J.M., Hollander M.C., Bortnick R.A., Amundson S.A., Seo Y.R., Deng C.X., Hanawalt P.C., Fornace A.J. Jr.: p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol* 20 (2000): 3705-3714

Snyder A.R., Morgan W.F.: Gene expression profiling after irradiation: clues to understanding acute and persistent responses? *Cancer Metastasis Rev* 23 (2004): 259-268

Solomon D.A., Cardoso M.C., Knudsen E.S.: Dynamic targeting of the replication machinery to sites of DNA damage. *J Cell Biol* 166 (2004): 455-463

Soria G., Podhajcer O., Prives C., Gottifredi V.: P21Cip1/WAF1 downregulation is required for efficient PCNA ubiquitination after UV irradiation. *Oncogene* 25 (2006): 2829-2838

Staßen T., Port M., Nuyken I., Abend M.: Radiation-induced gene expression in MCF-7 cells. *Int J Radiat Biol* 79 (2003): 319-331

Streffer C., Müller W.U., Kryscio A., Böcker W.: Micronuclei-biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. *Mutat Res* 404 (1998): 101-105

Sugasawa K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Tanaka K., Hanaoka F.: UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121 (2005): 387-400

Sun T., Chen C., Wu Y., Zhang S., Cui J., Shen P.: Modeling the role of p53 pulses in DNA damage induced cell death decision. *BMC Bioinformatics* 10 (2009): 190

Suzuki A., Tsutomi Y., Akahane K., Araki T., Miura M.: Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17 (1998): 931-939

Swartz H.M., Iwasaki A., Walczak T., Demidenko E., Salikhov I., Khan N., Lesniewski P., Thomas J., Romanyukha A., Schauer D., Starewicz P.: In vivo EPR dosimetry to quantify exposures to clinically significant doses of ionising radiation. *Radiat Prot Dosimetry* 120 (2006): 163-170

Tamura K., Hua B., Adachi S., Guney I., Kawauchi J., Morioka M., Tamamori-Adachi M., Tanaka Y., Nakabeppu Y., Sunamori M., Sedivy J.M., Kitajima S.: Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J* 24 (2005): 2590-2601

Teramoto T., Kiss A., Thorgeirsson S.S.: Induction of p53 and Bax during TGF-beta 1 initiated apoptosis in rat liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251 (1998): 56-60

Terzoudi G.I., Pantelias G.E.: Cytogenetic methods for biodosimetry and risk individualisation after exposure to ionising radiation. *Radiat Prot Dosimetry* 122 (2006): 513-520

Thierens H., Vral A., Morthier R., Aousalah B., De Ridder L.: Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 15 (2000): 245-249

Turtoi A., Brown I., Oskamp D., Schneeweiss F.H.: Early gene expression in human lymphocytes after gamma-irradiation-a genetic pattern with potential for biodosimetry. *Int J Radiat Biol* 84 (2008): 375-387

Turtoi A., Schneeweiss F.H.: Effect of (211)At alpha-particle irradiation on expression of selected radiation responsive genes in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 85 (2009): 403-412

Tyburski J.B., Patterson A.D., Krausz K.W., Slavík J., Fornace A.J. Jr., Gonzalez F.J., Idle J.R.: Radiation metabolomics. 1. Identification of minimally invasive urine biomarkers for gamma-radiation exposure in mice. *Radiat Res* 170 (2008): 1-14

Vairapandi M., Azam N., Balliet A.G., Hoffman B., Liebermann D.A.: Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* 275 (2000): 16810-16819

van der Vliet H.J., Wever P.C., Van Diepen F.N., Yong S.L., Ten Berge I.J.: Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol* 110 (1997): 324-328

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

Waga S., Hannon G.J., Beach D., Stillman B.: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369 (1994): 574-578

Wang X.W., Zhan Q., Coursen J.D., Khan M.A., Kontny H.U., Yu L., Hollander M.C., O'Connor P.M., Fornace A.J. Jr., Harris C.C.: GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999): 3706-3711

Weisdorf D., Chao N., Waselenko J.K., Dainiak N., Armitage J.O., McNiece I., Confer D.: Acute radiation injury: contingency planning for triage, supportive care, and transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12 (2006): 672-682

Wildemann B., Schmidmaier G., Ordell S., Stange R., Haas N.P., Raschke M.: Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF-beta1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65 (2003): 150-156

Wittschieben B.Ø., Wood R.D.: DDB complexities. *DNA Repair (Amst)* 2 (2003): 1065-1069

Woloschak G.E., Chang-Liu C.M., Shearin-Jones P.: Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res* 50 (1990): 3963-3967

Wolter K.G., Hsu Y.T., Smith C.L., Nechushtan A., Xi X.G., Youle R.J.: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139 (1997): 1281-1292

Wong F.L., Yamada M., Sasaki H., Kodama K., Hosoda Y.: Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors. *Radiat Res* 151 (1999): 736-746

Xiong Y., Zhang H., Beach D.: Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 7 (1993): 1572-1583

Xu S.Q., El-Deiry W.S.: p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun* 269 (2000): 179-190

Yan C., Boyd D.D.: ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer. *Cell Cycle* 5 (2006): 926-929

Yan C., Lu D., Hai T., Boyd D.D.: Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J* 24 (2005): 2425-2435

Yan C., Wang H., Boyd D.D.: ATF3 represses 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) expression by antagonizing p53-dependent trans-activation of the collagenase promoter. *J Biol Chem* 277 (2002): 10804-10812

Yoo J., Ghiassi M., Jirmanova L., Balliet A.G., Hoffman B., Fornace A.J. Jr., Liebermann D.A., Bottinger E.P., Roberts A.B.: Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem* 278 (2003): 43001-43007

Yu C., Takeda M., Soliven B.: Regulation of cell cycle proteins by TNF-alpha and TGF-beta in cells of oligodendroglial lineage. *J Neuroimmunol* 108 (2000): 2-10

Zerbini L.F., Wang Y., Czibere A., Correa R.G., Cho J.Y., Ijiri K., Wei W., Joseph M., Gu X., Grall F., Goldring M.B., Zhou J.R., Libermann T.A.: NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004): 13618-13623

Zhang H., Xiong Y., Beach D.: Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 4 (1993): 897-906

Zhang W., Bae I., Krishnaraju K., Azam N., Fan W., Smith K., Hoffman B., Liebermann DA.: CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene 18 (1999): 4899-4907*

Zhang Y., Fujita N., Tsuruo T.: Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene 18 (1999): 1131-1138*

Zhao L., Wang L., Ji W., Wang X., Zhu X., Hayman J.A., Kalemkerian G.P., Yang W., Brenner D., Lawrence T.S., Kong F.M.: Elevation of plasma TGF-beta1 during radiation therapy predicts radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 74 (2009): 1385-1390*

Zimmermann K., Mannhalter J.W.: Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques 21 (1996): 268-279*

8 Anhang

8.1 Ergebnisse der RNA-Qualitätskontrolle mittels Spektralphotometrie

Proband 1	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 2	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	133,63	2,15	1,39	8,02	0h/0Gy	167,25	2,14	1,45	10,04
0h/0,5Gy	283,17	2,11	1,47	16,99	0h/0,5Gy	148,86	2,15	1,43	8,93
0h/2Gy	234,37	2,11	1,51	14,06	0h/2Gy	165,08	2,17	1,09	9,90
8h/0Gy	163,49	2,20	0,64	9,81	8h/0Gy	274,04	2,10	2,02	16,44
8h/0,5Gy	225,21	2,12	1,90	13,51	8h/0,5Gy	261,68	2,09	2,20	15,70
8h/2Gy	204,69	2,13	1,52	12,28	8h/2Gy	217,69	2,14	1,41	13,06
24h/0Gy	215,92	2,11	2,14	12,96	24h/0Gy	261,53	2,12	2,29	15,69
24h/0,5Gy	199,77	2,11	2,05	11,99	24h/0,5Gy	224,80	2,13	2,40	13,49
24h/2Gy	206,82	2,11	2,00	12,41	24h/2Gy	202,98	2,15	1,49	12,18
48h/0Gy	107,61	2,22	2,51	6,46	48h/0Gy	117,17	2,12	2,17	7,03
48h/0,5Gy	99,42	2,19	2,67	5,97	48h/0,5Gy	153,34	2,12	2,21	9,20
48h/2Gy	92,40	2,17	2,69	5,54	48h/2Gy	108,70	2,12	1,35	6,52
Proband 3	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 4	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	54,50	2,15	0,87	3,27	0h/0Gy	163,83	2,14	1,00	9,83
0h/0,5Gy	140,16	2,19	0,89	8,41	0h/0,5Gy	183,68	2,15	0,73	11,02
0h/2Gy	130,04	2,16	1,74	7,80	0h/2Gy	169,05	2,17	0,70	10,14
8h/0Gy	255,74	2,12	1,40	15,34	8h/0Gy	153,78	2,16	1,04	9,23
8h/0,5Gy	194,23	2,14	0,74	11,65	8h/0,5Gy	159,19	2,13	1,20	9,55
8h/2Gy	214,25	2,15	0,98	12,86	8h/2Gy	158,26	2,12	1,87	9,50
24h/0Gy	195,82	2,13	2,31	11,75	24h/0Gy	110,14	2,15	1,76	6,61
24h/0,5Gy	245,09	2,11	2,27	14,71	24h/0,5Gy	144,61	2,15	2,26	8,68
24h/2Gy	223,27	2,15	1,29	13,40	24h/2Gy	131,32	2,13	1,55	7,88
48h/0Gy	103,13	2,12	1,17	6,19	48h/0Gy	80,13	2,14	1,03	4,81
48h/0,5Gy	128,38	2,09	1,92	7,70	48h/0,5Gy	75,17	2,15	1,98	4,51
48h/2Gy	119,86	2,04	1,97	7,19	48h/2Gy	51,62	2,13	1,06	3,10
Proband 5	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 6	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	186,20	2,15	1,30	11,17	0h/0Gy	223,36	2,11	1,80	13,40
0h/0,5Gy	192,19	2,15	1,08	11,53	0h/0,5Gy	260,37	2,10	2,13	15,62
0h/2Gy	162,38	2,13	1,25	9,74	0h/2Gy	278,14	2,09	2,15	16,69
8h/0Gy	217,39	2,16	1,59	13,04	8h/0Gy	52,55	2,13	2,05	3,15
8h/0,5Gy	130,92	2,17	0,89	7,86	8h/0,5Gy	195,03	2,16	0,81	11,70
8h/2Gy	168,98	2,17	0,72	10,14	8h/2Gy	186,62	2,14	1,87	11,20
24h/0Gy	189,24	2,14	2,12	11,35	24h/0Gy	181,01	2,10	1,91	10,86
24h/0,5Gy	134,02	2,15	0,66	8,04	24h/0,5Gy	155,21	2,10	1,98	9,31
24h/2Gy	143,12	2,15	0,81	8,59	24h/2Gy	180,64	2,09	2,11	10,84
48h/0Gy	107,52	2,19	-16,80	6,45	48h/0Gy	99,09	2,13	1,58	5,95
48h/0,5Gy	105,98	2,18	-17,55	6,36	48h/0,5Gy	73,23	2,11	1,53	4,39
48h/2Gy	110,46	2,16	-28,44	6,63	48h/2Gy	107,40	2,12	2,10	6,44
Proband 7	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 8	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	368,78	2,11	1,58	22,13	0h/0Gy	298,63	2,11	1,79	17,92
0h/0,5Gy	369,89	2,09	2,10	22,19	0h/0,5Gy	269,10	2,11	2,00	16,15
0h/2Gy	371,70	2,11	1,88	22,30	0h/2Gy	271,25	2,11	2,16	16,28
8h/0Gy	302,00	2,12	0,91	18,12	8h/0Gy	223,37	2,08	1,15	13,40
8h/0,5Gy	362,34	2,11	1,95	21,74	8h/0,5Gy	267,88	2,11	1,29	16,07
8h/2Gy	311,21	2,11	1,55	18,67	8h/2Gy	242,72	2,11	1,84	14,56
24h/0Gy	257,28	2,10	1,76	15,44	24h/0Gy	228,99	2,11	1,91	13,74
24h/0,5Gy	350,34	2,10	2,02	21,02	24h/0,5Gy	247,49	2,09	2,00	14,85
24h/2Gy	228,05	2,09	1,41	13,68	24h/2Gy	217,79	2,11	2,09	13,07
48h/0Gy	284,59	2,10	2,15	17,08	48h/0Gy	236,43	2,12	1,66	14,19
48h/0,5Gy	280,59	2,11	2,10	16,84	48h/0,5Gy	216,34	2,11	1,85	12,98
48h/2Gy	253,25	2,12	1,92	15,20	48h/2Gy	234,85	2,11	2,19	14,09

1 von 4

Tabelle 8.1: Ergebnisse der Spektralphotometrie zur Qualitätskontrolle der RNA. Der Quotient aus den gemessenen Absorptionswerten bei 260 und 280 nm bringt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und sollte stets über 1,9 liegen. Darüber hinaus ist zu jeder Probe die RNA-Konzentration (in ng/µl) und die tatsächliche RNA-Menge im jeweiligen „Collection Tube“ (in µg/60µl) angegeben. Die Probanden 9-31 sind auf den folgenden Seiten dargestellt.

Proband 9	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 10*	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	255,70	2,10	2,18	15,34	0h/0Gy	338,94	2,10	2,21	20,34
0h/0,5Gy	269,23	2,11	2,14	16,15	0h/0,5Gy	304,84	2,11	1,40	18,29
0h/2Gy	216,72	2,11	1,68	13,00	0h/2Gy	271,72	2,11	1,93	16,30
8h/0Gy	215,09	2,12	0,43	12,91	8h/0Gy	205,02	2,09	1,27	12,30
8h/0,5Gy	249,69	2,11	1,78	14,98	8h/0,5Gy	179,32	2,10	0,84	10,76
8h/2Gy	179,09	2,08	1,77	10,75	8h/2Gy	210,99	2,11	0,87	12,66
24h/0Gy	151,60	2,10	1,42	9,10	24h/0Gy	196,21	2,11	2,14	11,77
24h/0,5Gy	189,92	2,13	1,65	11,40	24h/0,5Gy	138,72	2,11	0,90	8,32
24h/2Gy	162,35	2,09	1,48	9,74	24h/2Gy	168,42	2,10	1,60	10,11
48h/0Gy	121,25	2,09	1,28	7,28	48h/0Gy	201,18	2,10	2,12	12,07
48h/0,5Gy	129,19	2,10	1,50	7,75	48h/0,5Gy	171,62	2,10	1,90	10,30
48h/2Gy	199,26	2,10	2,10	11,96	48h/2Gy	174,31	2,11	1,81	10,46

Proband 11	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 12	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	350,77	2,08	2,14	21,05	0h/0Gy	125,11	2,10	1,32	7,51
0h/0,5Gy	305,67	2,09	1,58	18,34	0h/0,5Gy	148,91	2,11	1,69	8,93
0h/2Gy	270,31	2,08	1,91	16,22	0h/2Gy	150,76	2,12	1,87	9,05
8h/0Gy	391,77	2,07	2,03	23,51	8h/0Gy	148,23	2,13	2,01	8,89
8h/0,5Gy	322,49	2,09	2,03	19,35	8h/0,5Gy	171,73	2,12	1,98	10,30
8h/2Gy	186,42	2,10	1,49	11,19	8h/2Gy	170,98	2,10	1,86	10,26
24h/0Gy	286,61	2,11	2,18	17,20	24h/0Gy	183,56	2,10	2,23	11,01
24h/0,5Gy	369,25	2,08	2,24	22,16	24h/0,5Gy	130,87	2,17	0,44	7,85
24h/2Gy	355,63	2,09	1,62	21,34	24h/2Gy	189,79	2,13	0,64	11,39
48h/0Gy	240,84	2,11	1,56	14,45	48h/0Gy	160,03	2,12	2,13	9,60
48h/0,5Gy	182,09	2,12	1,78	10,93	48h/0,5Gy	127,65	2,13	1,93	7,66
48h/2Gy	224,39	2,11	2,12	13,46	48h/2Gy	112,84	2,11	1,97	6,77

Proband 13	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 14	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	326,26	2,09	2,11	19,58	0h/0Gy	261,40	2,10	2,03	15,68
0h/0,5Gy	347,27	2,08	2,13	20,84	0h/0,5Gy	308,11	2,09	2,03	18,49
0h/2Gy	246,73	2,11	2,01	14,80	0h/2Gy	229,79	2,12	2,02	13,79
8h/0Gy	156,96	2,11	1,44	9,42	8h/0Gy	132,12	2,09	1,24	7,93
8h/0,5Gy	148,32	2,09	1,43	8,90	8h/0,5Gy	117,51	2,11	1,51	7,05
8h/2Gy	144,15	2,10	1,70	8,65	8h/2Gy	171,48	2,11	1,98	10,29
24h/0Gy	367,36	2,08	2,28	22,04	24h/0Gy	284,13	2,12	1,07	17,05
24h/0,5Gy	289,76	2,10	2,27	17,39	24h/0,5Gy	224,79	2,11	1,18	13,49
24h/2Gy	266,20	2,09	2,24	15,97	24h/2Gy	243,38	2,13	1,55	14,60
48h/0Gy	317,34	2,08	2,14	19,04	48h/0Gy	229,99	2,09	2,19	13,80
48h/0,5Gy	172,48	2,11	1,36	10,35	48h/0,5Gy	246,45	2,10	2,19	14,79
48h/2Gy	281,98	2,09	2,03	16,92	48h/2Gy	184,30	2,10	1,88	11,06

Proband 15	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 16	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	251,39	2,11	1,96	15,08	0h/0Gy	199,91	2,06	1,59	11,99
0h/0,5Gy	271,85	2,11	1,37	16,31	0h/0,5Gy	196,94	2,12	1,09	11,82
0h/2Gy	230,45	2,09	1,60	13,83	0h/2Gy	193,19	2,09	2,08	11,59
8h/0Gy	298,19	2,10	2,13	17,89	8h/0Gy	219,83	2,12	1,51	13,19
8h/0,5Gy	259,48	2,10	2,02	15,57	8h/0,5Gy	208,89	2,09	1,55	12,53
8h/2Gy	228,44	2,09	1,77	13,71	8h/2Gy	153,95	2,10	1,56	9,24
24h/0Gy	296,50	2,11	2,15	17,79	24h/0Gy	197,29	2,12	1,52	11,84
24h/0,5Gy	270,93	2,10	2,15	16,26	24h/0,5Gy	177,61	2,13	0,97	10,66
24h/2Gy	293,83	2,08	1,99	17,63	24h/2Gy	160,06	2,13	0,91	9,60
48h/0Gy	224,71	2,12	2,06	13,48	48h/0Gy	208,94	2,11	2,08	12,54
48h/0,5Gy	206,50	2,11	1,65	12,39	48h/0,5Gy	189,50	2,11	1,64	11,37
48h/2Gy	255,39	2,11	2,11	15,32	48h/2Gy	216,91	2,11	1,79	13,01

2 von 4

Tabelle 8.1 (Fortsetzung): Ergebnisse der Spektralphotometrie zur Qualitätskontrolle der RNA. Der Quotient aus den gemessenen Absorptionswerten bei 260 und 280 nm bringt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und sollte stets über 1,9 liegen. Darüber hinaus ist zu jeder Probe die RNA-Konzentration (in ng/µl) und die tatsächliche RNA-Menge im jeweiligen „Collection Tube“ (in µg/60µl) angegeben.

Proband 17	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 18	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	226,14	2,10	2,06	13,57	0h/0Gy	251,51	2,09	1,93	15,09
0h/0,5Gy	337,79	2,08	2,16	20,27	0h/0,5Gy	256,82	2,08	2,14	15,41
0h/2Gy	204,18	2,09	2,13	12,25	0h/2Gy	252,92	2,09	2,17	15,18
8h/0Gy	214,58	2,10	1,42	12,87	8h/0Gy	281,29	2,10	1,74	16,88
8h/0,5Gy	252,78	2,09	2,17	15,17	8h/0,5Gy	260,81	2,11	1,81	15,65
8h/2Gy	239,98	2,06	1,69	14,40	8h/2Gy	276,32	2,10	1,12	16,58
24h/0Gy	282,15	2,10	1,91	16,93	24h/0Gy	270,34	2,09	2,17	16,22
24h/0,5Gy	226,73	2,13	1,81	13,60	24h/0,5Gy	239,16	2,10	2,17	14,35
24h/2Gy	215,85	2,11	1,87	12,95	24h/2Gy	263,66	2,12	1,75	15,82
48h/0Gy	279,98	2,11	2,07	16,80	48h/0Gy	295,16	2,08	2,15	17,71
48h/0,5Gy	215,50	2,15	0,68	12,93	48h/0,5Gy	262,65	2,11	2,11	15,76
48h/2Gy	270,85	2,11	2,09	16,25	48h/2Gy	237,00	2,13	0,98	14,22
Proband 19	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 20	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	195,86	1,90	1,27	11,75	0h/0Gy	178,42	2,12	1,24	10,71
0h/0,5Gy	217,81	2,11	1,38	13,07	0h/0,5Gy	220,11	2,10	1,54	13,21
0h/2Gy	277,16	2,10	2,01	16,63	0h/2Gy	285,63	2,10	1,70	17,14
8h/0Gy	227,04	2,10	2,23	13,62	8h/0Gy	279,75	2,14	1,08	16,79
8h/0,5Gy	320,29	2,02	1,88	19,22	8h/0,5Gy	292,46	2,12	1,37	17,55
8h/2Gy	334,04	2,14	1,00	20,04	8h/2Gy	285,08	2,14	1,68	17,10
24h/0Gy	204,31	2,27	4,51	12,26	24h/0Gy	216,77	2,24	4,37	13,01
24h/0,5Gy	205,19	2,27	1,88	12,31	24h/0,5Gy	272,64	2,20	2,55	16,36
24h/2Gy	228,29	2,23	2,48	13,70	24h/2Gy	313,31	2,18	2,15	18,80
48h/0Gy	247,70	2,11	1,95	14,86	48h/0Gy	257,39	2,10	2,03	15,44
48h/0,5Gy	215,48	2,12	1,55	12,93	48h/0,5Gy	267,03	2,11	2,07	16,02
48h/2Gy	225,96	2,13	2,02	13,56	48h/2Gy	191,07	2,11	1,49	11,46
Proband 21	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 22	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	247,43	2,12	0,73	14,85	0h/0Gy	255,05	2,10	2,00	15,30
0h/0,5Gy	269,99	2,13	1,26	16,20	0h/0,5Gy	250,10	2,10	2,03	15,01
0h/2Gy	250,21	2,10	2,04	15,01	0h/2Gy	302,83	2,12	1,31	18,17
8h/0Gy	342,85	2,12	2,01	20,57	8h/0Gy	393,65	2,10	1,95	23,62
8h/0,5Gy	291,41	2,37	3,01	17,48	8h/0,5Gy	380,79	2,12	2,05	22,85
8h/2Gy	306,53	2,10	2,40	18,39	8h/2Gy	305,05	2,12	1,87	18,30
24h/0Gy	239,39	2,21	4,07	14,36	24h/0Gy	252,65	2,22	2,32	15,16
24h/0,5Gy	183,01	2,20	2,66	10,98	24h/0,5Gy	239,55	2,23	3,40	14,37
24h/2Gy	201,81	2,25	2,29	12,11	24h/2Gy	243,59	2,25	1,01	14,62
48h/0Gy	218,84	2,13	1,58	13,13	48h/0Gy	186,04	2,14	1,48	11,16
48h/0,5Gy	168,74	2,14	1,35	10,12	48h/0,5Gy	203,50	2,13	2,23	12,21
48h/2Gy	211,15	2,14	1,94	12,67	48h/2Gy	221,97	2,14	2,07	13,32
Proband 23	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl	Proband 24	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	304,70	2,10	1,40	18,28	0h/0Gy	73,20	2,03	1,42	4,39
0h/0,5Gy	320,67	2,10	1,42	19,24	0h/0,5Gy	53,68	1,99	0,47	3,22
0h/2Gy	268,98	2,11	1,73	16,14	0h/2Gy	60,40	2,04	1,02	3,62
8h/0Gy	262,52	2,12	1,56	15,75	8h/0Gy	360,30	2,09	1,92	21,62
8h/0,5Gy	211,76	2,12	1,23	12,71	8h/0,5Gy	200,45	2,09	2,15	12,03
8h/2Gy	202,57	2,12	0,88	12,15	8h/2Gy	230,35	2,10	1,95	13,82
24h/0Gy	252,58	2,11	1,65	15,15	24h/0Gy	180,67	2,11	1,49	10,84
24h/0,5Gy	180,04	2,13	0,76	10,80	24h/0,5Gy	212,57	2,11	1,24	12,75
24h/2Gy	227,90	2,11	1,78	13,67	24h/2Gy	197,66	2,12	2,09	11,86
48h/0Gy	191,19	2,08	2,18	11,47	48h/0Gy	292,97	2,09	2,18	17,58
48h/0,5Gy	184,56	2,11	1,49	11,07	48h/0,5Gy	223,04	2,10	1,95	13,38
48h/2Gy	169,23	2,10	2,18	10,15	48h/2Gy	226,36	2,09	1,83	13,58

3 von 4

Tabelle 8.1 (Fortsetzung): Ergebnisse der Spektralphotometrie zur Qualitätskontrolle der RNA. Der Quotient aus den gemessenen Absorptionswerten bei 260 und 280 nm bringt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und sollte stets über 1,9 liegen. Darüber hinaus ist zu jeder Probe die RNA-Konzentration (in ng/µl) und die tatsächliche RNA-Menge im jeweiligen „Collection Tube“ (in µg/60µl) angegeben.

Proband 25	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	241,07	2,07	1,52	14,46
0h/0,5Gy	211,64	2,07	1,80	12,70
0h/2Gy	222,29	2,09	1,67	13,34
8h/0Gy	235,73	2,12	0,77	14,14
8h/0,5Gy	177,03	2,11	1,90	10,62
8h/2Gy	194,73	2,10	2,05	11,68
24h/0Gy	262,64	2,01	1,22	15,76
24h/0,5Gy	238,49	1,99	1,46	14,31
24h/2Gy	241,23	1,95	1,44	14,47
48h/0Gy	171,74	2,10	2,16	10,30
48h/0,5Gy	162,69	2,09	2,05	9,76
48h/2Gy	192,76	2,10	2,16	11,57

Proband 26	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	227,84	2,08	1,65	13,67
0h/0,5Gy	245,43	2,07	2,08	14,73
0h/2Gy	229,90	2,08	2,09	13,79
8h/0Gy	266,07	2,08	2,09	15,96
8h/0,5Gy	222,84	2,09	1,77	13,37
8h/2Gy	191,44	2,10	1,67	11,49
24h/0Gy	264,10	2,00	1,69	15,85
24h/0,5Gy	97,18	1,90	1,11	5,83
24h/2Gy	152,14	1,94	1,26	9,13
48h/0Gy	273,19	2,08	1,81	16,39
48h/0,5Gy	169,15	2,11	1,66	10,15
48h/2Gy	190,58	2,09	1,67	11,43

Proband 27	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	242,69	2,08	2,02	14,56
0h/0,5Gy	213,44	2,09	1,71	12,81
0h/2Gy	215,78	2,13	1,11	12,95
8h/0Gy	192,07	2,10	1,58	11,52
8h/0,5Gy	154,03	2,10	1,11	9,24
8h/2Gy	339,67	2,06	1,99	20,38
24h/0Gy	216,54	1,95	1,52	12,99
24h/0,5Gy	158,41	1,95	1,33	9,50
24h/2Gy	299,06	2,01	1,50	17,94
48h/0Gy	221,44	2,10	2,11	13,29
48h/0,5Gy	189,92	2,12	1,68	11,40
48h/2Gy	153,09	2,09	1,81	9,19

Proband 28	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	146,00	2,08	2,07	8,76
0h/0,5Gy	176,65	2,10	0,92	10,60
0h/2Gy	160,13	2,09	1,85	9,61
8h/0Gy	119,71	2,09	0,90	7,18
8h/0,5Gy	135,61	2,10	1,93	8,14
8h/2Gy	94,66	2,11	1,75	5,68
24h/0Gy	220,75	1,98	1,60	13,25
24h/0,5Gy	172,72	1,94	1,54	10,36
24h/2Gy	182,31	1,95	1,55	10,94
48h/0Gy	69,47	2,06	1,72	4,17
48h/0,5Gy	227,16	2,09	2,04	13,63
48h/2Gy	198,36	2,11	2,21	11,90

Proband 29	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	68,80	1,99	-1,24	4,13
0h/0,5Gy	101,12	2,00	-2,48	6,07
0h/2Gy	109,37	2,03	-2,92	6,56
8h/0Gy	99,56	1,94	-0,49	5,97
8h/0,5Gy	69,24	1,91	-0,25	4,15
8h/2Gy	90,40	1,95	-0,34	5,42
24h/0Gy	49,05	2,03	-4,29	2,94
24h/0,5Gy	117,14	2,00	-2,62	7,03
24h/2Gy	99,97	2,02	-2,12	6,00
48h/0Gy	81,93	1,98	-1,16	4,92
48h/0,5Gy	53,03	1,96	-0,66	3,18
48h/2Gy	94,71	1,96	-1,47	5,68

Proband 30	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	127,86	2,04	-5,56	7,67
0h/0,5Gy	109,40	2,02	-10,40	6,56
0h/2Gy	109,90	2,03	-2,91	6,59
8h/0Gy	108,89	1,98	-0,41	6,53
8h/0,5Gy	75,93	1,93	-0,28	4,56
8h/2Gy	80,06	1,94	-0,32	4,80
24h/0Gy	183,30	2,06	16,96	11,00
24h/0,5Gy	143,59	2,06	-4,37	8,62
24h/2Gy	145,89	2,04	-5,22	8,75
48h/0Gy	58,77	1,99	-0,77	3,53
48h/0,5Gy	76,22	1,95	-1,23	4,57
48h/2Gy	93,23	1,99	-1,76	5,59

Proband 31	ng/µl	260/280	260/230	µg/60µl
0h/0Gy	102,71	2,02	-2,09	6,16
0h/0,5Gy	97,22	2,03	-2,25	5,83
0h/2Gy	88,16	1,73	-4,15	5,29
8h/0Gy	82,03	1,91	-0,31	4,92
8h/0,5Gy	107,70	1,90	-0,44	6,46
8h/2Gy	116,92	1,92	-0,49	7,02
24h/0Gy	133,97	2,05	1,68	8,04
24h/0,5Gy	117,03	2,03	-6,49	7,02
24h/2Gy	171,41	2,06	2,60	10,28
48h/0Gy	109,80	1,96	-2,00	6,59
48h/0,5Gy	86,39	2,01	-1,57	5,18
48h/2Gy	72,33	1,97	-1,10	4,34

4 von 4

Tabelle 8.1 (Fortsetzung): Ergebnisse der Spektralphotometrie zur Qualitätskontrolle der RNA. Der Quotient aus den gemessenen Absorptionswerten bei 260 und 280 nm bringt Aufschluss über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und sollte stets über 1,9 liegen. Darüber hinaus ist zu jeder Probe die RNA-Konzentration (in ng/µl) und die tatsächliche RNA-Menge im jeweiligen „Collection Tube“ (in µg/60µl) angegeben.

8.2 Auswertung der Standardkurven der RT Q-PCR

Proband	Platte	Steigung	Effizienz in %	Korrelation
1	1	-3,466429	97,15	-0,999733
1	2	-3,422768	97,98	-0,999715
2	1	-3,430431	97,83	-0,999792
2	2	-3,463496	97,21	-0,999887
3	1	-3,436644	97,71	-0,999817
3	2	-3,449661	97,47	-0,999866
4	1	-3,355091	99,32	-0,999683
4	2	-3,346158	99,50	-0,999598
5	1	-3,270152	101,10	-0,999689
5	2	-3,392243	98,57	-0,999796
6	1	-3,456984	97,33	-0,999820
6	2	-3,468635	97,11	-0,999886
7	1	-3,414530	98,14	-0,999955
7	2	-3,371209	98,99	-0,999495
8	1	-3,415112	98,13	-0,999692
8	2	-3,361705	99,18	-0,999859
9	1	-3,445123	97,55	-0,999622
9	2	-3,509355	96,37	-0,999650
10	1	-3,469260	97,10	-0,999645
10	2	-3,416149	98,11	-0,999884
11	1	-3,425916	97,92	-0,999799
11	2	-3,379002	98,84	-0,999592
12	1	-3,370193	99,01	-0,999926
12	2	-3,428424	97,87	-0,999756
13	1	-3,411169	98,20	-0,999830
13	2	-3,353287	99,35	-0,996433
14	1	-3,484815	96,81	-0,999907
14	2	-3,536009	95,89	-0,999405
15	1	-3,414739	98,13	-0,998906
15	2	-3,411021	98,21	-0,999951
16	1	-3,367756	99,06	-0,999655
16	2	-3,460416	97,26	-0,999877
17	1	-3,447001	97,52	-0,999870
17	2	-3,473363	97,02	-0,999880
18	1	-3,447233	97,51	-0,999886
18	2	-3,395491	98,51	-0,999794
19	1	-3,526356	96,06	-0,999762
19	2	-3,402446	98,37	-0,999818
20	1	-3,465173	97,18	-0,999815
20	2	-3,472392	97,04	-0,999903
21	1	-3,404010	98,34	-0,999801
21	2	-3,461532	97,24	-0,999941
22	1	-3,454182	97,38	-0,999749
22	2	-3,406910	98,29	-0,999962
23	1	-3,515400	96,26	-0,999822
23	2	-3,520669	96,16	-0,999939
24	1	-3,421317	98,01	-0,999619
24	2	-3,497255	96,58	-0,999874
25	1	-3,482606	96,85	-0,999737
25	2	-3,493330	96,66	-0,999676
26	1	-3,477575	96,95	-0,999698
26	2	-3,519882	96,18	-0,999714
27	1	-3,494524	96,63	-0,999711
27	2	-3,517851	96,21	-0,999914
28	1	-3,493243	96,66	-0,999894
28	2	-3,488807	96,74	-0,999938
29	1	-3,563685	95,41	-0,999891
29	2	-3,580354	95,12	-0,999515
30	1	-3,421443	98,00	-0,999628
30	2	-3,602942	94,74	-0,999188
31	1	-3,576812	95,18	-0,999805
31	2	-3,577704	95,17	-0,999879

	Steigung	Effizienz in %	Korrelation
Min	-3,602942	94,74	-0,999962
Max	-3,270152	101,10	-0,996433
Ø	-3,451700	97,46	-0,999706
SD	0,064581	1,22	0,000460

Tabelle 8.2: Auflistung der durch die Software des „GeneAmp 5700 Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems Applera automatisch ermittelten Parameter der Standardkurven (Ø = Mittelwert, Max = Maximum, Min = Minimum, SD = Standardabweichung).

8.3 Ergebnisse der normalisierten Genexpression

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13	14	15
ATF3	0,0	0,3	3,9	27,2	13,4	67,5	4,1	18,1	3,1	1,8	12,0	2,0	2,7	4,1	2,1	1,7	2,9
	0,5	0,3	6,8	18,3	17,1	66,3	5,1	15,1	3,2	1,9	10,3	2,7	2,6	5,6	1,5	1,4	3,1
	2,0	0,3	4,2	14,9	32,2	55,4	4,8	16,6	3,5	1,8	15,1	2,9	3,3	5,9	2,0	1,4	3,8
	0,0	8	17,4	58,1	37,5	95,2	6,1	36,4	17,2	13,7	30,1	21,2	14,8	10,1	6,7	9,1	7,2
	0,5	8	22,0	78,9	47,9	94,7	14,8	43,4	56,7	6,8	56,9	26,5	18,8	13,1	12,0	8,7	15,9
	2,0	8	19,3	76,2	73,1	211,1	45,8	45,9	62,9	13,0	53,8	34,7	18,6	17,1	10,6	6,4	19,6
	0,0	24	26,9	88,4	103,7	366,4	43,0	37,2	20,9	1,4	47,4	26,9	12,8	22,2	20,1	27,7	35,3
	0,5	24	29,5	189,5	130,8	269,8	64,8	53,7	60,4	12,0	129,9	75,2	18,9	47,7	43,6	47,2	27,2
	2,0	24	60,2	142,1	115,0	427,8	100,5	68,6	63,4	12,7	187,0	73,3	35,5	51,3	32,5	62,7	56,9
	0,0	48	29,8	125,0	69,3	564,6	10,9	49,6	24,0	2,0	60,0	10,6	15,7	17,4	23,4	70,3	12,8
0,5	48	21,7	103,7	122,9	532,3	29,9	71,8	22,5	15,9	116,3	72,0	18,0	22,2	24,7	97,7	26,1	
2,0	48	68,1	94,5	84,2	452,2	27,8	63,5	25,6	12,4	99,1	87,3	20,7	48,4	22,7	115,4	28,0	
BAX	0,0	0,3	188,9	244,2	219,0	252,7	163,3	183,0	282,6	94,8	173,8	106,7	126,1	137,1	93,5	120,8	100,9
	0,5	0,3	188,2	194,2	186,2	247,4	197,6	171,4	220,7	77,2	151,8	93,4	125,0	135,9	93,2	90,6	111,6
	2,0	0,3	196,9	226,1	199,6	226,9	200,3	182,4	244,0	84,5	197,5	110,8	131,2	102,7	99,5	105,5	119,1
	0,0	8	176,8	184,9	154,5	217,6	150,2	234,1	206,7	83,6	134,0	128,1	110,0	101,5	111,1	150,8	111,1
	0,5	8	170,8	203,1	199,0	203,2	161,6	186,9	292,4	86,9	180,6	124,2	111,9	122,9	134,0	138,7	118,7
	2,0	8	149,2	206,1	230,9	238,2	155,0	157,1	286,7	103,1	196,9	136,0	140,7	107,7	129,0	121,6	125,0
	0,0	24	129,2	114,9	102,6	198,1	115,3	108,3	88,1	27,1	133,3	94,1	98,1	98,9	97,1	99,5	86,4
	0,5	24	155,0	160,4	132,2	158,8	119,9	118,3	83,4	27,3	134,9	114,6	87,2	101,5	96,4	115,8	88,1
	2,0	24	130,3	161,0	168,4	177,4	117,4	125,9	106,6	29,0	168,0	104,8	105,8	93,5	103,4	123,3	96,1
	0,0	48	112,7	91,5	101,2	108,8	98,1	89,6	51,4	21,2	110,0	73,1	64,5	61,9	67,2	74,6	59,1
0,5	48	119,1	105,1	135,4	108,4	97,1	122,9	51,7	20,9	75,7	75,4	82,2	64,8	85,1	86,0	73,1	
2,0	48	142,1	140,8	126,8	112,3	94,2	104,1	60,2	20,1	59,9	74,0	65,9	65,2	69,8	72,3	57,9	
CDKN1A	0,0	0,3	44,4	115,8	50,2	197,7	32,0	62,9	43,6	24,4	59,1	23,1	25,8	43,5	29,3	19,9	22,3
	0,5	0,3	46,2	73,6	51,1	170,9	40,8	58,5	38,7	27,1	48,7	24,7	26,7	39,0	25,9	17,5	28,3
	2,0	0,3	39,3	73,1	39,7	129,9	39,2	66,8	45,6	27,9	67,2	23,8	28,3	23,5	26,7	16,9	33,4
	0,0	8	91,6	181,8	125,9	438,5	32,6	216,2	79,5	56,3	80,8	66,1	44,4	32,4	40,0	48,9	34,3
	0,5	8	102,3	290,3	235,8	476,5	72,3	213,2	173,7	47,6	160,5	86,2	54,4	42,5	65,8	43,6	52,4
	2,0	8	110,4	341,6	341,5	815,2	199,4	228,5	217,8	63,3	168,4	88,4	79,4	54,4	68,2	41,5	79,7
	0,0	24	117,1	201,0	152,5	956,0	60,4	223,0	86,0	9,1	137,3	88,2	57,1	58,3	57,9	64,6	81,1
	0,5	24	101,2	281,3	155,5	496,7	172,1	135,4	209,6	41,2	406,1	228,5	69,1	99,8	99,8	114,2	67,0
	2,0	24	169,7	301,6	175,0	554,8	279,3	184,5	196,8	35,0	407,6	198,2	103,0	93,1	79,7	115,9	141,8
	0,0	48	49,0	112,7	65,9	324,2	12,9	106,6	53,1	6,2	93,9	27,3	36,5	23,9	35,9	71,1	20,5
0,5	48	34,7	76,7	86,9	249,3	42,0	103,7	42,7	31,5	147,7	121,2	43,0	33,4	47,5	95,1	38,7	
2,0	48	113,1	107,7	89,6	227,7	40,3	108,7	55,4	26,1	142,1	131,3	50,5	66,8	45,0	129,9	50,9	
DDB2	0,0	0,3	22,1	25,0	22,7	27,3	33,0	26,1	36,0	11,7	31,9	11,9	19,5	28,6	15,4	16,4	16,8
	0,5	0,3	25,3	17,0	21,9	26,7	29,6	24,1	26,3	11,0	26,1	13,3	22,3	25,0	13,9	11,9	16,2
	2,0	0,3	21,7	21,7	22,7	23,1	31,6	24,3	31,5	12,3	32,2	12,5	20,5	15,0	13,6	13,4	17,5
	0,0	8	19,5	15,8	15,8	18,9	22,4	25,1	25,5	12,4	19,8	15,3	17,6	14,6	15,6	20,0	14,2
	0,5	8	18,3	17,6	20,0	19,4	26,2	19,0	34,0	14,5	28,3	14,6	16,5	13,7	20,8	19,3	15,4
	2,0	8	20,4	19,2	29,6	26,6	27,4	20,0	33,3	16,0	33,7	17,4	20,1	14,6	19,9	17,0	16,7
	0,0	24	15,0	14,4	12,1	22,5	17,5	14,1	10,3	3,3	20,5	10,8	12,1	17,2	13,3	11,4	11,9
	0,5	24	18,0	13,7	14,0	14,9	18,8	13,8	9,6	3,4	19,2	16,5	11,3	16,5	14,0	13,1	12,3
	2,0	24	17,8	13,5	17,0	17,8	17,5	16,0	11,8	3,4	23,7	13,8	13,3	12,9	13,8	14,4	11,7
	0,0	48	16,9	13,5	16,0	14,1	19,0	15,7	8,4	3,3	22,0	10,7	11,8	12,1	12,1	10,3	9,7
0,5	48	17,3	16,2	16,7	11,4	21,1	20,1	10,0	4,0	16,1	10,9	14,3	13,1	15,2	12,7	12,4	
2,0	48	22,6	24,5	17,6	15,0	19,3	18,0	10,8	3,2	10,9	9,1	13,3	12,1	13,3	11,3	8,9	
GADD45A	0,0	0,3	5,9	6,8	5,1	10,1	7,5	7,3	11,4	4,4	4,7	6,3	8,0	9,8	5,2	5,8	5,6
	0,5	0,3	6,0	7,0	6,2	8,5	7,3	6,1	10,5	4,3	5,4	7,0	7,8	8,1	5,0	5,2	5,4
	2,0	0,3	6,5	6,6	7,0	8,7	7,1	6,4	10,1	4,2	7,8	7,4	8,3	4,0	5,3	4,9	6,9
	0,0	8	6,1	9,9	8,8	13,7	5,1	12,0	10,3	5,9	5,2	10,9	8,0	5,3	6,6	9,6	5,3
	0,5	8	7,1	16,7	22,7	22,7	9,8	38,2	26,8	6,3	20,3	16,1	15,8	21,5	11,0	12,2	8,4
	2,0	8	8,3	33,1	32,7	51,5	23,5	53,1	26,9	9,0	15,0	39,4	25,9	22,3	13,5	11,8	10,3
	0,0	24	3,5	4,4	6,3	51,3	4,9	11,4	9,3	1,3	6,5	7,3	10,0	4,1	5,2	5,6	5,4
	0,5	24	4,9	13,1	7,7	35,7	8,7	23,8	14,9	2,4	19,7	18,3	15,3	6,7	6,4	8,4	7,3
	2,0	24	10,4	16,7	10,4	64,1	13,1	31,4	26,4	2,9	17,8	19,2	18,6	6,3	6,4	8,7	8,8
	0,0	48	3,0	5,1	4,7	48,9	2,6	8,5	9,2	0,9	6,4	4,2	7,1	3,2	3,5	4,7	4,0
0,5	48	3,3	5,8	7,8	61,1	5,5	22,7	9,5	2,5	14,1	21,0	16,3	5,3	6,0	7,6	6,2	
2,0	48	10,1	8,4	10,6	61,2	6,8	25,2	9,9	2,2	21,3	41,6	12,1	7,2	6,0	9,7	6,9	
PCNA	0,0	0,3	37,9	42,3	41,1	40,8	49,8	45,1	69,0	21,6	45,9	26,5	37,0	47,6	28,8	29,6	31,6
	0,5	0,3	37,8	34,5	47,7	41,0	46,9	37,8	56,0	21,8	37,6	23,7	40,8	41,4	23,1	24,1	32,0
	2,0	0,3	38,1	39,6	43,9	33,8	43,7	36,0	57,2	21,1	48,2	24,4	43,8	23,4	23,3	25,6	29,6
	0,0	8	30,8	22,8	23,8	25,6	36,7	28,1	44,7	16,7	30,9	28,8	31,7	25,5	26,8	38,6	26,2
	0,5	8	31,7	31,9	34,6	26,9	39,4	27,8	54,6	19,0	37,1	26,4	30,0	23,5	32,8	35,2	25,7
	2,0	8	33,5	33,6	65,7	41,4	40,7	33,1	52,4	21,8	52,0	25,0	45,9	26,4	33,8	27,9	29,2
	0,0	24	24,6	20,8	14,6	24,2	26,6	23,6	18,3	6,8	33,0	21,2	23,8	21,9	17,8	18,8	17,8
	0,5	24	29,1	13,0	18,1	17,1	28,6	19,5	12,7	4,9	25,3	20,3	22,2	22,5	17,1	23,9	19,3
	2,0	24	18,7	15,8	22,1	20,2	24,1	22,4	15,6	5,2	31,3	19,1	26,4	22,6	19,4	21,0	19,1
	0,0	48	21,1	8,6	14,4	10,1	21,5	16,3	12,4	5,0	23,4	17,7	14,9	12,2	9,9	12,1	11,6
0,5	48	24,5	14,1	13,0	7,4	15,6	11,0	9,0	4,3	10,1	12,3	21,2	14,3	14,5	13,7	16,0	
2,0	48	13,4	23,4	14,5	8,1	15,4	12,6	10,6	3,5	9,9	11,3	16,1	15,6	13,0	13,4	11,1	

Tabelle 8.3: Normalisierte Genexpression der Probanden 1-15 (alle Werte mit Faktor 1000 multipliziert, D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h, Proband 10* ist nur zu Vergleichszwecken aufgeführt).

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
ATF3	0,0	0,3	2,1	3,2	1,5	2,3	3,7	2,6	2,2	2,3	3,0	1,8	1,2	1,1	1,2	2,7	1,9	1,1
	0,5	0,3	2,4	3,0	2,0	2,6	3,2	2,4	1,8	2,6	4,0	2,3	1,2	1,9	1,1	3,5	1,7	1,2
	2,0	0,3	2,2	3,7	2,1	2,3	2,8	2,7	1,6	3,2	2,9	2,3	1,7	1,7	1,2	2,8	1,7	1,8
	0,0	8	6,9	22,6	3,9	22,2	24,6	29,0	12,2	4,6	6,1	7,5	4,6	2,5	3,8	8,3	4,8	2,7
	0,5	8	9,1	14,5	6,7	32,2	18,4	30,0	12,1	3,6	4,8	8,2	4,6	3,2	3,0	7,3	4,5	2,5
	2,0	8	11,0	13,8	6,3	25,2	25,4	32,9	9,4	2,8	6,6	7,9	4,3	4,6	3,7	8,7	3,7	4,2
	0,0	24	27,5	50,8	19,1	32,0	43,0	23,2	22,4	5,6	8,2	16,0	11,1	7,9	6,0	10,5	19,3	16,5
	0,5	24	54,1	49,6	25,2	59,0	34,0	42,9	33,4	8,6	18,1	25,7	27,6	16,3	16,2	12,3	26,4	14,4
	2,0	24	69,4	58,9	32,4	40,4	41,8	38,2	21,2	8,5	26,7	13,1	14,3	11,2	7,7	18,8	39,3	13,1
	0,0	48	15,1	24,5	8,0	36,9	15,3	44,0	16,5	18,0	12,1	49,6	39,1	27,2	25,6	45,6	40,7	29,4
0,5	48	28,0	24,3	14,6	25,7	27,5	53,2	18,5	20,0	16,6	36,9	75,7	17,9	29,0	32,8	66,6	23,1	
2,0	48	29,2	21,2	14,9	18,1	28,3	40,8	8,2	27,7	13,1	24,6	41,8	18,7	14,7	19,4	40,8	17,9	
BAX	0,0	0,3	115,8	125,0	98,1	108,1	121,2	113,0	101,9	125,5	202,4	121,2	115,2	133,0	146,1	135,4	114,7	116,6
	0,5	0,3	122,0	126,8	92,5	107,0	114,6	112,7	96,1	130,3	236,6	136,8	144,6	139,2	109,8	158,3	122,0	92,8
	2,0	0,3	99,8	129,9	92,2	95,7	95,5	110,0	82,1	129,9	201,7	120,8	126,8	123,1	103,7	127,6	110,4	120,8
	0,0	8	132,6	144,3	98,4	106,0	111,1	108,5	91,3	96,4	78,3	113,9	120,6	125,4	130,3	134,9	116,7	113,9
	0,5	8	146,2	132,9	111,9	114,8	111,1	125,7	88,1	109,6	104,0	170,2	142,7	132,1	148,7	173,2	130,8	105,1
	2,0	8	134,9	132,2	108,1	111,1	90,7	108,6	80,5	99,1	103,0	145,6	124,1	126,1	129,0	175,6	133,1	100,5
	0,0	24	92,3	106,2	74,1	67,5	88,4	68,9	75,1	80,8	106,3	115,0	125,0	125,0	113,5	131,7	182,4	138,2
	0,5	24	113,1	101,9	74,3	84,8	87,5	94,4	81,9	85,4	116,3	125,9	129,0	123,3	121,2	113,8	171,4	124,1
	2,0	24	101,2	107,0	73,6	64,5	100,8	69,2	73,5	89,7	107,3	138,2	168,3	105,3	114,0	109,6	175,0	127,2
	0,0	48	61,5	63,2	57,3	47,7	72,3	67,5	69,1	62,5	78,1	129,9	95,1	111,1	129,0	107,3	110,1	105,5
0,5	48	65,2	72,8	60,7	59,4	83,6	71,8	61,1	80,8	74,1	150,7	111,9	102,6	102,6	117,1	89,1	117,0	
2,0	48	65,2	66,1	56,7	50,8	81,6	58,5	54,0	73,6	83,6	130,3	103,3	126,9	101,3	92,8	87,2	115,9	
CDKN1A	0,0	0,3	30,0	24,4	17,6	19,5	36,0	27,4	20,6	20,3	38,3	15,5	13,8	21,0	16,6	18,0	16,7	21,1
	0,5	0,3	33,9	21,7	14,5	20,8	30,2	28,6	18,2	19,1	36,8	18,8	16,5	22,6	15,4	26,5	17,8	18,3
	2,0	0,3	26,8	22,7	14,5	16,7	26,3	23,3	17,0	22,8	23,2	15,0	14,8	21,6	12,8	21,6	16,0	24,9
	0,0	8	43,0	70,8	20,8	118,7	107,7	165,0	66,3	22,2	27,8	24,3	23,4	20,6	26,7	29,7	25,1	22,0
	0,5	8	53,3	51,5	29,1	171,9	92,2	151,8	66,5	23,3	27,2	30,8	24,7	28,9	25,2	30,3	23,4	23,2
	2,0	8	64,7	60,6	30,1	141,7	158,8	157,9	61,7	19,4	42,0	26,8	20,3	29,3	26,1	29,0	19,8	24,8
	0,0	24	80,6	143,6	69,4	112,3	185,6	113,1	99,1	22,6	32,5	37,3	28,4	29,1	24,2	35,8	59,1	52,0
	0,5	24	153,4	116,2	86,6	152,7	124,2	161,6	102,0	25,7	54,3	47,1	53,9	58,1	59,6	39,2	58,3	57,8
	2,0	24	175,8	133,7	100,2	95,4	143,2	129,9	62,2	23,5	84,8	33,0	35,6	38,9	27,7	50,2	73,2	46,1
	0,0	48	26,0	34,0	17,5	72,0	35,5	99,8	35,3	26,9	19,0	58,3	39,1	30,7	49,9	50,8	40,2	35,0
0,5	48	39,8	34,6	28,4	46,4	61,4	106,2	37,4	31,8	24,2	44,9	68,7	30,9	49,9	37,8	59,6	36,3	
2,0	48	67,7	38,8	41,1	42,0	76,2	85,7	27,4	48,5	37,4	48,0	57,1	38,7	29,5	36,8	52,6	34,7	
DDB2	0,0	0,3	14,6	17,1	14,8	17,2	19,4	21,5	13,6	17,7	27,5	9,2	16,5	17,1	18,7	11,6	17,7	16,2
	0,5	0,3	14,0	16,8	13,5	17,0	17,7	20,6	12,0	15,9	31,1	10,4	17,9	15,1	13,3	15,5	19,3	12,7
	2,0	0,3	11,2	15,9	14,4	13,1	14,1	17,6	10,1	15,6	24,3	8,3	11,8	17,3	13,0	12,8	17,0	14,8
	0,0	8	13,4	17,6	13,5	14,3	14,4	15,9	10,1	13,6	10,9	7,9	16,2	15,5	15,7	11,4	16,7	15,6
	0,5	8	14,7	17,3	15,2	16,3	17,7	19,7	11,5	15,7	16,3	12,3	18,5	17,3	17,3	15,0	20,3	15,6
	2,0	8	16,6	16,8	14,5	16,5	14,2	19,0	10,3	13,9	13,5	10,4	18,6	18,3	16,2	14,3	19,7	16,4
	0,0	24	12,8	15,3	9,4	10,1	11,4	12,5	9,1	11,7	15,1	11,2	18,7	19,3	14,3	16,1	27,7	20,6
	0,5	24	15,5	13,5	10,6	11,2	11,2	15,4	9,1	12,1	16,0	10,9	19,2	16,2	16,0	15,2	25,4	22,2
	2,0	24	13,0	14,8	10,7	10,9	13,8	11,8	8,0	11,8	11,8	10,1	22,5	15,1	13,9	13,2	25,5	18,9
	0,0	48	8,2	11,9	10,3	9,8	12,1	10,8	9,3	11,2	10,2	10,3	13,5	16,1	15,8	9,0	16,0	16,7
0,5	48	9,2	13,7	10,6	11,2	12,1	13,8	8,6	14,6	12,2	14,3	14,7	17,1	14,8	11,7	14,4	19,0	
2,0	48	10,3	12,5	11,4	11,3	14,3	10,4	7,8	12,9	14,1	11,7	18,1	20,5	13,7	9,6	15,6	19,0	
GADD45A	0,0	0,3	10,0	7,9	4,4	7,9	8,0	7,9	5,5	8,3	14,6	5,9	6,0	7,8	6,0	6,6	9,4	5,7
	0,5	0,3	8,4	6,2	4,2	6,9	6,8	6,8	6,1	8,4	8,9	5,8	7,6	5,5	4,6	9,4	9,9	5,9
	2,0	0,3	7,2	6,9	4,0	6,1	5,7	6,0	4,7	9,8	8,5	4,9	6,8	5,0	4,7	6,6	9,4	7,2
	0,0	8	9,1	11,2	4,6	6,6	4,9	7,8	4,8	7,3	4,3	5,0	7,9	5,4	6,0	6,9	7,6	5,9
	0,5	8	17,2	8,7	7,0	8,9	8,0	13,5	6,4	8,9	6,7	10,1	13,4	8,0	9,0	11,8	10,5	6,4
	2,0	8	16,4	12,6	14,7	10,2	10,3	12,3	7,9	7,6	6,7	10,6	12,9	7,3	9,9	11,9	9,9	7,3
	0,0	24	9,7	6,5	5,5	4,8	8,6	6,5	4,5	4,3	4,3	5,0	5,5	3,6	3,5	4,5	11,5	6,6
	0,5	24	14,8	8,2	5,4	5,2	7,2	11,3	5,8	5,4	5,9	6,4	8,8	9,0	7,6	5,9	13,1	7,7
	2,0	24	15,7	9,5	7,4	5,2	8,6	9,2	4,6	5,5	6,3	7,8	11,7	6,4	5,3	5,6	13,7	7,1
	0,0	48	3,8	3,7	2,8	4,3	4,3	6,9	3,6	4,7	2,4	7,3	5,8	4,4	5,3	6,1	6,5	5,2
0,5	48	6,5	5,1	4,5	5,1	7,9	10,9	4,5	7,7	3,4	8,8	13,4	7,8	11,0	8,4	11,3	9,0	
2,0	48	8,0	5,8	6,5	4,5	11,4	10,0	3,6	10,0	6,8	10,6	12,8	12,1	7,8	8,4	9,4	11,7	
PCNA	0,0	0,3	32,0	33,1	35,7	36,9	40,8	37,9	32,9	41,4	42,6	29,5	33,5	36,0	30,3	27,9	29,8	30,0
	0,5	0,3	28,4	30,9	32,6	38,0	34,1	35,7	30,7	35,6	37,0	32,5	34,8	29,8	22,9	38,8	30,4	21,5
	2,0	0,3	24,1	30,5	30,2	29,2	28,5	32,5	25,0	41,4	35,5	27,7	34,4	30,7	22,4	33,1	29,4	26,7
	0,0	8	26,2	29,7	27,1	27,0	25,9	25,0	25,5	24,2	21,5	22,9	26,6	26,2	24,5	25,7	26,1	24,5
	0,5	8	35,7	27,8	30,3	29,8	33,3	33,0	24,5	26,2	30,7	37,1	34,6	31,7	28,1	35,4	28,7	23,9
	2,0	8	33,3	30,7	32,3	28,7	24,3	29,9	26,1	21,5	29,9	32,8	33,2	28,8	25,7	33,2	28,5	23,9
	0,0	24	20,9	23,4	17,9	21,2	22,8	20,9	21,3	20,4	32,2	28,8	28,3	29,4	24,6	23,8	31,6	27,8
	0,5	24	23,8	21,9	19,8	20,3	21,8	26,5	19,8	20,3	33,3	22,0	22,0	20,6	20,1	22,6	31,3	27,8
	2,0	24	24,1	24,4	20,4	20,2	24,7	17,7	18,9	21,6	25,2	28,7	29,8	23,6	23,2	20,2	29,9	28,9
	0,0	48	11,7	12,9	14,6	14,5	19,8	16,4	15,8	15,7	20,3	22,3	16,2	18,5	18,7	17,8	18,9	21,2
0,5	48	15,3	16,2	16,7	19,7	20,5	21,3	15,2	20,4	23,4	32,2	18,7	14,1	15,4	22,9	18,0	21,3	
2,0	48	13,9	13,8	15,0	17,5	21,3	16,1	15,1	16,1	21,6	23,5	17,6	17,2	14,8	16,8	16,5	18,5	

Tabelle 8.3 (Fortsetzung): Normalisierte Genexpression der Probanden 16-31 (alle Werte mit Faktor 1000 multipliziert, D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h).

8.4 Ergebnisse der differentiellen Genexpression

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13	14	15
ATF3	0,5	0,3	1,75	0,67	1,28	0,98	1,26	0,83	1,01	1,06	0,85	1,37	0,99	1,37	0,74	0,80	1,09
	2,0	0,3	1,09	0,55	2,41	0,82	1,19	0,91	1,13	1,00	1,26	1,48	1,25	1,44	1,00	0,83	1,32
	0,5	8	1,27	1,36	1,28	1,00	2,44	1,19	3,29	0,50	1,89	1,25	1,27	1,30	1,78	0,96	2,19
	2,0	8	1,11	1,31	1,95	2,22	7,54	1,26	3,65	0,95	1,79	1,64	1,26	1,70	1,57	0,70	2,70
	0,5	24	1,09	2,14	1,26	0,74	1,51	1,44	2,89	8,26	2,74	2,80	1,48	2,15	2,17	1,70	0,77
	2,0	24	2,24	1,61	1,11	1,17	2,34	1,85	3,03	8,80	3,95	2,73	2,77	2,31	1,62	2,26	1,61
	0,5	48	0,73	0,83	1,77	0,94	2,75	1,45	0,94	7,78	1,94	6,80	1,14	1,28	1,06	1,39	2,04
	2,0	48	2,28	0,76	1,21	0,80	2,56	1,28	1,06	6,09	1,65	8,24	1,32	2,78	0,97	1,64	2,19
BAX	0,5	0,3	1,00	0,80	0,85	0,98	1,21	0,94	0,78	0,81	0,87	0,88	0,99	0,99	1,00	0,75	1,11
	2,0	0,3	1,04	0,93	0,91	0,90	1,23	1,00	0,86	0,89	1,14	1,04	1,04	0,75	1,06	0,87	1,18
	0,5	8	0,97	1,10	1,29	0,93	1,08	0,80	1,41	1,04	1,35	0,97	1,02	1,21	1,21	0,92	1,07
	2,0	8	0,84	1,11	1,49	1,09	1,03	0,67	1,39	1,23	1,47	1,06	1,28	1,06	1,16	0,81	1,13
	0,5	24	1,20	1,40	1,29	0,80	1,04	1,09	0,95	1,01	1,01	1,22	0,89	1,03	0,99	1,16	1,02
	2,0	24	1,01	1,40	1,64	0,90	1,02	1,16	1,21	1,07	1,26	1,11	1,08	0,95	1,06	1,24	1,11
	0,5	48	1,06	1,15	1,34	1,00	0,99	1,37	1,01	0,99	0,69	1,03	1,27	1,05	1,27	1,15	1,24
	2,0	48	1,26	1,54	1,25	1,03	0,96	1,16	1,17	0,95	0,55	1,01	1,02	1,05	1,04	0,97	0,98
CDKN1A	0,5	0,3	1,04	0,64	1,02	0,86	1,27	0,93	0,89	1,11	0,82	1,07	1,03	0,90	0,88	0,88	1,27
	2,0	0,3	0,89	0,63	0,79	0,66	1,22	1,06	1,05	1,14	1,14	1,03	1,09	0,54	0,91	0,85	1,50
	0,5	8	1,12	1,60	1,87	1,09	2,22	0,99	2,19	0,85	1,99	1,30	1,23	1,31	1,65	0,89	1,53
	2,0	8	1,21	1,88	2,71	1,86	6,12	1,06	2,74	1,12	2,08	1,34	1,79	1,68	1,71	0,85	2,32
	0,5	24	0,86	1,40	1,02	0,52	2,85	0,61	2,44	4,51	2,96	2,59	1,21	1,71	1,72	1,77	0,83
	2,0	24	1,45	1,50	1,15	0,58	4,63	0,83	2,29	3,84	2,97	2,25	1,80	1,60	1,38	1,79	1,75
	0,5	48	0,71	0,68	1,32	0,77	3,25	0,97	0,80	5,11	1,57	4,44	1,18	1,39	1,32	1,34	1,89
	2,0	48	2,31	0,96	1,36	0,70	3,11	1,02	1,04	4,24	1,51	4,81	1,38	2,79	1,25	1,83	2,49
DDB2	0,5	0,3	1,14	0,68	0,97	0,98	0,90	0,92	0,73	0,94	0,82	1,12	1,14	0,88	0,90	0,73	0,96
	2,0	0,3	0,98	0,87	1,00	0,85	0,96	0,93	0,87	1,05	1,01	1,05	1,05	0,53	0,89	0,82	1,04
	0,5	8	0,94	1,11	1,26	1,02	1,17	0,76	1,33	1,17	1,43	0,96	0,94	0,94	1,34	0,97	1,08
	2,0	8	1,05	1,21	1,87	1,41	1,22	0,80	1,31	1,29	1,70	1,14	1,14	1,00	1,28	0,85	1,18
	0,5	24	1,19	0,95	1,15	0,66	1,07	0,98	0,93	1,02	0,94	1,52	0,94	0,96	1,06	1,15	1,03
	2,0	24	1,18	0,93	1,40	0,79	1,00	1,13	1,15	1,03	1,16	1,28	1,10	0,75	1,04	1,26	0,98
	0,5	48	1,02	1,21	1,04	0,81	1,11	1,28	1,19	1,21	0,73	1,02	1,22	1,08	1,25	1,23	1,28
	2,0	48	1,33	1,82	1,10	1,06	1,01	1,14	1,28	0,97	0,50	0,85	1,13	1,00	1,10	1,10	0,92
GADD45A	0,5	0,3	1,02	1,02	1,23	0,85	0,97	0,84	0,92	0,96	1,15	1,10	0,98	0,82	0,97	0,89	0,97
	2,0	0,3	1,11	0,97	1,38	0,86	0,94	0,88	0,89	0,95	1,65	1,16	1,03	0,40	1,03	0,85	1,22
	0,5	8	1,16	1,68	2,59	1,66	1,92	3,20	2,61	1,07	3,93	1,49	1,99	4,03	1,66	1,27	1,60
	2,0	8	1,35	3,34	3,73	3,77	4,60	4,44	2,62	1,53	2,90	3,63	3,26	4,17	2,05	1,23	1,95
	0,5	24	1,40	2,98	1,23	0,70	1,77	2,09	1,60	1,80	3,04	2,51	1,52	1,65	1,22	1,49	1,36
	2,0	24	3,00	3,79	1,65	1,25	2,65	2,75	2,82	2,14	2,74	2,63	1,85	1,56	1,23	1,54	1,65
	0,5	48	1,10	1,14	1,67	1,25	2,12	2,68	1,03	2,66	2,18	5,01	2,29	1,64	1,74	1,63	1,55
	2,0	48	3,39	1,66	2,28	1,25	2,65	2,97	1,08	2,34	3,30	9,93	1,70	2,24	1,75	2,06	1,73
PCNA	0,5	0,3	1,00	0,82	1,16	1,00	0,94	0,84	0,81	1,01	0,82	0,89	1,10	0,87	0,80	0,81	1,01
	2,0	0,3	1,01	0,94	1,07	0,83	0,88	0,80	0,83	0,98	1,05	0,92	1,18	0,49	0,81	0,87	0,94
	0,5	8	1,03	1,40	1,45	1,05	1,08	0,99	1,22	1,13	1,20	0,92	0,95	0,92	1,22	0,91	0,98
	2,0	8	1,09	1,47	2,76	1,62	1,11	1,18	1,17	1,30	1,68	0,87	1,45	1,03	1,26	0,72	1,11
	0,5	24	1,18	0,62	1,24	0,70	1,08	0,83	0,69	0,72	0,77	0,96	0,93	1,03	0,96	1,27	1,08
	2,0	24	0,76	0,76	1,51	0,83	0,91	0,95	0,85	0,76	0,95	0,90	1,11	1,03	1,09	1,11	1,07
	0,5	48	1,16	1,64	0,90	0,73	0,72	0,67	0,73	0,85	0,43	0,70	1,42	1,17	1,47	1,13	1,38
	2,0	48	0,64	2,73	1,01	0,81	0,71	0,77	0,86	0,69	0,43	0,64	1,08	1,28	1,31	1,11	0,96

Tabelle 8.4: Differentielle Genexpression der Probanden 1-15 (D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h, Proband 10* ist nur zu Vergleichszwecken aufgeführt).

PPD	D [Gy]	t p.r. [h]	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
ATF3	0,5	0,3	1,14	0,93	1,30	1,13	0,86	0,91	0,84	1,14	1,36	1,31	1,01	1,74	0,95	1,30	0,90	1,04
	2,0	0,3	1,06	1,14	1,35	1,01	0,77	1,05	0,73	1,39	0,98	1,28	1,38	1,55	1,02	1,06	0,90	1,56
	0,5	8	1,32	0,64	1,74	1,45	0,75	1,03	1,00	0,79	0,78	1,10	0,99	1,31	0,79	0,88	0,93	0,93
	2,0	8	1,59	0,61	1,62	1,14	1,03	1,13	0,77	0,61	1,08	1,06	0,93	1,88	0,98	1,04	0,77	1,57
	0,5	24	1,97	0,98	1,32	1,85	0,79	1,85	1,49	1,53	2,22	1,61	2,49	2,06	2,70	1,17	1,37	0,87
	2,0	24	2,52	1,16	1,69	1,26	0,97	1,65	0,95	1,53	3,26	0,82	1,29	1,41	1,29	1,79	2,03	0,80
	0,5	48	1,85	0,99	1,82	0,70	1,80	1,21	1,12	1,11	1,37	0,75	1,93	0,66	1,13	0,72	1,64	0,79
2,0	48	1,93	0,87	1,85	0,49	1,85	0,93	0,50	1,54	1,08	0,50	1,07	0,68	0,58	0,43	1,00	0,61	
BAX	0,5	0,3	1,05	1,01	0,94	0,99	0,95	1,00	0,94	1,04	1,17	1,13	1,25	1,05	0,75	1,17	1,06	0,80
	2,0	0,3	0,86	1,04	0,94	0,89	0,79	0,97	0,81	1,03	1,00	1,00	1,10	0,92	0,71	0,94	0,96	1,04
	0,5	8	1,10	0,92	1,14	1,08	1,00	1,16	0,97	1,14	1,33	1,49	1,18	1,05	1,14	1,28	1,12	0,92
	2,0	8	1,02	0,92	1,10	1,05	0,82	1,00	0,88	1,03	1,31	1,28	1,03	1,00	0,99	1,30	1,14	0,88
	0,5	24	1,22	0,96	1,00	1,26	0,99	1,37	1,09	1,06	1,09	1,09	1,03	0,99	1,07	0,86	0,94	0,90
	2,0	24	1,10	1,01	0,99	0,96	1,14	1,00	0,98	1,11	1,01	1,20	1,35	0,84	1,00	0,83	0,96	0,92
	0,5	48	1,06	1,15	1,06	1,24	1,16	1,06	0,88	1,29	0,95	1,16	1,18	0,92	0,80	1,09	0,81	1,11
2,0	48	1,06	1,05	0,99	1,06	1,13	0,87	0,78	1,18	1,07	1,00	1,09	1,14	0,78	0,86	0,79	1,10	
CDKN1A	0,5	0,3	1,13	0,89	0,82	1,07	0,84	1,04	0,89	0,94	0,96	1,21	1,20	1,08	0,93	1,47	1,06	0,86
	2,0	0,3	0,89	0,93	0,82	0,86	0,73	0,85	0,83	1,13	0,61	0,97	1,08	1,03	0,77	1,20	0,96	1,18
	0,5	8	1,24	0,73	1,40	1,45	0,86	0,92	1,00	0,98	1,27	1,05	1,40	0,94	1,02	0,93	1,06	1,06
	2,0	8	1,50	0,86	1,45	1,19	1,47	0,96	0,93	0,88	1,51	1,11	0,86	1,42	0,98	0,98	0,79	1,13
	0,5	24	1,90	0,81	1,25	1,36	0,67	1,43	1,03	1,14	1,67	1,26	1,90	2,00	2,46	1,09	0,99	1,11
	2,0	24	2,18	0,93	1,44	0,85	0,77	1,15	0,63	1,04	2,61	0,89	1,25	1,34	1,14	1,40	1,24	0,89
	0,5	48	1,53	1,02	1,62	0,64	1,73	1,06	1,06	1,18	1,27	0,77	1,76	1,01	1,00	0,74	1,48	1,03
2,0	48	2,60	1,14	2,35	0,58	2,14	0,86	0,78	1,80	1,97	0,82	1,46	1,26	0,59	0,72	1,31	0,99	
DDB2	0,5	0,3	0,96	0,98	0,91	0,99	0,91	0,96	0,89	0,90	1,13	1,13	1,08	0,88	0,71	1,33	1,09	0,79
	2,0	0,3	0,77	0,93	0,97	0,76	0,73	0,82	0,74	0,88	0,88	0,90	0,71	1,01	0,69	1,10	0,96	0,91
	0,5	8	1,10	0,98	1,12	1,14	1,23	1,24	1,14	1,16	1,50	1,56	1,14	1,12	1,10	1,31	1,21	1,00
	2,0	8	1,24	0,95	1,07	1,15	0,99	1,20	1,03	1,02	1,24	1,33	1,15	1,19	1,03	1,25	1,18	1,05
	0,5	24	1,21	0,88	1,13	1,11	0,98	1,23	0,99	1,04	1,06	0,97	1,03	0,84	1,12	0,94	0,92	1,08
	2,0	24	1,01	0,97	1,14	1,09	1,21	0,95	0,87	1,01	0,78	0,90	1,20	0,78	0,98	0,82	0,92	0,92
	0,5	48	1,13	1,15	1,03	1,15	1,00	1,28	0,93	1,31	1,19	1,39	1,09	1,06	0,93	1,30	0,90	1,14
2,0	48	1,26	1,05	1,10	1,15	1,18	0,96	0,84	1,15	1,38	1,14	1,34	1,27	0,86	1,07	0,97	1,13	
GADD45A	0,5	0,3	0,84	0,79	0,95	0,87	0,85	0,86	1,11	1,02	0,61	0,97	1,27	0,71	0,77	1,42	1,06	1,03
	2,0	0,3	0,72	0,87	0,91	0,77	0,71	0,75	0,85	1,19	0,58	0,83	1,13	0,64	0,78	1,00	1,00	1,25
	0,5	8	1,89	0,78	1,55	1,34	1,62	1,73	1,34	1,22	1,55	2,03	1,69	1,48	1,49	1,71	1,38	1,08
	2,0	8	1,80	1,13	3,24	1,55	2,09	1,57	1,65	1,04	1,54	2,13	1,63	1,35	1,64	1,72	1,31	1,24
	0,5	24	1,53	1,26	0,98	1,09	0,84	1,75	1,30	1,25	1,36	1,26	1,61	2,48	2,15	1,29	1,13	1,17
	2,0	24	1,62	1,45	1,33	1,07	1,00	1,42	1,03	1,28	1,46	1,55	2,14	1,77	1,49	1,24	1,19	1,07
	0,5	48	1,69	1,39	1,61	1,17	1,81	1,57	1,24	1,63	1,40	1,20	2,31	1,77	2,07	1,37	1,73	1,72
2,0	48	2,08	1,58	2,36	1,04	2,62	1,45	1,01	2,13	2,77	1,45	2,21	2,73	1,46	1,38	1,45	2,22	
PCNA	0,5	0,3	0,89	0,94	0,91	1,03	0,84	0,94	0,93	0,86	0,87	1,10	1,04	0,83	0,76	1,39	1,02	0,72
	2,0	0,3	0,75	0,92	0,85	0,79	0,70	0,86	0,76	1,00	0,83	0,94	1,03	0,85	0,74	1,19	0,99	0,89
	0,5	8	1,36	0,94	1,12	1,10	1,28	1,32	0,96	1,08	1,43	1,62	1,30	1,21	1,15	1,38	1,10	0,97
	2,0	8	1,27	1,04	1,19	1,06	0,94	1,20	1,02	0,89	1,39	1,44	1,25	1,10	1,05	1,29	1,09	0,97
	0,5	24	1,14	0,94	1,11	0,96	0,96	1,27	0,93	1,00	1,03	0,77	0,78	0,70	0,82	0,95	0,99	1,00
	2,0	24	1,15	1,05	1,14	0,96	1,08	0,85	0,89	1,06	0,78	1,00	1,05	0,80	0,94	0,85	0,95	1,04
	0,5	48	1,31	1,26	1,14	1,36	1,04	1,30	0,96	1,30	1,15	1,44	1,15	0,76	0,82	1,29	0,95	1,00
2,0	48	1,19	1,07	1,03	1,20	1,07	0,98	0,96	1,03	1,06	1,05	1,08	0,93	0,79	0,95	0,87	0,87	

2 von 2

Tabelle 8.4 (Fortsetzung): Differentielle Genexpression der Probanden 16-31 (D = Dosis in Gy, t = Zeit p.r. in h).

8.5 Kolinearität zwischen den Zielgenen

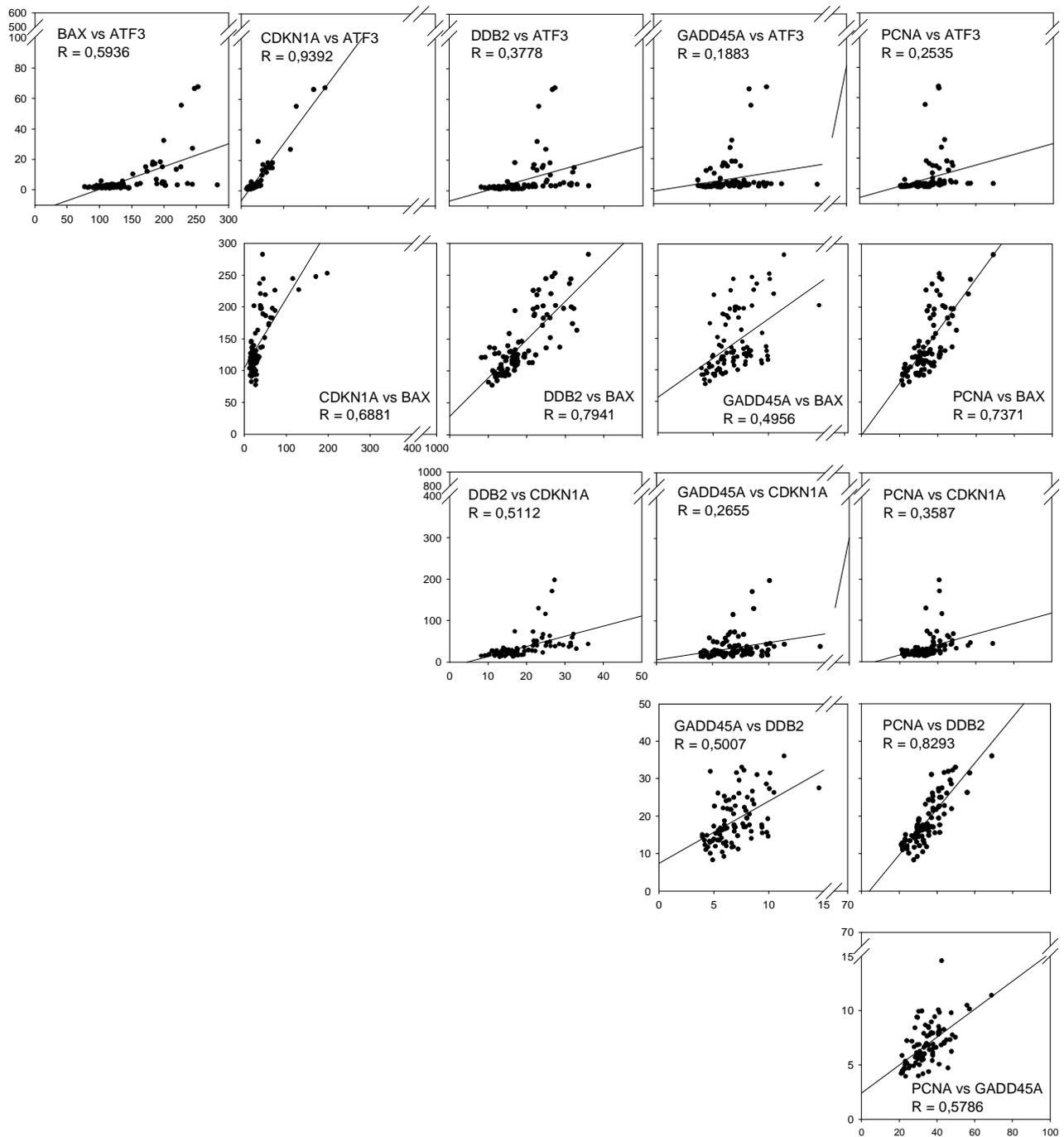


Abb. 8.1: Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der normalisierten Genexpression der einzelnen Zielgene zum Zeitpunkt 20 Minuten nach Bestrahlung. R gibt den Korrelationskoeffizienten an.

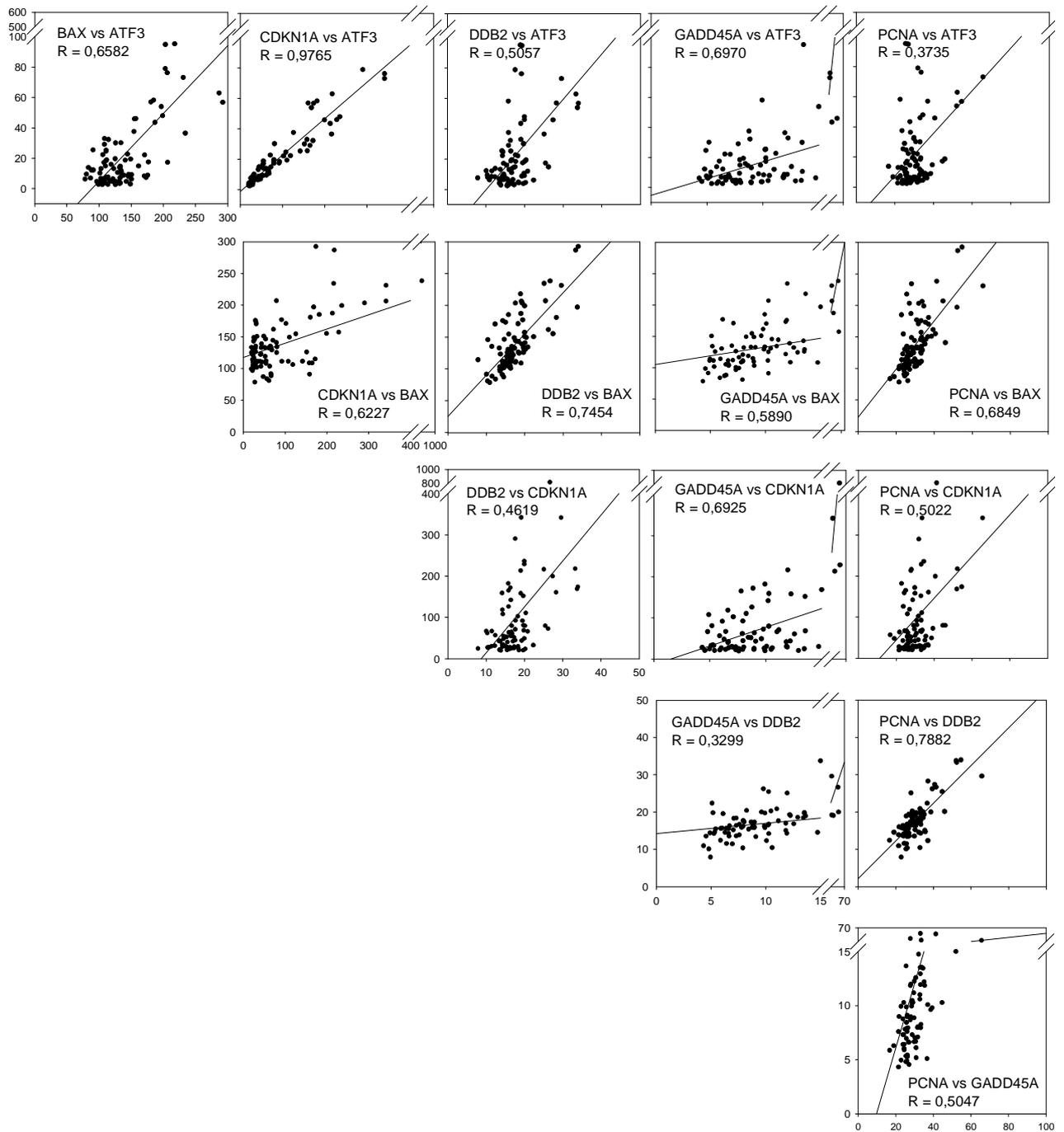


Abb. 8.2: Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der normalisierten Genexpression der einzelnen Zielgene zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Bestrahlung. R gibt den Korrelationskoeffizienten an.

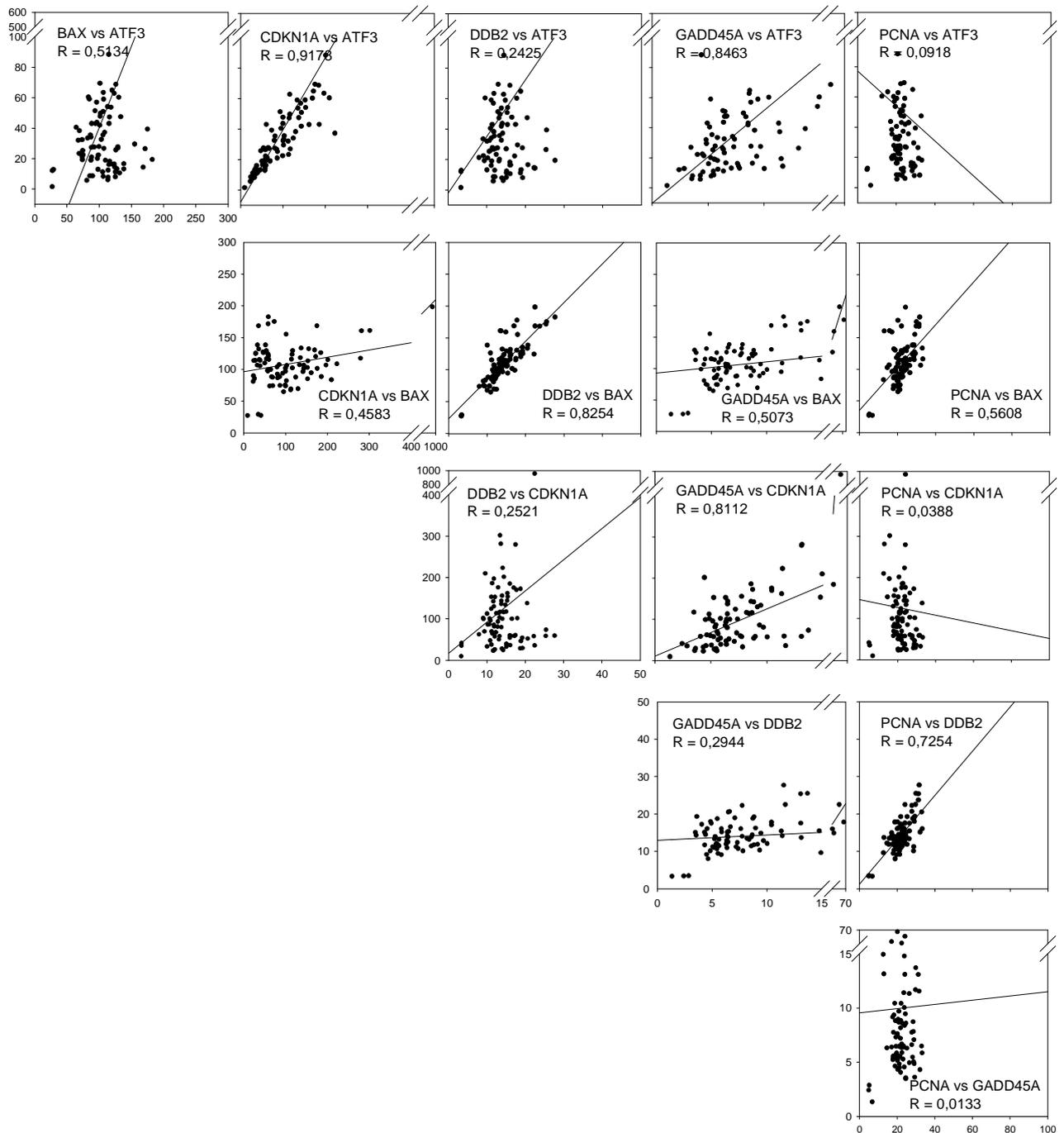


Abb. 8.3: Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der normalisierten Genexpression der einzelnen Zielgene zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung. R gibt den Korrelationskoeffizienten an.

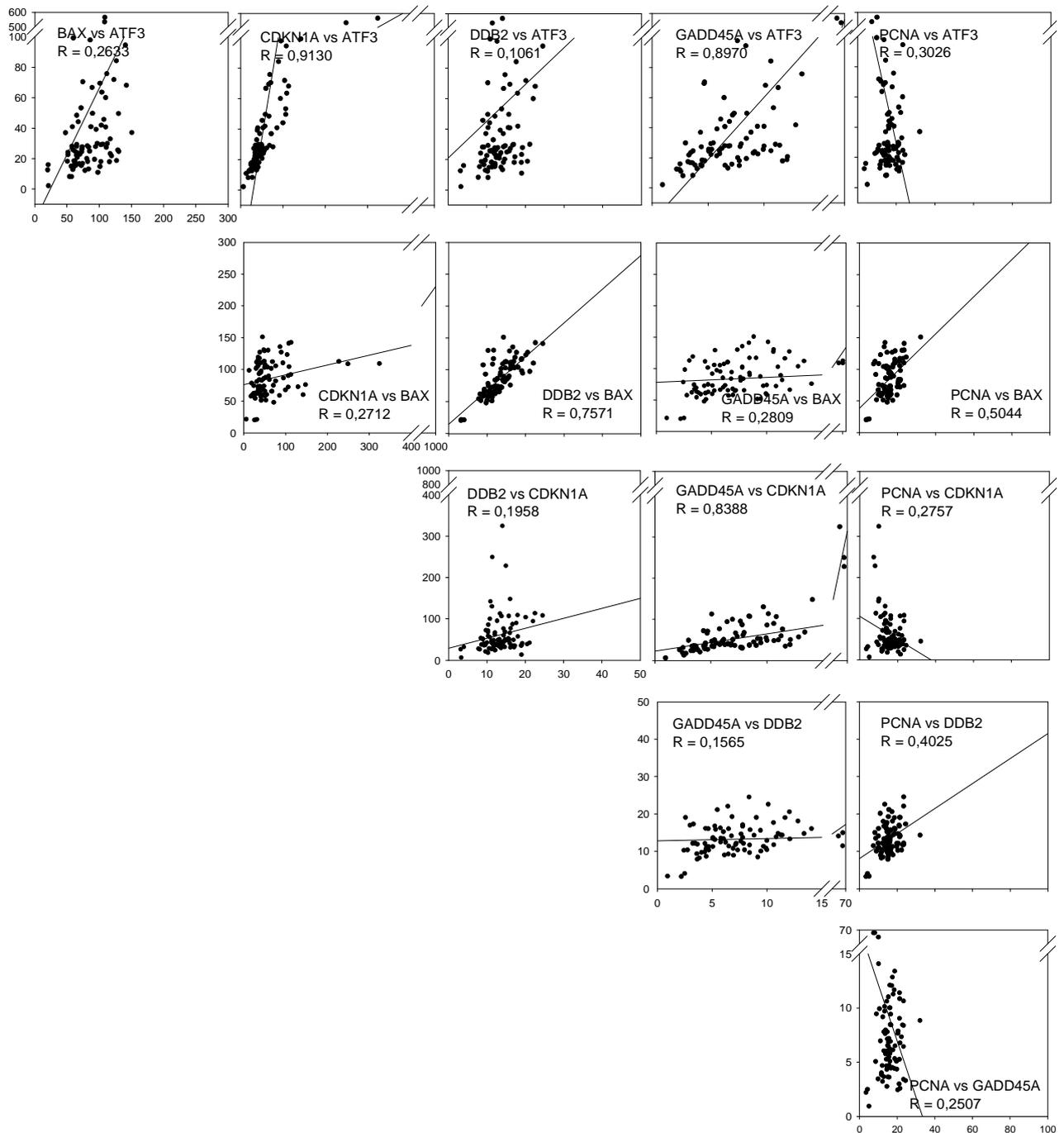


Abb. 8.4: Grafische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der normalisierten Genexpression der einzelnen Zielgene zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Bestrahlung. R gibt den Korrelationskoeffizienten an.

8.6 Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Genexpression

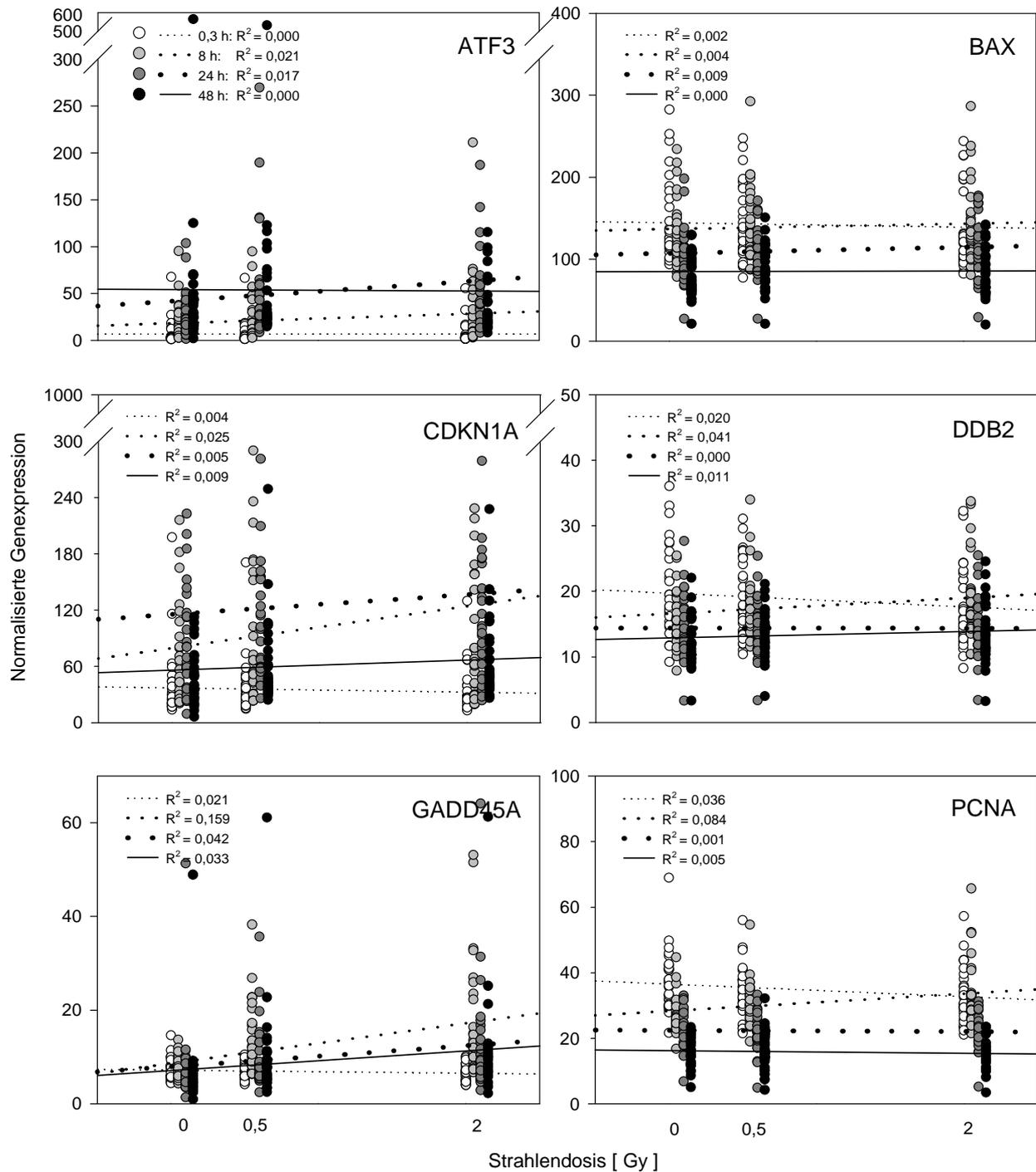


Abb. 8.5: Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Höhe der Strahlendosis und der normalisierten Genexpression der 6 Zielgene, aufgeschlüsselt nach Zeitpunkt nach Bestrahlung. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Strahlendosis erklären lässt.

8.7 Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit und der Genexpression

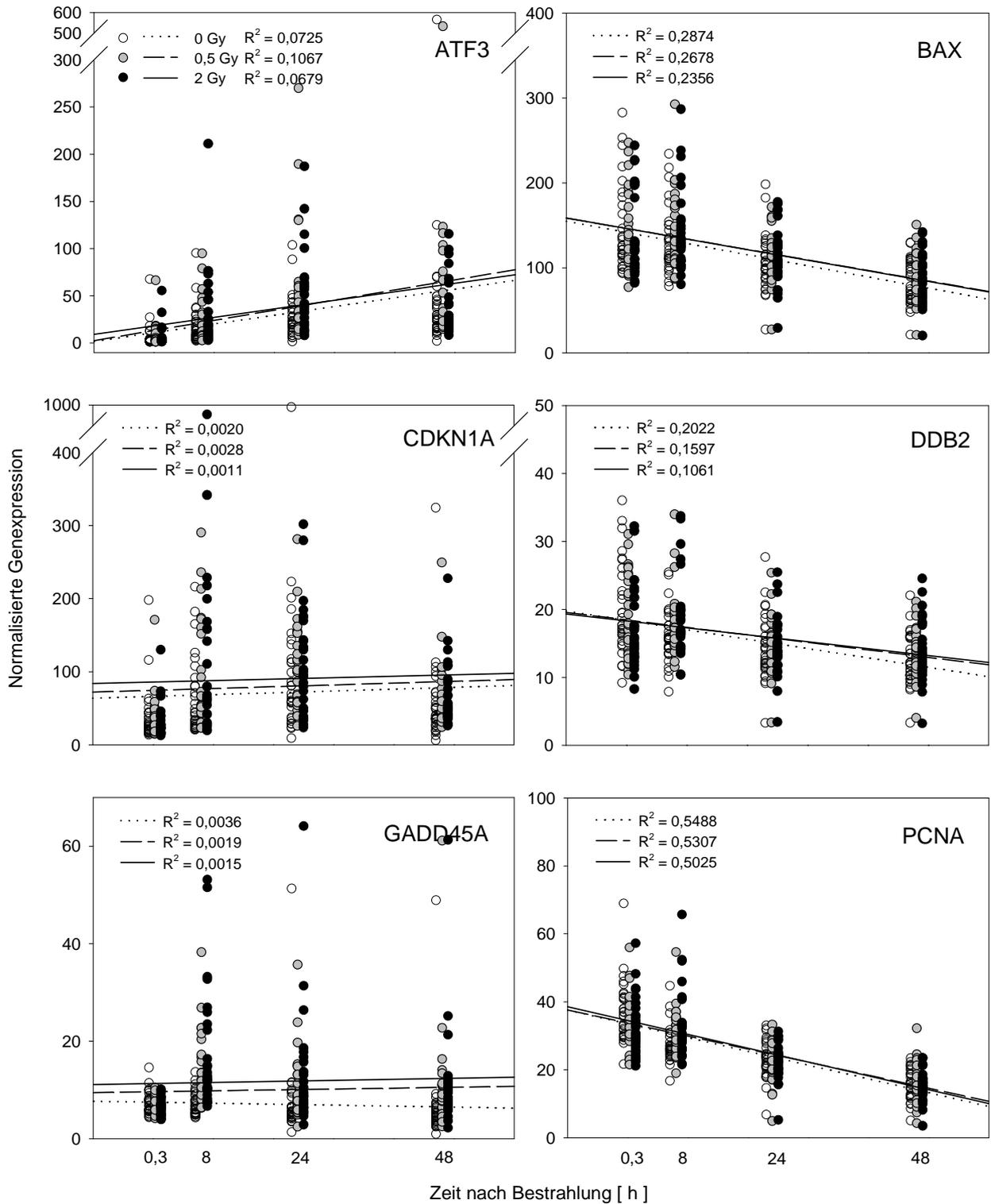
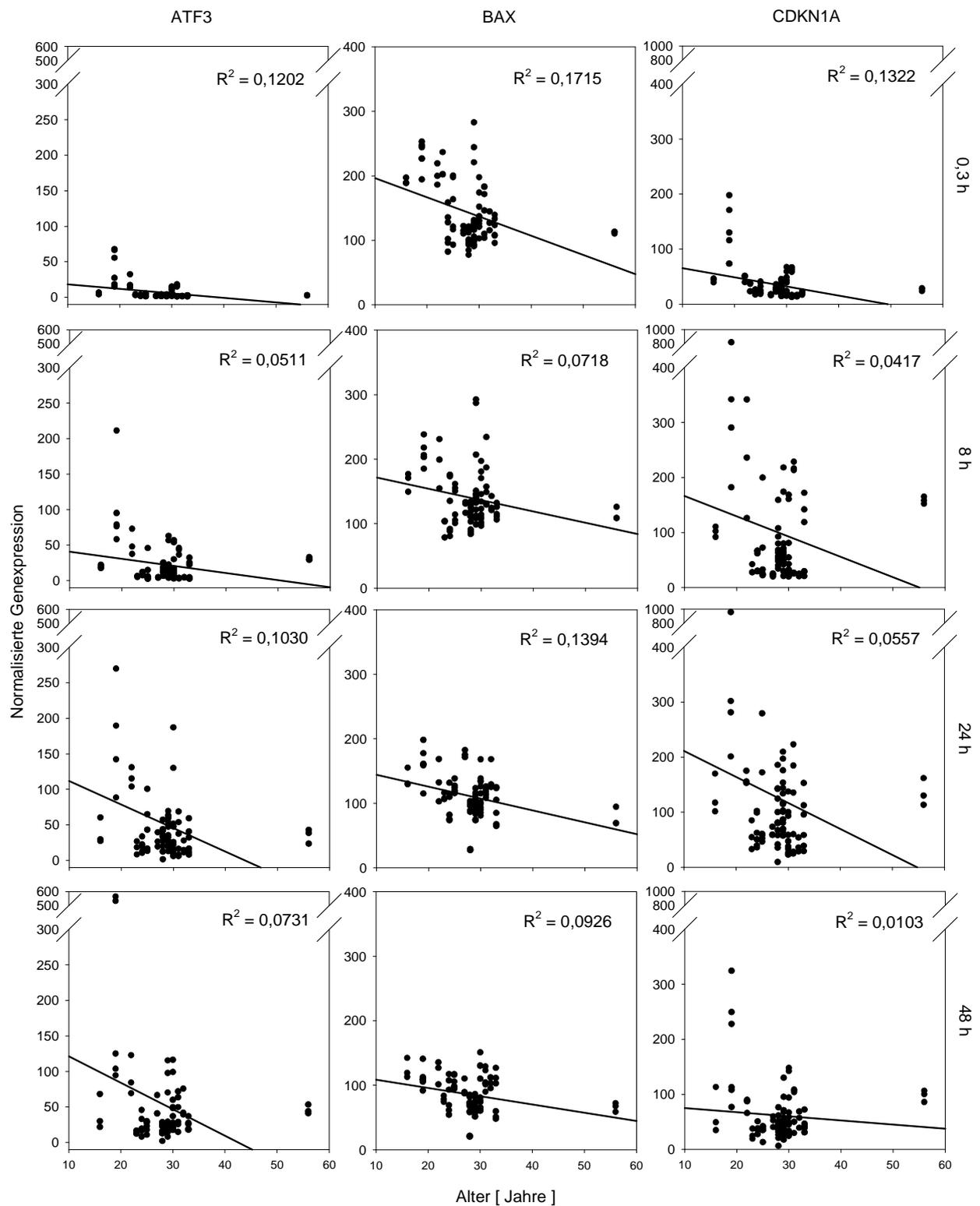


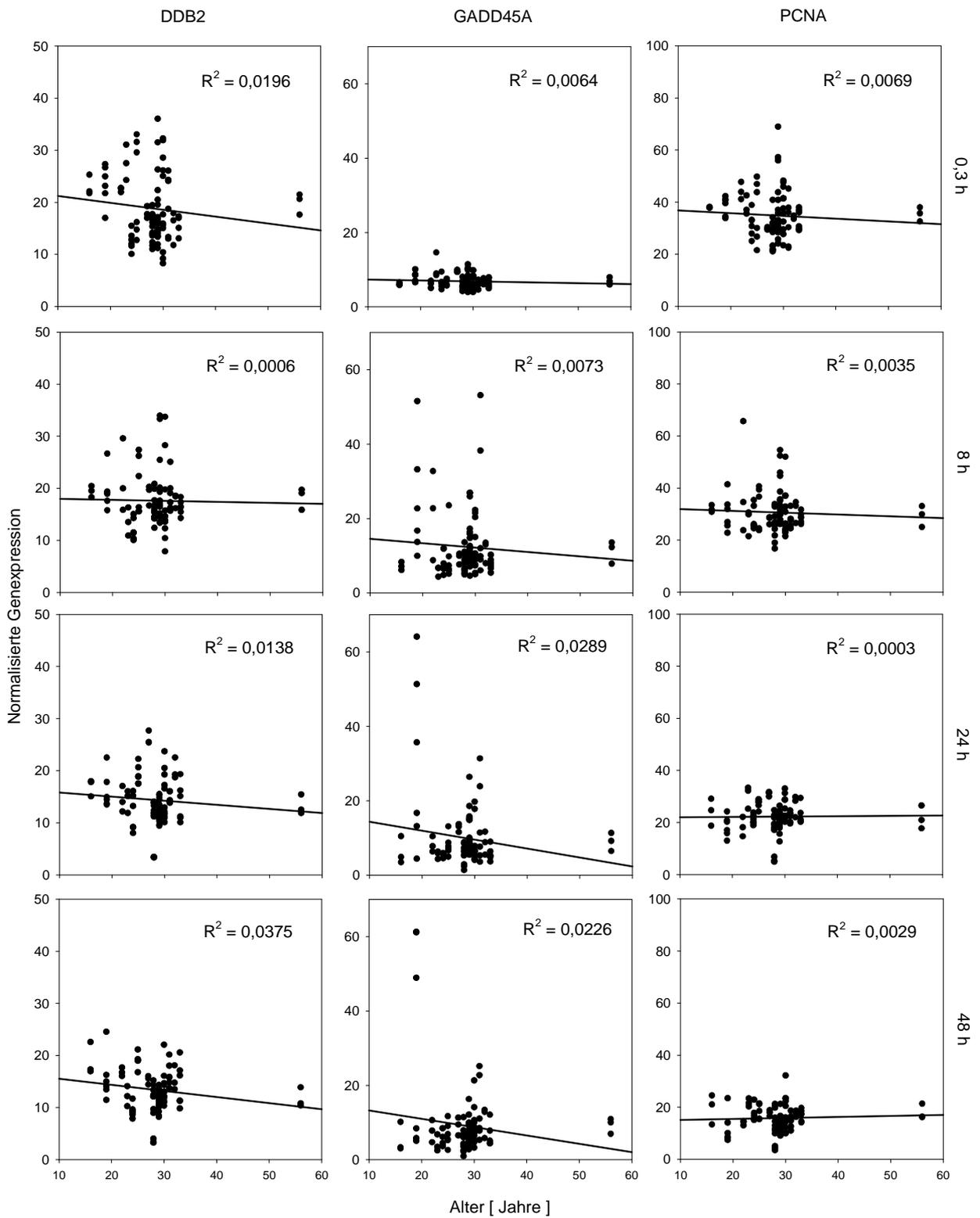
Abb. 8.6: Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Zeitpunkt nach Bestrahlung und der Höhe der normalisierten Genexpression, aufgeschlüsselt nach der Strahlendosis. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Inkubationszeit erklären lässt.

8.8 Zusammenhang zwischen weiteren Parametern und der Genexpression



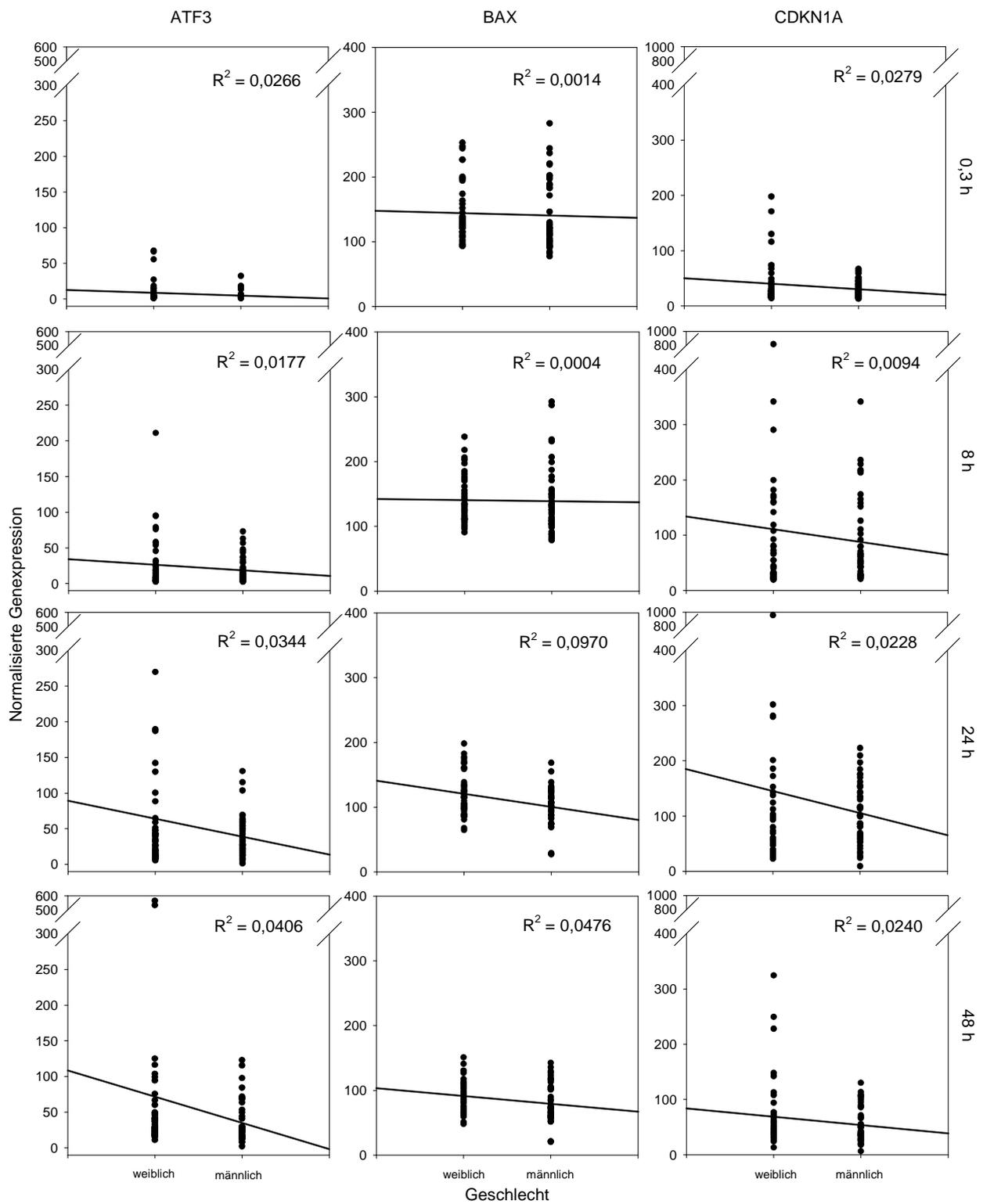
1 von 2

Abb. 8.7: Zusammenhang zwischen dem Probandenalter und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch das Probandenalter erklären lässt.



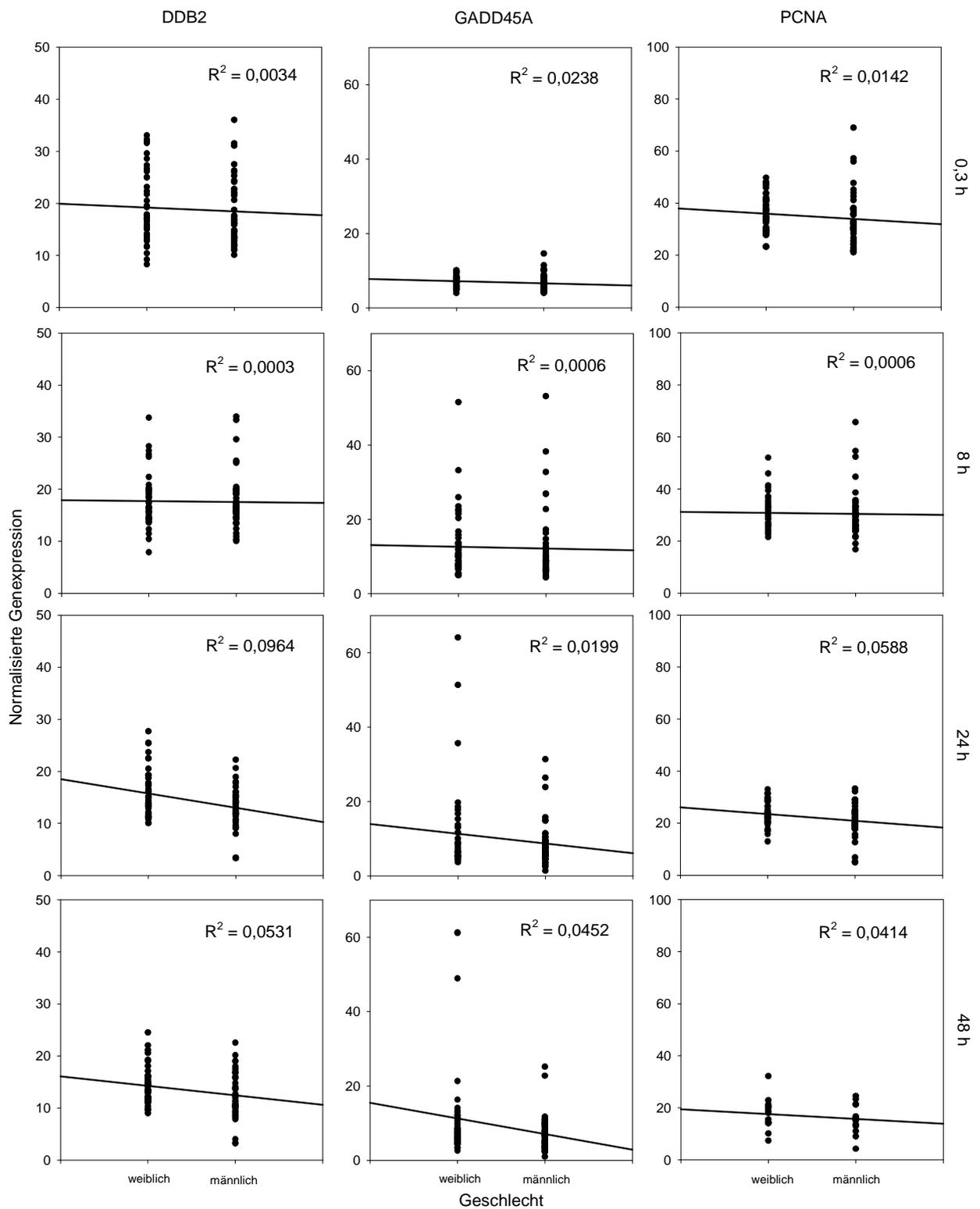
2 von 2

Abb. 8.7 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen dem Probandenalter und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch das Probandenalter erklären lässt.



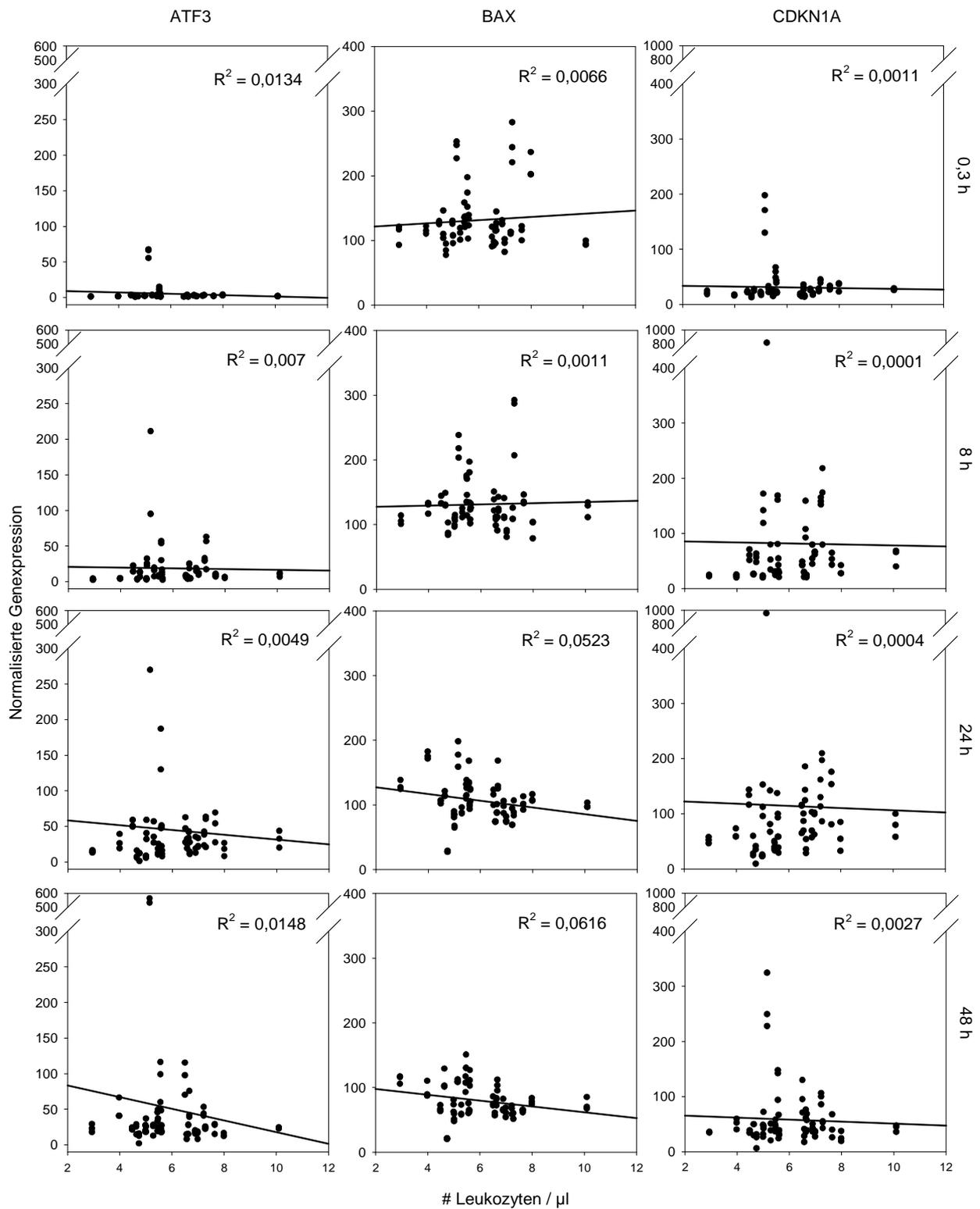
1 von 2

Abb. 8.8: Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch das Geschlecht der Probanden erklären lässt.



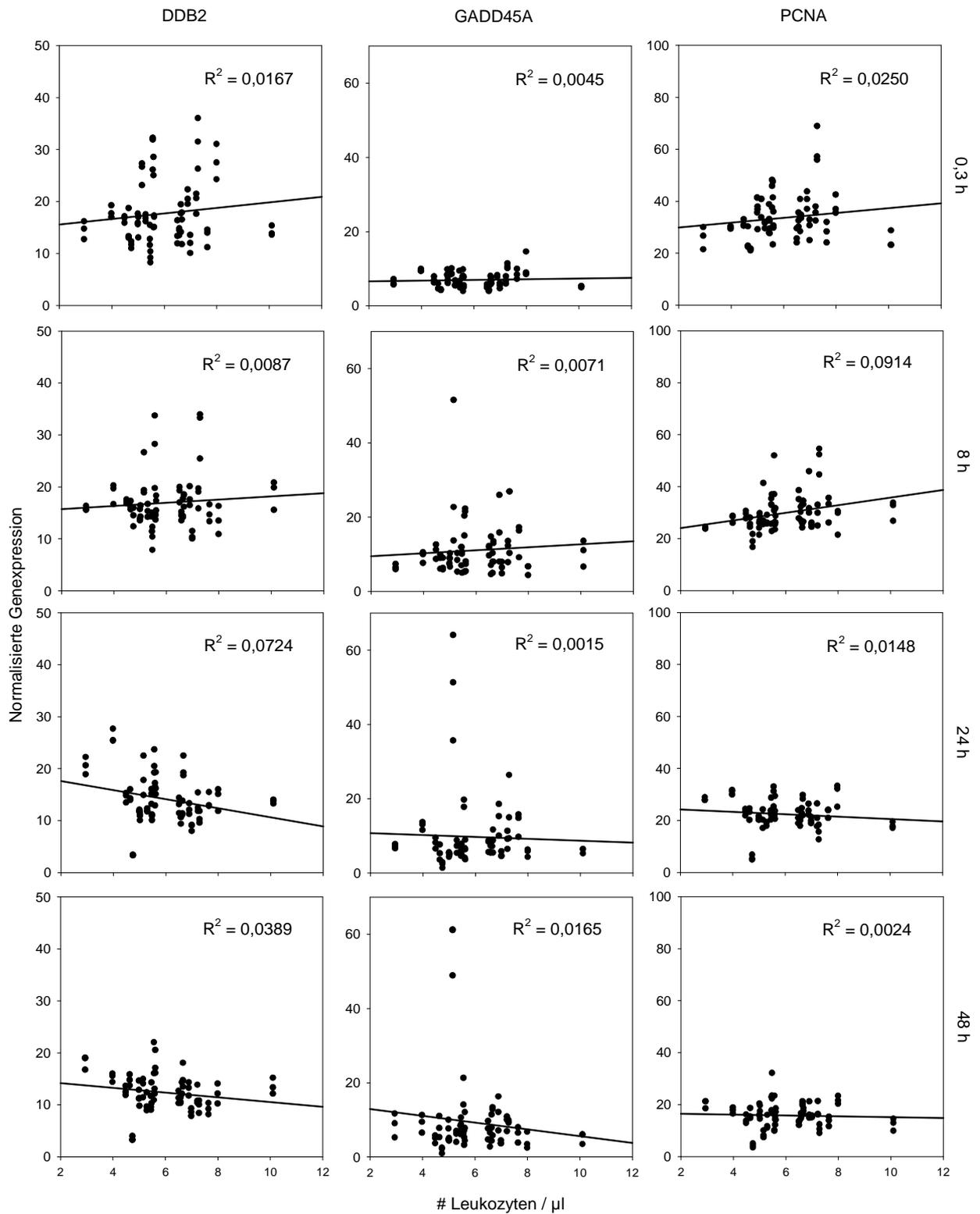
2 von 2

Abb. 8.8 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch das Geschlecht der Probanden erklären lässt.



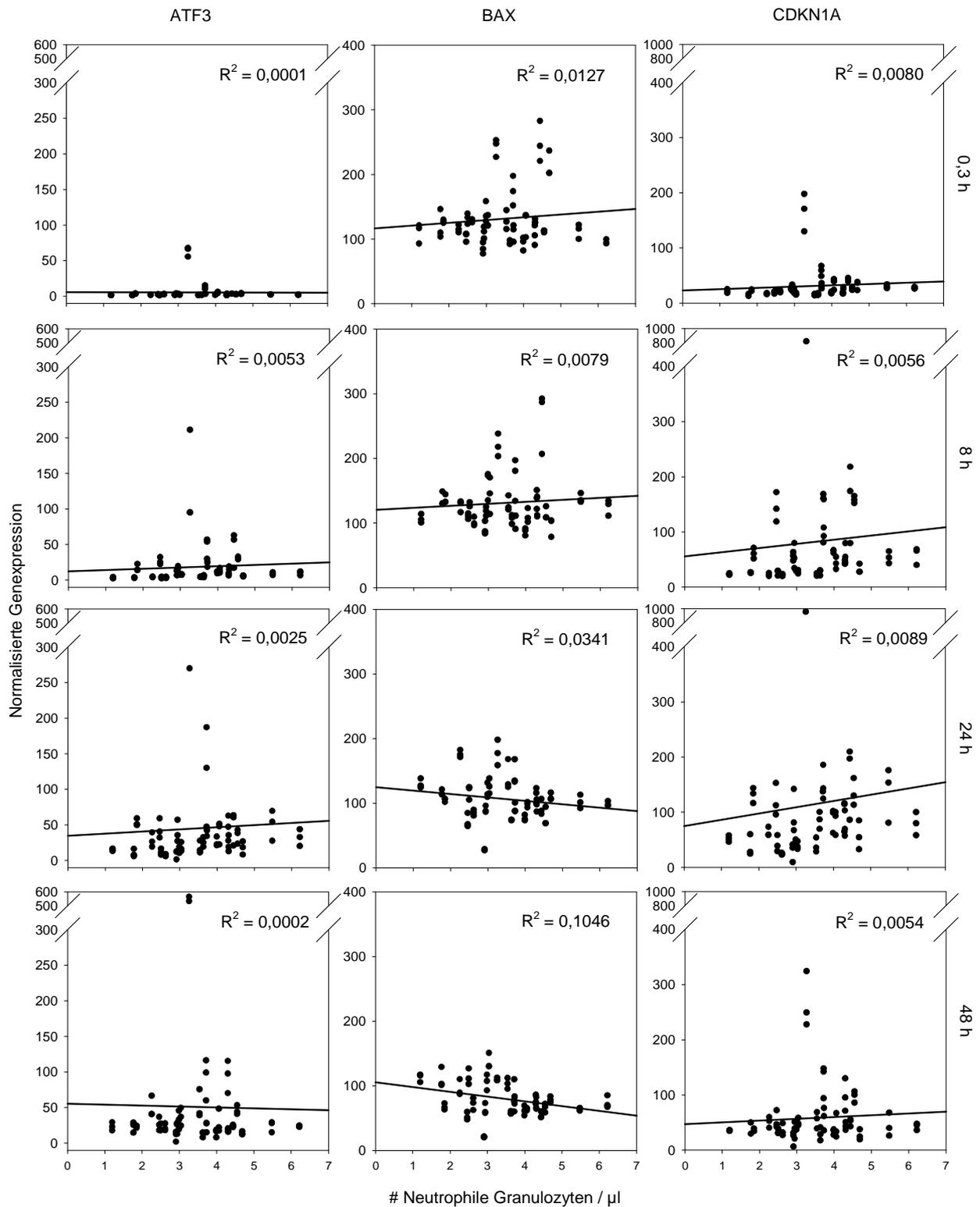
1 von 2

Abb. 8.9: Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der Leukozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der Leukozyten erklären lässt.



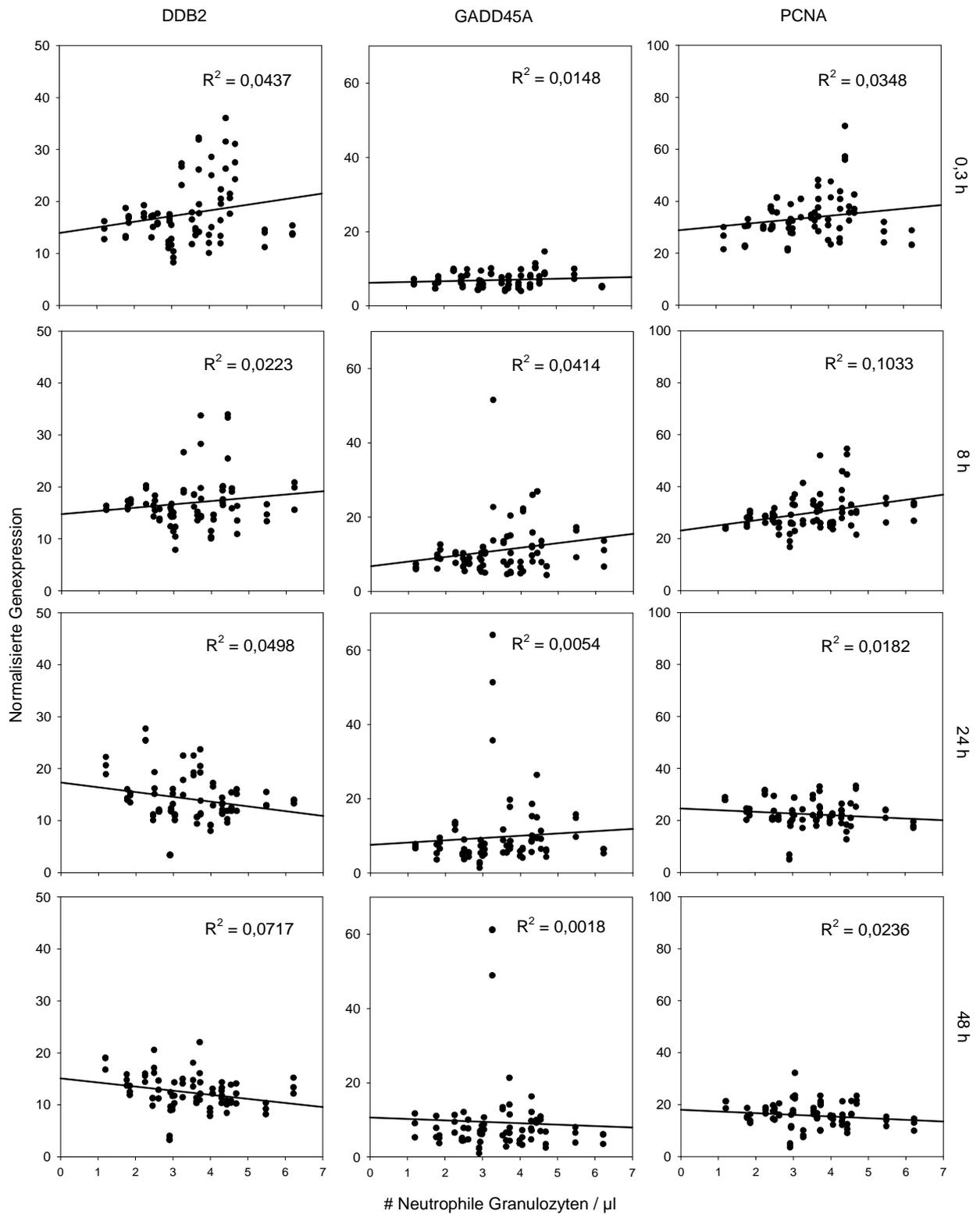
2 von 2

Abb. 8.9 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der Leukozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der Leukozyten erklären lässt.



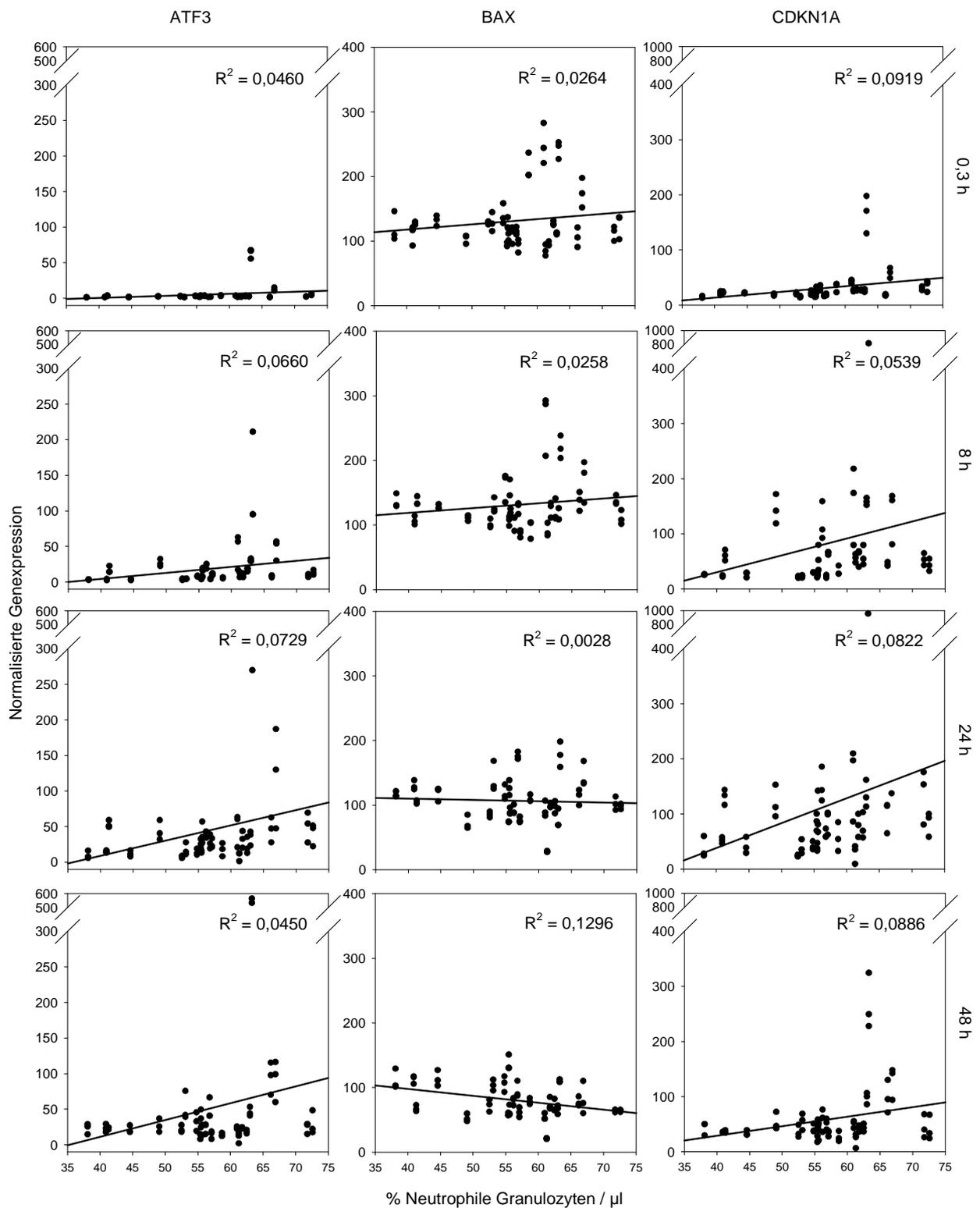
1 von 2

Abb. 8.10: Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der neutrophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten erklären lässt.



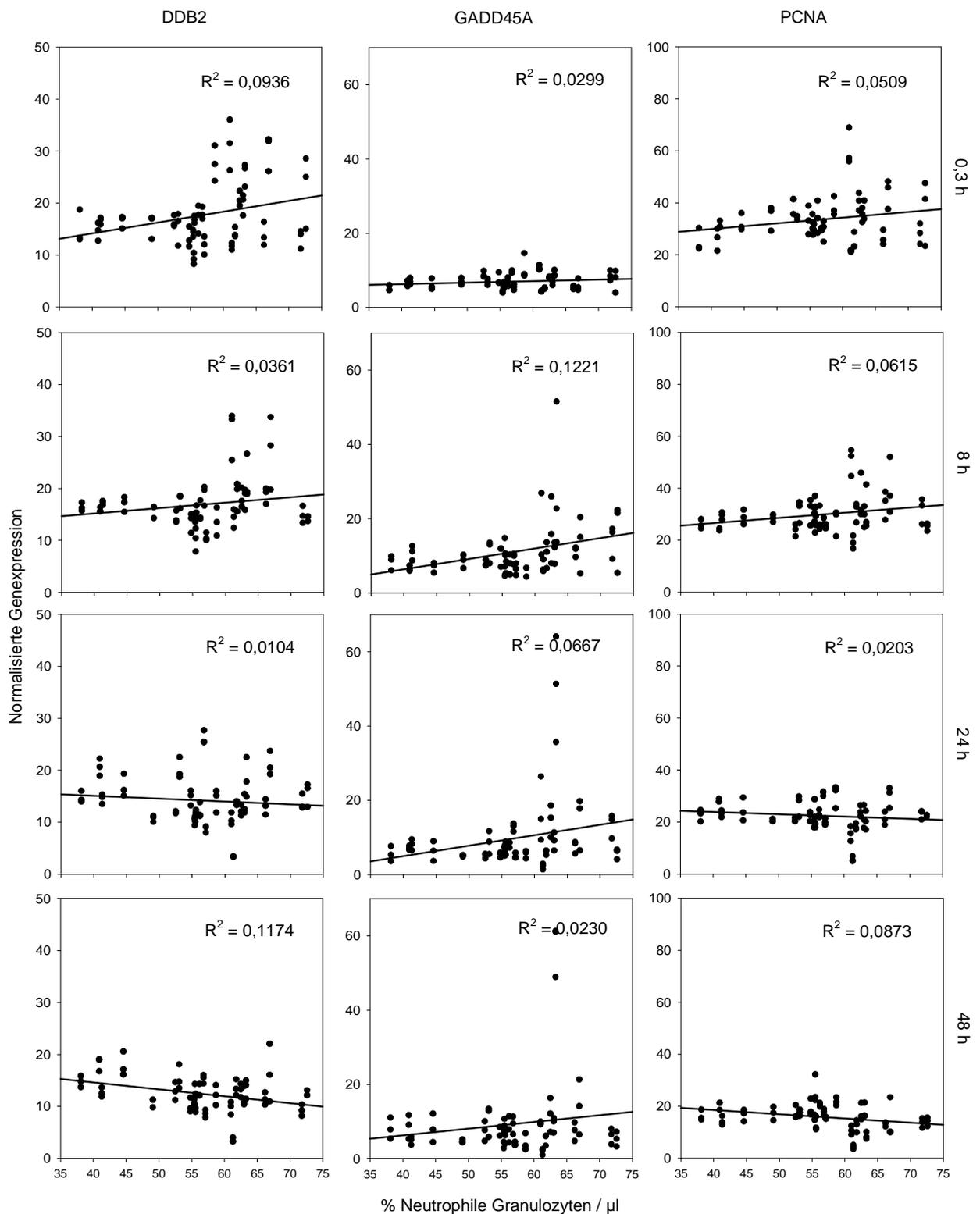
2 von 2

Abb. 8.10 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der neutrophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten erklären lässt.



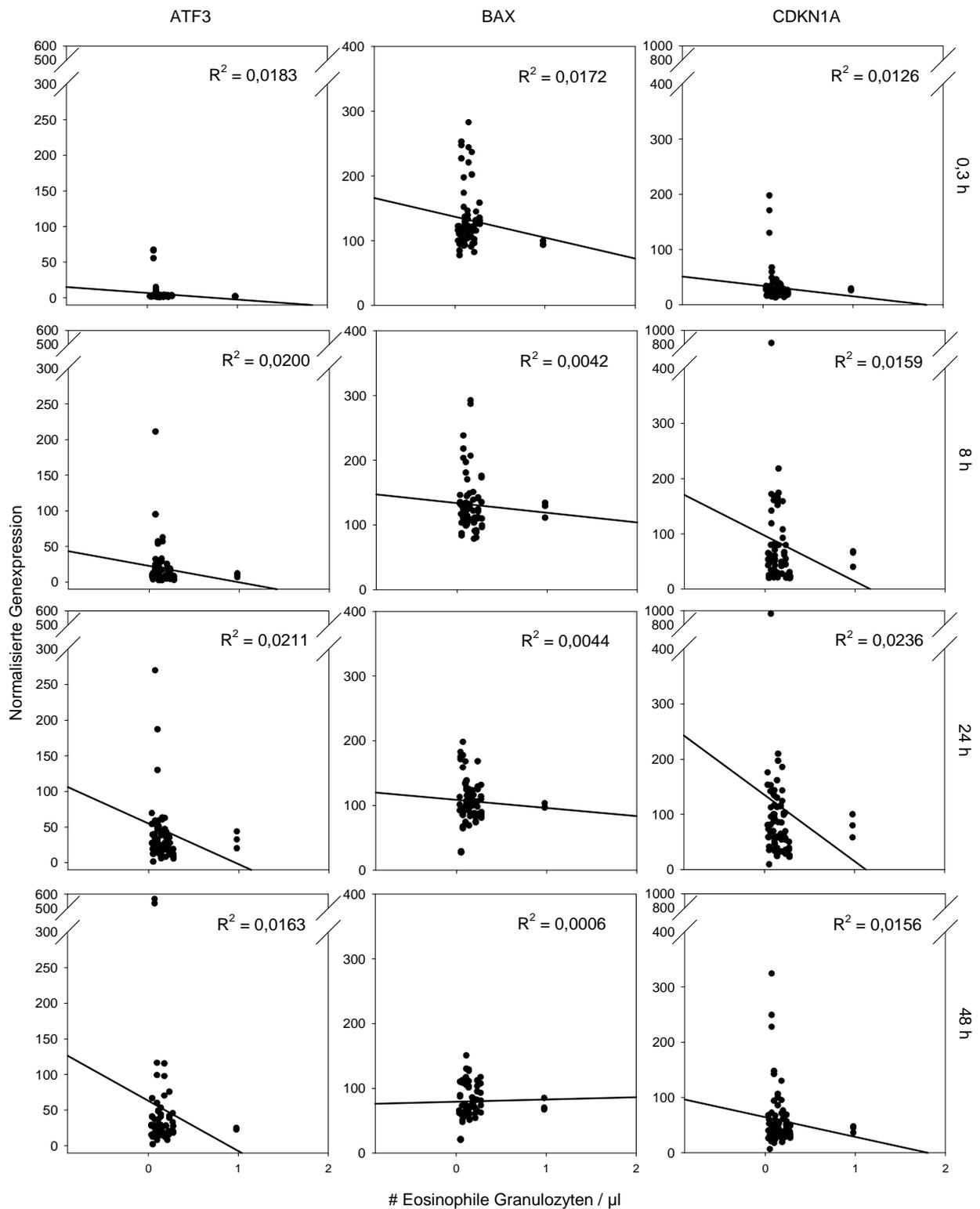
1 von 2

Abb. 8.11: Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der neutrophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der neutrophilen Granulozyten erklären lässt.



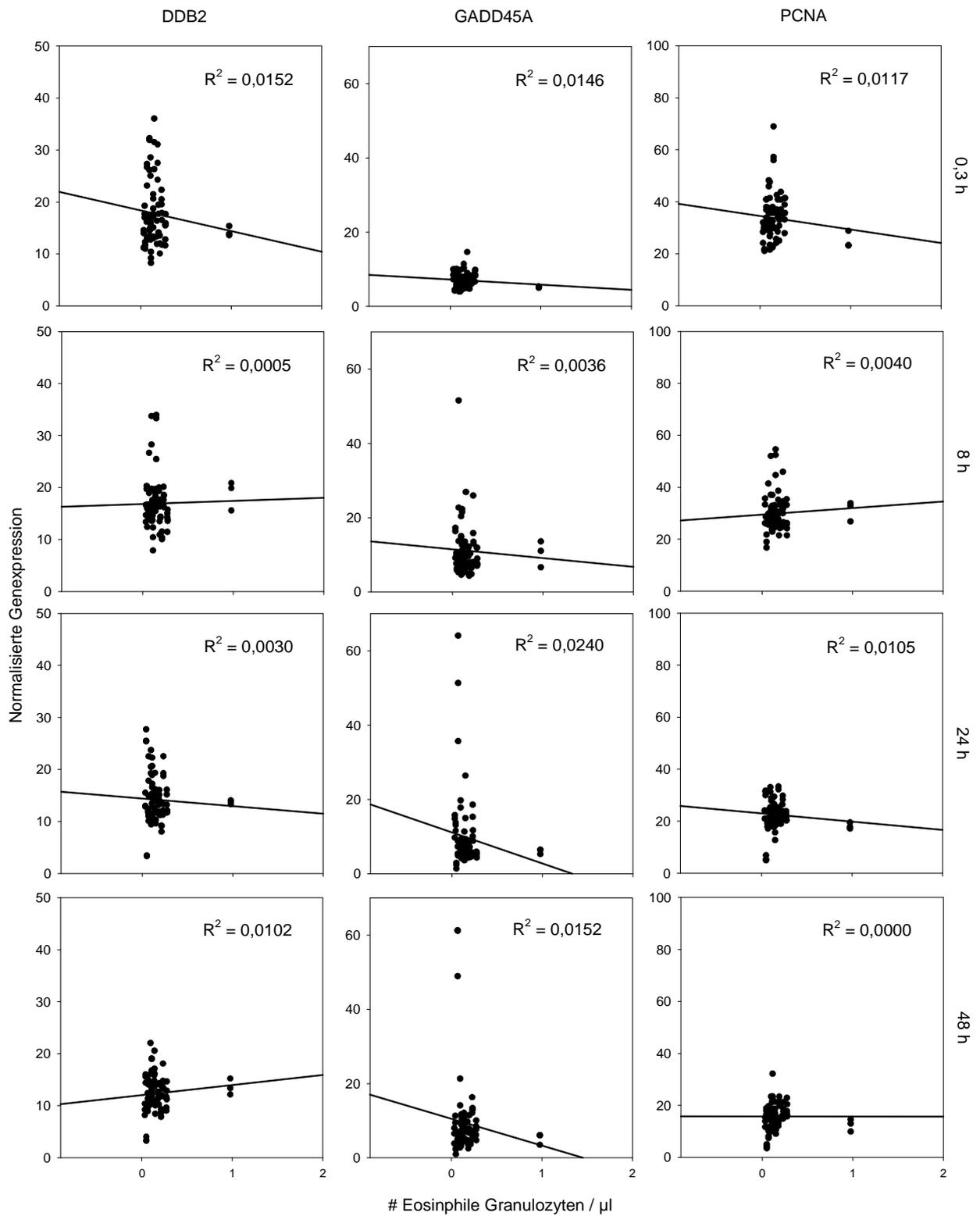
2 von 2

Abb. 8.11: Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der neutrophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der neutrophilen Granulozyten erklären lässt.



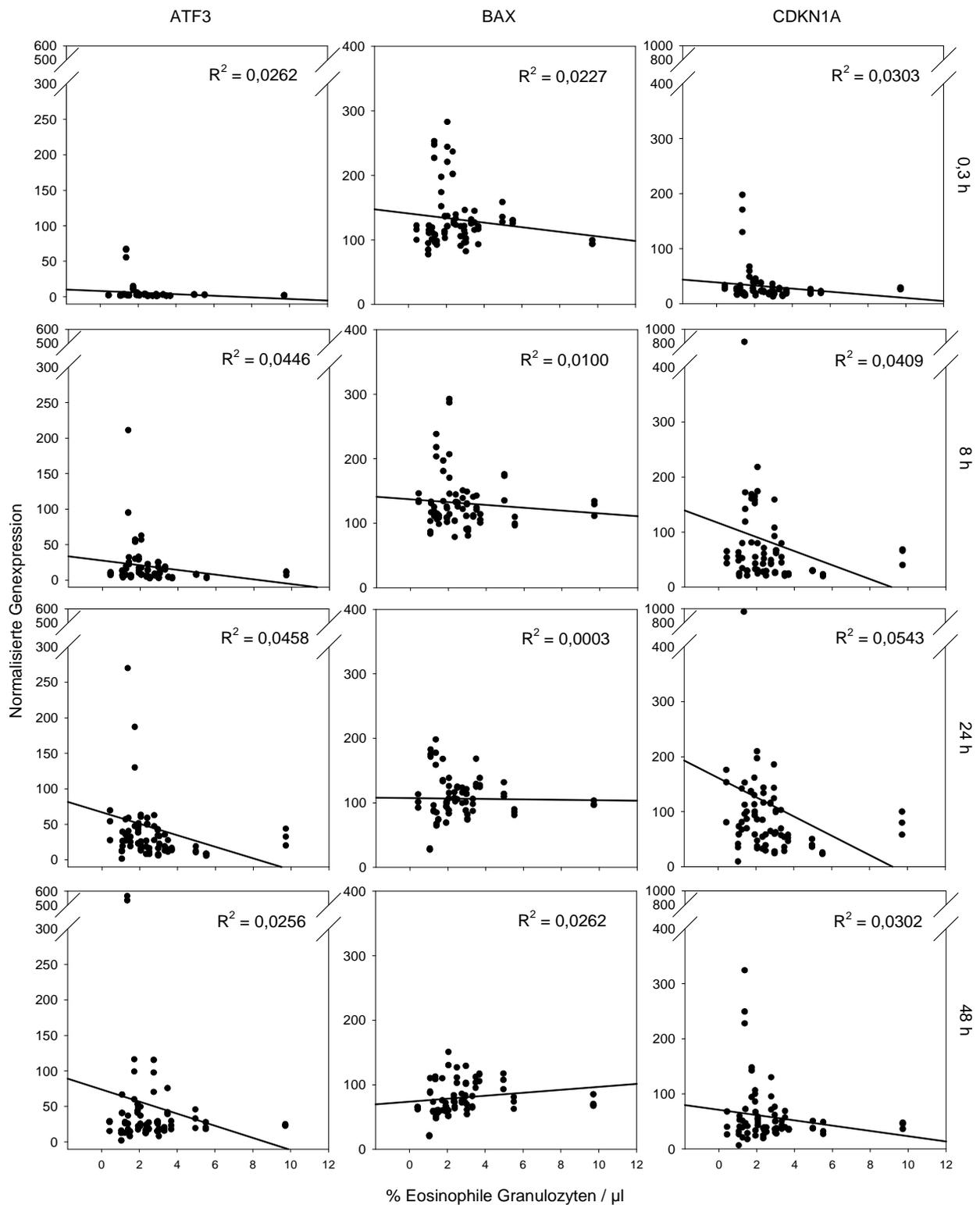
1 von 2

Abb. 8.12: Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der eosinophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der eosinophilen Granulozyten erklären lässt.



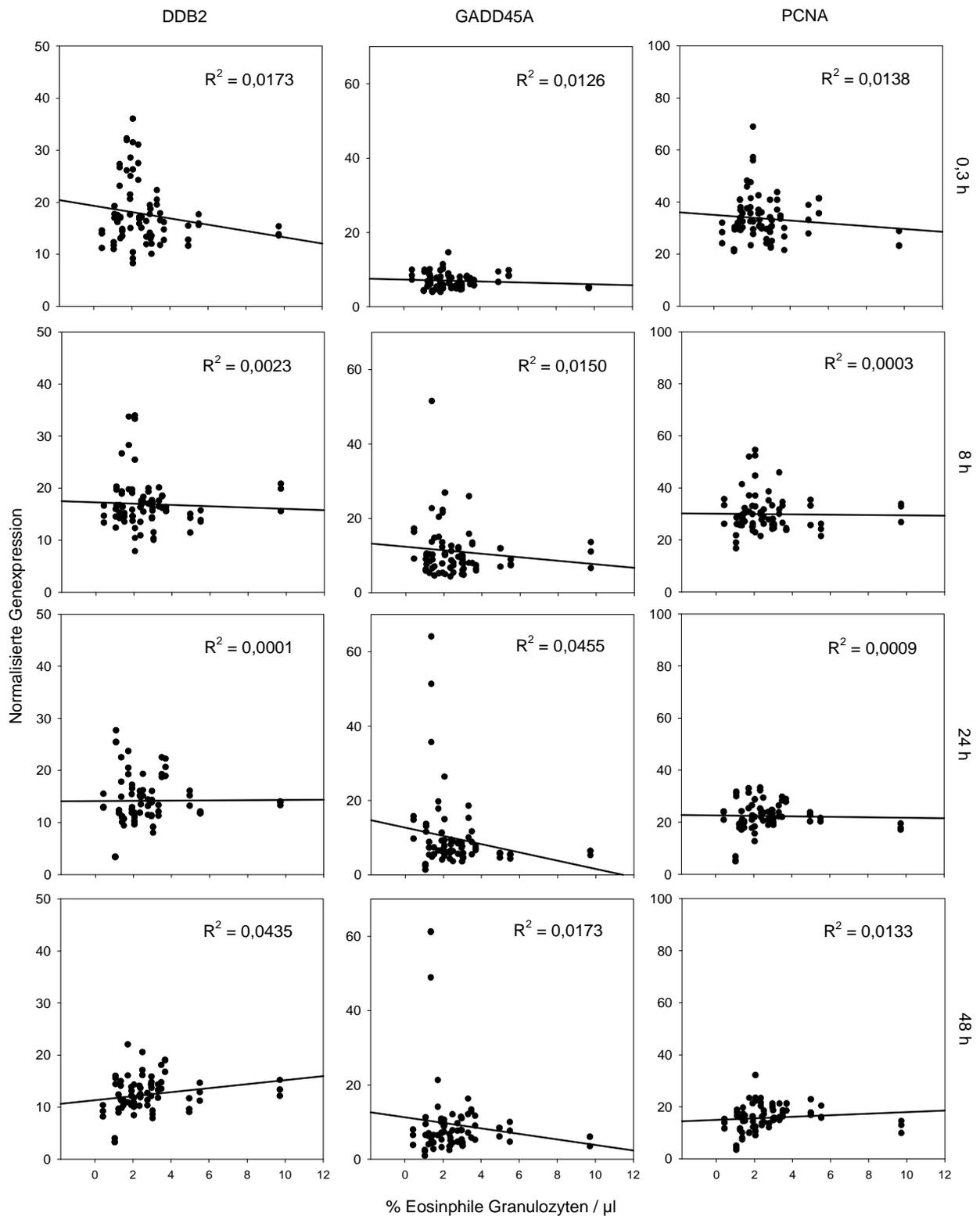
2 von 2

Abb. 8.12 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der eosinophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der eosinophilen Granulozyten erklären lässt.



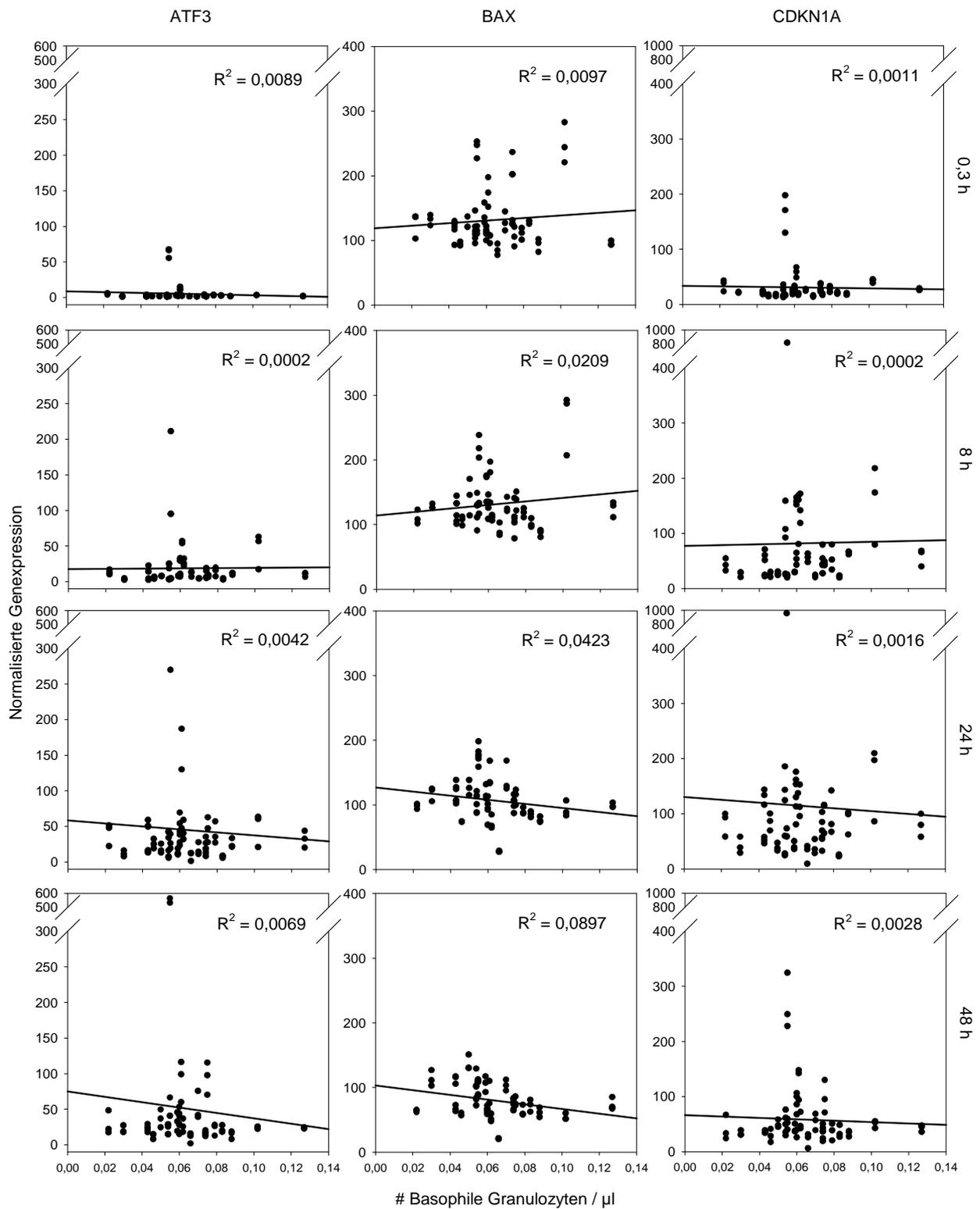
1 von 2

Abb. 8.13: Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der eosinophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der eosinophilen Granulozyten erklären lässt.



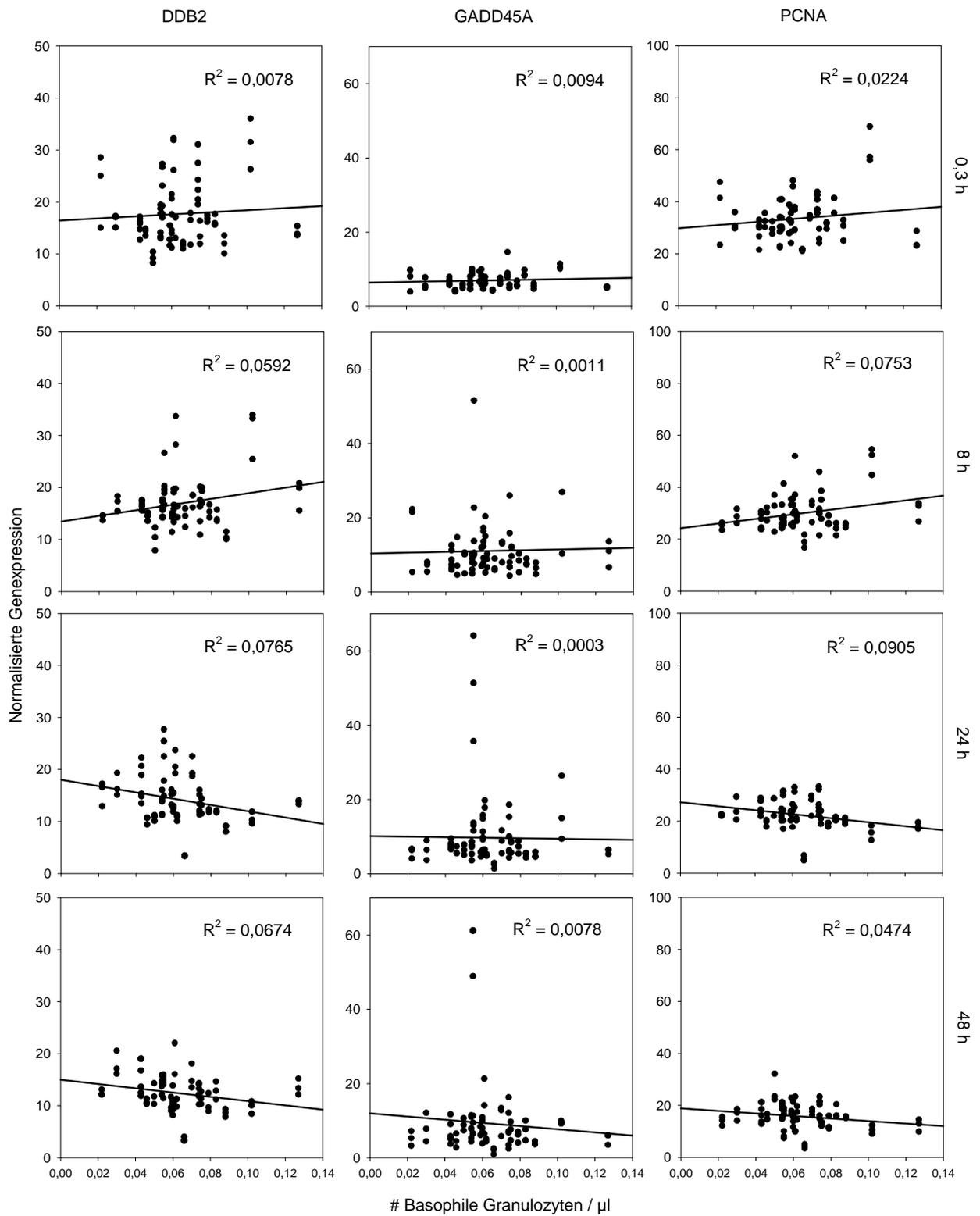
2 von 2

Abb. 8.13 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der eosinophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der eosinophilen Granulozyten erklären lässt.



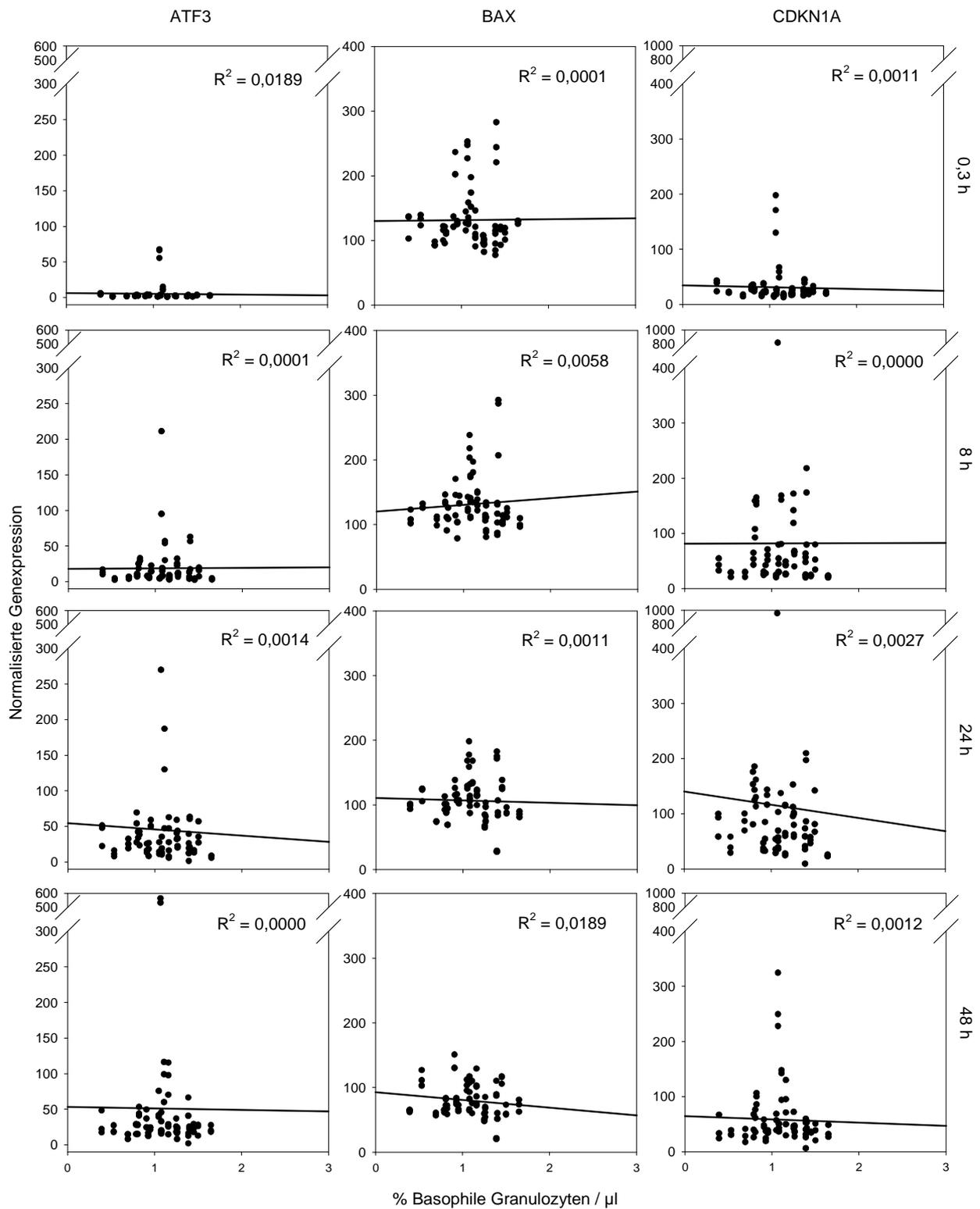
1 von 2

Abb. 8.14: Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der basophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der basophilen Granulozyten erklären lässt.



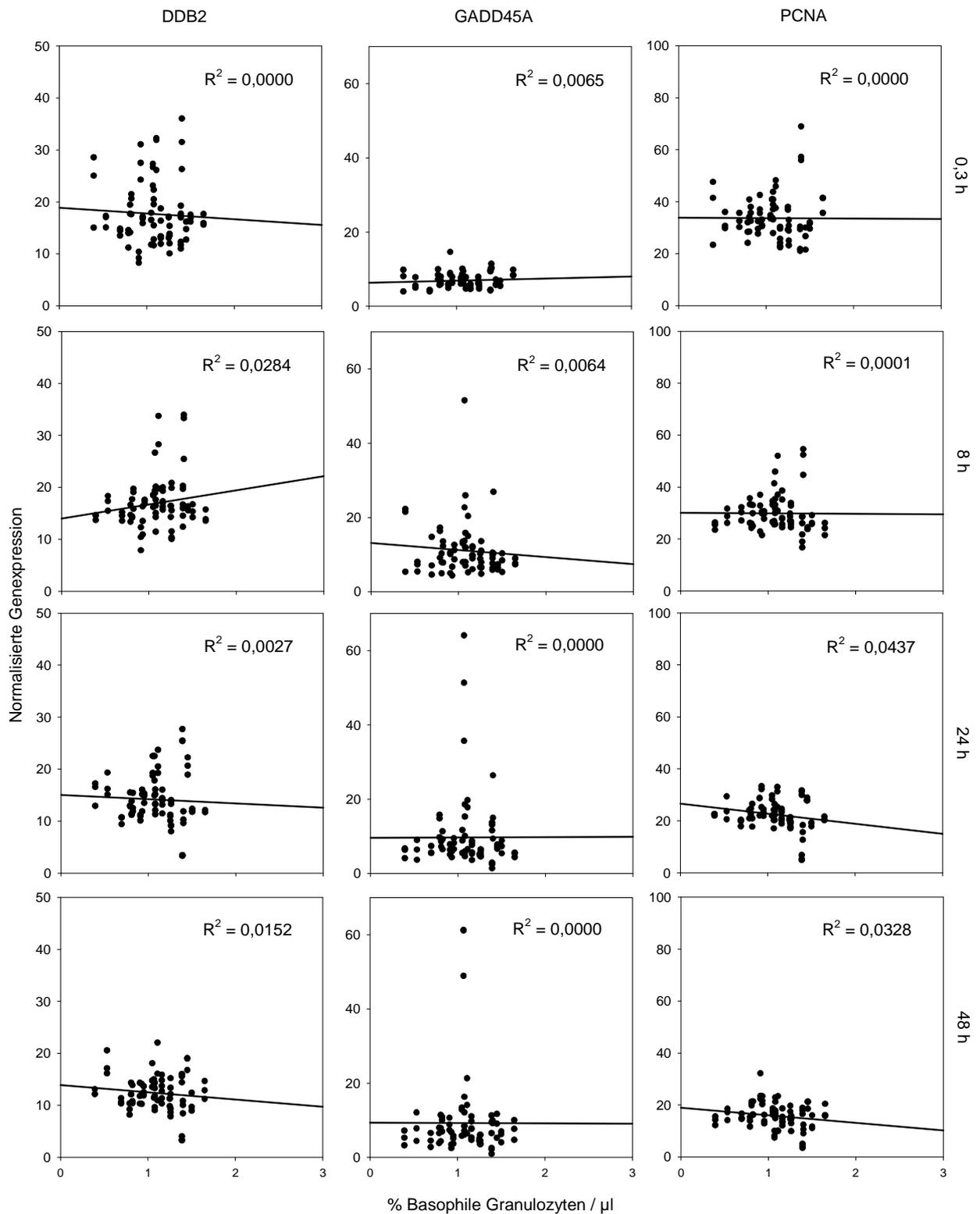
2 von 2

Abb. 8.14 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der basophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der basophilen Granulozyten erklären lässt.



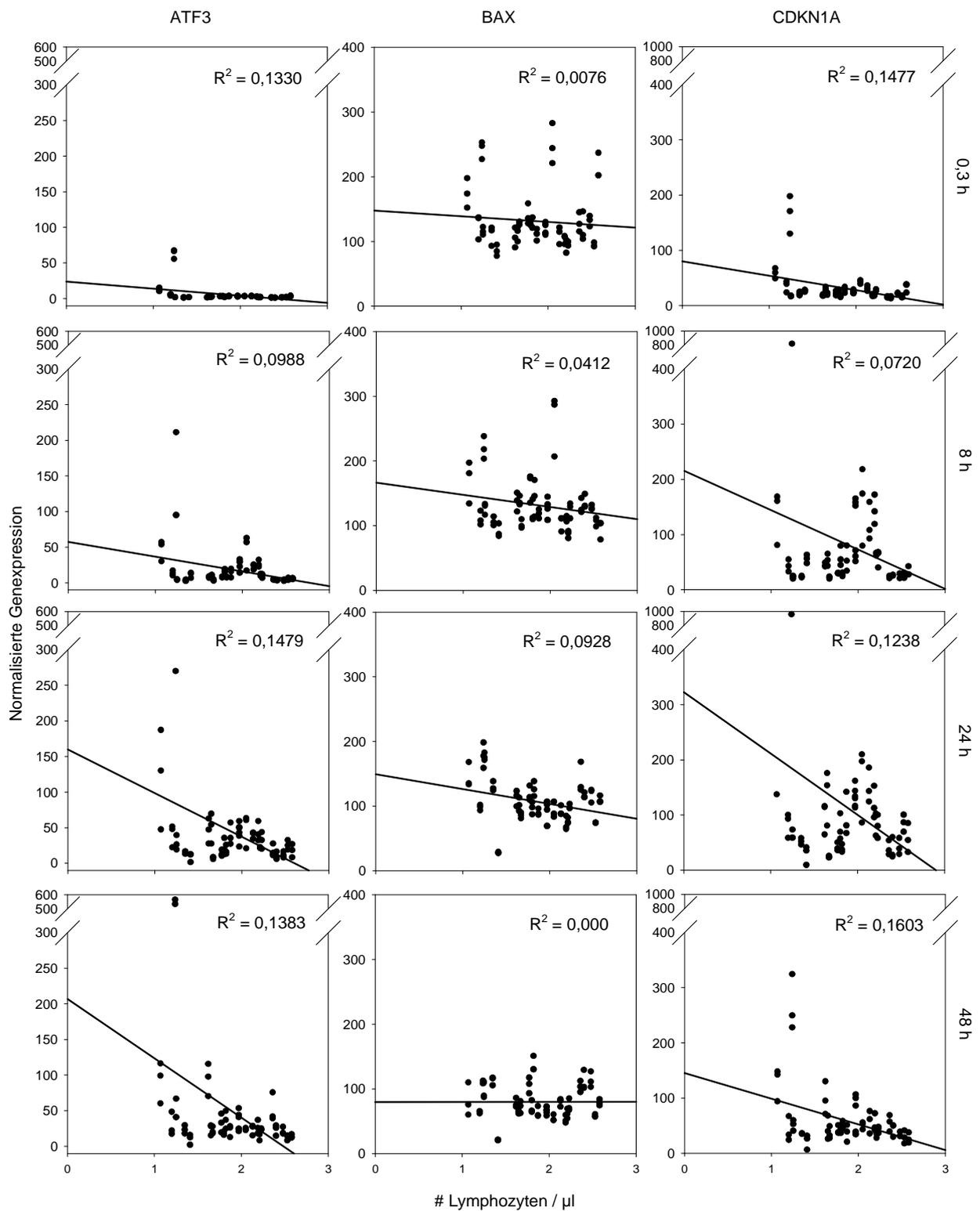
1 von 2

Abb. 8.15: Zusammenhang zwischen der reaktiven Anzahl (%) der basophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der basophilen Granulozyten erklären lässt.



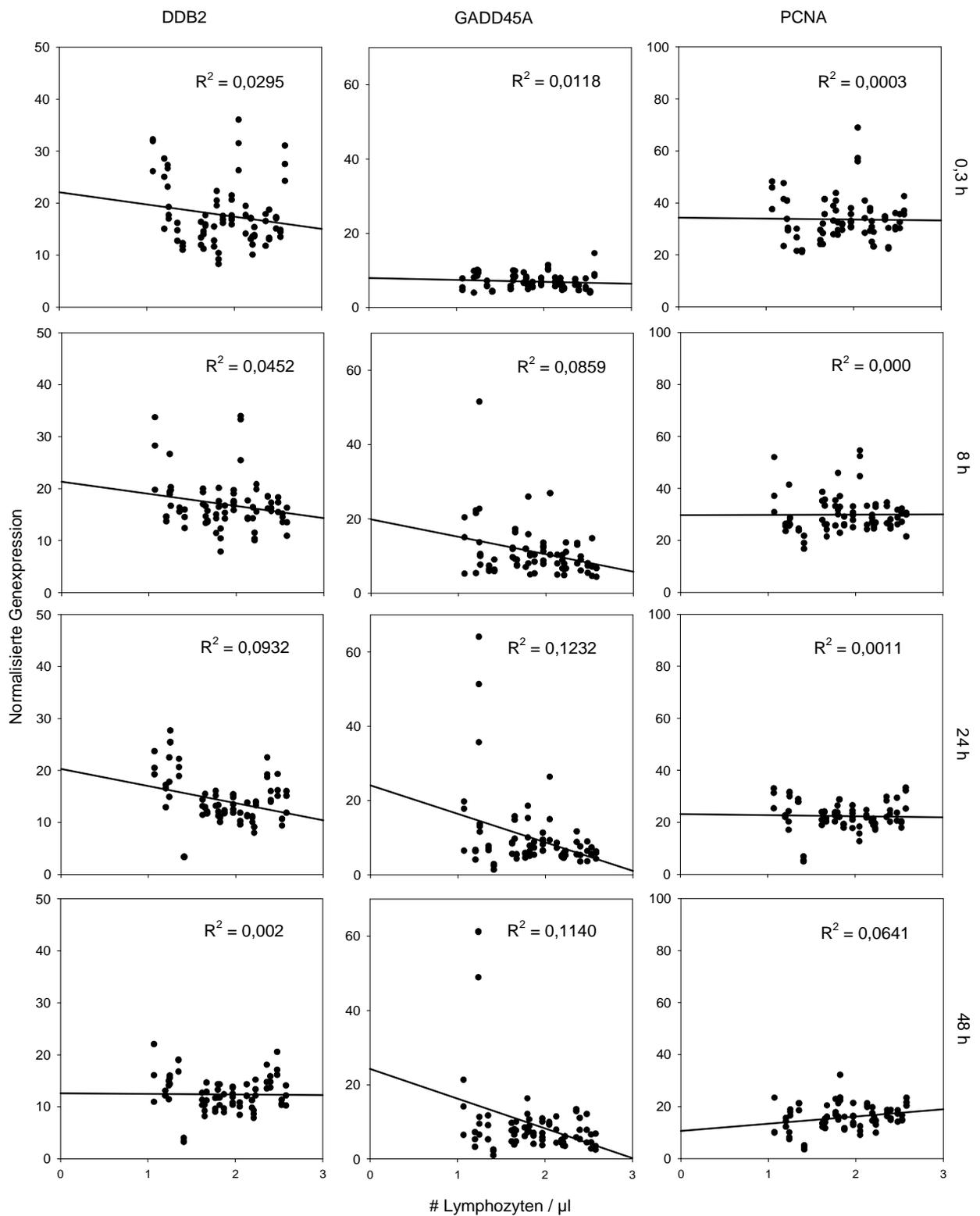
2 von 2

Abb. 8.15 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der basophilen Granulozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der basophilen Granulozyten erklären lässt.



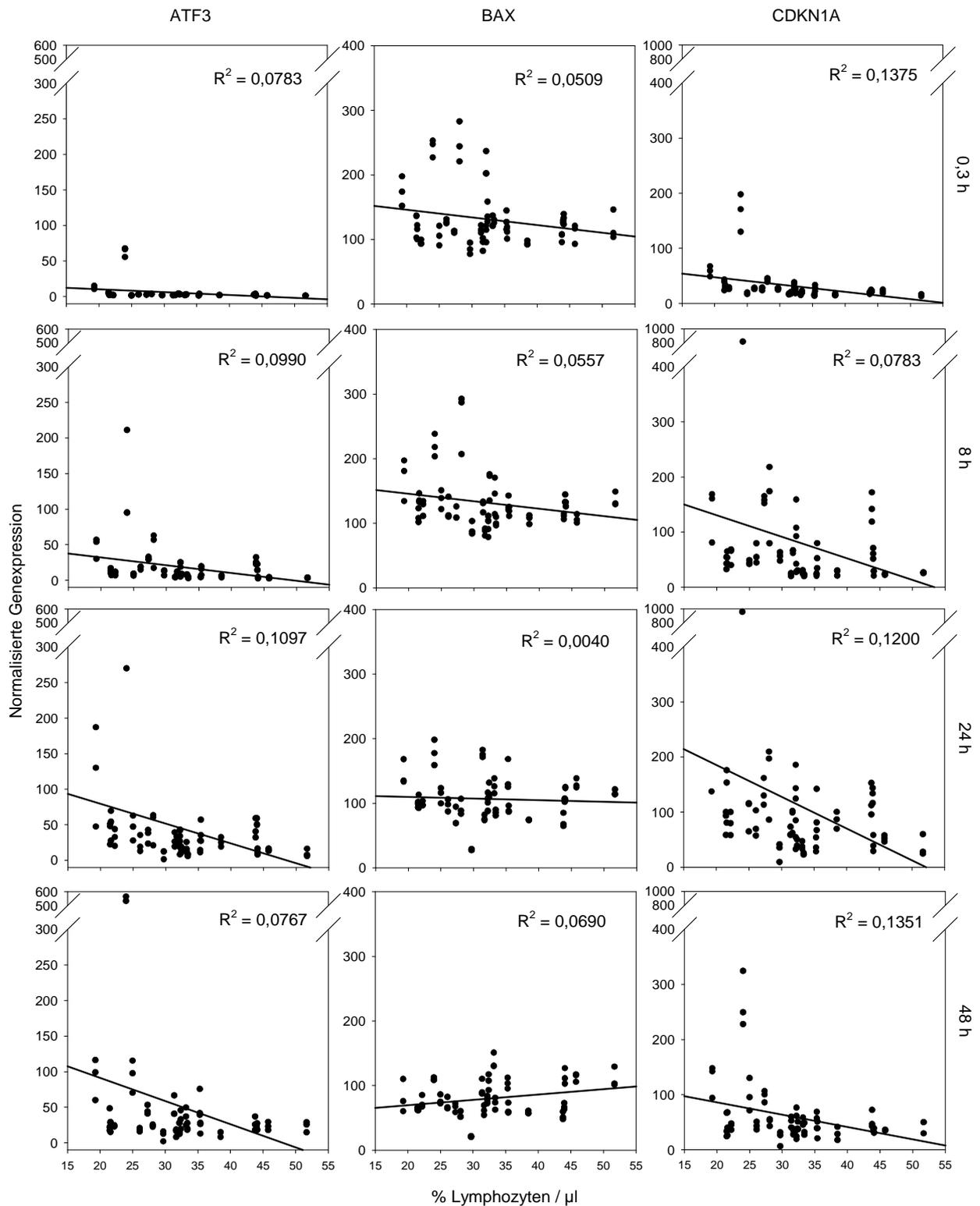
1 von 2

Abb. 8.16: Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der Lymphozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der Lymphozyten erklären lässt.



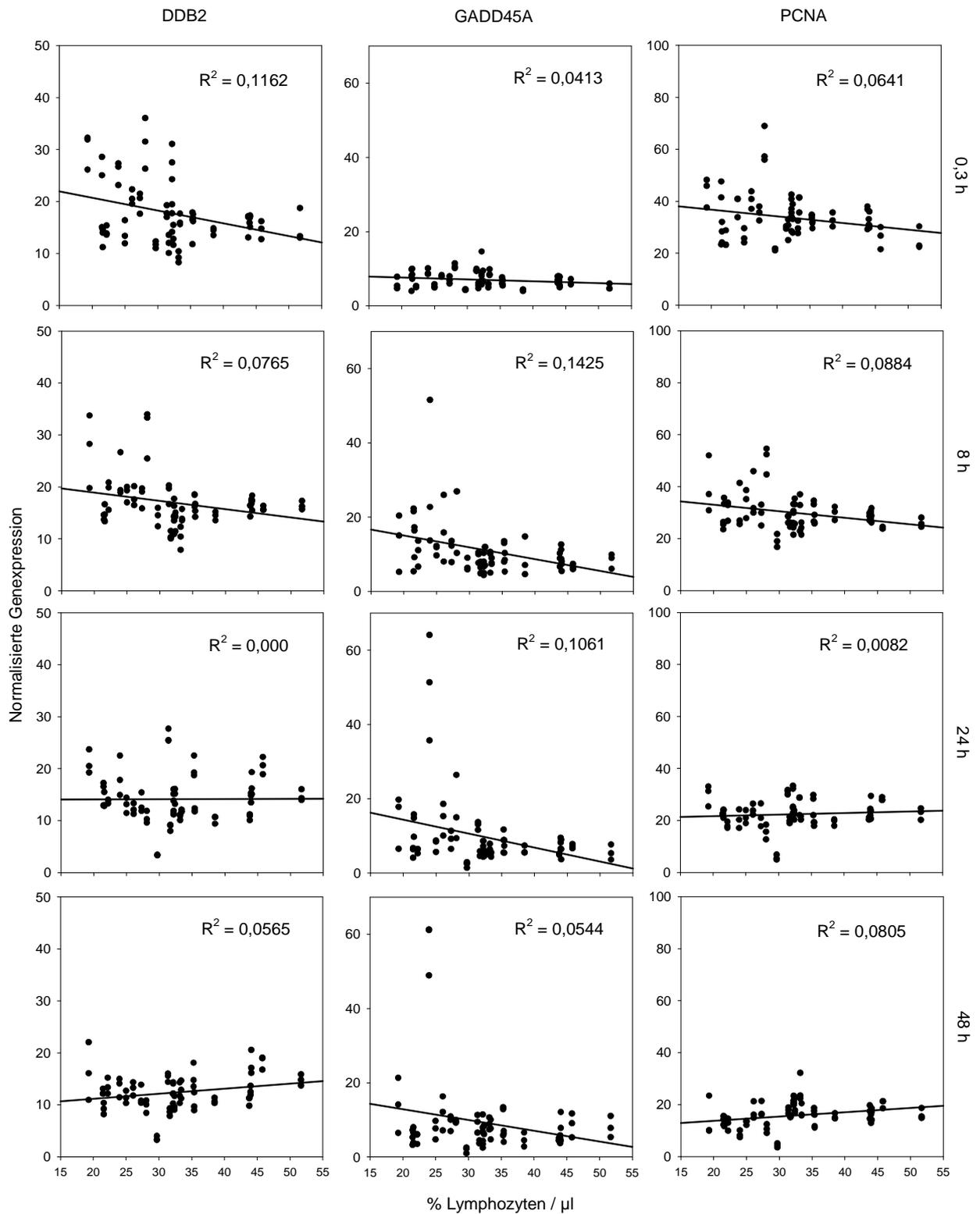
2 von 2

Abb. 8.16 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der Lymphozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der Lymphozyten erklären lässt.



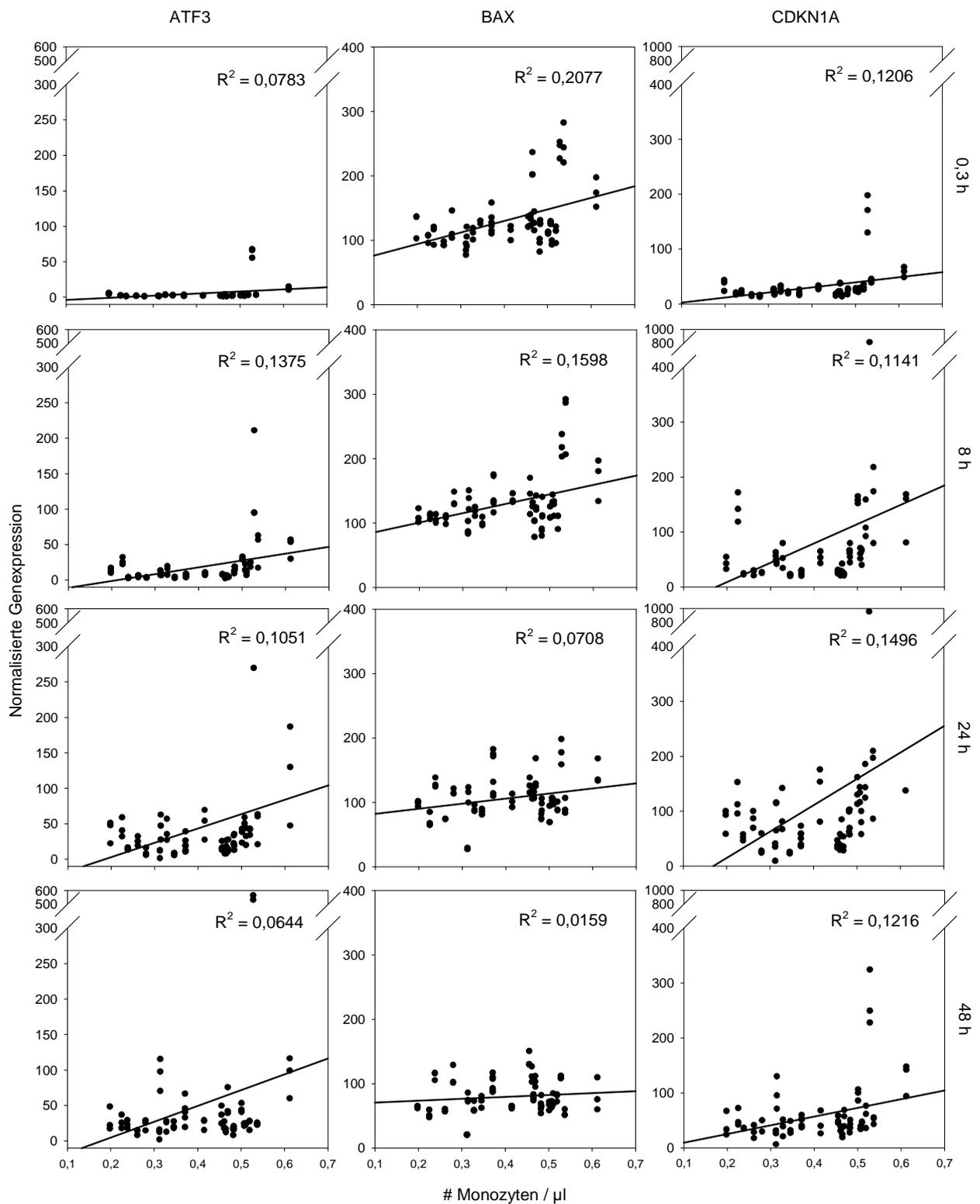
1 von 2

Abb. 8.17: Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der Lymphozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der Lymphozyten erklären lässt.



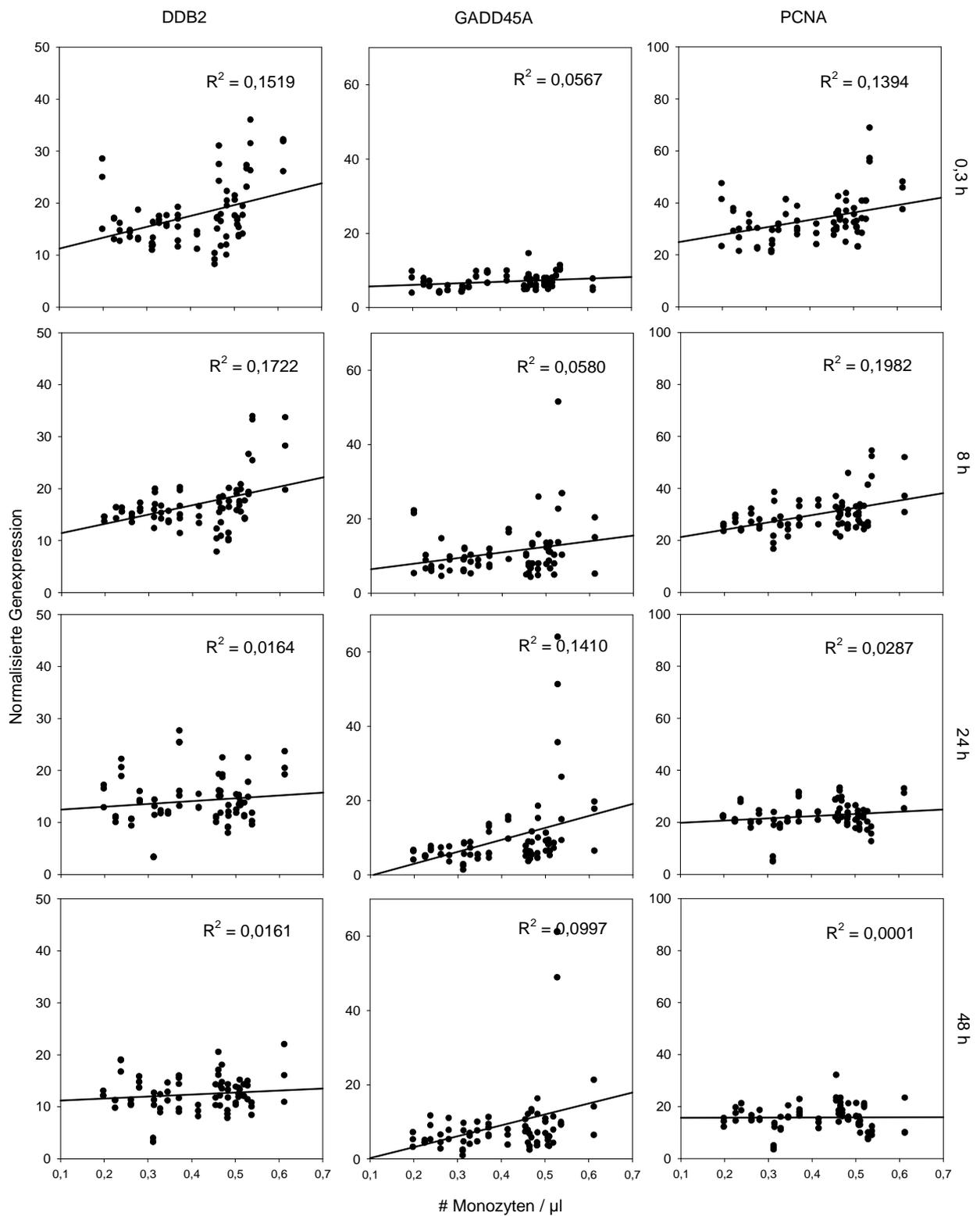
2 von 2

Abb. 8.17 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der Lymphozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der Lymphozyten erklären lässt.



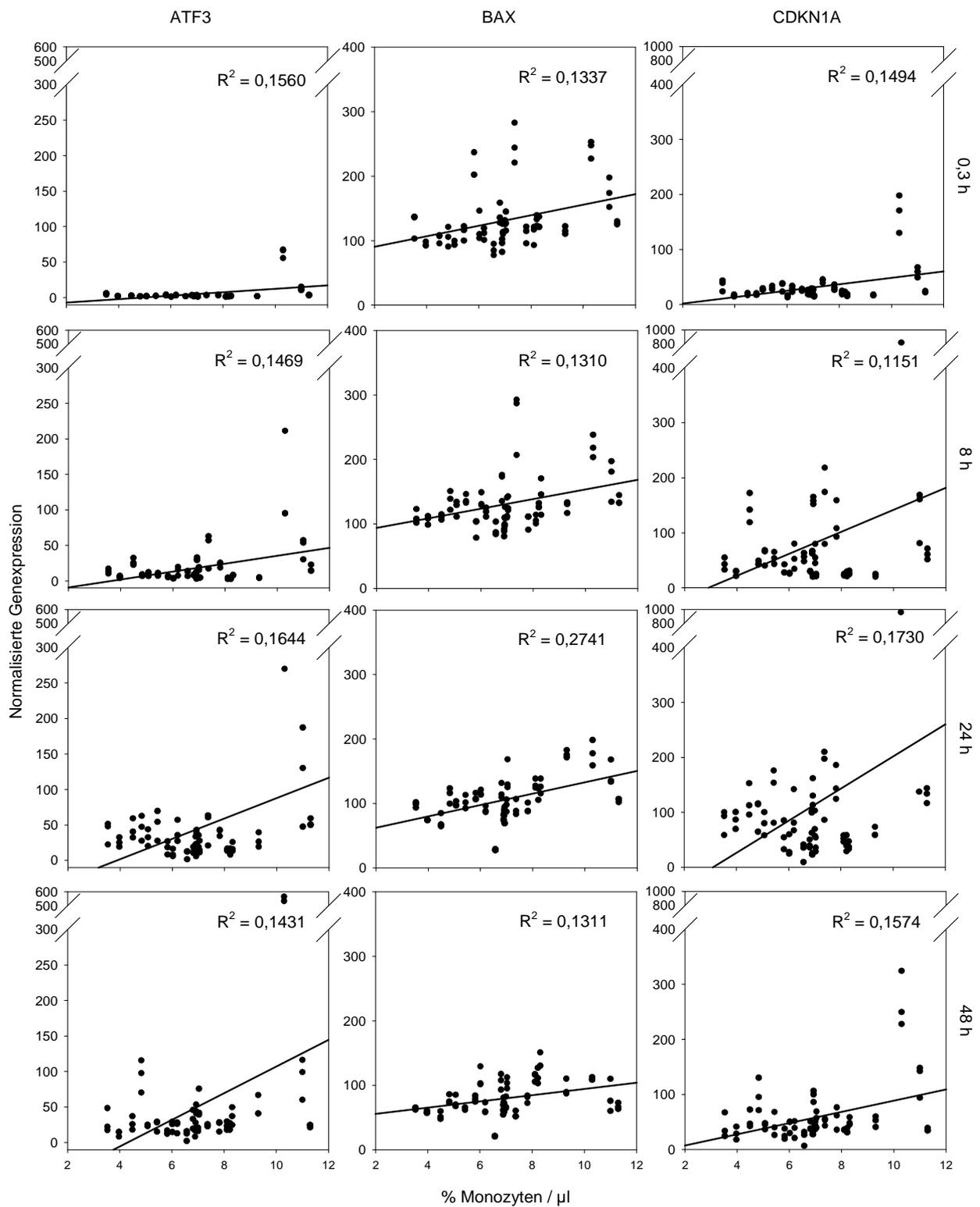
1 von 2

Abb. 8.18: Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der Monozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der Monozyten erklären lässt.



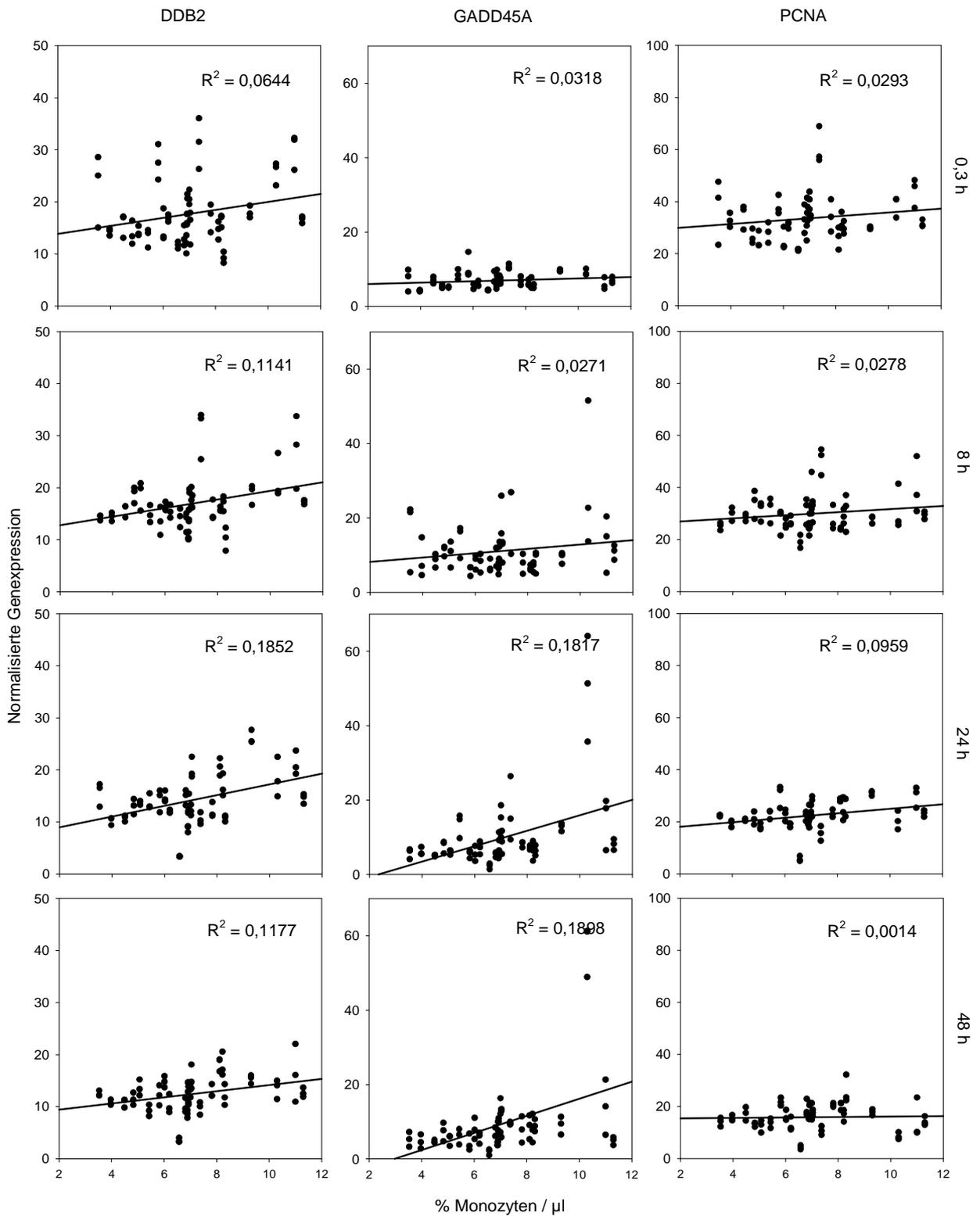
2 von 2

Abb. 8.18 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl (#) der Monozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die Gesamtzahl der Monozyten erklären lässt.



1 von 2

Abb. 8.19: Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der Monozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der Monozyten erklären lässt.



2 von 2

Abb. 8.19 (Fortsetzung): Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl (%) der Monozyten und der normalisierten Genexpression. Jeder Punkt steht für einen einzelnen Messwert. Der Variabilitätskoeffizient (R^2) gibt an, wie sehr sich die Höhe der normalisierten Genexpression durch die relative Anzahl der Monozyten erklären lässt.

8.9 Einflussfaktoren auf die Genexpression im verwendeten In-vitro-Modell

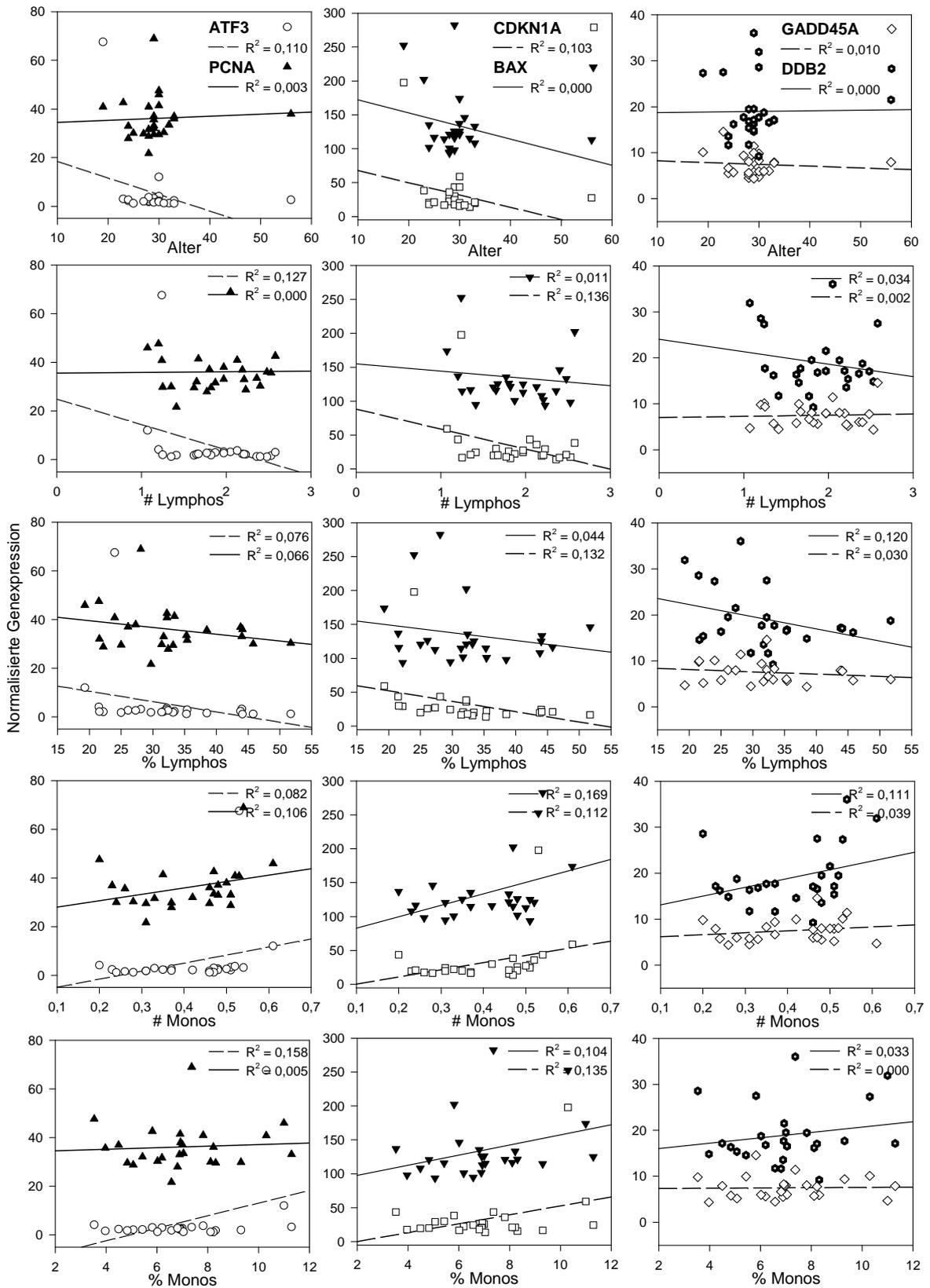


Abb. 8.20: Einfluss von Probandenalter und verschiedenen Blutbildparametern auf die Höhe der normalisierten Genexpression der unbestrahlten Kontrollproben 20 Minuten nach Blutentnahme. (# = absolute Anzahl, % = relative Anzahl, Lymphos = Lymphozyten, Monos = Monozyten.)

9 Danksagung

Die Erstellung der vorliegenden Arbeit war mir in diesem Umfang nur durch die Unterstützung vieler Menschen möglich, für deren Hilfe ich mich an dieser Stelle bedanken möchte. So waren es oft die kleinen Dinge, die Großes bewirkten.

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. V. Meineke für die freundliche Aufnahme im Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München, insbesondere für die Bereitstellung sämtlicher Materialien und Laborgeräte. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M.Sc. M. Abend für die Überlassung des Themas sowie die kompetente und versierte Betreuung. Mit viel Menschlichkeit, beständiger Freundlichkeit und unendlicher Geduld begleitete er mich über den gesamten Zeitraum meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer der Doktorarbeit Herrn Dr. C. Ruf bedanken, der mich für diese Arbeit motiviert und vor allem während des experimentellen Teils und bei der umfangreichen Auswertung stets hilfsbereit beraten hat. Im Weiteren gilt mein Dank den Herren Drs. A. Riecke und M. Port, die mir mit wertvollen Ratschlägen neue Denkanstöße gegeben haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn S. Senf für die kompetente und geduldige Einarbeitung in sämtliche Labortätigkeiten im Zusammenhang mit der RT Q-PCR und Herrn R. Hartmann für die Unterstützung bei der Probenaufbereitung, RNA-Isolation und cDNA-Synthese. Allen weiteren, hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes danke ich für die überaus herzliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern Marlis und Hans-Armin Brosow sowie meinem Bruder Volker und vielen Freunden danke ich für das große Interesse an meiner Arbeit und die damit verbundene, wertvolle moralische Unterstützung. Mein abschließender Dank gilt Herrn C. Hesse und Frau R. Uschold. Ihr wachsamer und kritischer Blick von außen war mir stets eine große Hilfe.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Geburtsdatum 21. März 1977
Geburtsort Neustadt an der Weinstraße

Beruflicher Werdegang:

Seit Oktober 2009 Dezent für Qualitätsmanagement in regionalen Sanitätseinrichtungen, Sanitätsamt der Bundeswehr in München

Von August 2008 bis September 2009 Dezent für Krankenhausinformationssysteme und Telemedizin, Sanitätsamt der Bundeswehr in München

November 2007 Beginn der Promotion am Institut für Radiobiologie der Bundeswehr in München

Von Mai 2005 bis Juli 2008 Truppenarzt im Sanitätszentrum Neubiberg an der Universität der Bundeswehr München

Von November 2003 bis Mai 2005 Assistenzarzt am Bundeswehrkrankenhaus Berlin, Abteilung für Urologie

November 2004 Approbation als Arzt und Ernennung zum Sanitätsoffizier

November 2003 Teilapprobation als Arzt

Januar 1997 Wechsel in die Laufbahn der Sanitätsoffizieranwärter

Juli 1996 Eintritt in die Bundeswehr als Grundwehrdienstleistender

Universitäre Ausbildung:

Von November 1999 bis November 2003 Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Technischen Universität München

Von November 1997 bis Oktober 1999 Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg