

Untersuchung strahleninduzierter Genexpressionsänderungen in Subpopulationen des peripheren Blutes unter Verwendung zuvor identifizierter Gene mit Korrelation zum Schweregrad der akuten Strahlenkrankheit

Alan Sebastian Don Mallawaratchy

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

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Michael Abend
2. Prof. Dr. Stephanie E. Combs

Die Dissertation wurde am 02.06.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort	2
2	Einführung	2
2.1	Verzeichnis der Abkürzungen	2
2.2	Einleitung	5
2.3	Akutes Strahlensyndrom.....	6
2.4	Nukleare Szenarien	6
2.5	Polymerase-Kettenreaktion	7
2.6	cDNA-Synthese.....	7
2.7	qRT-PCR.....	7
2.8	Normalisierung mittels 18S rRNA als Haushaltsgen	8
2.9	PPD – „Primer Probe Design“	8
2.10	Studien zu relevanten Genen bezüglich des akuten Strahlensyndroms.....	8
3	Material und Methode	9
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	9
3.2	Arbeitsablauf.....	12
3.3	Gewinnung von peripherem Blut.....	13
3.4	Bestrahlung des peripheren Blutes mit 4 Gy	14
3.5	Lagerung des peripheren Blutes in einer Zellkultur für 24h	14
3.6	Zellseparation von Granulozyten (CD15 Antigen), B-Lymphozyten (CD19 Antigen), T-Lymphozyten (CD3 Antigen) und NK-Zellen (CD56 Antigen) aus Vollblut mittels immunomagnetischer Separation („Magnetic Beads“)	14
3.7	RNA-Isolation des Vollblutes.....	16
3.8	RNA-Isolation der Zellsubpopulationen.....	17
3.9	Zellzählung	17
3.10	Spektralphotometrische RNA-Mengenbestimmungen	18
3.11	DNA-Kontaminationsbestimmung durch Agarose-Gel-Elektrophorese nach Beta-actin-Nachweis mittels PCR	18
3.12	RNA-Integritäts-/Qualitätsbestimmung.....	19
3.13	cDNA-Synthese und qRT-PCR.....	20
4	Statistik	22
5	Ergebnisse	22
5.1	Zellsubpopulationsmengen.....	22
5.2	Zellvitalität und RNA-Quantität/–Qualität.....	24
5.3	Genexpression im Vollblut und in Zellsubpopulationen.....	27

6	Diskussion.....	33
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	36
8	Referenzen	40
9	Anhang	44
10	Danksagung.....	65

1 Vorwort

In dieser Arbeit sind Inhalte der eingereichten Veröffentlichung Ostheim, P., Don Mallawaratchy, A., et al. (2021b). "Acute Radiation Syndrome-related gene expression in irradiated peripheral blood cell populations." Int J Radiat Biol 97(4): 474-484 eingegangen. Diese Veröffentlichung beschreibt Untersuchungen meiner Doktorarbeit, die um verschiedene Aspekte methodisch erweitert worden sind.

2 Einführung

2.1 Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Δ	Delta bzw. Differenz
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ASK	Akute Strahlenkrankheit
B	B - Zellen
BP	Basenpaare
CT	Cycle Threshold
cDNA	Complementary DNA
D	Dosis
DDB2	Damage Specific DNA Binding Protein 2
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Erythrozytenlysepuffer
et al.	Et alteri
FC	Fold-Change
FCS	Fetal calf serum
FDXR	Ferredoxin reductase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Granulozyten
Gy	Gray
h	Stunde
H	Hämatologisches Organsystem nach METREPOL
HARS	Hematologic acute radiation syndrome
HASK	Hämatologische akute Strahlenkrankheit
ID	Identifikationsnummer
k	Kilo
kb	1000 Basenpaare
Ko	Kontrolle
METREPOL	Medical Treatment Protocols for Radiation Accident Victims
min	Minute
miRNA	MicroRNA

mRNA	Messenger RNA
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTC	Non-Template Control (Negativkontrolle)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pol	Polymerase
POU2AF1	POU class 2 associating factor 1
PPD	Primer Probe Design
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
R	Korrelationskoeffizient
RDD	Radiological Dispersal Devices
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
Rn	Normalisiertes Reportersignal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT Q-PCR	Realtime Q-PCR
s.	Siehe
s	Sekunde
S	Svedberg

SD	Standardabweichung
SOP	Standard Operating Procedure
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
Taq	Thermus aquaticus (-Polymerase)
T	T-Zellen
V	Volt
WHB	Whole Blood
WNT3	Wingless-type MMTV integration site family member 3
ZNS	Zentrales Nervensystem

2.2 Einleitung

Durch Unfälle in Atomkraftwerken, schmutzige Bomben oder nukleare Waffen kann radioaktive Strahlung freigesetzt werden. Diese führt dosisabhängig zu gesundheitlichen Schäden beim Menschen. Solche Individuen können infolgedessen ein akutes Strahlensyndrom oder eine akute Strahlenkrankheit (ASK) entwickeln. Die schnelle Unterscheidung zwischen unbestrahlten Individuen und Personen, die entweder eine sehr hohe oder eine geringe Dosis absorbiert haben, ist schwierig, da die dazu nötige Diagnostik, wie z.B. die Untersuchung dizentrischer Chromosomen, drei bis vier Tage benötigt. Diese Methode nutzt man zur Bestimmung einer biologischen Dosimetrie, wodurch jedoch wertvolle Zeit zur Durchführung lebensnotwendiger Therapieschritte verloren geht. Zur Frühdiagnostik können zudem klinische Symptome wie Übelkeit oder Erbrechen (klinische Dosimetrie) verwendet werden, die aber eher unspezifisch sind. Mithilfe der physikalischen Dosimetrie lässt sich zwar eine Aussage über die absorbierte Dosis treffen, jedoch kann, basierend auf der Messung allein, keine Ganzkörper- von einer Teilkörperbestrahlung differenziert werden. In einer solchen Situation können strahleninduzierte Genexpressionsänderungen im peripheren Blut zur Frühdiagnose und Differenzierung der oben angegebenen Expositionsgruppen verwendet werden. In vorangegangenen Experimenten wurden entsprechende Gene wie beispielsweise WNT3, DDB2, FDXR oder POU2AF1 identifiziert (Port, M. et al., 2016a). Die Leukozyten im bestrahlten, peripheren Blut sind für die strahleninduzierten Genexpressionsänderungen in den zuvor identifizierten Genen

(FDXR, WNT3, POU2AF1, DDB2) maßgeblich verantwortlich. Zu den Leukozyten gehören die B-, T-, NK-Zellen, Granulozyten und Monozyten, wobei sich die Subpopulationen in der Häufigkeit, in der sie im peripheren Blut vorkommen, deutlich unterscheiden. Ziel dieser Arbeit war es, einen Vergleich zwischen Zellpopulationen des peripheren Blutes nach Bestrahlung anzustellen, um herauszufinden, ob nur eine Zellsubpopulation der Leukozyten oder mehrere Zelltypen für die Genexpressionsänderungen zuständig sind. Auf diese Frage werde ich in meiner Arbeit näher eingehen. Hierfür wurden die RNA-Mengen der verschiedenen Zellpopulationen und die Genexpressionsänderungen der jeweiligen Zellen sowie des jeweiligen Gens nach Bestrahlung betrachtet, um herauszufinden, mit welchem Anteil die einzelne Zellpopulation an der Gesamtgenexpression beitrug. Dazu musste man wissen, wie sich das Gen vor und nach Bestrahlung verhielt. Da die Granulozyten im Vergleich zu den anderen Zellpopulationen am häufigsten vorzufinden sind, könnte man an dieser Stelle davon ausgehen, dass die Genexpressionsänderungen durch diesen Zelltypen maßgeblich bedingt werden.

2.3 Akutes Strahlensyndrom

Ist der Organismus akuter Strahlung ausgesetzt, so kommt es dosisabhängig zu verschiedenen Syndromen. Diese können verschiedene Organsysteme wie die Haut, den Gastrointestinaltrakt, das ZNS oder das hämatopoetische System (HARS, hämatologisch akutes Strahlensyndrom) betreffen. Durch diese vorher genannten Syndrome kann sich die akute Strahlenkrankheit (ASK) äußern. Beim Schweregrad spielen verschiedene Faktoren wie Strahlenart, Dosis etc. eine Rolle. Am strahlensensibelsten sind Zellen mit hoher Proliferation wie beispielsweise Zellen des Knochenmarks (Dietel et al., 2013). Der Schweregrad z.B. der HARS kann nach den METREPOL-Kriterien, basierend auf klinische Zeichen und Symptome, in vier Stufen bzw. Phasen (H1 bis H4) unterteilt werden (Friesecke, I., et al. 2001; Port et al., 2016a). Die erste Phase (prodromal) äußert sich in den ersten Tagen mit Symptomen wie Erbrechen, Kopfschmerzen, Erythemen und Fieber. In der darauf folgenden Latenzphase, welche Tage bis Wochen andauern kann, zeigt das Labor eine Lympho- und Granulozytopenie (Dietel et al., 2013). Syndromspezifische Symptome wie Anämien oder Hämorrhagien, verursacht durch Panzytopenien, werden beim HARS in der manifesten Phase (dritten Phase) sichtbar. Im letzten Stadium kommt es entweder zum Tod oder zur Erholung (Macia et al., 2011).

2.4 Nukleare Szenarien

Die Verwendung von Radionukliden zum Bau einer Waffe (RDD) ist in den letzten Jahren zu einem realistischen Szenario geworden. Das Leben tausender Menschen durch radioaktive Strahlenquellen zu bedrohen, macht den Einsatz von Radionukliden zu einer Gefahr für alle (Rump et al., 2017).

Weiterhin gab es auch radioaktive Unfälle wie 1986 in Chernobyl (Ukraine) oder 1987 in Goiana (Brasilien). Ein gutes medizinisches Management bzw. eine gute medizinische

Versorgung ist sehr wichtig. Die Unterscheidung von Menschen, die bereits eine hohe Dosis absorbiert haben von denjenigen Individuen mit niedriger oder keiner Strahlenbelastung, ist entscheidend. Denn man muss hierbei abwägen, wer zuerst therapiert werden soll und bei wem nur intensive Beobachtung genügt (Chaudhry, 2008).

2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR dient zur Amplifikation bestimmter Abschnitte des Genoms. Dabei wiederholen sich folgende Schritte: Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Elongation. Der erste Schritt erfolgt durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C, wodurch es zum Aufbrechen der Helixstruktur kommt und die DNA-Stränge einzeln vorliegen. Beim nächsten Schritt sinkt die Temperatur auf 50 °C, sodass sich anschließend passende Oligomere (Primer) an komplementäre Abschnitte anlagern. Im letzten Schritt werden die Stränge bei einer Temperatur von 75 °C verlängert. Als Startpunkt dient dabei der Primer. So kommt es nach jedem Zyklus n zu einer Verdopplung der Kopienanzahl (2^n) (Ramesh et al., 1992).

2.6 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA aus RNA wird eine reverse Transkriptase benötigt, welche RNA-abhängig komplementäre DNA synthetisiert. Dabei werden unspezifische Primer genutzt, welche dazu führen, dass nicht nur mRNA, sondern auch rRNA umgeschrieben wird (Gallo et al., 1971). Dies ist wichtig, da 18S rRNA zur Normalisierung genutzt wird.

2.7 qRT-PCR

Bei der qRT-PCR wird einerseits die DNA vervielfältigt und andererseits die Fluoreszenz mittels Spektrometer gemessen. Diese steigt mit jedem weiteren Zyklus und gibt Auskunft über die Menge der vervielfältigten DNA. Bei dieser Arbeit wurde eine TaqMan-Sonde genutzt. Hierbei handelt es sich um eine Hydrolyse-Sonde, die am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff und am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff trägt. Die örtliche Nähe beider Farbstoffe hemmt die Freisetzung von Licht des Reporters. Die doppelstrangspezifische Polymerase hydrolysiert die Sonde, die sich anschließend von der DNA trennt. Dies führt einerseits zur Reporterfreisetzung und andererseits zu einem Anstieg der Fluoreszenz, da der Quencher die Emittierung von Licht durch den Reporter nicht mehr blockieren kann (Bustin, 2000). Auf diese Weise steigt bei der Elongation die gemessene Fluoreszenz. TaqMan-Sonden, die nicht an der DNA gebunden sind, werden durch die Polymerase nicht hydrolysiert.

Die Baseline gibt die Genexpression nach 0 Gy (also ohne Bestrahlung) an. Der CT-Wert gibt wiederum genau denjenigen PCR-Zyklus an, bei welchem die Fluoreszenz des Reporters eine bestimmte Grenze überschreitet. Dieser CT-Wert wird auch als „Threshold Cycle“ bezeichnet und hängt ebenso von der DNA-Ausgangsmenge ab. Ist der CT-Wert um eins kleiner, dann ist die cDNA-Ausgangsmenge und die Fluoreszenz doppelt so hoch (2^n), wenn man dabei von

einer 100% Effizienz ausgeht. Hierbei kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Kopienanzahl bzw. der DNA. Der daraus resultierende Amplifikationsplot ergibt sich durch Auftragung des normalisierten R_n -Wertes auf der y-Achse sowie die Anzahl der PCR-Zyklen auf der x-Achse. Das normalisierte Reportersignal (R_n) berechnet man durch Division der Intensität der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes und der Intensität des Referenzfarbstoffes. Dies dient zum Ausgleich von Pipettierungenauigkeiten.

2.8 Normalisierung mittels 18S rRNA als Haushaltsgen

Um mögliche Fehlerquellen wie Enzymeffektivitätsunterschiede, Pipettierfehler, Qualitäts- und Ausgangsmengendifferenzen zu minimieren, müssen die CT-Werte der untersuchten Gene mithilfe eines Haushaltsgens normalisiert werden. Das Haushaltsgen hat die Eigenschaft, dass es trotz Bestrahlung in der Expression unverändert bleibt. In dieser Studie wurde 18S ribosomale RNA (18S rRNA) als Haushaltsgen verwendet. In vorangegangenen Untersuchungen wurde die besondere Eignung von 18S rRNA bewiesen. Dieses Haushaltsgen bleibt relativ konstant bei externen Stimuli wie etwa Strahlung (Banda et al., 2008; Port et al. 2007).

2.9 PPD – „Primer Probe Design“

Die Primer binden an komplementäre Abschnitte, die zu vervielfältigen sind. Die benutzten Primer („Intron Spanning Primer Probe Design“) der verwendeten TaqMan-Chemie binden an benachbarte Exons und überbrücken eine Intronregion (Bustin, 2000). Große Amplikons können aufgrund der kurzen Elongationszeit nicht synthetisiert werden, sodass sich eine DNA-Kontamination der RNA-Isolate darauf nicht auswirken würde.

Bei den vorgefertigten Primer und „Probes“ (Sonden) handelt es sich um Hydrolyse-Sonden.

2.10 Studien zu relevanten Genen bezüglich des akuten Strahlensyndroms

In den letzten Jahren wurden Gene im peripheren Blut identifiziert, die eine Vorhersage zum Schweregrad der ASK erlauben (Abend et al., 2016; Brzoska, 2015; Dressman et al., 2007; Joiner et al., 2011; Port et al., 2018; Port et al., 2021).

Dabei wurden eine Hoch- und Herunterregulierung bestimmter mRNA/miRNA nach Bestrahlung beobachtet, die zur Vorhersage des später eintretenden HARS genutzt wurden. 18 Paviane wurden mit einer Dosis von 2,5 oder 5 Gy bestrahlt. Einer starb daraufhin, weshalb nur noch bei 17 Pavianen Blut vor Bestrahlung und ein Tag sowie zwei Tage nach der Bestrahlung entnommen wurde. Dann hat man eine Genomsequenzierung mittels Microarray gemacht, um nach Genen zu suchen, die durch Strahlung ihre Expression ändern. Es wurden 89 Gene gefunden und nach Durchführung einer qRT-PCR wurden 29 Gene zur Vorhersage eines HARS identifiziert (Port et al., 2016a).

Außerdem hat man Blut von bestrahlten Patienten, wie z.B. nach Radiotherapie bei einem Prostatakarzinom oder nach Ganzkörperbestrahlung von Leukämiepatienten, genommen und auf spezifische Gene untersucht (Port et al., 2018).

Ausgehend von diesen Vorarbeiten wurden Gene identifiziert, die von besonderer, diagnostischer Relevanz sind. In dieser Arbeit werden explizit folgende Gene untersucht: WNT3, POU2AF1, FDXR und DDB2 (Lee et al., 2018; O'Brien et al., 2018; Port et al., 2016a; Port et al., 2018; Port et al., 2021).

Welche Funktionen haben diese Gene? WNT3 ist bei der Embryonalentwicklung bei verschiedenen Tumortypen wie Brustkrebs etc. beteiligt. Außerdem spielt WNT3 eine Rolle sowohl bei der Resistenz gegenüber Strahlung von squamösen Ösophaguszellkarzinomen (Liu et al., 2019; Port et al., 2018) als auch bei Reparaturvorgängen des Dünndarmgewebes nach Strahlenbelastung durch Aktivierung des Wnt/ β -catenin-Signalweges (Gong et al., 2016; Port et al., 2018). POU2AF1 trägt zu der Expression von Immunglobulinen und CD20 in B-Zellen bei. FDXR ist bei der Expression eines mitochondrialen Proteins, bei der Apoptose und beim Elektronentransport bei Cytochrom P450 beteiligt. Außerdem reagiert FDXR auf Strahlung, weshalb man es zur Biodosimetrie nutzen kann (O'Brien et al., 2018; Port et al., 2018). DDB2 ist Bestandteil der Nukleotidexzisionsreparatur, welche z.B. bei Schäden durch UV-Strahlung benötigt wird. Zudem ist es bei der Ubiquitinierung von Histonen involviert (Port et al., 2018).

3 Material und Methode

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte	Hersteller (Hauptsitz)
7900HT sequence detection system	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Agilent 2100 bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
AutoMACS Pro Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
AXIO Vert A1 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrische Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fumehood	Köttermann Systemlabor, Uetze, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	PEQlab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland
Heraeus BBD 6220 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
IKA M83 Vortex	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Laminar Flow Hood	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Maxishot SPE cabin	Yxlon, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Neubauer Zählkammer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PEQlab PCR Workstation Pro	PEQlab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland
Proflex PCR System Thermal Cycler	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
REAX 2000 Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Rotilabo mini centrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TW12 Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland

UNIDOS webline 10021 Dosimeter	PTW, Freiburg, Deutschland
Vilber-E-Box Imaging	Vilber, Collégien, Frankreich
Waage Sartorius BP41005	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kits	Hersteller (Hauptsitz)
Agilent RNA Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Agilent RNA Pico Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
QIAmp RNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
TaqMan _PreAmp	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Chemikalien und Reagenzien	Hersteller (Hauptsitz)
100bp DNA ladder	Köttermann Systemlabor, Uetze, Deutschland
Agarose Type 1-A: low EEO	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DNase & RDD Puffer	QIAGEN, Venlo, Niederlande
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Puffer 2	Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland
RPMI- Zellkulturmedium	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
PPD	Hersteller (Hauptsitz)

Hs00902257_m1 WNT3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hs01031617_m1 FDXR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hs01573369_m1 POU2AF1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hs03003631_g1 18S rRNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hs03044949_m1 DDB2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Materialien	Hersteller (Hauptsitz)
96 well Optical Plates	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
EppendorfgeläÙe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon tubes	Corning, Inc., Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen	Corning, Inc., Corning, New York, USA
Software	Hersteller (Hauptsitz)
Inventor Professional	Autodesk, San Rafael, Kalifornien, USA
Sigma Plot 14	Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland

Tabelle 1: Diese Tabelle zeigt das jeweilige Verbrauchsmaterial und den Hersteller.

3.2 Arbeitsablauf

Die nachfolgende Abbildung (s. Abb. 2) veranschaulicht grob die Arbeitsschritte. Es wurde Blut von sechs gesunden Donoren (zwei weiblich und vier männlich) im Alter von 24 bis 37 Jahren entnommen. Nach Bestrahlung der Hälfte der Blutproben mit 4 Gy wurde das gesamte Blut (bestrahlt und unbestrahlt) für 24 h in einem Zellkulturmedium inkubiert. Blutproben, die zur Auswertung der Genexpression in Zellpopulationen dienten, durchliefen noch einen Zwischenschritt (Isolation der Zellpopulationen mittels „Magnetic-Beads“) bevor die RNA

isoliert wurde. Hierbei wurde ein anderes Kit („Rneasy Mini Kit“) genutzt. Dann folgte die Qualitätskontrolle, welche die NanoDrop-Messung, Beta-actin-PCR und RIN-Bestimmung beinhaltet. Die cDNA-Synthese und die qRT-PCR waren die letzten Schritte.

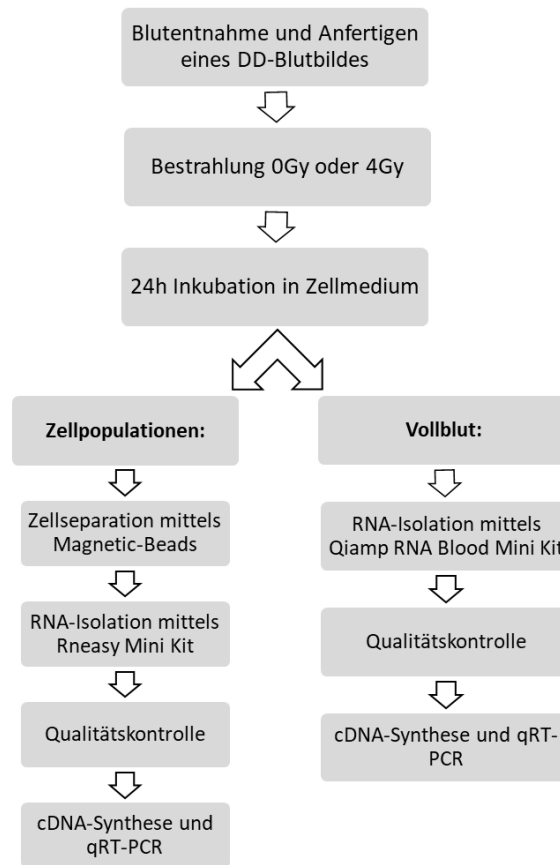


Abb. 2: Hier findet man eine Übersicht über den Arbeitsablauf mit Bestrahlung der Blutröhrchen, Kultivierung, Separation, RNA-Isolation, Qualitätskontrolle und qRT-PCR.

3.3 Gewinnung von peripherem Blut

Bei sechs Probanden (zwei weiblich und vier männlich) im Alter von 24 bis 37 Jahren wurden jeweils 18 EDTA-Röhrchen mit je 4,9 ml Vollblut entnommen und danach sofort bearbeitet. Die Anamnese der Teilnehmer war unauffällig und es waren keine Vorbestrahlungen bekannt. Das Alter lag im Durchschnitt bei ca. 32 Jahren (s. Tabelle 2).

Proband	Jahrgang	Geschlecht	Alter
I	1995	m	24
II	1991	w	28

III	1983	m	36
IV	1982	m	37
V	1983	m	36
VI	1987	w	32

Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt das Alter, das Geburtsjahr und das jeweilige Geschlecht der Testpersonen.

3.4 Bestrahlung des peripheren Blutes mit 4 Gy

Genexpressionsänderungen von vier vorher festgelegten Genen (WNT3, FDXR, POU2AF1, DDB2) wurden bei unbestrahlten und bestrahlten B-, NK-, T- Zellen, Granulozyten und im peripheren Blut betrachtet. Dafür wurden je neun der 18 Röhrchen mit einer Einstellung von 4 Gy mit 240 kV, 13mA und einer Dosisrate von 1 Gy/min mittels einer Röntgenröhre (Maxishot SPE cabin) für 4 min bestrahlt. Die absorbierte Dosisrate wurde mit einem Dosimeter (UNIDOS webline 10021) gemessen. Die Dosis wurde aufgrund vorheriger Daten aus anderen Experimenten gewählt (Port et al., 2016b).

3.5 Lagerung des peripheren Blutes in einer Zellkultur für 24h

Das Blut der neun unbestrahlten und bestrahlten Röhrchen je Proband wurde in zwei separate 250 cm² Zellkulturflaschen im Verhältnis von 1:2 mit RPMI-Medium (mit 10% FCS) gegeben (44,1 µl Blut und 44,1 µl RPMI-Medium) und über 24 h bei 37 °C, 5 %iger CO₂-Atmosphäre und 95 %iger Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.6 Zellseparation von Granulozyten (CD15 Antigen), B-Lymphozyten (CD19 Antigen), T-Lymphozyten (CD3 Antigen) und NK-Zellen (CD56 Antigen) aus Vollblut mittels immunomagnetischer Separation („Magnetic Beads“)

Die jeweiligen Subpopulationen wurden durch immunomagnetische Zellseparation (AutoMACS Pro Separator) aus dem gewonnenen Vollblut isoliert. Hierzu wurde unter dem Punkt „Separation“ des Menüs der Unterpunkt „Wash Now“ gewählt. Nach Ablauf dieses Programmes war das Gerät zur Separation bereit. Für jeden Probanden benötigt man jeweils 8 Röhrchen (mit zu prozessierendem Material) für bestrahlt und unbestrahlt. Weil das Zellseparationsgerät mit der benötigten Einstellung nur maximal 15 ml bei einem einzelnen Vorgang prozessieren kann und das Rack nur eine Kapazität von fünf gleichzeitig zu prozessierenden Proben hat, benötigte man insgesamt zwei Läufe pro Proband. Für die Isolation jeder Zellpopulation wurden somit jeweils zwei EDTA-Röhrchen mit jeweils 4,9 ml Vollblutvolumen benötigt.

Für die unbestrahlten Proben werden anfangs vier Falconröhrchen mit jeweils 45 ml benötigt, die mit 1.1 bis 1.4 nummeriert wurden. Alle Vorgänge wurden unter der Sterilbank erledigt.

In jedes Röhrchen wurden 19,6 ml Flüssigkeit (bestehend aus Blut und Zellkulturmedium) der unbestrahlten Zellkulturflasche überführt. Dann wurden 490 µl (50 µl des Antikörpers pro ml Blut) des jeweiligen AK hinzugegeben und für 30 s gevortext (s. Tabelle 3). Nun wurden noch weitere acht 45 ml Falconröhrchen benötigt, die mit 1.1a und 1.1b, 1.2a und 1.2b, 1.3a und 1.3b sowie 1.4a und 1.4b beschriftet wurden. Anschließend wurden 15 ml aus dem Röhrchen 1.1 entnommen und in das Proberöhrchen 1.1a und die restlichen 4,6 ml von 19,6 ml in 1.1b gegeben, 15 ml aus dem Gefäß 1.2 in 1.2a und die restlichen 4,6 ml in 1.2b transferiert usw. Die Proberöhrchen wurden dann für 15 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Wie auf der Abb. 9 unten zu sehen ist, wurde **Position A** des „Cooling-Racks“ mit diesen Proberöhrchen, **Position B** für die Negativ- und **Position C** für die Positivselektion mit weiteren leeren Röhrchen beladen. Das „Cooling-Rack“ wurde wie oben beschrieben beladen, in den Autoseparator gestellt und die Schutzblende geschlossen. Für jeden Slot wurde das Programm „POSSELWB“ („positive selection from whole blood“), die jeweiligen Volumina der Proberöhrchen sowie das Waschprogramm „Rinse“ eingestellt. Letztlich wurde das Gerät gestartet. Bei der Separation werden die markierten Zellen zurückgehalten und in die 15 ml Röhrchen in Position C freigesetzt. Die unmarkierten Zellen gelangen in die 45 ml Gefäße in Position B.

Die gleiche Vorgehensweise erfolgte nun auch mit dem Inhalt der bestrahlten Zellkulturflasche. Der einzige Unterschied bestand lediglich in der Beschriftung, die nun von 1.5a/1.5b bis 1.8a/1.8b ging. Dies passierte zeitversetzt, da sonst die Qualität des Ausgangsmaterials schwindete. Nach den Läufen wurden die Inhalte der Röhrchen 1.1a und 1.1b bzw. 1.2a und 1.2b usw. zu jeweils einem Falconröhrchen mit der Nummerierung 1.1 bis 1.8 zusammengeführt und kühl gelagert. Somit verliehen insgesamt acht Röhrchen pro Proband. Aliquots á 10 µl, nummeriert mit 1.1 bis 1.8, wurden entnommen und in einem separaten Eppendorfgefäß zur späteren Zellzählung in der Neubauer Zählkammer aufbewahrt.

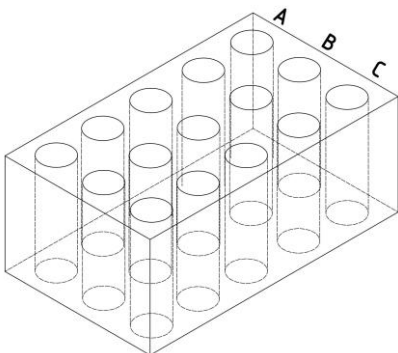


Abb. 9: Diese Abb. zeigt skizzenhaft das „Cooling-Rack“. Position A wird mit den Proben beladen. Nach der Separation findet man in den Röhrchen in Position B die Negativ- und in Position C die Positivselektion.

Gefäß-nr.	Strahlendosis (Gy)	Blutbestandteil	AK-Typ	Menge Antikörper in µl	Menge Blut-Puffergemisch aus der Zellkulturflasche (ml)
1.1	0	B-Zellen	CD-19	490	19,6

1.2	0	NK-Zellen	CD-56	490	19,6
1.3	0	T-Zellen	CD-3	490	19,6
1.4	0	Granulozyten	CD-15	490	19,6
1.5	4 Gy	B-Zellen	CD-19	490	19,6
1.6	4 Gy	NK-Zellen	CD-56	490	19,6
1.7	4 Gy	T-Zellen	CD-3	490	19,6
1.8	4 Gy	Granulozyten	CD-15	490	19,6

Tabelle 3: Diese Tabelle zeigt anhand eines Probanden, welche Mengen AK und Blut-Puffergemisch für die jeweilige Isolation benötigt wurden.

3.7 RNA-Isolation des Vollblutes

Bei der RNA-Isolation aus Vollblut wurde die vorgegebene Methode leicht modifiziert, um die Ausbeute zu erhöhen (Ostheim et al., 2021a). Es wurde mit 400 g für 20 min statt 10 min zentrifugiert. Zur RNA-Isolation aus Vollblut wurde das „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ benutzt. Die bestrahlten und unbestrahlten Vollblutproben (je 4,9 ml) wurden im Verhältnis 1:6, bezogen auf das Ausgangsvolumen, mit dem Erythrozytenlysepuffer (24,5 ml) vermischt. Dann wurde das Gemisch für 15 min auf Eis gelegt, wobei die Proben innerhalb der Zeit zwei Mal gevortext wurden. Danach wurden die Proben zwei Mal bei 4 °C mit 400 g für 20 min zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit dekantiert, damit nur das Zellpellet übrig blieb. Zwischen diesen zwei Zentrifugationsschritten wurde der Überschuss verworfen und der EL-Puffer (8,9 ml) im Verhältnis 1:3, bezogen auf das Ausgangsvolumen von 4,9 ml, zugefügt und gevortext. Zur späteren Zellzählung wurden 100 µl entnommen und in einem separaten Eppendorfgefäß kühl aufbewahrt. Anschließend wurden 600 µl RLT-Puffer zur Leukozytenlyse hinzugefügt, welcher mittels seines Guanidin-Thiocyanat-Anteils die Bindungsrate der RNA an der Membran der Säule erhöht. Zur Deaktivierung von RNAsen wurde außerdem noch Beta-Mercaptoethanol beigefügt. Das Gemisch wurde nun in ein „spin column“ gegeben und für 120 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. 600 µl des 70 %igen Ethanol, welches die Bindung zwischen RNA und der „spin column“ verbessert, wurde zugegeben. Die Probe wurde mit 350 µl RW1 Waschlösung in eine „QIAamp membrane spin column“ transferiert und für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Um mögliche DNA-Reste zu eliminieren, wurden noch 80 µl DNase (210 RDD buffer + 80 µl DNase) zugegeben. Außerdem kamen noch 350 µl RW1-Waschlösung hinzu und dann wurde für 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Zuletzt wurde mit 500 µl RPE-Puffer zwei Mal gewaschen und die Probe mit 60 µl RNase freiem Wasser eluiert.

3.8 RNA-Isolation der Zellsubpopulationen

Alle Schritte wurden nach einer SOP (Standardanweisung) des Institutes durchgeführt. Dabei wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgte in drei Schritten:

1. Zellyse und damit Freisetzung aller Zellbestandteile wie DNA, Proteine und RNA.
2. Aufreinigung der RNA-Probe, sodass unerwünschte, zusätzliche Bestandteile wie DNA oder Proteine durch Waschvorgänge entfernt wurden.
3. Elution der an der Silica-Membran gebundenen RNA durch RNase-freies Wasser.

Beim ersten Punkt wurden die Isolate in den Falcon-Tubes mit 153 g für 15 min zentrifugiert, der Überschuss verworfen und 600 µl des β-Mercaptoethanol-RLT-Puffer-Gemisches (Verhältnis 1:100) zugefügt, um die Zellen einerseits zu lysieren und andererseits denaturierende Eigenschaften der Enzyme wie RNasen zu deaktivieren. Mithilfe der Kolbenhubpipette wurde die Lösung gemischt. Nun wurden 600 µl Ethanol zugeführt, dann wurden 650 µl der Gesamtlösung in eine Processing-Tube umgesetzt und für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Schließlich entsorgte man den Durchfluss und die Säule wurde in eine neue Processing-Tube transferiert. Sollte die Probe ein Volumen von mehr als 650 µl übersteigen, so wurden die letzten Schritte nach dem Ethanol wiederholt.

Beim nächsten Schritt wurden 700 µl des RW 1-Puffers zugegeben, gefolgt von einer Zentrifugation mit 8000 g für eine Zeit von 15 Sekunden. Mögliche DNA-Kontaminationen wurden nach einer Zugabe von einem 80 µl DNase-RDD-Puffer-Gemisch (Verhältnis 1:8) und einer Wartezeit von 15 min eliminiert. Rest-RNA wurde durch die Beigabe von einem 620 µl RW 1-Puffer und zweimal von einem 500 µl RPE-Puffer gereinigt, wobei zwischen diesen drei Schritten immer mit der oben aufgeführten Einstellung zentrifugiert und der Durchfluss verworfen wurde (außer nach der letzten Pufferzugabe eines RPE-Puffers). Hier wurden für 120 s mit 16.000 g zentrifugiert und dann die Säule in ein „Collecting-Tube“ transferiert.

Als Letztes wurde die RNA gelöst. Dies geschah in zwei Schritten. Es wurden jeweils 30 µl RNase-freies Wasser hinzupipettiert, für 60 Sekunden inkubiert und dann für weitere 60 s bei 8000 g zentrifugiert, wobei beim letzten Schritt mit dem Maximum zentrifugiert wurde. Das „Collecting-Tube“ wurde verschlossen und beschriftet.

3.9 Zellzählung

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension in den Eppendorfgefäßen mit jeweils 10 µl Trypanblau versetzt und für 10 s gevortext. Ein Volumen von 10 µl wurde in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und unter einem Mikroskop (Zeiss Axio vert A1) ausgezählt. Aus der Anzahl der toten und lebenden Zellen wurde die Zellvitalität (in Prozent) berechnet.

3.10 Spektralphotometrische RNA-Mengenbestimmungen

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in ng/µl wurde die Lichtabsorption mit Hilfe des NanoDrops (PiqLab Biotechnology) bestimmt. Dazu wurden die Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm unter Einbringung von 1,5 µl der jeweiligen Proben gemessen, welche zur Konzentrationsbestimmung der Salze, Nukleinsäuren und Proteinen genutzt wurden. Der Quotient aus 260 nm und 280 nm gab den Kontaminationsgrad der Nukleinsäure z.B. durch Proteine an. Werte zwischen 1,8 und 2,2 standen für einen hohen Reinheitsgrad der RNA.

3.11 DNA-Kontaminationsbestimmung durch Agarose-Gel-Elektrophorese nach Beta-actin-Nachweis mittels PCR

Um mögliche Kontaminationen mit DNA auszuschließen, welche die 18S rRNA Mengenbestimmungen verfälschen könnten, wurde eine PCR mit einem β-actin-Nachweis durchgeführt. Es existieren viele Kopien dieses Gens auf der DNA. Deshalb ist diese Methode besonders sensitiv zum Nachweis von DNA-Kontaminationen. Ein 13-facher Ansatz des „Master-Mixes“ (s. Tabelle 4) wurde benötigt. Jeweils einen Ansatz für die Positivkontrolle mit DNA, für die Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser und für den Überschuss. Die restlichen zehn Ansätze waren für die Proben eines Probanden. Alle verwendeten Chemikalien und Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und vor Gebrauch gevortext. In jedes Gefäß wurden entweder 1 µl der Probe oder 1 µl der Kontrollen mit jeweils 49 µl des „Master-Mixes“ pipettiert, gevortext und anzentrifugiert. Dann folgten drei Schritte der PCR, welche mithilfe des Proflex PCR System Thermal Cyclers durchgeführt wurden. Bei letzterem wurde ein voreingestelltes Programm ausgewählt. Im ersten Schritt wurde eine Temperatur von 95 °C für 15 min eingestellt, um die DNA-Polymerase zu starten. Beim nächsten, insgesamt 90-minütigen Schritt wechselten sich drei einminütige Phasen 30-mal ab: Denaturierung bei 94 °C, Anlagerung („Annealing“) der Primer an die DNA bei 66 °C und Elongation bei 72°C. Im letzten Schritt wurde die Probe auf 8 °C herabgekühlt.

Nun wurde ein Gel hergestellt. Dafür wurden 100 ml TAE-Puffer mit 1 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben gemischt und mit einer Mikrowelle immer wieder kurz erhitzt bis sich die Agarose vollständig auflöste. Dann kamen noch 1 µl Ethidiumbromid (0.2 µg/ml) dazu. Bevor das Gel erstarrte, wurde es mit einem Kamm in die Form gegossen. Nach dem Abkühlen wurde der Kamm entfernt, die Platte in die mit TAE-Puffer befüllte Kammer gelegt und die Geltaschen mit den jeweiligen Proben aus den Perforationen der „Mini-Tray“-Reaktionsplatte befüllt. Bei der Vorbereitung dieser „Wells“ wurden 3 µl des vorgefertigten Loadingbuffers und 7 µl der jeweiligen PCR-Amplifikation in die Öffnungen des Gels pipettiert, wobei in die erste Geltasche 10 µl einer 1000 bp DNA-Leiter als Längenstandard kam. Dann wurden eine Spannung von 100 V, eine Stromstärke von 400 mA und eine Zeitdauer von 0,5 h eingestellt und die Elektrophorese gestartet.

	Volumen in µl
RNase-freies Wasser	22

„Master-Mix“	25
Antisense	1
Sense	1
RNA-Probe	1
Gesamtvolumen	50

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Mengenangaben, welche für den β -actin-PCR-Ansatz für eine Probe notwendig waren.



Abb. 1: Die Abbildung eines Gelelektrophoresegels zeigt rechts die 1 kb DNA-Leiter, dann folgen vier Proben als Beispiel, die Positivkontrolle (+Ko, DNA mit „Loadingbuffer“), die Negativkontrolle (-Ko, RNase-freies Wasser) und der Überschuss („Loadingbuffer“). Das Fehlen einer Bande auf Höhe der Positivkontrolle bei den Proben zeigt eine fehlende DNA-Kontamination.

3.12 RNA-Integritäts-/Qualitätsbestimmung

Die RNA-Qualität wurde durch den Agilent 2100 Bioanalyzer beurteilt. Dabei wurde abhängig von der RNA-Konzentration, welche im NanoDrop gemessen wurde, entweder ein Nano- oder ein Picochip mit je 1 μ l der jeweiligen Proben beladen. Ersterer wurde bei Konzentrationen größer als 50 ng/ μ l verwendet. Ein Spannungsgradient wurde erzeugt, der die Moleküle je nach Größe schneller oder langsamer wandern ließ. Diese Moleküle wurden durch Fluoreszenz detektiert. Am Ende wurden ein Elektropherogramm und ein gelelektrophorese ähnliches Bild mit Banden (Intensität im Verhältnis 1:2) erzeugt, welche die 18S und 28S Ribosomen RNA zeigten. Das Gerät berechnete anhand eines Algorithmus einen RIN-Wert, welcher eine Aussage über die Degradierung der RNA macht.

3.13 cDNA-Synthese und qRT-PCR

Zur qRT-PCR benötigte man cDNA, die aus RNA hergestellt und vervielfältigt wurde. Zur Umschreibung von RNA in cDNA wurde eine bestimmte, vorher errechnete Menge RNA mit RNase-freiem Wasser in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vermischt, damit ein Endvolumen von 50 µl entstand. Zu diesem Volumen wurden nochmals 50 µl des „Master-Mixes“ hinzugefügt, welcher aus dem „High Capacity cDNA Archive Kit“ der Firma Applied Biosystems hergestellt wurde. Die für den "Master-Mix“ benötigten Chemikalien (s. Tabelle 5) wurden zuvor auf Eis langsam aufgetaut, gevortext und erst dann hineingegeben. Die reverse Transkriptase kam als letztes dazu, weil sie aufgrund ihrer Eigenschaft nicht sehr erschütterungsresistent war. Danach wurde alles durch Hoch- und Herunterpipettieren gemischt. Diese Schritte erfolgten unter einer Sterilbank. Das Gesamtvolumen betrug nun 100 µl.

	Volumen in µl
RNase-freies Wasser	21
RT-Puffer	10
dNTPs	4
„Random Primers“	10
Reverse Transkriptase	5
Gesamtvolumen	50

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt die Mengenangaben, welche für den „Master-Mix“ einer Probe notwendig waren.

Dann folgte die PCR zur Umschreibung von RNA in cDNA, welche mithilfe eines voreingestellten Programmes im Proflex PCR System Thermal Cycler durchgeführt wurde. Hierbei gab es drei Schritte: Im ersten Schritt wurde zur Bindung der Primer eine Temperatur von 25 °C für 10 min eingestellt. Beim nächsten, insgesamt 120-minütigen Schritt stieg die Temperatur auf 37 °C, bei der ein Enzym unter optimalen Bedingungen die RNA im gleichen Verhältnis in cDNA transkribierte. Im letzten Schritt wurde die Probe auf 8 °C zur Stoppung der Reaktion herabgekühlt.

Letztendlich folgte die eigentliche qRT-PCR. Hierbei kam es zur Amplifikation der jeweiligen cDNA und Messung der Fluoreszenz eines Reporters unter Betrachtung des jeweiligen CT-Wertes. Mit jedem Zyklus erhöhte sich die Menge an cDNA um den Faktor 2ⁿ und dabei gab der CT-Wert an, bei welchem Zyklus die Fluoreszenz des Reporters einen bestimmten Grenzwert überstieg.

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde die cDNA mit Puffer 2 verdünnt, um eine Verdünnungsreihe mit einer Konzentration größer als 10 ng/10 µl herzustellen (s. Tabelle 6). Diese Konzentration wurde gewählt, damit möglichst alles im lineardynamischen Bereich stattfand.

PPD	cDNA-Konzentration
18S RNA	≥10ng/10µl
WNT3	≥10ng/10µl
POU2AF1	≥10ng/10µl
FDXR	≥10ng/10µl
DDB2	≥10ng/10µl

Tabelle 6: Diese Tabelle zeigt die jeweiligen cDNA-Konzentrationen für die qRT-PCR.

Nun folgten diese Schritte der qRT-PCR. Zunächst wurden die Standardreihe und die Verdünnungsreihen der Proben auf Eis langsam aufgetaut und dann im Thermomixer für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Danach wurden sie 15 min lang abgekühlt.

Zur eigentlichen Herstellung des „Master-Mixes“ wurden nach dem langsamen Auftauen der Chemikalien auf Eis 20µl des „Master-Mixes“ mit 10µl cDNA vermischt (s. Tabelle 7). Aufgrund der Durchführung einer Doppelbestimmung samt Überschussberechnung (bedingt durch möglichen Materialverlust beim Pipettieren jeder Probe) wurden jedoch 60 µl des jeweiligen „Master-Mixes“ in ein Eppendorfgefäß mit 30 µl der zu untersuchenden Probe (cDNA) eingebracht und gevortext. Aus diesem wurden je 30 µl in zwei nebeneinander liegende Vertiefungen der 96-„Well“-Platte pipettiert und der Rest wurde verworfen. Bei jeder Versuchsperson wurden zwei 96-„Well“-Platten verwendet, die folgendermaßen beladen wurden: Die ersten sechs „Wells“ wurden mit der Standardreihe befüllt. Dann folgten 18S, die Proben und eine Negativkontrolle. Schlussendlich wurde die Platte mit einer Folie („Optical Adhesive Cover“) versiegelt und mit 1200 rpm für 60 s zentrifugiert. Die Zentrifugation diente der Entfernung von Luftblasen und dem Sammeln des Reaktionsgemisches am Boden.

	Volumen in µl
RNase-freies Wasser	3,5
TaqManUniverersal „Master-Mix“	15
PPD	1,5
Gesamtvolumen	20

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt die Mengenangaben, welche für den „Master-Mix“ für eine Probe notwendig waren.

Abschließend wurde die qRT-PCR im QuantStudio 12K gestartet und es folgten drei Schritte: Beim 1. Schritt wurde die Temperatur für 2 min auf 50 °C erhöht, um das Enzym Uracil-N-Glykosylase zum Abbau vorher entstandener, nicht gewünschter cDNA-Vervielfältigungen zu aktivieren. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur für 10 min zur Aktivierung der Polymerase auf 95 °C erhöht. Im letzten Schritt, welcher 40-mal ablief (40 Zyklen), wechselten sich immer zwei Zwischenschritte ab: Jeweils eine einminütige Denaturierung bei 95 °C und ein einminütiges Anlagern von Primern sowie „Probes“ (Annealing) mit

Elongation bei 60 °C der DNA. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Software generierte aus den Rohdaten eine Grafik, wobei auf der y-Achse das normalisierte Reportersignal und auf der x-Achse die Anzahl der PCR-Zyklen dargestellt wurden.

Um Abweichungen durch verschiedene Faktoren zu reduzieren, wurden von den CT-Werten der zu untersuchenden Gene die 18S-CT-Werte abgezogen. Dies wird als Normalisierung bezeichnet und diente dazu, den methodischen Fehler zu reduzieren. Man erhält immer zwei CT-Werte, da immer eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. 18S fungiert hier als nichtreguliertes Referenzgen. Bevor alles ausgewertet wurde, musste der manuelle „Threshold“ noch auf 0,05 gestellt werden.

Dabei waren drei Formeln für die restlichen Kalkulationen entscheidend.

(1) Um den normalisierten CT-Wert (ΔCT) zu berechnen, machte man Folgendes:

$$\Delta CT = CT \text{ des Zielgens} - CT \text{ des Referenzgens}$$

(2) $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ (Zielgen 0 Gy/4 Gy)} - \text{Mittelwert von } \Delta CT \text{ (Zielgen 0 Gy)}$

(3) Die relative Genexpressionsänderung wird mittels „Fold Change“ (FC) berechnet.

$$FC = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

4 Statistik

Das Vollblut wurde nicht in der Statistik betrachtet, da ein anderes Kit genutzt wurde und somit ein anderer Arbeitsablauf stattfand. Für die Statistik wurden zum Gruppenvergleich entweder parametrische Tests (t-Tests) oder bei fehlender Normalverteilung und ungleicher Varianz nichtparametrische Tests (Mann-Whitney-U Tests) in Sigma Plot 14 genutzt (s. Anhang Tabelle 9).

5 Ergebnisse

5.1 Zellsubpopulationsmengen

Strahlenexposition und Kultivierungszeit hatten anscheinend keine Auswirkungen auf das Verhältnis der Zellsubpopulationen. Dieses blieb annähernd gleich. Dabei war die Anzahl an unbestrahlten B-Lymphozyten (im Mittel $723 \cdot 10^3$ Zellen/ml Vollblut) am kleinsten, gefolgt von den NK-Zellen (im Mittel $763 \cdot 10^3$ Zellen/ml Vollblut), T-Lymphozyten (im Mittel $2764 \cdot 10^3$ Zellen/ml Vollblut) und Granulozyten (im Mittel $4637 \cdot 10^3$ Zellen/ml Vollblut, s. Tabelle 8). Im Vergleich dazu waren im Vollblut nach 0 Gy im Mittel $1875 \cdot 10^3$ Zellen/ml

Vollblut. Es gab im Vergleich zu den bestrahlten Proben keinen signifikanten Unterschied (p-Werte immer größer als 0,05, s. Anhang Tabelle 9).

Proben	Dosis (Gy)	1. Zellzählung Zellen*103/ml	2. Zellzählung Zellen*103/ml	3. Zellzählung Zellen*103/ml	4. Zellzählung Zellen*103/m	Tote Zellen*10 ³ /ml	Mittelwert lebender	Zellvitalität in %
1.1	0	980	880	640	700	0	800	100,00
1.2	0	680	640	820	520	0	665	100,00
1.3	0	2020	2400	2160	2380	600	2240	78,87
1.4	0	4280	4360	3060	4120	20	3955	99,50
1.5	4	900	1000	800	1040	0	935	100,00
1.6	4	980	800	1080	680	20	885	97,79
1.7	4	2440	2620	3060	2300	180	2605	93,54
1.8	4	6320	7100	6840	6560	40	6705	99,41
1.9	0	1720	1600	1520	1560	3240	1600	33,06
1.10	4	1400	1440	1320	1240	1800	1350	42,86
2.1	0	980	1000	980	920	20	970	97,98
2.2	0	1140	760	800	620	20	830	97,65
2.3	0	1780	2020	1400	1340	1240	1635	56,87
2.4	0	1520	1360	1000	980	20	1215	98,38
2.5	4	1520	1360	1000	980	20	1215	98,38
2.6	4	840	780	560	880	20	765	97,45
2.7	4	2680	2840	2580	2740	160	2710	94,43
2.8	4	4460	4600	4380	4500	120	4485	97,39
2.9	0	3280	2880	2240	2120	1320	2630	66,58
2.10	4	1880	2040	1680	1720	2080	1830	46,80
3.1	0	460	320	580	560	60	480	88,89
3.2	0	1060	1040	1000	960	40	1015	96,21
3.3	0	5280	5000	4020	3800	540	4525	89,34
3.4	0	9140	7220	6800	6040	100	7300	98,65
3.5	4	980	1160	1120	960	0	1055	100,00
3.6	4	760	800	960	740	100	815	89,07
3.7	4	3080	3000	2500	2820	240	2850	92,23
3.8	4	4180	4680	3900	4320	20	4270	99,53
3.9	0	2920	2640	2600	2240	4800	2600	35,14
3.10	4	2120	1520	1920	1720	2600	1820	41,18
4.1	0	380	720	540	680	0	580	100,00
4.2	0	760	680	640	900	100	745	88,17
4.3	0	2700	2440	2240	2680	460	2515	84,54
4.4	0	4820	3980	4340	5100	40	4560	99,13
4.5	4	600	720	880	760	20	740	97,37
4.6	4	460	920	600	680	20	665	97,08
4.7	4	3140	2440	2720	2780	280	2770	90,82
4.8	4	5080	5560	5240	5040	240	5230	95,61
4.9	0	1920	1240	1240	1240	2600	1410	35,16
4.10	4	680	960	640	560	4960	710	12,52
5.1	0	740	820	660	780	40	750	94,94
5.2	0	560	520	500	540	20	530	96,36
5.3	0	3060	3440	3160	3300	1220	3240	72,65
5.4	0	7000	7720	8020	7460	80	7550	98,95
5.5	4	780	720	820	740	20	765	97,45
5.6	4	720	640	600	580	40	635	94,07
5.7	4	4900	5260	5040	5400	420	5150	92,46
5.8	4	7160	7640	7420	7020	80	7310	98,92
5.9	0	1760	1640	1560	1840	4840	1700	25,99
5.10	4	2080	1920	1840	2040	3040	1970	39,32
6.1	0	740	840	720	740	0	760	100,00
6.2	0	720	820	800	840	40	795	95,21
6.3	0	2300	2640	2400	2380	160	2430	93,82
6.4	0	3060	3440	3220	3260	20	3245	99,39
6.5	4	680	640	600	620	0	635	100,00
6.6	4	960	1000	1040	940	60	985	94,26
6.7	4	1640	2040	2080	1840	60	1900	96,94
6.8	4	3960	4020	4120	4060	40	4040	99,02
6.9	0	1280	1320	1400	1240	4360	1310	23,10
6.10	4	680	880	760	960	160	820	83,67

Tabelle 8: Diese Tabelle zeigt die Zellzahlen und die Zellvitalität der einzelnen Proben.

An der Gesamtzahl der Leukozyten bildeten prozentual die unbestrahlten B-Lymphozyten (8,1 %) den kleinsten Anteil, gefolgt von den NK-Zellen (8,6 %), T-Lymphozyten (31,1 %) und den Granulozyten (52,2 %, s. Abb. 3, rechter Teil der Abb.). Schaut man sich die Zellpopulationen nach Bestrahlung mit 4 Gy an, dann bildeten die NK-Zellen den kleinsten Anteil (7,9 %), gefolgt von den B-Lymphozyten (8,9 %), T-Lymphozyten (29,9%) und Granulozyten (53,3 %, s. Abb. 3, rechter Teil der Abb.).

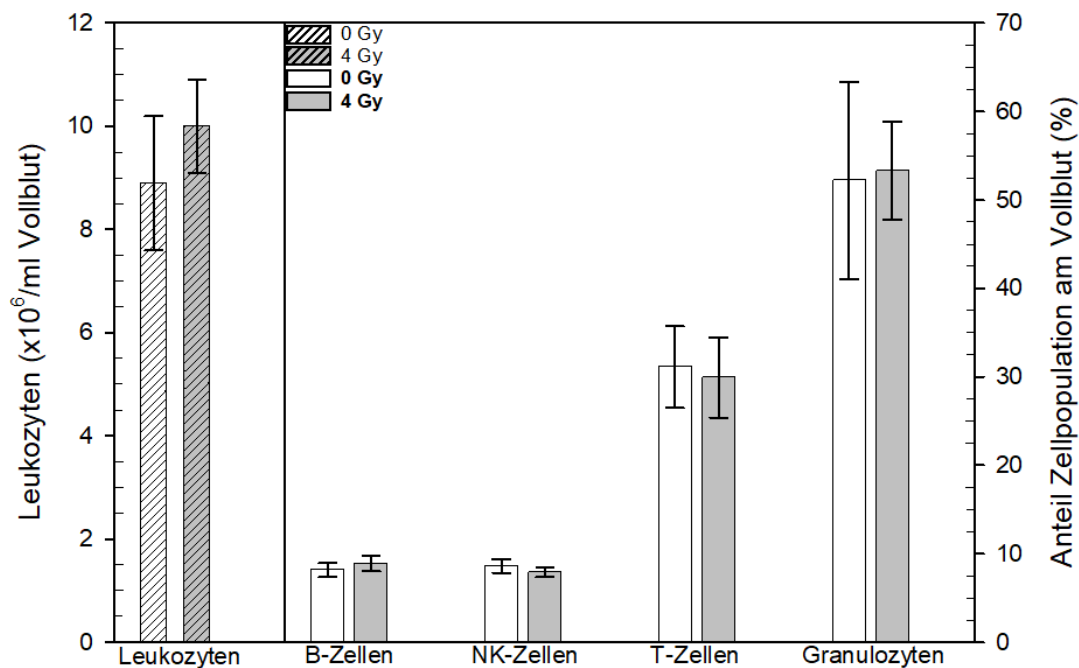


Abb. 3: Auf der linken Seite sieht man die Leukozytenzellzahl in Vollblutkulturen nach 24h, die entweder nicht oder mit 4 Gy bestrahlt wurden. Auf der rechten Seite findet man den jeweiligen Anteil in Prozent vor, den eine Zellpopulation an der Gesamtheit ausmacht.

5.2 Zellvitalität und RNA-Quantität/-Qualität

Betrachtete man die Zellvitalität, so fiel auf, dass diese sehr hoch war und meist über 95% lag (außer beim Vollblut mit 36,4 % und bei T-Zellen mit 79,2 %). Dabei war die Vitalität bei den Granulozyten (99,0 %) am höchsten, gefolgt von den B-Lymphozyten (96,9 %) und den NK-Zellen (95,6 %, s. Abb. 4). Im Vergleich zu den unbestrahlten Proben war die Vitalität nach Bestrahlung mit 4 Gy auch meist über 95% (außer beim Vollblut mit 44,3 % und T-

Zellen mit 93,4 %). Hierbei war die Vitalität bei den Granulozyten (98,3 %) am höchsten, gefolgt von den B-Lymphozyten (98,9 %) und den NK-Zellen (94,9 %).

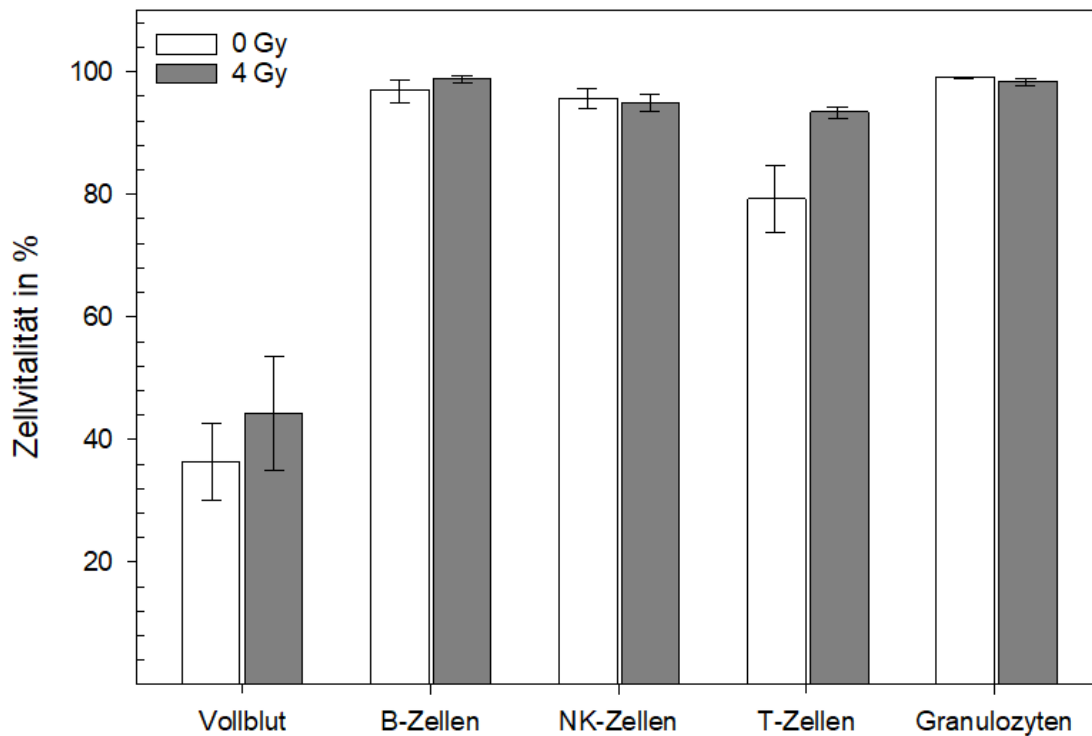


Abb. 4: Diese Abb. zeigt die jeweilige Zellvitalität in Prozent nach der Separation der Zellpopulationen bzw. nach dem Erythrozytenlyseschritt des Vollblutes.

Es wurde im Durchschnitt pro 60 µl Eluat 4,58 µg RNA aus dem unbestrahlten und 2,78 µg RNA aus dem bestrahlten Vollblut isoliert. Aus den T-Lymphozyten kam die meiste RNA mit 5,68 µg pro 60 µl Eluat nach 0 Gy und mit 5,39 µg pro 60 µl Eluat nach 4 Gy (s. Abb. 5). Die niedrigste Menge RNA konnte aus den unbestrahlten NK-Zellen mit 0,63 µg/60 µl Eluat gewonnen werden, gefolgt von den B-Zellen und den Granulozyten mit 0,64 µg/60 µl Eluat. Nach Bestrahlung betrug die Ausbeute bei den B-Zellen 0,42 µg/60 µl Eluat, gefolgt von den NK-Zellen mit 0,45 µg/60 µl Eluat und den Granulozyten mit 0,74 µg/60 µl Eluat. Betrachtete man die RNA-Ausbeute zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben, so

gab es keinen signifikanten Unterschied (s. Anhang Tabelle 9).

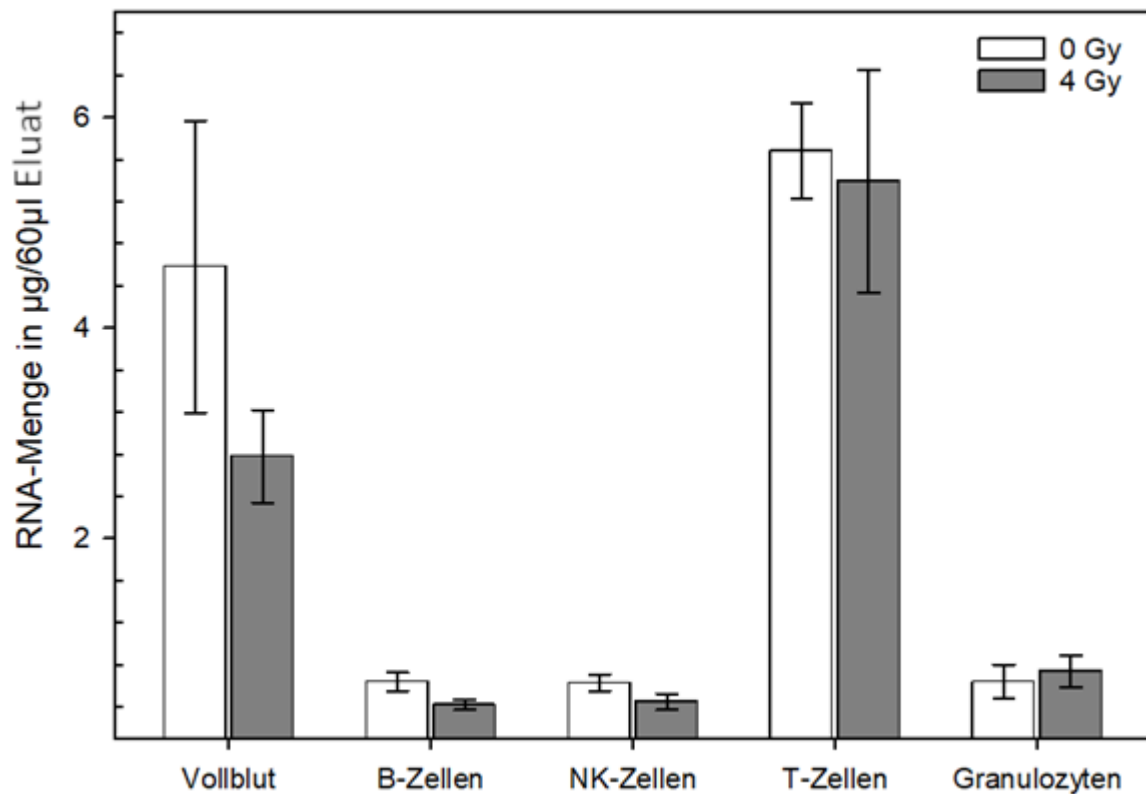


Abb. 5: Die Abb. zeigt die RNA-Ausbeute in µg/60µl Eluat bei 0 und 4 Gy auf der y-Achse und die jeweilige Zellpopulation bzw. das Vollblut auf der x-Achse.

Die RIN-Durchschnittswerte waren alle größer als 7. Dabei waren die Werte bei den unbestrahlten Granulozyten mit 7,9 am niedrigsten, gefolgt vom Vollblut und den NK-Zellen mit 9,0, den B-Zellen mit 9,1 und den T-Zellen mit 10 (s. Abb. 6). Es gab im Vergleich zu den bestrahlten Proben keinen Unterschied, außer bei den B-Zellen ($P=0.004$, s. Anhang Tabelle 9). Hier waren wieder die Werte mit 9,7 bei den T-Zellen nach Bestrahlung mit 4 Gy am höchsten und bei den Granulozyten mit 7,4 am niedrigsten.

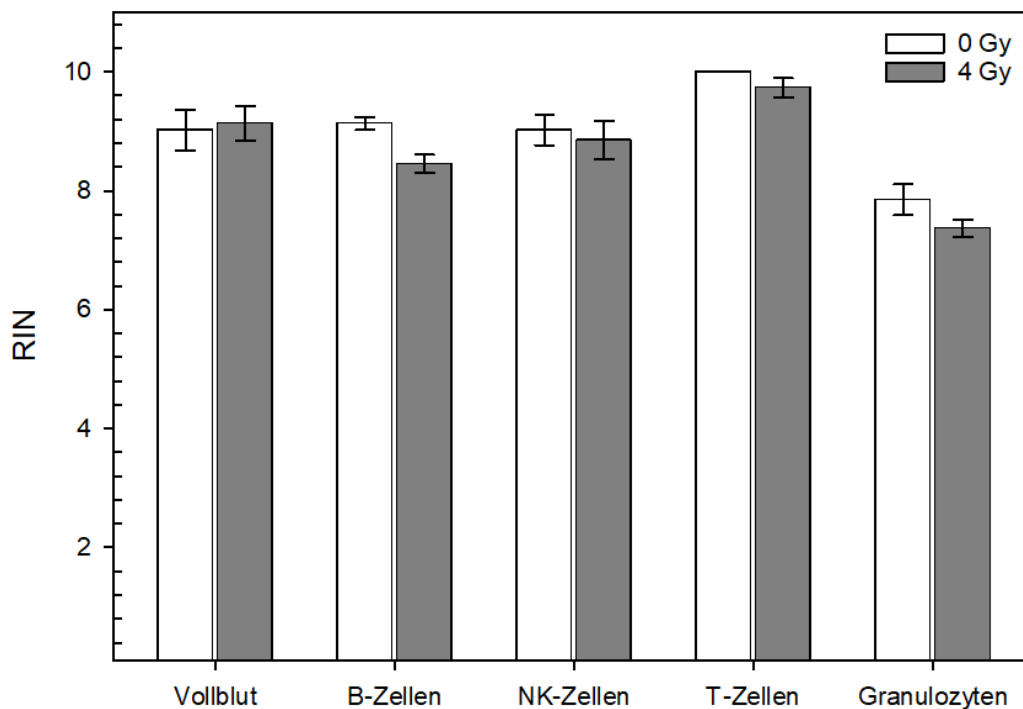


Abb. 6: Diese Abb. zeigt die RIN-Werte der jeweiligen Zellpopulationen und des Vollblutes nach 0 Gy sowie 4 Gy.

5.3 Genexpression im Vollblut und in Zellsubpopulationen

Ziel dieser Arbeit war es, einen Vergleich zwischen Zellpopulationen des peripheren Blutes nach Bestrahlung anzustellen. Hierfür wurden die RNA-Mengen der verschiedenen Zellpopulationen und die relativen Genexpressionsänderungen („Fold Changes“) nach Bestrahlung in den jeweiligen Zellen und des jeweiligen Gens betrachtet, um herauszufinden, mit welchem Anteil die jeweilige Zellpopulation an der Gesamtgenexpression betrug. Hierfür betrachtete man das Gen vor und nach Bestrahlung sowie die Anzahl der Kopien bestrahlt relativ zu unbestrahlt (s. Tabelle 9). Als Referenz wurden die gemessenen RNA-Mengen in Granulozyten genommen. Diese wurden als eins gesetzt. Die jeweiligen RNA-Mengen der anderen Zellen wurden relativ dazu im Verhältnis berechnet. Dasselbe wurde mit den normalisierten CT-Werten gemacht. Als Referenz wurden die gemessenen normalisierten CT-Werte der Granulozyten genommen. Diese wurden als eins gesetzt. Die jeweiligen „Fold-Changes“ der anderen Zellen wurden auch hier relativ dazu berechnet. Je nachdem wie hoch der „Fold-Change“ bzw. dessen Differenz war, gab es auch demzufolge Unterschiede zwischen den RNA-Mengen in den unterschiedlichen Zellpopulationen. Für den „Fold-

Change“ nach Bestrahlung waren die Genexpressionswerte bei 0 Gy nötig. Zur Berechnung der Anzahl an Genkopien wurde der „Fold-Change“ (nach Bestrahlung) mit den adaptierten „Fold-Changes“ der normalisierten CT-Werte und den RNA-Mengen in Bezug auf die Referenz multipliziert. Durch die Bestrahlung kam es zur Hochregulation von FDXR und DDB2 (s. Abb. 7). Dementsprechend fand man niedrigere, normalisierte CT-Werte im Vollblut (s. Abb. 8).

Bei WNT3 war die Anzahl der Kopien nach 0 Gy bei den Granulozyten und der strahleninduzierte „Fold-Change“ bei den T-Zellen am niedrigsten (s. Abb. 7, 8 und Tabelle 9). Am höchsten war die Herunterregulation um das 4-Fache in den B-Zellen nach 4 Gy. Dieser Zelltyp wies einen niedrigen CT-Wert und auch die meisten Kopien vor (90,5-Fache mehr an Kopien als in den Granulozyten, s. Tabelle 9). Ein Anstieg der Genkopien um das 2,7- bzw. 4-Fache war bei den NK- und B-Zellen zu verzeichnen, jedoch war die Veränderung bei den T-Zellen marginal (Abfall um das 1,8-Fache). Die interindividuellen Abweichungen bei der Anzahl der Kopien bei 0 Gy und den „Fold-Changes“ waren bei den NK-Zellen zwischen den verschiedenen Donoren sehr groß (s. Anhang Abb. 1, 5 und Tabelle 9). Hierbei konnte aber bei den meisten Donoren die Genexpression von WNT3 in den Granulozyten nicht gemessen werden (s. Anhang Abb. 1 und 5). Der „WNT3-Fold-Change“ wurde in erster Linie durch B-Zellen (82,4 %), gefolgt von NK-Zellen (9,8 %), T-Zellen (7,3 %) und Granulozyten (0,5 %, s. Tabelle 9) bedingt. Betrachtete man die normalisierten CT-Werte der bestrahlten und unbestrahlten Proben, so gab es keinen signifikanten Unterschied (s. Anhang Abb. 5 und Anhang Tabelle 9).

Die Anzahl der Kopien der NK-Zellen bei 0 Gy und die strahleninduzierten „Fold-Changes“ der T-Zellen waren bei POU2AF1 am niedrigsten (s. Abb. 7, 8 und Tabelle 9). Am stärksten wurde die Genexpression um das 4,6-Fache in den Granulozyten nach 4 Gy herunterreguliert. Die meisten Kopien fand man trotz eines kleineren CT-Wertes in den B-Zellen wieder (588-Fache mehr an Kopien als in den Granulozyten). Ein Anstieg der Genkopien um das 2,2- bzw. 2,5-Fache war bei den B- und NK-Zellen zu verzeichnen, jedoch war die Veränderung bei den T-Zellen marginal (Abfall um das 1,2-Fache, s. Tabelle 9). Die interindividuellen Unterschiede bei der Anzahl der Kopien bei 0 Gy und den „Fold-Changes“ waren zwischen den verschiedenen Donoren bei den NK-Zellen und den Granulozyten sehr groß (s. Anhang Abb. 2,6 und Tabelle 9). Der „POU2AF1-Fold-Change“ wurde in erster Linie durch B-Zellen (97,1 %), gefolgt von T-Zellen (2,4 %), Granulozyten (0,3 %) und NK-Zellen (0,1 %, s.

Tabelle 9) bedingt. Betrachtete man die normalisierten CT-Werte der bestrahlten und unbestrahlten Proben, so gab es nur bei den B- ($P = 0,028$) und T-Zellen ($P = 0,021$) einen signifikanten Unterschied (s. Anhang Abb. 6 und Anhang Tabelle 9).

Die meisten FDXR-Kopien nach 0 Gy fand man in NK-Zellen, jedoch wurde FDXR nach Bestrahlung nur um das 12,4-Fache hochreguliert. Bei den Granulozyten waren die Anzahl der Kopien nach 0 Gy und die strahleninduzierten „Fold-Changes“ bei der Genexpression von FDXR am niedrigsten (s. Abb. 7, 8 und Tabelle 9). Die unbestrahlten B- und T-Zellen zeichneten sich mit einer 1,5- bzw. 2,5-fach höheren Anzahl an Kopien aus und FDXR wurde nach Bestrahlung mit 4 Gy um das 22,9 bzw. 29,2-Fache hochreguliert. Die Abweichungen der CT-Werte nach 0 Gy und der „Fold-Changes“ waren zwischen den Donoren gering (s. Anhang Abb. 3 und 7). Letztendlich lässt sich sagen, dass die Änderung des „FDXR-Fold Changes“ überwiegend durch T-Zellen (73,2 %), gefolgt von NK-Zellen (15,9 %), B-Zellen (10,4 %) und Granulozyten (0,4 %, s. Tabelle 9) verursacht wurde. Betrachtet man die normalisierten CT-Werte der bestrahlten und unbestrahlten Proben, so gab es signifikante Unterschiede bei allen Zellpopulationen ($P < 0,05$, s. Anhang Abb. 7 und Anhang Tabelle 9).

DDB2 wies ähnliche Verhaltensmuster auf. Die meisten Kopien (0 Gy) fand man wiederum bei den NK-Zellen mit einer relativen Änderung von 59,7 in Bezug auf die Referenz (s. Tabelle 9). Hierbei stiegen nach 4 Gy die Kopien des Gens DDB2 um das 3,6-Fache. Die niedrigste Anzahl der Kopien (0 Gy) fand man bei den Granulozyten. Dann kamen die T- und die B-Zellen (s. Anhang Abb. 4 und 8). Die höchste Hochregulation nach Bestrahlung mit 4 Gy fand man in den T-Zellen (um das 6,5-Fache). Bei den anderen Zellen war der Anstieg nur um das 3,6-, 3,8- bzw. 5,7-Fache zu verzeichnen. Die interindividuellen Unterschiede bei der Anzahl der Kopien bei 0 Gy und den „Fold-Changes“ waren in den sechs Donoren wiederum gering (s. Anhang Abb. 4, 8 und Tabelle 9). Der „DDB2-Fold-Change“ wurde in erster Linie durch T-Zellen (79,2 %), gefolgt von NK-Zellen (14,8 %), B-Zellen (5,6 %) und Granulozyten (0,4 %, s. Tabelle 9) bedingt. Betrachtete man die normalisierten CT-Werte der bestrahlten und unbestrahlten Proben, so gab es keinen signifikanten Unterschied (s. Anhang Abb. 8 und Anhang Tabelle 9).

Die wenigsten Kopien pro Gen fand man bei WNT3 (436), gefolgt von FDXR (535) und POU2AF1 (1.322). DDB2 wies die meisten Kopien auf (1.431, s. Tabelle 9).

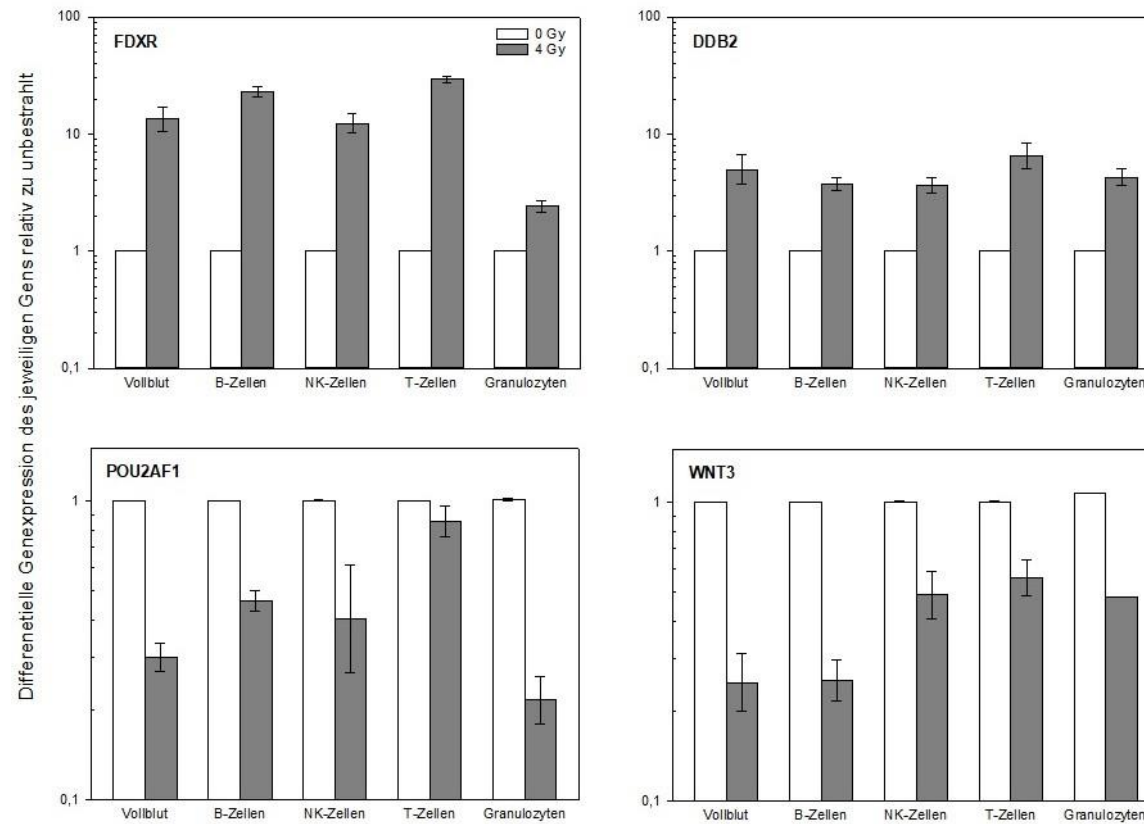


Abb. 7: Es werden die Mittelwerte der differentiellen Genexpression der untersuchten Gene im Vollblut und in den verschiedenen Zellpopulationen gezeigt. Dabei sind die Werte 24h nach Bestrahlung aufgeführt. Die Genexpressionsmessungen der unbestrahlten Proben sind als Referenz mit 1 festgesetzt und der „Fold-Change“ (grauer Balken) ist relativ dazu berechnet. Fehlende Fehlerbalken bei den Granulozyten weisen auf die Auswertung der Daten nur eines Probanden hin.

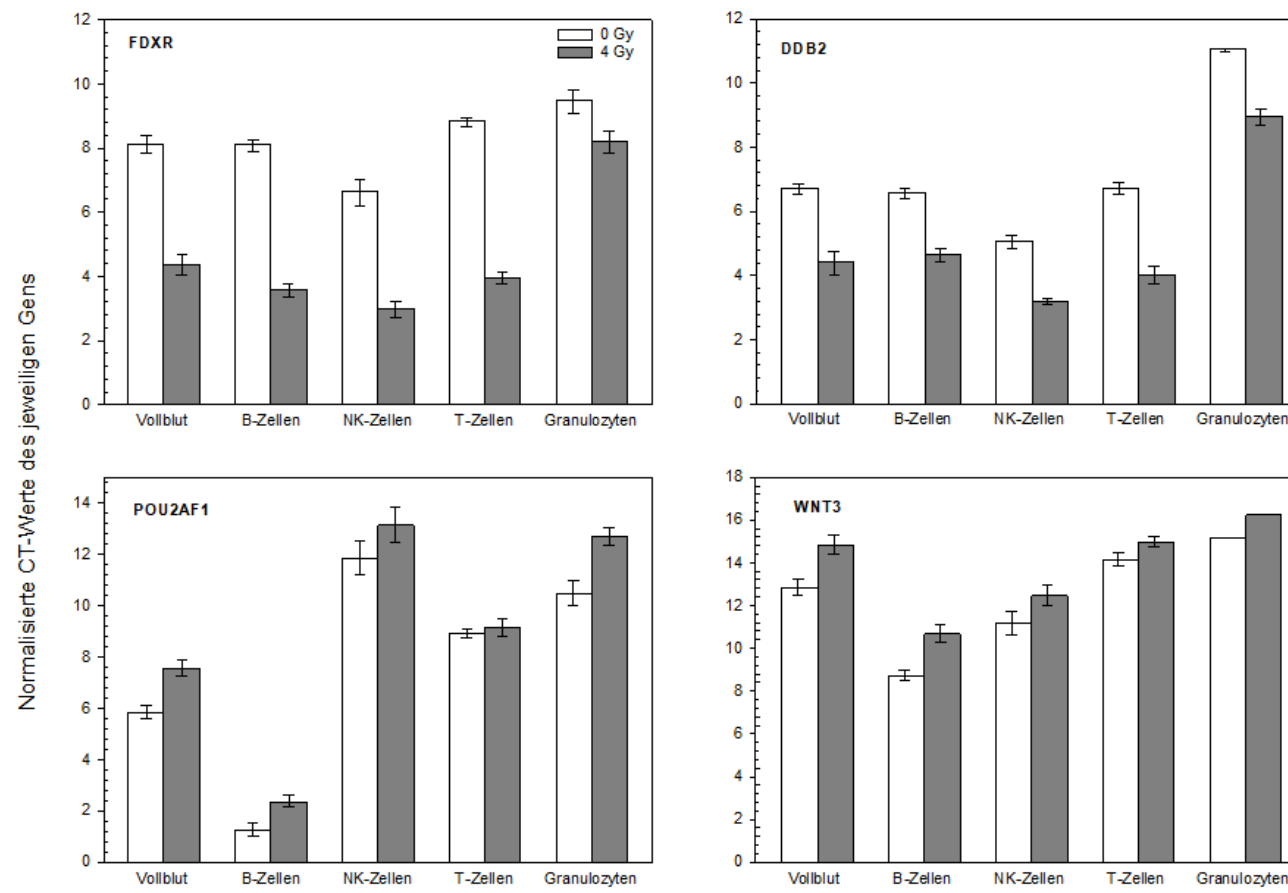


Abb. 8: Es werden die Mittelwerte der normalisierten Genexpression der untersuchten Gene im Vollblut und in den verschiedenen Zellpopulationen gezeigt. Dabei sind die Werte 24h nach 0 Gy oder 4 Gy Bestrahlung aufgeführt.

Blutbestandteil		RNA-Menge ($\mu\text{g}/60\mu\text{l}$) Eluat	Normalisierter CT-Wert	FC (relativ zu unbestrahlt)	Anzahl Kopien	Anzahl Kopien (%)
WNT3						
Vollbut	Messungen	4,58	12,8	4,0		
B-Zellen	Messungen	0,64	8,7	4,0	359	82,4
	Adaptierter FC	1,0	90,5			
NK-Zellen	Messungen	0,63	11,2	2,7	43	9,8
	Adaptierter FC	1,0	16,0			
T-Zellen	Messungen	5,68	14,2	1,8	32	7,3
	Adaptierter FC	8,9	2,0			
Granulozyten	Messungen	0,64	15,2	2,1	2	0,5
	Adaptierter FC	1,0	1,0			
Gesamtzahl der Kopien					436	
POU2AF1						
Vollbut	Messungen	4,58	5,9	3,3		
B-Zellen	Messungen	0,64	1,3	2,2	1.284	97,1
	Adaptierter FC	1,0	588,1			
NK-Zellen	Messungen	0,63	11,9	2,5	1	0,1
	Adaptierter FC	1,0	0,4			
T-Zellen	Messungen	5,68	8,9	1,2	32	2,4
	Adaptierter FC	8,9	3,0			
Granulozyten	Messungen	0,64	10,5	4,6	5	0,3
	Adaptierter FC	1,0	1,0			
Gesamtzahl der Kopien					1.322	
FDXR						
Vollbut	Messungen	4,58	8,1	13,4		
B-Zellen	Messungen	0,64	8,1	22,9	56	10,4
	Adaptierter FC	1,0	2,5			
NK-Zellen	Messungen	0,63	6,6	12,4	85	15,9
	Adaptierter FC	1,0	7,0			
T-Zellen	Messungen	5,68	8,8	29,2	392	73,2
	Adaptierter FC	8,9	1,5			
Granulozyten	Messungen	0,64	9,4	2,4	2	0,4
	Adaptierter FC	1,0	1,0			
Gesamtzahl der Kopien					535	
DDB2						
Vollbut	Messungen	4,58	6,8	5,0		
B-Zellen	Messungen	0,64	6,6	3,8	80	5,6
	Adaptierter FC	1,0	21,1			
NK-Zellen	Messungen	0,63	5,1	3,6	212	14,8
	Adaptierter FC	1,0	59,7			
T-Zellen	Messungen	5,68	6,7	6,5	1.134	79,2
	Adaptierter FC	8,9	19,7			
Granulozyten	Messungen	0,64	11,0	5,7	6	0,4
	Adaptierter FC	1,0	1,0			
Gesamtzahl der Kopien					1.431	

Tabelle 9: Diese Tabelle zeigt die RNA-Ausbeute, normalisierte CT-Werte und den „Fold-Change“. Dabei werden die RNA-Menge und der normalisierte CT-Wert der Granulozyten als Referenz eins gesetzt. Relativ dazu werden die Änderungen (RNA-Menge sowie adaptierter „Fold-Change“) bei den anderen Zellpopulationen dargestellt.

6 Diskussion

Für nukleare oder radiologische Szenarien benötigt man eine frühe und massentaugliche Diagnostik zur Vorhersage der ASK. Durch das Institut der Radiobiologie der Bundeswehr wurden verschiedene Gene zur Diskriminierung zwischen bestrahlten und unbestrahlten Individuen und zur Unterscheidung verschiedener Schweregrade des HARS identifiziert. In vivo und entsprechende in vitro Genexpressionsmessungen bei menschlichen Leukämiepatienten zeigten ähnliche Expressionsmuster von WNT3, POU2AF1, FDXR und DDB2 (Port et al., 2018). Dabei schien die Quelle dieser Veränderungen das bestrahlte, periphere Blut zu sein (Port et al., 2019). Es war indes unklar, welche Zellsubpopulationen primär beteiligt waren und ob die Diagnostik nach deren Kenntnis weiter verbessert werden könnte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Genexpression separat in B- und T-Lymphozyten sowie in NK-Zellen und Granulozyten betrachtet. Die T-Zellen spielten dabei die Hauptrolle mit einem 9-fach höheren Beitrag zur RNA-Gesamtmenge als andere Zellsubpopulationen (s. Tabelle 9). Die Betrachtung der jeweiligen RNA-Gesamtmenge, der Genexpression bei 0 Gy und der durch Strahlung induzierten „Fold Changes“ bei jedem einzelnen Gen machte deutlich, mit welchem Anteil die jeweiligen Zellen zur Genexpression beitrugen. Dabei standen wiederum die T-Lymphozyten (73,2 %/ 79,2 %) hervor, welche für die nach Strahlung bedingte Hochregulation von FDXR/DDB2 hauptverantwortlich waren. Die B-Lymphozyten (97,1 %/ 82,4 %) waren überwiegend bei der Herunterregulation von POU2AF1/WNT3 beteiligt (s. Tabelle 9).

Schaut man sich andere Arbeiten an, so wurden nicht so viele Zellsubpopulationen und Gene im Vergleich betrachtet. Es wurden lediglich FDXR und DDB2 in T- oder B-Lymphozyten untersucht, wobei diese Arbeiten zu ähnlichen Ergebnissen führten (Boldt et al., 2012; Kabacik et al., 2015; Mori et al., 2005; Pogosova-Agadjanyan et al., 2011). Hier wurden jedoch nicht die RNA-Mengen berücksichtigt. POU2AF1 und WNT3 eigneten sich auch zur Biodosimetrie und Vorhersage eines schweren HARS (Abend et al., 2016; Port et al., 2018; Port et al., 2019; Templin et al., 2011).

Man weiß, dass die verschiedenen Zellsubpopulationen des peripheren Blutes unterschiedlich auf ionisierende Strahlung reagieren (Bogdandi et al., 2010; Louagie et al., 1999; Prosser,

1976). Dementsprechend würde man daraus schlussfolgern, dass bestimmte Gene auch unterschiedlich reguliert werden. Anhand dieser Daten würde man dann in Zukunft nur einzelne Zellpopulationen anstatt des ganzen peripheren Blutes aus Biodosimetriezwecken betrachten. Diese Arbeit zeigt aber, dass Letzteres zwar möglich ist, aber das Ergebnis bzw. die Sensitivität dadurch nicht verbessert wird. T-Lymphozyten spiegelten hier die größte Quelle bezüglich RNA des Vollblutes wider (s. Abb. 5 und Tabelle 9). Außerdem waren die T-Zellen sehr strahlensensitiv, sodass man große „Fold-Changes“ in Bezug auf FDXR und DDB2 (im Vergleich zu unbestrahlten Proben) vorfindet (s. Abb. 7, 8 und Tabelle 10). Zudem hatten sich alle Zellpopulationen ungefähr gleich verhalten, sodass die Richtung der Genexpressionsänderung immer die Gleiche war (entweder hoch- oder herunterreguliert). Daher sind im Rahmen der Biodosimetrie Genexpressionsmessungen von FDXR oder DDB2 in spezifischen Zellpopulationen des peripheren Blutes nicht sinnvoll (Riecke et al., 2012). Bei WNT3 und POU2AF1 würde eine Isolation zur Vorhersage eines HARS möglicherweise die Sensitivität erhöhen. Jedoch macht es auch hier keinen Sinn, zusätzlich Zellen (B-Zellen) zu isolieren, denn der „Fold-Change“ bei 4 Gy im Vollblut zeigte die gleiche Größenordnung (4-fache, strahlenbedingte Herunterregulierung der Genexpression) wie in den B-Lymphozyten. Es würde nur mehr Aufwand entstehen (s. Tabelle 9). Aus den Daten wird auch deutlich, dass die anderen Zellpopulationen einen geringen Beitrag zur Genexpressionsänderung leisteten (s. Abb. 7, 8 und Tabelle 9).

Aus dieser Arbeit wird sehr klar, ob und welche Zellen auf ionisierende Strahlung reagieren (z.B. B- und T-Zellen). Jedoch kann man nicht genau ausschließen, ob diese beiden Zellpopulationen durch andere Faktoren oder Mechanismen in ihrer Genexpression beeinflusst wurden. Zu denken wäre an gezielte Freisetzung von Zytokinen anderer Zellen oder von Stoffen, die einerseits durch zerstörte Zellen bei den ganzen Isolationsschritten entstanden oder andererseits in den Kultur- und Isolationsmedien vorhanden waren. Man hätte zwar auch die Zellpopulationen erst isolieren und dann einzeln bestrahlen können. Dies würde unbekannte Variablen und Einflussfaktoren in den Versuchsaufbau bringen, deren Auswirkungen man nicht abschätzen könnte. Dieser Versuchsaufbau kommt einem in Vivo-Modell aber sehr nahe.

Durch die verschiedenen Lyseschritte und die anschließende Zentrifugation könnte es zu einer deutlichen Reduzierung der Zellvitalität gekommen sein. Dies würde die geringe Zellvitalität

des Vollblutes von unter 50 % nach 24h erklären (s. Abb. 4). Trotzdem war das isolierte Material für die restlichen Schritte ausreichend. Das relative Verhältnis der Leukozytenzellpopulationen untereinander blieb auch 24 h nach Bestrahlung im Gegensatz zu anderen Arbeiten, wo die Zellzahl abfiel, unverändert (Gridley et al., 2009; Paul et al., 2013) (s. Abb. 3). Dies verdeutlicht nochmals die optimale Eignung dieses *in vitro* Modelles, um die *in vivo* Situation korrekt abzubilden. Dies kann an den immer gleichbleibenden Zellkulturmedien liegen. Außerdem wurden in anderen Arbeiten die Untersuchungen nach mehreren Tagen durchgeführt, weshalb eine stärkere Änderung in Bezug auf die Zellzahl zu sehen war (Paul et al., 2008; Paul et al., 2013). In dieser Arbeit wurde nur ein kurzer Zeitraum von 24 h betrachtet. Eine andere Arbeit zeigte auch, dass die Leukozytenzahl in der Zellkultur bis zu 12 h stabil blieb und die strahleninduzierten „Fold-Changes“ ähnliche Ausmaße wie in diesem *in vitro* Modell annahm (Ostheim et al., 2021b). Außerdem wurden hier nur vier Zellpopulationen betrachtet, welche nicht die Gesamtheit aller Zellpopulationen des Vollblutes widerspiegeln, jedoch aber am häufigsten vertreten sind.

Es wurden nur sechs gesunde, menschliche Probanden angeschaut. Eine höhere Zahl wäre besser gewesen, jedoch spricht die hohe Kontinuität von FDXR und DDB2 und die geringe interindividuelle Varianz in den untersuchten Zellpopulationen für verlässliche Daten. Das Modell weist zwar einige Grenzen auf, aber Änderungen der Genexpression der vorher genannten Gene werden durch dieses Modell im Vergleich zu den Ergebnissen *in vivo* gut dargestellt (Macaeva et al., 2019; O'Brien et al., 2018; Paul et al., 2008; Port et al., 2016a; Port et al., 2018). Bei POU2AF1 und WNT3 gab es Varianzen in der Genexpressionsmessung zwischen den Donoren und innerhalb der Zellpopulationen sowie auch teilweise Schwierigkeiten bei der WNT3-Detektierung in Granulozyten. Dadurch fehlen in einigen Abbildungen die Daten bezüglich der Granulozyten, da diese Messungen außerhalb des lineardynamischen Bereiches waren und somit nicht mehr korrekt gemessen bzw. dargestellt werden konnten. Um dieses Problem zu beseitigen, ist eine Konzentration der cDNA für die qRT-PCR von 50ng/10µl zielführender. Dies wurde aber nicht in dieser Arbeit erzielt, da das Ausgangsmaterial der isolierten Zellen manchmal zu gering war, um eine solche Konzentration zu erreichen. Es ist ein bestimmtes Muster innerhalb der Daten wie die Genexpressionsänderung in B-Zellen erkennbar, welche zwischen den Donoren ungefähr gleich blieb und was wiederum für ein gutes *in vitro* Modell spricht.

Schaut man sich die Isolation der einzelnen Zellpopulationen an, so kann es natürlich vorkommen, dass trotz der gezielt eingesetzten Antikörper andere Zellen entweder durch Fehlbindungen oder durch andere Einflüsse in das Isolat gelangen und somit die Probe nicht zu 100 % rein ist. Dabei war der Reinheitsgrad bei einem T-Zellisolat größer als 90 %, aber bei anderen Zelltypen deutlich niedriger (B-Zellen ca. 52 % und NK-Zellen ca. 63 %) (Ostheim et al., 2021b). Somit gab es eine hohe Kontamination mit T-Zellen und auch mit einigen Erythrozyten. Daher ist davon auszugehen, dass die Genexpressionsmessungen von POU2AF1 und WNT3 höchstwahrscheinlich etwas niedriger ausfielen als bei einem reineren Isolat (Ostheim et al., 2021b). Das Beinhalt von Erythrozyten ist eher unproblematisch, da diese in allen Zellisolaten vorkamen und generell ein anderes Genexpressionsmuster aufweisen. Die Auswirkung auf die untersuchte Genexpression war wahrscheinlich marginal (Kabanova et al., 2009; Peslak et al., 2011; Schjeide et al., 1983; Xu et al., 2012).

Schlussendlich lässt sich sagen, dass maßgeblich die T-Zellen für die strahleninduzierte Hochregulation von FDXR/DDB2 und die B-Zellen für Herunterregulation von POU2AF1/WNT3 verantwortlich waren. Dabei hatten sie auch eine entsprechende Auswirkung auf die Genexpression des Vollblutes, deren Ausmaß auch dort ersichtlich wurde. Daher erhöht eine Isolation von Zellpopulationen aus dem Vollblut nicht die Sensitivität der Genexpression der vier Gene. Es macht nur den Arbeitsablauf langwieriger, ohne einen entsprechenden Vorteil zu erzielen. Jedoch wurde die Wichtigkeit von FDXR und DDB2 für biodosimetrische Zwecke (O'Brien et al., 2018; Manning et al., 2013) verdeutlicht.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Das Bild eines Gelelektrophoresegels zeigt rechts die 1 kb DNA-Leiter, dann folgen vier Proben als Beispiel, die Positivkontrolle, die Negativkontrolle und der Überschuss. Das Fehlen einer Bande bei den Proben auf Höhe der Positivkontrolle zeigt eine fehlende DNA-Kontamination. **19**

Abb. 2: Hier findet man eine Übersicht über den Arbeitsablauf mit Bestrahlung der Blutröhrchen, Kultivierung, Separation, RNA-Isolation, Qualitätskontrolle und qRT-PCR. **13**

Abb. 3: Auf der linken Seite findet man die Leukozytenzellzahl in Vollblutkulturen nach 24h, die entweder nicht oder mit 4 Gy bestrahlt wurden. Auf der rechten Seite findet den jeweiligen Anteil, den eine Zellpopulation an der Gesamtheit ausmacht, in Prozent vor.	24
Abb. 4: Diese Abbildung zeigt die jeweilige Zellvitalität nach der Separation der Zellpopulationen bzw. nach dem Erythrozytenlyseschritt des Vollblutes in Prozent an.	25
Abb. 5: Die Abbildung zeigt die RNA-Ausbeute bei 0 und 4 Gy auf der y-Achse und die jeweilige Zellpopulation bzw. das Vollblut auf der x-Achse.	26
Abb. 6: Diese Abbildung zeigt die RIN-Werte der jeweiligen Zellpopulationen und des Vollblutes nach 0 Gy und 4 Gy.	27
Abb. 7: Es werden die Mittelwerte der differentiellen Genexpression der untersuchten Gene im Vollblut und in den verschiedenen Zellpopulationen gezeigt. Dabei sind die Werte nach 24h nach Bestrahlung aufgeführt. Die Genexpressionsmessungen der unbestrahlten Proben werden als Referenz mit 1 festgesetzt und der „Fold-Change“ wird relativ dazu berechnet. Fehlende Fehlerbalken weisen auf die Auswertung der Daten nur eines Probanden hin.	30
Abb. 8: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für DDB2, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden.	31
Abb. 9: Diese Abb. zeigt skizzenhaft das „Cooling-Rack“. Position A wird mit den Proben beladen. Nach der Separation findet man in den Röhrchen in Position B die Negativ- und in Position C die Positivselektion. Die Abbildung wurde selbstständig mit Autodesk Inventor Professional erstellt.	32
Tabelle 1: Diese Tabelle zeigt das jeweilige Verbrauchsmaterial und den Hersteller.	9
Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt das Alter, das Geburtsjahr und das jeweilige Geschlecht der Testpersonen.	13
Tabelle 3: Diese Tabelle zeigt anhand eines Probanden welche Mengen Antikörper und Blut-Puffergemisch für die jeweilige Isolation benötigt werden.	15
Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Mengenangaben, welche für den β -actin-PCR-	18

Ansatz für eine Probe notwendig sind.

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt die Mengenangaben, welche für den „Master-Mix“ für eine Probe notwendig sind. **20**

Tabelle 6: Diese Tabelle zeigt die jeweiligen cDNA-Konzentrationen für die qRT-PCR. **21**

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt die Mengenangaben, welche für den „Master-Mix“ für eine Probe notwendig sind. **21**

Tabelle 8: Diese Tabelle zeigt die Zellzahlen und die Zellvitalität der einzelnen Proben. **23**

Tabelle 9: Diese Tabelle zeigt die RNA-Ausbeute, normalisierte CT-Werte und den „Fold-Change“. Dabei werden die RNA-Menge und der normalisierte CT-Wert der Granulozyten als Referenz 1 gesetzt. Relativ dazu werden die Änderungen bei den anderen Zellpopulationen dargestellt. **32**

Anhang Tabelle 1: Diese Tabelle zeigt die RIN-Werte der einzelnen Proben. **44**

Anhang Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt die RNA-Menge der einzelnen Proben. **45**

Anhang Tabelle 3: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 1. Probanden für 18S und WNT3. **46**

Anhang Tabelle 4: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 2. Probanden für 18S, POU2AF1, FDXR, DDB2 und WNT3. **47**

Anhang Tabelle 5: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 3. Probanden für 18S, FDXR, DDB2 und WNT3. **49**

Anhang Tabelle 6: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 4. Probanden für 18S, DDB2, FDXR, POU2AF1 und WNT3. **51**

Anhang Tabelle 7: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 5. Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3. **53**

Anhang Tabelle 8: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 6. **54**

Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3.

Anhang Tabelle 9: Diese Tabelle zeigt die P-Werte der jeweiligen Zellpopulationen in den jeweiligen Abbildungen. **56**

Anhang Abb. 1: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für WNT3, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet. **57**

Anhang Abb. 2: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für POU2AF1, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet. **58**

Anhang Abb. 3: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für FDXR, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden. **59**

Anhang Abb. 4: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für DDB2, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden. **60**

Anhang Abb. 5: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von WNT3 wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet. **61**

Anhang Abb. 6: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von POU2AF1 wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet. **62**

Anhang Abb. 7: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von FDXR wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt. **63**

Anhang Abb. 8: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von DDB2 wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt. **64**

8 Referenzen

- Abend, M.,** Badie, C., Quintens, R., Kriehuber, R., Manning, G., Macaeva, E., et. al. (2016). Examining Radiation-Induced In Vivo and In Vitro Gene Expression Changes of the Peripheral Blood in Different Laboratories for Biodosimetry Purposes: First RENE B Gene Expression Study. *Radiat Res*, 185(2), 109-123. doi:10.1667/RR14221.1
- Banda, M.,** Bommineni, A., Thomas, R. A., Luckinbill, L. S., & Tucker, J. D. (2008). 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(1-2), 126-134. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.08.005
- Bogdandi, E. N.,** Balogh, A., Felgyinszki, N., Szatmari, T., Persa, E., Hildebrandt, G., et. al. (2010). Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiat Res*, 174(4), 480-489. doi:10.1667/RR2160.1
- Boldt, S.,** Knops, K., Kriehuber, R., & Wolkenhauer, O. (2012). A frequency-based gene selection method to identify robust biomarkers for radiation dose prediction. *Int J Radiat Biol*, 88(3), 267-276. doi:10.3109/09553002.2012.638358
- Brzoska, K.,** & Kruszewski, M. (2015). Toward the development of transcriptional biodosimetry for the identification of irradiated individuals and assessment of absorbed radiation dose. *Radiat Environ Biophys*, 54(3), 353-363. doi:10.1007/s00411-015-0603-8
- Bustin, S. A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2), 169-193. doi:10.1677/jme.0.0250169
- Chaudhry, M. A.** (2008). Biomarkers for human radiation exposure. *J Biomed Sci*, 15(5), 557-563. doi:10.1007/s11373-008-9253-z
- Cho, S. J.,** Kang, H., Hong, E. H., Kim, J. Y., & Nam, S. Y. (2018). Transcriptome analysis of low-dose ionizing radiation-impacted genes in CD4(+) T-cells undergoing activation and regulation of their expression of select cytokines. *J Immunotoxicol*, 15(1), 137-146. doi:10.1080/1547691X.2018.1521484
- Dietel, M.,** Norbert, S., Martin, Z. (2013). *Harrisons Innere Medizin* (18. Aufl.). Berlin, Deutschland: ABW Wissenschaftsverlag.

- Dressman, H. K.**, Muramoto, G. G., Chao, N. J., Meadows, S., Marshall, D., Ginsburg, G. S., et. al. (2007). Gene expression signatures that predict radiation exposure in mice and humans. *PLoS Med*, 4(4), e106. doi:10.1371/journal.pmed.0040106
- Friesecke, I.**, Beyrer, K., Fliedner, T. M., & system, M. t. M. t. p. f. r. a. v. a. a. b. f. a. c. g. (2001). How to cope with radiation accidents: the medical management. *Br J Radiol*, 74(878), 121-122. doi:10.1259/bjr.74.878.740121
- Fujimori, Y.**, Saheki, K., Itoi, H., Okamamoto, T., & Kakishita, E. (2000). Increased expression of Fas (APO-1, CD95) on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during total body irradiation. *Acta Haematol*, 104(4), 193-196. doi:10.1159/000046514
- Gallo, R. C.**, Sarin, P. S., Allen, P. T., Newton, W. A., Priori, E. S., Bowen, J. M., et. al. (1971). Reverse transcriptase in type C virus particles of human origin. *Nat New Biol*, 232(31), 140-142. doi:10.1038/newbio232140a0
- Gong, W.**, Guo, M., Han, Z., Wang, Y., Yang, P., Xu, C., et. al. (2016). Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury. *Cell Death Dis*, 7(9), e2387. doi:10.1038/cddis.2016.276
- Gridley, D. S.**, Slater, J. M., Luo-Owen, X., Rizvi, A., Chapes, S. K., Stodieck, L. S., et. al. (2009). Spaceflight effects on T lymphocyte distribution, function and gene expression. *J Appl Physiol* (1985), 106(1), 194-202. doi:10.1152/jappphysiol.91126.2008
- Joiner, M. C.**, Thomas, R. A., Grever, W. E., Smolinski, J. M., Divine, G. W., Konski, A. A., et. al. (2011). Developing point of care and high-throughput biological assays for determining absorbed radiation dose. *Radiother Oncol*, 101(1), 233-236. doi:10.1016/j.radonc.2011.05.068
- Kabacik, S.**, Manning, G., Raffy, C., Bouffler, S., & Badie, C. (2015). Time, dose and ataxia telangiectasia mutated (ATM) status dependency of coding and noncoding RNA expression after ionizing radiation exposure. *Radiat Res*, 183(3), 325-337. doi:10.1667/RR13876.1
- Kabanova, S.**, Kleinbongard, P., Volkmer, J., Andree, B., Kelm, M., & Jax, T. W. (2009). Gene expression analysis of human red blood cells. *Int J Med Sci*, 6(4), 156-159. doi:10.7150/ijms.6.156
- Lee, Y.**, Pujol Canadell, M., Shuryak, I., Perrier, J. R., Taveras, M., Patel, P., et. al. (2018). Candidate protein markers for radiation biodosimetry in the hematopoietically humanized mouse model. *Sci Rep*, 8(1), 13557. doi:10.1038/s41598-018-31740-8
- Liu, J.**, Xue, N., Guo, Y., Niu, K., Gao, L., Zhang, S., et. al. (2019). CircRNA_100367 regulated the radiation sensitivity of esophageal squamous cell carcinomas through miR-217/Wnt3 pathway. *Aging (Albany NY)*, 11(24), 12412-12427. doi:10.18632/aging.102580

- Louagie, H.**, Van Eijkeren, M., Philippe, J., Thierens, H., & de Ridder, L. (1999). Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol*, 75(6), 767-771. doi:10.1080/095530099140113
- Macaeva, E.**, Mysara, M., De Vos, W. H., Baatout, S., & Quintens, R. (2019). Gene expression-based biodosimetry for radiological incidents: assessment of dose and time after radiation exposure. *Int J Radiat Biol*, 95(1), 64-75. doi:10.1080/09553002.2018.1511926
- Macia, I. G. M.**, Lucas Calduch, A., & Lopez, E. C. (2011). Radiobiology of the acute radiation syndrome. *Rep Pract Oncol Radiother*, 16(4), 123-130. doi:10.1016/j.rpor.2011.06.001
- Majewski, M.**, Nestler, T., Kagler, S., Richardsen, I., Ruf, C. G., Matthies, C., et. al. (2018). Liquid Biopsy Using Whole Blood from Testis Tumor and Colon Cancer Patients-A New and Simple Way? *Health Phys*, 115(1), 114-120. doi:10.1097/HP.0000000000000867
- Manning, G.**, Kabacik, S., Finnon, P., Bouffler, S., & Badie, C. (2013). High and low dose responses of transcriptional biomarkers in ex vivo X-irradiated human blood. *Int J Radiat Biol*, 89(7), 512-522. doi:10.3109/09553002.2013.769694
- Mori, M.**, Benotmane, M. A., Tirone, I., Hooghe-Peters, E. L., & Desaintes, C. (2005). Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets. *Cell Mol Life Sci*, 62(13), 1489-1501. doi:10.1007/s00018-005-5086-3
- O'Brien, G.**, Cruz-Garcia, L., Majewski, M., Grepl, J., Abend, M., Port, M., et. al. (2018). FDXR is a biomarker of radiation exposure in vivo. *Sci Rep*, 8(1), 684. doi:10.1038/s41598-017-19043-w
- Ostheim, P.**, Coker, O., Schule, S., Hermann, C., Combs, S. E., Trott, K. R., et. al. (2021a). Identifying a Diagnostic Window for the Use of Gene Expression Profiling to Predict Acute Radiation Syndrome. *Radiat Res*, 195(1), 38-46. doi:10.1667/RADE-20-00126.1
- Ostheim, P.**, Don Mallawaratchy, A., Muller, T., Schule, S., Hermann, C., Popp, T., et. al. (2021b). Acute radiation syndrome-related gene expression in irradiated peripheral blood cell populations. *Int J Radiat Biol*, 97(4), 474-484. doi:10.1080/09553002.2021.1876953
- Paul, S.**, & Amundson, S. A. (2008). Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 71(4), 1236-1244. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.03.043
- Paul, S.**, Smilenov, L. B., & Amundson, S. A. (2013). Widespread decreased expression of immune function genes in human peripheral blood following radiation exposure. *Radiat Res*, 180(6), 575-583. doi:10.1667/RR13343.1

- Peslak, S. A.**, Wenger, J., Bemis, J. C., Kingsley, P. D., Frame, J. M., Koniski, A. D., et. al. (2011). Sublethal radiation injury uncovers a functional transition during erythroid maturation. *Exp Hematol*, 39(4), 434-445. doi:10.1016/j.exphem.2011.01.010
- Pogosova-Agadjanyan, E. L.**, Fan, W., Georges, G. E., Schwartz, J. L., Kepler, C. M., Lee, H., et. al. (2011). Identification of radiation-induced expression changes in nonimmortalized human T cells. *Radiat Res*, 175(2), 172-184. doi:10.1667/rr1977.1
- Port, M.**, Herodin, F., Drouet, M., Valente, M., Majewski, M., Ostheim, P., et. al. (2021). Gene Expression Changes in Irradiated Baboons: A Summary and Interpretation of a Decade of Findings. *Radiat Res*, 195(6), 501-521. doi:10.1667/RADE-20-00217.1
- Port, M.**, Herodin, F., Valente, M., Drouet, M., Lamkowski, A., Majewski, M., et. al. (2016). First Generation Gene Expression Signature for Early Prediction of Late Occurring Hematological Acute Radiation Syndrome in Baboons. *Radiat Res*, 186(1), 39-54. doi:10.1667/RR14318.1
- Port, M.**, Herodin, F., Valente, M., Drouet, M., Ullmann, R., Doucha-Senf, S., et. al. (2016). MicroRNA Expression for Early Prediction of Late Occurring Hematologic Acute Radiation Syndrome in Baboons. *PLoS One*, 11(11), e0165307. doi:10.1371/journal.pone.0165307
- Port, M.**, Majewski, M., Herodin, F., Valente, M., Drouet, M., Forcheron, F., et. al. (2018). Validating Baboon Ex Vivo and In Vivo Radiation-Related Gene Expression with Corresponding Human Data. *Radiat Res*, 189(4), 389-398. doi:10.1667/RR14958.1
- Port, M.**, Ostheim, P., Majewski, M., Voss, T., Haupt, J., Lamkowski, A., et. al. (2019). Rapid High-Throughput Diagnostic Triage after a Mass Radiation Exposure Event Using Early Gene Expression Changes. *Radiat Res*, 192(2), 208-218. doi:10.1667/RR15360.1
- Port, M.**, Schmelz, H. U., Stassen, T., Mueller, K., Stockinger, M., Obermair, R., et. al. (2007). Correcting false gene expression measurements from degraded RNA using RTQ-PCR. *Diagn Mol Pathol*, 16(1), 38-49. doi:10.1097/01.pdm.0000213472.70054.94
- Prosser, J. S.** (1976). Survival of human T and B lymphocytes after X-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 30(5), 459-465. doi:10.1080/09553007614551271
- Ramesh, R.**, Munshi, A., & Panda, S. K. (1992). Polymerase chain reaction. *Natl Med J India*, 5(3), 115-119. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304285>
- Riecke, A.**, Rufa, C. G., Cordes, M., Hartmann, J., Meineke, V., & Abend, M. (2012). Gene expression comparisons performed for biodosimetry purposes on in vitro peripheral blood cellular subsets and irradiated individuals. *Radiat Res*, 178(3), 234-243. doi:10.1667/rr2738.1
- Rump, A.**, Stricklin, D., Lamkowski, A., Eder, S., Abend, M., & Port, M. (2017). The Incorporation of Radionuclides After Wounding by a "Dirty Bomb": The Impact of Time for

Decorporation Efficacy and a Model for Cases of Disseminated Fragmentation Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 6(1), 1-9. doi:10.1089/wound.2016.0693

Schjeide, O. A., Schjeide, S., & Briles, W. E. (1983). Changes in expressions of red blood cell antigens following gamma irradiation of chicken embryos. *Cytobios*, 36(143-44), 187-196. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6851662>

Templin, T., Amundson, S. A., Brenner, D. J., & Smilenov, L. B. (2011). Whole mouse blood microRNA as biomarkers for exposure to gamma-rays and (56)Fe ion. *Int J Radiat Biol*, 87(7), 653-662. doi:10.3109/09553002.2010.549537

Wasserman, J., Blomgren, H., Petrini, B., Baral, E., Strender, L. E., Jarstrand, C., et. al. (1982). Effect of radiation therapy and in vitro x-ray exposure on lymphocyte subpopulations and their functions. *Am J Clin Oncol*, 5(2), 195-208. doi:10.1097/0000421-198204000-00069

Xu, D., Peng, M., Zhang, Z., Dong, G., Zhang, Y., & Yu, H. (2012). Study of damage to red blood cells exposed to different doses of gamma-ray irradiation. *Blood Transfus*, 10(3), 321-330. doi:10.2450/2012.0076-11

9 Anhang

Proben	Blutbestandteil	RIN-Werte	Bestrahlung	Proben	Blutbestandteil	Bestrahlung	RIN-Werte
1.1	B	9,10	0 Gy	4.1	B	0 Gy	9,40
1.2	NK	9,20	0 Gy	4.2	NK	0 Gy	9,20
1.3	T	10,00	0 Gy	4.3	T	0 Gy	10,00
1.4	G	8,00	0 Gy	4.4	G	0 Gy	9,00
1.5	B	8,40	4 Gy	4.5	B	4 Gy	7,80
1.6	NK	9,00	4 Gy	4.6	NK	4 Gy	9,20
1.7	T	10,00	4 Gy	4.7	T	4 Gy	10,00
1.8	G	7,20	4 Gy	4.8	G	4 Gy	7,50
1.9	WB	8,50	0 Gy	4.9	WB	0 Gy	9,80
1.10	WB	9,70	4Gy	4.10	WB	4Gy	9,60
2.1	B	9,30	0 Gy	5.1	B	0 Gy	8,70
2.2	NK	9,60	0 Gy	5.2	NK	0 Gy	9,30
2.3	T	10,00	0 Gy	5.3	T	0 Gy	10,00
2.4	G	7,20	0 Gy	5.4	G	0 Gy	7,80
2.5	B	8,80	4 Gy	5.5	B	4 Gy	8,60
2.6	NK	9,40	4 Gy	5.6	NK	4 Gy	9,40
2.7	T	9,80	4 Gy	5.7	T	4 Gy	10,00
2.8	G	7,50	4 Gy	5.8	G	4 Gy	7,90
2.9	WB	7,90	0 Gy	5.9	WB	0 Gy	10,00
2.10	WB	8,20	4Gy	5.10	WB	4Gy	9,00
3.1	B	9,00	0 Gy	6.1	B	0 Gy	9,30
3.2	NK	9,00	0 Gy	6.2	NK	0 Gy	7,80
3.3	T	10,00	0 Gy	6.3	T	0 Gy	10,00
3.4	G	7,40	0 Gy	6.4	G	0 Gy	7,70
3.5	B	8,80	4 Gy	6.5	B	4 Gy	8,30
3.6	NK	7,30	4 Gy	6.6	NK	4 Gy	8,80
3.7	T	9,00	4 Gy	6.7	T	4 Gy	9,60
3.8	G	7,20	4 Gy	6.8	G	4 Gy	6,90
3.9	WB	8,50	0 Gy	6.9	WB	0 Gy	9,40
3.10	WB	9,90	4Gy	6.10	WB	4Gy	8,40

Anhang Tabelle 1: Diese Tabelle zeigt die RIN-Werte der einzelnen Proben.

Probennummer	Probenart	Dosis in Gy	RNA-Menge in ng/µl	RNA-Gesamtmenge in µg/60µl Eluat
1.9	Vollblut	0	33,7	2,02
1.10	Vollblut	0	58,53	3,51
2.9	Vollblut	0	177,36	10,64
2.10	Vollblut	0	61,6	3,70
3.9	Vollblut	0	102,9	6,17
3.10	Vollblut	0	23,5	1,41
4.9	Vollblut	4	53,1	3,19
4.10	Vollblut	4	30,47	1,83
5.9	Vollblut	4	74,22	4,45
5.10	Vollblut	4	23,5	1,41
6.9	Vollblut	4	46,1	2,77
6.10	Vollblut	4	50,2	3,01
1.1	B-Zellen	0	9,67	0,58
2.1	B-Zellen	0	14,58	0,87
3.1	B-Zellen	0	8,26	0,50
4.1	B-Zellen	0	6,3	0,38
5.1	B-Zellen	0	15,6	0,94
6.1	B-Zellen	0	9,3	0,56
1.5	B-Zellen	4	6,55	0,39
2.5	B-Zellen	4	9,42	0,57
3.5	B-Zellen	4	8,9	0,53
4.5	B-Zellen	4	3,9	0,23
5.5	B-Zellen	4	7,5	0,45
6.5	B-Zellen	4	6,2	0,37
1.2	NK-Zellen	0	8,27	0,50
2.2	NK-Zellen	0	6,42	0,39
3.2	NK-Zellen	0	13,38	0,80
4.2	NK-Zellen	0	12,3	0,74
5.2	NK-Zellen	0	8,5	0,51
6.2	NK-Zellen	0	14,5	0,87
1.6	NK-Zellen	4	13,15	0,79
2.6	NK-Zellen	4	7,57	0,45
3.6	NK-Zellen	4	7,4	0,44
4.6	NK-Zellen	4	5,7	0,34
5.6	NK-Zellen	4	3,6	0,22
6.6	NK-Zellen	4	7,6	0,46
1.3	T-Zellen	0	114,68	6,88
2.3	T-Zellen	0	85,21	5,11
3.3	T-Zellen	0	96	5,76
4.3	T-Zellen	0	110,6	6,64
5.3	T-Zellen	0	97,8	5,87
6.3	T-Zellen	0	64,2	3,85
1.7	T-Zellen	4	151,27	9,08
2.7	T-Zellen	4	79,61	4,78
3.7	T-Zellen	4	29	1,74
4.7	T-Zellen	4	104,1	6,25
5.7	T-Zellen	4	115,5	6,93
6.7	T-Zellen	4	59,1	3,55
1.4	G-Zellen	0	7,16	0,43
2.4	G-Zellen	0	5,83	0,35
3.4	G-Zellen	0	15,62	0,94
4.4	G-Zellen	0	21,5	1,29
5.4	G-Zellen	0	10,1	0,61
6.4	G-Zellen	0	4	0,24
1.8	G-Zellen	4	20,38	1,22
2.8	G-Zellen	4	2,8	0,17
3.8	G-Zellen	4	8,26	0,50
4.8	G-Zellen	4	14,9	0,89
5.8	G-Zellen	4	12,6	0,76
6.8	G-Zellen	4	15,5	0,93

Anhang Tabelle 2: Diese Tabelle zeigt die RNA-Menge der einzelnen Proben.

Öffnung	Probe	Probenname	Dosis (Gy)	Detektorname	Ct	Mittelwert CT-Werte	norm. CT	Mittelwert norm. CT-Werte	ΔΔ CT (log. sc.)	ΔΔ CT (lin sc.)	FC
1	1.1	B	0	18S	19,43	19,49					
2	1.1	B	0	18S	19,56						
3	1.2	NK	0	18S	19,58	19,58					
4	1.2	NK	0	18S	19,58						
5	1.3	T	0	18S	18,17	18,10					
6	1.3	T	0	18S	18,03						
7	1.4	G	0	18S	18,60	18,61					
8	1.4	G	0	18S	18,62						
9	1.5	B	4	18S	20,55	20,51					
10	1.5	B	4	18S	20,46						
11	1.6	NK	4	18S	19,12	19,14					
12	1.6	NK	4	18S	19,17						
13	1.7	T	4	18S	18,88	18,69					
14	1.7	T	4	18S	18,49						
15	1.8	G	4	18S	18,37	18,38					
16	1.8	G	4	18S	18,39						
17	1.9	Vollblut	0	18S	18,83	18,76					
18	1.9	Vollblut	0	18S	18,68						
19	1.10	Vollblut	4	18S	20,69	20,64					
20	1.10	Vollblut	4	18S	20,58						
21	1.4	G	0	WNT3	36,88	38,44	18,28	19,83	-1,55	2,93	1,00
22	1.4	G	0	WNT3	40,00		21,38		1,55	0,34	
23	1.8	G	4	WNT3	40,00	40,00	21,63	21,62	1,81	0,29	0,29
24	1.8	G	4	WNT3	40,00		21,61		1,78	0,29	
25	1.9	Vollblut	0	WNT3	34,51	34,63	15,68	15,87	-0,19	1,14	1,00
26	1.9	Vollblut	0	WNT3	34,75		16,06		0,19	0,87	
27	1.10	Vollblut	4	WNT3	37,73	37,37	17,04	16,73	1,17	0,44	0,55
28	1.10	Vollblut	4	WNT3	37,00		16,42		0,55	0,68	
29	1.1	B	0	FDXR	27,56	27,54	8,06	8,05	0,02	0,99	1,00
30	1.1	B	0	FDXR	27,53		8,03		-0,02	1,01	
31	1.2	NK	0	FDXR	25,80	25,82	6,22	6,24	-0,02	1,01	1,00
32	1.2	NK	0	FDXR	25,83		6,25		0,02	0,99	
33	1.3	T	0	FDXR	26,99	26,94	8,89	8,84	0,05	0,97	1,00
34	1.3	T	0	FDXR	26,89		8,80		-0,05	1,03	
35	1.4	G	0	FDXR	28,88	28,88	10,27	10,27	0,00	1,00	1,00
36	1.4	G	0	FDXR	28,88		10,27		0,00	1,00	
37	1.5	B	4	FDXR	24,46	24,46	3,96	3,96	-4,09	17,05	17,05
38	1.5	B	4	FDXR	24,46		3,96		-4,09	17,05	
39	1.6	NK	4	FDXR	21,80	21,80	2,66	2,66	-3,57	11,91	11,93
40	1.6	NK	4	FDXR	21,80		2,66		-3,58	11,94	
41	1.7	T	4	FDXR	22,56	22,58	3,87	3,89	-4,98	31,49	30,91
42	1.7	T	4	FDXR	22,61		3,92		-4,92	30,33	
43	1.8	G	4	FDXR	27,66	27,70	9,28	9,32	-0,99	1,99	1,93
44	1.8	G	4	FDXR	27,74		9,36		-0,91	1,88	
45	1.9	Vollblut	0	FDXR	26,64	26,63	7,88	7,87	0,01	0,99	1,00
46	1.9	Vollblut	0	FDXR	26,62		7,87		-0,01	1,01	
47	1.10	Vollblut	4	FDXR	25,22	25,26	4,58	4,62	-3,29	9,80	9,52
48	1.10	Vollblut	4	FDXR	25,30		4,67		-3,21	9,24	
49	1.1	B	0	DDB2	26,28	26,27	6,79	6,78	0,01	0,99	1,00
50	1.1	B	0	DDB2	26,27		6,77		-0,01	1,01	
51	1.2	NK	0	DDB2	24,77	24,73	5,19	5,15	0,03	0,98	1,00
52	1.2	NK	0	DDB2	24,70		5,12		-0,03	1,02	
53	1.3	T	0	DDB2	25,17	25,16	7,07	7,07	0,01	1,00	1,00
54	1.3	T	0	DDB2	25,16		7,06		-0,01	1,00	
55	1.4	G	0	DDB2	29,67	29,67	11,06	11,06	0,00	1,00	1,00
56	1.4	G	0	DDB2	29,68		11,06		0,00	1,00	
57	1.5	B	4	DDB2	25,99	26,00	5,48	5,50	-1,30	2,46	2,43
58	1.5	B	4	DDB2	26,02		5,52		-1,26	2,40	
59	1.2	NK	4	DDB2	21,94	21,93	2,79	2,79	-2,36	5,13	5,14
60	1.2	NK	4	DDB2	21,93		2,79		-2,36	5,14	
61	1.7	T	4	DDB2	22,36	22,38	3,67	3,70	-3,40	10,52	10,33
62	1.7	T	4	DDB2	22,41		3,72		-3,34	10,15	
63	1.8	G	4	DDB2	27,98	27,88	9,60	9,50	-1,46	2,76	2,96
64	1.8	G	4	DDB2	27,78		9,40		-1,67	3,17	
65	1.9	Vollblut	0	DDB2	25,31	25,33	6,55	6,57	-0,02	1,01	1,00
66	1.9	Vollblut	0	DDB2	25,35		6,59		0,02	0,99	
67	1.10	Vollblut	4	DDB2	25,29	25,34	4,66	4,71	-1,91	3,76	3,64
68	1.10	Vollblut	4	DDB2	25,39		4,76		-1,81	3,51	
69	1.1	B	0	POU2AF1	22,49	22,52	3,00	3,03	-0,03	1,02	1,00
70	1.1	B	0	POU2AF1	22,55		3,06		0,03	0,98	
71	1.2	NK	0	POU2AF1	32,80	32,95	13,22	13,37	-0,15	1,11	1,00
72	1.2	NK	0	POU2AF1	33,11		13,53		0,15	0,90	
73	1.3	T	0	POU2AF1	29,73	29,79	11,63	11,69	-0,06	1,04	1,00
74	1.3	T	0	POU2AF1	29,85		11,75		0,06	0,96	
75	1.4	G	0	POU2AF1	30,07	29,86	11,45	11,25	0,21	0,87	1,00
76	1.4	G	0	POU2AF1	29,65		11,04		-0,21	1,15	
77	1.5	B	4	POU2AF1	24,80	24,77	4,30	4,26	1,27	0,42	0,42
78	1.5	B	4	POU2AF1	24,74		4,23		1,21	0,43	
79	1.2	NK	4	POU2AF1	35,23	35,06	16,09	15,92	2,72	0,15	0,17
80	1.2	NK	4	POU2AF1	34,89		15,74		2,37	0,19	
81	1.7	T	4	POU2AF1	30,38	30,31	11,69	11,62	0,00	1,00	1,05
82	1.7	T	4	POU2AF1	30,24		11,55		-0,14	1,10	
83	1.8	G	4	POU2AF1	32,52	33,24	14,14	14,86	2,89	0,13	0,08
84	1.8	G	4	POU2AF1	33,97		15,59		4,35	0,05	

85	1.9	Vollblut	0	POU2AF1	34,35	34,38	15,59	15,62	-0,03	1,02	1,00
86	1.9	Vollblut	0	POU2AF1	34,41		15,65		0,03	0,98	
87	1.10	Vollblut	4	POU2AF1	40,00	39,83	19,36	19,20	3,74	0,07	0,08
88	1.10	Vollblut	4	POU2AF1	39,67		19,03		3,41	0,09	
1	1.1	B	0	18S	19,29	19,25					
2	1.1	B	0	18S	19,21						
3	1.5	B	4	18S	20,27	20,30					
4	1.5	B	4	18S	20,33						
5	1.1	B	0	WNT3	29,12	29,13	9,87	9,87	0,00	1,00	1,00
6	1.1	B	0	WNT3	29,13		9,88		0,00	1,00	
7	1.5	B	4	WNT3	31,58	31,90	11,28	11,60	1,41	0,38	0,30
8	1.5	B	4	WNT3	32,22		11,92		2,05	0,24	
9	1.3	T	0	18S	19,60	19,63					
10	1.3	T	0	18S	19,66						
11	1.7	T	4	18S	19,58	19,57					
12	1.7	T	4	18S	19,55						
13	1.3	T	0	WNT3	35,51	34,57	15,91	14,94	0,97	0,51	1,00
14	1.3	T	0	WNT3	33,62		13,96		-0,97	1,96	
15	1.7	T	4	WNT3	35,88	35,38	16,30	15,82	1,37	0,39	0,54
16	1.7	T	4	WNT3	34,89		15,33		0,40	0,76	
17	1.2	NK	0	18S	19,31	19,24					
18	1.2	NK	0	18S	19,18						
19	1.6	NK	4	18S	18,47	18,48					
20	1.6	NK	4	18S	18,48						
21	1.2	NK	0	WNT3	32,00	32,33	12,76	13,09	-0,32	1,25	1,00
22	1.2	NK	0	WNT3	32,65		13,41		0,32	0,80	
23	1.6	NK	4	WNT3	32,16	31,74	13,68	13,27	0,60	0,66	0,88
24	1.6	NK	4	WNT3	31,33		12,85		-0,24	1,18	

Anhang Tabelle 3: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 1. Probanden für 18S, FDXR, DDB2, POU2AF1 und WNT3.

Öffnung	Probe	Probenname	Dosis (Gy)	Detektorname	Ct	Mittelwert CT-Werte	norm. CT	Mittelwert norm. CT-Werte	$\Delta\Delta$ CT (log. sc.)	$\Delta\Delta$ CT (lin sc.)	FC
1	2.1	B	0	18S	20,65	20,67					
2	2.1	B	0	18S	20,70						
3	2.5	B	4	18S	20,59	20,64					
4	2.5	B	4	18S	20,68						
5	2.1	B	0	WNT3	29,89	29,92	9,21	9,25	-0,04	1,03	1,00
6	2.1	B	0	WNT3	29,96		9,29		0,04	0,97	
7	2.5	B	4	WNT3	32,32	32,37	11,69	11,74	2,44	0,18	0,18
8	2.5	B	4	WNT3	32,42		11,79		2,54	0,17	
9	2.2	NK	0	18S	19,75	19,78					
10	2.2	NK	0	18S	19,82						
11	2.6	NK	4	18S	20,13	20,12					
12	2.6	NK	4	18S	20,12						
13	2.2	NK	0	WNT3	32,26	32,35	12,48	12,56	-0,09	1,06	1,00
14	2.2	NK	0	WNT3	32,43		12,65		0,09	0,94	
15	2.6	NK	4	WNT3	33,45	33,73	13,33	13,61	0,76	0,59	0,49
16	2.6	NK	4	WNT3	34,01		13,88		1,32	0,40	
17	2.3	T	0	18S	19,40	19,37					
18	2.3	T	0	18S	19,35						
19	2.7	T	4	18S	19,61	19,66					
20	2.7	T	4	18S	19,71						
21	2.3	T	0	WNT3	33,50	33,61	14,10	14,24	-0,13	1,10	1,00
22	2.3	T	0	WNT3	33,72		14,37		0,13	0,91	
23	2.7	T	4	WNT3	35,32	35,13	15,71	15,48	1,47	0,36	0,42
24	2.7	T	4	WNT3	34,95		15,24		1,01	0,50	
25	2.10	Vollblut	4	18S	19,94	19,87					
26	2.10	Vollblut	4	18S	19,80						
27	2.9	Vollblut	0	18S	20,05	20,06					
28	2.9	Vollblut	0	18S	20,07						
29	2.10	Vollblut	4	WNT3	35,33	36,06	15,40	16,19	1,48	0,36	0,21
30	2.10	Vollblut	4	WNT3	36,79		16,99		3,07	0,12	
31	2.9	Vollblut	0	WNT3	33,87	33,98	13,81	13,91	-0,10	1,07	1,00
32	2.9	Vollblut	0	WNT3	34,09		14,02		0,10	0,93	
33	2.9	Vollblut	0	18S	19,98	19,92					
34	2.9	Vollblut	0	18S	19,85						
35	2.10	Vollblut	4	18S	20,45	20,49					

36	2.10	Vollblut	4	18S	20,53						
37	2.9	Vollblut	0	POU2AF1	25,76	25,78	5,84	5,87	-0,03	1,02	1,00
38	2.9	Vollblut	0	POU2AF1	25,81		5,90		0,03	0,98	
39	2.10	Vollblut	4	POU2AF1	27,53	27,52	7,04	7,03	1,17	0,44	0,45
40	2.10	Vollblut	4	POU2AF1	27,52		7,02		1,16	0,45	
41	2.3	T	0	18S	19,36	19,38					
42	2.3	T	0	18S	19,40						
43	2.7	T	4	18S	19,65	19,64					
44	2.7	T	4	18S	19,64						
45	2.3	T	0	POU2AF1	28,40	28,40	9,02	9,01	0,00	1,00	1,00
46	2.3	T	0	POU2AF1	28,39		9,01		0,00	1,00	
47	2.7	T	4	POU2AF1	28,87	28,80	9,22	9,16	0,21	0,86	0,90
48	2.7	T	4	POU2AF1	28,73		9,09		0,08	0,95	
49	2.1	B	0	18S	20,65	20,67					
50	2.1	B	0	18S	20,70						
51	2.5	B	4	18S	20,59	20,64					
52	2.5	B	4	18S	20,68						
53	2.1	B	0	POU2AF1	22,05	22,09	1,38	1,42	-0,04	1,03	1,00
54	2.1	B	0	POU2AF1	22,12		1,45		0,04	0,98	
55	2.5	B	4	POU2AF1	23,49	23,50	2,85	2,86	1,43	0,37	0,37
56	2.5	B	4	POU2AF1	23,51		2,87		1,46	0,36	
57	2.2	NK	0	18S	19,75	19,78					
58	2.2	NK	0	18S	19,82						
59	2.6	NK	4	18S	20,13	20,12					
60	2.6	NK	4	18S	20,12						
61	2.2	NK	0	POU2AF1	32,53	32,26	12,75	12,48	0,26	0,83	1,00
62	2.2	NK	0	POU2AF1	32,00		12,22		-0,26	1,20	
63	2.6	NK	4	POU2AF1	33,52	33,60	13,40	13,48	0,92	0,53	0,50
64	2.6	NK	4	POU2AF1	33,68		13,55		1,07	0,48	
1	2.1	B	0	18S	20,16	20,20					
2	2.1	B	0	18S	20,23						
3	2.2	NK	0	18S	19,77	19,74					
4	2.2	NK	0	18S	19,71						
5	2.3	T	0	18S	19,38	19,30					
6	2.3	T	0	18S	19,21						
7	2.4	G	0	18S	20,59	20,58					
8	2.4	G	0	18S	20,58						
9	2.5	B	4	18S	20,61	20,58					
10	2.5	B	4	18S	20,55						
11	2.6	NK	4	18S	20,12	20,05					
12	2.6	NK	4	18S	19,98						
13	2.7	T	4	18S	17,53	17,51					
14	2.7	T	4	18S	17,49						
15	2.8	G	4	18S	24,00	24,15					
16	2.8	G	4	18S	24,30						
17	2.9	Vollblut	0	18S	19,62	19,71					
18	2.9	Vollblut	0	18S	19,81						
19	2.10	Vollblut	4	18S	17,32	17,29					
20	2.10	Vollblut	4	18S	17,25						
21	2.4	G	0	WNT	40,00	40,00	19,41	19,42	0,00	1,00	1,00
22	2.4	G	0	WNT	40,00		19,42		0,00	1,00	
23	2.8	G	4	WNT	40,00	40,00	16,00	15,85	-3,42	10,67	11,84
24	2.8	G	4	WNT	40,00		15,70		-3,72	13,14	
25	2.4	G	0	PO	40,00	40,00	19,41	19,42	0,00	1,00	1,00
26	2.4	G	0	PO	40,00		19,42		0,00	1,00	
27	2.8	G	4	PO	40,00	40,00	16,00	15,85	-3,42	10,67	11,84
28	2.8	G	4	PO	40,00		15,70		-3,72	13,14	
29	2.1	B	0	FDX	28,84	28,91	8,65	8,71	-0,06	1,05	1,00
30	2.1	B	0	FDX	28,97		8,77		0,06	0,96	
31	2.2	NK	0	FDX	28,27	28,28	8,53	8,54	-0,01	1,01	1,00
32	2.2	NK	0	FDX	28,29		8,55		0,01	0,99	
33	2.3	T	0	FDX	28,47	28,44	9,17	9,14	0,03	0,98	1,00
34	2.3	T	0	FDX	28,41		9,11		-0,03	1,02	
35	2.4	G	0	FDX	31,00	31,08	10,42	10,50	-0,08	1,06	1,00
36	2.4	G	0	FDX	31,16		10,58		0,08	0,95	
37	2.5	B	4	FDX	24,97	24,96	4,38	4,37	-4,33	20,06	20,19
38	2.5	B	4	FDX	24,95		4,37		-4,34	20,32	
39	2.6	NK	4	FDX	24,18	24,19	4,14	4,14	-4,41	21,20	21,15
40	2.6	NK	4	FDX	24,19		4,14		-4,40	21,10	

41	2.7	T	4	FDX	21,87	21,84	4,35	4,33	-4,79	27,66	28,13
42	2.7	T	4	FDX	21,82		4,31		-4,84	28,60	
43	2.8	G	4	FDX	32,55	32,95	8,40	8,80	-2,09	4,26	3,24
44	2.8	G	4	FDX	33,35		9,20		-1,30	2,46	
45	2.9	Vollblut	0	FDX	28,91	28,85	9,20	9,14	0,06	0,96	1,00
46	2.9	Vollblut	0	FDX	28,78		9,07		-0,06	1,05	
47	2.10	Vollblut	4	FDX	22,75	22,74	5,46	5,45	-3,68	12,78	12,83
48	2.10	Vollblut	4	FDX	22,74		5,45		-3,69	12,88	
49	2.1	B	0	DDB	26,16	26,15	5,96	5,96	0,01	1,00	1,00
50	2.1	B	0	DDB	26,15		5,95		-0,01	1,00	
51	2.2	NK	0	DDB	25,51	25,52	5,77	5,78	-0,01	1,01	1,00
52	2.2	NK	0	DDB	25,53		5,79		0,01	0,99	
53	2.3	T	0	DDB	25,25	25,33	5,96	6,03	-0,08	1,05	1,00
54	2.3	T	0	DDB	25,41		6,11		0,08	0,95	
55	2.4	G	0	DDB	31,55	31,61	10,96	11,02	-0,06	1,04	1,00
56	2.4	G	0	DDB	31,67		11,08		0,06	0,96	
57	2.5	B	4	DDB	24,54	24,57	3,96	3,99	-1,99	3,99	3,92
58	2.5	B	4	DDB	24,59		4,01		-1,94	3,85	
59	2.6	NK	4	DDB	23,31	23,32	3,27	3,27	-2,52	5,72	5,71
60	2.6	NK	4	DDB	23,32		3,27		-2,51	5,71	
61	2.7	T	4	DDB	22,56	22,56	5,05	5,04	-0,98	1,98	1,99
62	2.7	T	4	DDB	22,55		5,03		-1,00	2,00	
63	2.8	G	4	DDB	33,43	33,34	9,28	9,19	-1,74	3,35	3,56
64	2.8	G	4	DDB	33,26		9,11		-1,92	3,78	
65	2.9	Vollblut	0	DDB	26,40	26,43	6,69	6,72	-0,03	1,02	1,00
66	2.9	Vollblut	0	DDB	26,46		6,75		0,03	0,98	
67	2.10	Vollblut	4	DDB	22,93	22,97	5,64	5,68	-1,08	2,11	2,05
68	2.10	Vollblut	4	DDB	23,01		5,72		-1,00	2,00	

Anhang Tabelle 4: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 2. Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3.

Öffnung	Probe	Probenname	Dosis (Gy)	Detektorname	Ct	Mittelwert CT-Werte	norm. CT	Mittelwert norm. CT-Wert	ΔΔ CT (log. sc.)	ΔΔ CT (lin sc.)	FC
1	3.1	B	0	18S	18,56	18,70					
2	3.1	B	0	18S	18,84						
3	3.2	NK	0	18S	19,56	19,64					
4	3.2	NK	0	18S	19,71						
5	3.3	T	0	18S	18,57	18,55					
6	3.3	T	0	18S	18,53						
7	3.4	G	0	18S	19,21	19,20					
8	3.4	G	0	18S	19,18						
9	3.5	B	4	18S	19,89	19,86					
10	3.5	B	4	18S	19,84						
11	3.6	NK	4	18S	18,51	18,50					
12	3.6	NK	4	18S	18,50						
13	3.7	T	4	18S	19,44	19,50					
14	3.7	T	4	18S	19,57						
15	3.8	G	4	18S	19,01	18,95					
16	3.8	G	4	18S	18,89						
17	3.9	Vollblut	0	18S	21,40	21,52					
18	3.9	Vollblut	0	18S	21,63						
19	3.10	Vollblut	4	18S	17,72	17,70					
20	3.10	Vollblut	4	18S	17,67						
21	3.4	G	0	WNT3	40,00	40,00	20,79	20,80	-0,01	1,01	1,00
22	3.4	G	0	WNT3	40,00		20,82		0,01	0,99	
23	3.8	G	4	WNT3	40,00	40,00	20,99	21,05	0,18	0,88	0,84
24	3.8	G	4	WNT3	40,00		21,11		0,31	0,81	
25	3.1	B	0	FDXR	26,50	26,48	7,80	7,78	0,02	0,99	1,00
26	3.1	B	0	FDXR	26,46		7,76		-0,02	1,01	
27	3.2	NK	4	FDXR	26,72	26,71	7,09	7,07	0,02	0,99	1,00
28	3.2	NK	4	FDXR	26,69		7,05		-0,02	1,01	
29	3.3	T	0	FDXR	26,80	26,79	8,26	8,24	0,01	0,99	1,00
30	3.3	T	0	FDXR	26,77		8,23		-0,01	1,01	
31	3.4	G	0	FDXR	29,09	29,00	9,89	9,80	0,09	0,94	1,00
32	3.4	G	0	FDXR	28,91		9,71		-0,09	1,07	
33	3.5	B	4	FDXR	23,13	23,12	3,26	3,26	-4,51	22,85	22,98
34	3.5	B	4	FDXR	23,11		3,25		-4,53	23,10	
35	3.6	NK	4	FDXR	21,11	21,13	2,61	2,62	-4,46	22,07	21,79
36	3.6	NK	4	FDXR	21,15		2,64		-4,43	21,51	
37	3.7	T	4	FDXR	22,88	22,83	3,37	3,32	-4,87	29,21	30,19
38	3.7	T	4	FDXR	22,78		3,28		-4,96	31,21	
39	3.8	G	4	FDXR	27,37	27,39	8,42	8,44	-1,38	2,60	2,57
40	3.8	G	4	FDXR	27,41		8,46		-1,34	2,54	

41	3.9	Vollblut	0	FDXR	29,27	29,29	7,75	7,77	-0,03	1,02	1,00
42	3.9	Vollblut	0	FDXR	29,32		7,80		0,03	0,98	
43	3.10	Vollblut	4	FDXR	22,36	22,35	4,66	4,66	-3,11	8,64	8,68
44	3.10	Vollblut	4	FDXR	22,35		4,65		-3,12	8,72	
45	3.1	B	0	DDB2	25,46	25,52	6,76	6,81	-0,06	1,04	1,00
46	3.1	B	0	DDB2	25,57		6,87		0,06	0,96	
47	3.2	NK	0	DDB2	24,09	24,00	4,45	4,36	0,09	0,94	1,00
48	3.2	NK	0	DDB2	23,91		4,27		-0,09	1,06	
49	3.3	T	0	DDB2	24,79	24,76	6,24	6,21	0,02	0,98	1,00
50	3.3	T	0	DDB2	24,74		6,19		-0,02	1,02	
51	3.4	G	0	DDB2	30,43	30,31	11,23	11,11	0,12	0,92	1,00
52	3.4	G	0	DDB2	30,20		11,00		-0,12	1,08	
53	3.5	B	4	DDB2	24,24	24,27	4,38	4,41	-2,44	5,41	5,30
54	3.5	B	4	DDB2	24,30		4,44		-2,38	5,20	
55	3.6	NK	4	DDB2	21,55	21,56	3,05	3,06	-1,31	2,48	2,46
56	3.6	NK	4	DDB2	21,57		3,07		-1,29	2,45	
57	3.7	T	4	DDB2	22,61	22,61	3,11	3,10	-3,11	8,63	8,65
58	3.7	T	4	DDB2	22,60		3,10		-3,12	8,68	
59	3.8	G	4	DDB2	27,63	27,65	8,68	8,70	-2,43	5,40	5,32
60	3.8	G	4	DDB2	27,67		8,72		-2,39	5,24	
61	3.9	Vollblut	0	DDB2	28,22	28,22	6,70	6,70	0,00	1,00	1,00
62	3.9	Vollblut	0	DDB2	28,22		6,70		0,00	1,00	
63	3.10	Vollblut	4	DDB2	22,59	22,60	4,90	4,91	-1,80	3,49	3,47
64	3.10	Vollblut	4	DDB2	22,61		4,91		-1,79	3,45	
1	3.9	Vollblut	0	18S	19,12	19,04					
2	3.9	Vollblut	0	18S	18,97						
3	3.10	Vollblut	4	18S	20,68	20,64					
4	3.10	Vollblut	4	18S	20,64						
6	3.9	Vollblut	0	WNT3	32,51	32,59	13,47	13,55	-0,08	1,06	1,00
7	3.9	Vollblut	0	WNT3	32,67		13,63		0,08	0,95	
8	3.10	Vollblut	4	WNT3	36,86	36,80	16,22	16,16	2,67	0,16	0,16
9	3.10	Vollblut	4	WNT3	36,73		16,09		2,54	0,17	
10	3.3	T	0	18S	19,71	19,71					
11	3.3	T	0	18S	19,70						
12	3.7	T	4	18S	19,94	19,96					
13	3.7	T	4	18S	19,98						
14	3.3	T	0	WNT3	33,65	33,89	13,94	14,18	-0,25	1,19	1,00
15	3.3	T	0	WNT3	34,13		14,43		0,25	0,84	
16	3.7	T	4	WNT3	33,98	35,05	14,04	15,09	-0,14	1,10	0,53
17	3.7	T	4	WNT3	36,13		16,15		1,97	0,26	
18	3.1	B	0	18S	18,25	18,24					
19	3.1	B	0	18S	18,23						
20	3.5	B	4	18S	19,63	19,66					
21	3.5	B	4	18S	19,68						
22	3.1	B	0	WNT3	28,19	28,21	9,95	9,97	-0,01	1,01	1,00
23	3.1	B	0	WNT3	28,22		9,98		0,01	0,99	
24	3.5	B	4	WNT3	33,10	32,38	13,45	12,72	3,48	0,09	0,15
25	3.5	B	4	WNT3	31,66		12,00		2,03	0,24	
26	3.2	NK	0	18S	19,37	19,37					
27	3.2	NK	0	18S	19,37						
28	3.6	NK	4	18S	18,27	18,25					
29	3.6	NK	4	18S	18,24						
30	3.2	NK	0	WNT3	32,97	32,98	13,60	13,61	-0,01	1,01	1,00
31	3.2	NK	0	WNT3	32,99		13,62		0,01	0,99	
32	3.6	NK	4	WNT3	32,86	33,52	14,61	15,27	1,00	0,50	0,32
33	3.6	NK	4	WNT3	34,18		15,93		2,32	0,20	
34	3.9	Vollblut	0	18S	19,12	19,04					
35	3.9	Vollblut	0	18S	18,97						
36	3.10	Vollblut	4	18S	20,68	20,64					
37	3.10	Vollblut	4	18S	20,64						
38	3.9	Vollblut	0	POU2AF1	25,32	25,31	6,28	6,27	0,01	0,99	1,00
39	3.9	Vollblut	0	POU2AF1	25,30		6,26		-0,01	1,01	
40	3.10	Vollblut	4	POU2AF1	28,33	28,32	7,69	7,69	1,42	0,37	0,37
41	3.10	Vollblut	4	POU2AF1	28,32		7,68		1,41	0,38	
42	3.3	T	0	18S	19,66	19,63					
43	3.3	T	0	18S	19,61						
44	3.7	T	4	18S	19,83	19,79					
45	3.7	T	4	18S	19,75						
46	3.3	T	0	POU2AF1	27,97	27,89	8,33	8,25	0,08	0,95	1,00
47	3.3	T	0	POU2AF1	27,81		8,17		-0,08	1,06	
48	3.7	T	4	POU2AF1	27,51	27,49	7,71	7,70	-0,54	1,45	1,46
49	3.7	T	4	POU2AF1	27,48		7,69		-0,56	1,47	
50	3.1	B	0	18S	18,25	18,24					
51	3.1	B	0	18S	18,23						
52	3.5	B	4	18S	19,63	19,66					
53	3.5	B	4	18S	19,68						
54	3.1	B	0	POU2AF1	20,35	20,41	2,11	2,17	-0,07	1,05	1,00
55	3.1	B	0	POU2AF1	20,48		2,24		0,07	0,96	
56	3.5	B	4	POU2AF1	22,68	22,74	3,02	3,08	0,85	0,55	0,53
57	3.5	B	4	POU2AF1	22,80		3,15		0,98	0,51	
58	3.2	NK	0	18S	19,37	19,37					
59	3.2	NK	0	18S	19,37						
60	3.6	NK	4	18S	18,27	18,25					

61	3.6	NK	4	18S	18,24						
62	3.2	NK	0	POU2AF1	32,62	32,73	13,25	13,36	-0,11	1,08	1,00
63	3.2	NK	0	POU2AF1	32,83		13,46		0,11	0,93	
64	3.6	NK	4	POU2AF1	32,58	32,30	14,32	14,05	0,97	0,51	0,62
65	3.6	NK	4	POU2AF1	32,02		13,77		0,41	0,75	
66	3.4	G	0	18S	18,89	18,88					
67	3.4	G	0	18S	18,87						
68	3.8	G	4	18S	18,37	18,40					
69	3.8	G	4	18S	18,43						
70	3.4	G	0	POU2AF1	31,20	31,15	12,32	12,27	0,06	0,96	1,00
71	3.4	G	0	POU2AF1	31,09		12,21		-0,06	1,04	
72	3.8	G	4	POU2AF1	32,32	32,47	13,92	14,07	1,66	0,32	0,29
73	3.8	G	4	POU2AF1	32,63		14,23		1,96	0,26	

Anhang Tabelle 5: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 3. Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3.

Öffnung	Probe	Probenname	Dosis (Gy)	Detektorname	Ct	Mittelwert CT-Werte	norm. CT	Mittelwert norm. CT-Wert	ΔΔ CT (log. sc.)	ΔΔ CT (lin sc.)	FC
1	4.1	B	0	18S	19,46	19,45					
2	4.1	B	0	18S	19,43						
3	4.2	NK	0	18S	18,54	18,50					
4	4.2	NK	0	18S	18,46						
5	4.3	T	0	18S	18,62	18,61					
6	4.3	T	0	18S	18,60						
7	4.4	G	0	18S	19,40	19,37					
8	4.4	G	0	18S	19,34						
9	4.5	B	4	18S	21,13	21,09					
10	4.5	B	4	18S	21,06						
11	4.6	NK	4	18S	19,28	19,25					
12	4.6	NK	4	18S	19,21						
13	4.7	T	4	18S	18,28	18,23					
14	4.7	T	4	18S	18,17						
15	4.8	G	4	18S	18,50	18,49					
16	4.8	G	4	18S	18,48						
17	4.9	Vollblut	0	18S	19,66	19,63					
18	4.9	Vollblut	0	18S	19,59						
19	4.10	Vollblut	4	18S	19,13	19,18					
20	4.10	Vollblut	4	18S	19,24						
21	4.1	B	0	WNT3	29,45	29,43	9,99	9,98	0,01	1,00	1,00
22	4.1	B	0	WNT3	29,41		9,98		-0,01	1,00	
23	4.4	G	0	WNT3	40,00	38,48	20,60	19,11	1,49	0,36	1,00
24	4.4	G	0	WNT3	36,95		17,62		-1,49	2,81	
25	4.5	B	4	WNT3	32,32	32,46	11,19	11,37	1,21	0,43	0,38
26	4.5	B	4	WNT3	32,61		11,55		1,57	0,34	
27	4.8	G	4	WNT3	40,00	40,00	21,50	21,51	2,40	0,19	0,19
28	4.8	G	4	WNT3	40,00		21,52		2,41	0,19	
29	4.1	B	0	POU2AF1	22,19	22,18	2,73	2,74	0,00	1,00	1,00
30	4.1	B	0	POU2AF1	22,17		2,74		0,00	1,00	
31	4.3	T	0	POU2AF1	29,56	29,58	10,94	10,97	-0,03	1,02	1,00
32	4.3	T	0	POU2AF1	29,60		11,00		0,03	0,98	
33	4.5	B	4	POU2AF1	25,11	25,05	3,97	3,95	1,24	0,42	0,43
34	4.5	B	4	POU2AF1	24,99		3,93		1,20	0,44	
35	4.7	T	4	POU2AF1	29,59	29,45	11,31	11,22	0,33	0,79	0,84
36	4.7	T	4	POU2AF1	29,31		11,14		0,16	0,89	
37	4.1	B	0	FDXR	26,92	26,88	7,48	7,43	0,05	0,97	1,00
38	4.1	B	0	FDXR	26,83		7,38		-0,05	1,03	
39	4.2	NK	0	FDXR	24,40	24,35	5,90	5,85	0,05	0,97	1,00
40	4.2	NK	0	FDXR	24,30		5,81		-0,05	1,03	
41	4.3	T	0	FDXR	27,29	27,31	8,68	8,70	-0,02	1,02	1,00
42	4.3	T	0	FDXR	27,33		8,72		0,02	0,98	
43	4.4	G	0	FDXR	28,05	28,04	8,68	8,67	0,01	1,00	1,00
44	4.4	G	0	FDXR	28,04		8,67		-0,01	1,00	
45	4.5	B	4	FDXR	24,26	24,24	3,17	3,15	-4,26	19,18	19,44
46	4.5	B	4	FDXR	24,23		3,13		-4,30	19,70	
47	4.6	NK	4	FDXR	21,65	21,66	2,40	2,41	-3,45	10,93	10,84
48	4.6	NK	4	FDXR	21,67		2,43		-3,43	10,75	
49	4.7	T	4	FDXR	21,79	21,83	3,56	3,60	-5,14	35,26	34,36
50	4.7	T	4	FDXR	21,86		3,64		-5,07	33,48	
51	4.8	G	4	FDXR	25,41	25,41	6,92	6,93	-1,75	3,37	3,36
52	4.8	G	4	FDXR	25,42		6,93		-1,74	3,35	
53	4.9	Vollblut	0	FDXR	27,08	27,08	7,45	7,45	0,00	1,00	1,00
54	4.9	Vollblut	0	FDXR	27,08		7,45		0,00	1,00	

55	4.10	Vollblut	4	FDXR	23,00	23,04	3,82	3,86	-3,64	12,43	12,10
56	4.10	Vollblut	4	FDXR	23,08		3,90		-3,56	11,78	
57	4.1	B	0	DDB2	25,68	25,68	6,23	6,24	-0,01	1,00	1,00
58	4.1	B	0	DDB2	25,69		6,24		0,01	1,00	
59	4.2	NK	0	DDB2	23,53	23,53	5,04	5,03	0,01	1,00	1,00
60	4.2	NK	0	DDB2	23,52		5,03		-0,01	1,00	
61	4.3	T	0	DDB2	25,38	25,36	6,77	6,75	0,02	0,99	1,00
62	4.3	T	0	DDB2	25,34		6,73		-0,02	1,01	
63	4.4	G	0	DDB2	30,24	30,36	10,88	10,99	-0,12	1,09	1,00
64	4.4	G	0	DDB2	30,48		11,11		0,12	0,92	
65	4.5	B	4	DDB2	25,69	25,71	4,59	4,62	-1,64	3,12	3,07
66	4.5	B	4	DDB2	25,73		4,64		-1,60	3,02	
67	4.6	NK	4	DDB2	22,46	22,48	3,21	3,23	-1,82	3,53	3,49
68	4.6	NK	4	DDB2	22,49		3,25		-1,79	3,45	
69	4.7	T	4	DDB2	22,09	22,05	3,86	3,82	-2,88	7,38	7,59
70	4.7	T	4	DDB2	22,01		3,79		-2,96	7,80	
71	4.8	G	4	DDB2	26,42	26,46	7,93	7,97	-3,07	8,38	8,12
72	4.8	G	4	DDB2	26,51		8,02		-2,98	7,87	
73	4.9	Vollblut	0	DDB2	26,00	25,93	6,37	6,30	0,07	0,95	1,00
74	4.9	Vollblut	0	DDB2	25,86		6,23		-0,07	1,05	
75	4.10	Vollblut	4	DDB2	22,84	22,85	3,66	3,67	-2,64	6,25	6,20
76	4.10	Vollblut	4	DDB2	22,87		3,68		-2,62	6,15	
1	4.4	G	0	18S	20,10	20,09					
2	4.4	G	0	18S	20,07						
3	4.8	G	4	18S	19,42	19,42					
4	4.8	G	4	18S	19,43						
5	4.4	G	0	WNT3	40,00	38,50	19,91	18,41	1,50	0,35	1,00
6	4.4	G	0	WNT3	37,00		16,91		-1,50	2,83	
7	4.8	G	4	WNT3	40,00	40,00	20,58	20,58	2,17	0,22	0,22
8	4.8	G	4	WNT3	40,00		20,58		2,17	0,22	
9	4.3	T	0	18S	19,55	19,59					
10	4.3	T	0	18S	19,63						
11	4.7	T	4	18S	19,68	19,66					
12	4.7	T	4	18S	19,64						
13	4.3	T	0	WNT3	33,32	33,02	13,78	13,44	0,34	0,79	1,00
14	4.3	T	0	WNT3	32,73		13,10		-0,34	1,26	
15	4.7	T	4	WNT3	33,41	33,75	13,74	14,09	0,30	0,81	0,63
16	4.7	T	4	WNT3	34,09		14,45		1,01	0,49	
17	4.2	NK	0	18S	17,80	17,82					
18	4.2	NK	0	18S	17,84						
19	4.6	NK	4	18S	19,17	19,21					
20	4.6	NK	4	18S	19,26						
21	4.2	NK	0	WNT3	28,77	28,77	10,95	10,95	0,00	1,00	1,00
22	4.2	NK	0	WNT3	28,77		10,94		0,00	1,00	
23	4.6	NK	4	WNT3	30,50	30,50	11,29	11,29	0,35	0,79	0,79
24	4.6	NK	4	WNT3	30,50		11,29		0,34	0,79	
25	4.9	Vollblut	0	18S	20,52	20,53					
26	4.9	Vollblut	0	18S	20,53						
27	4.10	Vollblut	4	18S	19,72	19,73					
28	4.10	Vollblut	4	18S	19,75						
29	4.9	Vollblut	0	POU2AF1	26,63	26,59	6,10	6,06	0,04	0,98	1,00
30	4.9	Vollblut	0	POU2AF1	26,55		6,03		-0,04	1,02	
31	4.10	Vollblut	4	POU2AF1	27,78	27,79	8,05	8,06	1,98	0,25	0,25
32	4.10	Vollblut	4	POU2AF1	27,80		8,07		2,00	0,25	
33	4.2	NK	0	18S	17,80	17,82					
34	4.2	NK	0	18S	17,84						
35	4.6	NK	4	18S	19,17	19,21					
36	4.6	NK	4	18S	19,26						
37	4.2	NK	0	POU2AF1	31,63	31,58	13,81	13,75	0,05	0,96	1,00
38	4.2	NK	0	POU2AF1	31,52		13,70		-0,05	1,04	
39	4.6	NK	4	POU2AF1	32,60	32,67	13,39	13,46	-0,36	1,29	1,23
40	4.6	NK	4	POU2AF1	32,73		13,52		-0,23	1,17	
41	4.4	G	0	18S	20,10	20,09					
42	4.4	G	0	18S	20,07						
43	4.8	G	4	18S	19,42	19,42					
44	4.8	G	4	18S	19,43						
45	4.4	G	0	POU2AF1	32,26	32,43	12,17	12,35	-0,17	1,13	1,00
46	4.4	G	0	POU2AF1	32,61		12,52		0,17	0,89	
47	4.8	G	4	POU2AF1	33,57	33,53	14,15	14,10	1,80	0,29	0,30
48	4.8	G	4	POU2AF1	33,48		14,06		1,71	0,31	

Anhang Tabelle 6: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 4. Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3.

Öffnung	Probe	Probenname	Dosis (Gy)	Detektorname	Ct	Mittelwert CT-Werte	norm. CT	Mittelwert norm. CT-Werte	ΔΔ CT (log. sc.)	ΔΔ CT(lin sc.)	FC
1	5.1	B	0	18S	18,39	18,49					
2	5.1	B	0	18S	18,60						
3	5.2	NK	0	18S	19,72	19,73					
4	5.2	NK	0	18S	19,74						
5	5.3	T	0	18S	17,90	17,86					
6	5.3	T	0	18S	17,82						
7	5.4	G	0	18S	18,38	18,42					
8	5.4	G	0	18S	18,46						
9	5.5	B	4	18S	18,74	18,77					
10	5.5	B	4	18S	18,80						
11	5.6	NK	4	18S	19,44	19,40					
12	5.6	NK	4	18S	19,36						
13	5.7	T	4	18S	17,98	17,90					
14	5.7	T	4	18S	17,82						
15	5.8	G	4	18S	17,89	17,91					
16	5.8	G	4	18S	17,93						
17	5.9	Vollblut	0	18S	17,66	17,62					
18	5.9	Vollblut	0	18S	17,59						
19	5.10	Vollblut	4	18S	22,18	22,09					
20	5.10	Vollblut	4	18S	21,99						
21	5.2	NK	0	WNT3	31,94	31,95	12,22	12,22	0,00	1,00	1,00
22	5.2	NK	0	WNT3	31,96		12,22		0,00	1,00	
23	5.4	G	0	WNT3	40,00	40,00	21,62	21,58	0,04	0,98	1,00
24	5.4	G	0	WNT3	40,00		21,54		-0,04	1,03	
25	5.6	NK	4	WNT3	33,35	33,10	13,90	13,70	1,68	0,31	0,36
26	5.6	NK	4	WNT3	32,86		13,50		1,27	0,41	
27	5.8	G	4	WNT3	36,95	38,47	19,06	20,56	-2,53	5,76	2,03
28	5.8	G	4	WNT3	40,00		22,07		0,48	0,71	
29	5.2	NK	0	POU2AF1	30,69	30,68	10,97	10,96	0,01	0,99	1,00
30	5.2	NK	0	POU2AF1	30,68		10,94		-0,01	1,01	
31	5.4	G	0	POU2AF1	31,34	31,22	12,96	12,80	0,16	0,89	1,00
32	5.4	G	0	POU2AF1	31,09		12,64		-0,16	1,12	
33	5.6	NK	4	POU2AF1	32,45	32,51	13,01	13,10	2,05	0,24	0,23
34	5.6	NK	4	POU2AF1	32,57		13,20		2,25	0,21	
35	5.8	G	4	POU2AF1	32,86	32,75	14,97	14,83	2,17	0,22	0,24
36	5.8	G	4	POU2AF1	32,63		14,70		1,90	0,27	
37	5.1	B	0	FDXR	26,90	26,88	8,41	8,39	0,02	0,99	1,00
38	5.1	B	0	FDXR	26,86		8,37		-0,02	1,01	
39	5.2	NK	0	FDXR	25,58	25,54	5,85	5,81	0,04	0,97	1,00
40	5.2	NK	0	FDXR	25,50		5,77		-0,04	1,03	
41	5.3	T	0	FDXR	26,87	26,82	9,01	8,96	0,05	0,97	1,00
42	5.3	T	0	FDXR	26,77		8,91		-0,05	1,03	
43	5.4	G	0	FDXR	26,86	26,89	8,44	8,47	-0,04	1,03	1,00
44	5.4	G	0	FDXR	26,93		8,51		0,04	0,97	
45	5.5	B	4	FDXR	22,20	22,20	3,43	3,43	-4,96	31,13	31,03
46	5.5	B	4	FDXR	22,21		3,44		-4,95	30,93	
47	5.6	NK	4	FDXR	22,53	22,55	3,13	3,15	-2,69	6,43	6,33
48	5.6	NK	4	FDXR	22,58		3,17		-2,64	6,24	
49	5.7	T	4	FDXR	22,33	22,33	4,43	4,43	-4,52	23,02	23,06
50	5.7	T	4	FDXR	22,33		4,43		-4,53	23,10	
51	5.8	G	4	FDXR	25,56	25,67	7,65	7,75	-0,82	1,77	1,65
52	5.8	G	4	FDXR	25,77		7,86		-0,62	1,53	
53	5.9	Vollblut	0	FDXR	26,38	26,33	8,75	8,71	0,04	0,97	1,00
54	5.9	Vollblut	0	FDXR	26,29		8,66		-0,04	1,03	
55	5.10	Vollblut	4	FDXR	25,33	25,33	3,24	3,24	-5,46	44,17	44,17
56	5.10	Vollblut	4	FDXR	25,33		3,24		-5,46	44,17	
57	5.1	B	0	DDB2	25,34	25,37	6,85	6,88	-0,04	1,03	1,00
58	5.1	B	0	DDB2	25,41		6,92		0,04	0,98	
59	5.2	NK	0	DDB2	24,42	24,45	4,69	4,72	-0,03	1,02	1,00
60	5.2	NK	0	DDB2	24,47		4,74		0,03	0,98	
61	5.3	T	0	DDB2	24,73	24,82	6,87	6,97	-0,09	1,07	1,00
62	5.3	T	0	DDB2	24,92		7,06		0,09	0,94	
63	5.4	G	0	DDB2	29,52	29,48	11,10	11,06	0,04	0,97	1,00
64	5.4	G	0	DDB2	29,44		11,03		-0,04	1,03	
65	5.5	B	4	DDB2	23,23	23,22	4,47	4,45	-2,42	5,34	5,40
66	5.5	B	4	DDB2	23,20		4,43		-2,45	5,47	
67	5.6	NK	4	DDB2	22,80	22,80	3,39	3,40	-1,32	2,50	2,49
68	5.6	NK	4	DDB2	22,81		3,41		-1,31	2,48	
69	5.7	T	4	DDB2	22,18	22,16	4,28	4,26	-2,69	6,43	6,51
70	5.7	T	4	DDB2	22,14		4,24		-2,72	6,59	
71	5.8	G	4	DDB2	27,47	27,46	9,56	9,55	-1,51	2,84	2,86
72	5.8	G	4	DDB2	27,46		9,54		-1,52	2,87	
73	5.9	Vollblut	0	DDB2	25,09	25,09	7,47	7,47	0,00	1,00	1,00
74	5.9	Vollblut	0	DDB2	25,10		7,47		0,00	1,00	
75	5.10	Vollblut	4	DDB2	25,45	25,45	3,36	3,37	-4,11	17,24	17,17
76	5.10	Vollblut	4	DDB2	25,46		3,37		-4,10	17,10	
1	5.3	T	0	18S	19,13	19,12					
2	5.3	T	0	18S	19,11						
3	5.7	T	4	18S	18,99	18,94					
4	5.7	T	4	18S	18,89						

5	5.9	Vollblut	0	18S	19,87	19,80						
6	5.9	Vollblut	0	18S	19,74							
7	5.10	Vollblut	4	18S	21,95	21,96						
8	5.10	Vollblut	4	18S	21,97							
9	5.3	T	0	WNT3	32,52	32,45	13,40	13,33	0,07	0,95	1,00	
10	5.3	T	0	WNT3	32,38		13,26		-0,07	1,05		
11	5.7	T	4	WNT3	33,27	33,59	14,33	14,65	1,00	0,50	0,40	
12	5.7	T	4	WNT3	33,91		14,97		1,64	0,32		
13	5.9	Vollblut	0	WNT3	31,81	31,97	12,00	12,17	-0,16	1,12	1,00	
14	5.9	Vollblut	0	WNT3	32,14		12,33		0,16	0,89		
15	5.10	Vollblut	4	WNT3	35,08	35,37	13,12	13,41	0,95	0,52	0,42	
16	5.10	Vollblut	4	WNT3	35,66		13,70		1,53	0,35		
17	5.1	B	0	18S	18,43	18,40						
18	5.1	B	0	18S	18,38							
19	5.5	B	4	18S	18,28	18,31						
20	5.5	B	4	18S	18,35							
21	5.1	B	0	WNT3	27,44	27,53	9,04	9,13	-0,08	1,06	1,00	
22	5.1	B	0	WNT3	27,61		9,21		0,08	0,94		
23	5.5	B	4	WNT3	29,62	29,56	11,31	11,25	2,18	0,22	0,23	
24	5.5	B	4	WNT3	29,51		11,19		2,07	0,24		
25	5.3	T	0	18S	19,13	19,12						
26	5.3	T	0	18S	19,11							
27	5.7	T	4	18S	18,99	18,94						
28	5.7	T	4	18S	18,89							
29	5.9	Vollblut	0	18S	19,87	19,80						
30	5.9	Vollblut	0	18S	19,74							
31	5.10	Vollblut	4	18S	21,95	21,96						
32	5.10	Vollblut	4	18S	21,97							
33	5.3	T	0	POU2AF1	28,17	28,19	9,05	9,07	-0,03	1,02	1,00	
34	5.3	T	0	POU2AF1	28,22		9,10		0,03	0,98		
35	5.7	T	4	POU2AF1	28,44	28,42	9,50	9,48	0,43	0,74	0,75	
36	5.7	T	4	POU2AF1	28,41		9,47		0,40	0,76		
37	5.9	Vollblut	0	POU2AF1	24,91	24,90	5,11	5,10	0,01	1,00	1,00	
38	5.9	Vollblut	0	POU2AF1	24,90		5,09		-0,01	1,00		
39	5.10	Vollblut	4	POU2AF1	28,77	28,75	6,81	6,79	1,71	0,31	0,31	
40	5.10	Vollblut	4	POU2AF1	28,72		6,77		1,66	0,32		
41	5.1	B	0	18S	18,43	18,40						
42	5.1	B	0	18S	18,38							
43	5.5	B	4	18S	18,28	18,31						
44	5.5	B	4	18S	18,35							
45	5.1	B	0	POU2AF1	21,03	21,05	2,63	2,65	-0,02	1,01	1,00	
46	5.1	B	0	POU2AF1	21,07		2,67		0,02	0,99		
47	5.5	B	4	POU2AF1	22,34	22,28	4,02	3,96	1,37	0,39	0,40	
48	5.5	B	4	POU2AF1	22,22		3,91		1,26	0,42		

Anhang Tabelle 7: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 5. Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3.

Öffnung	Probe	Probenname	Dosis (Gy)	Detektorname	Ct	Mittelwert CT-Werte	norm. CT	Mittelwert norm. CT-Werte	ΔΔ CT (log. sc.)	ΔΔ CT (lin. sc.)	FC
1	6.1	B	0	18S	18,71	18,68					
2	6.1	B	0	18S	18,65						
3	6.2	NK	0	18S	18,53	18,47					
4	6.2	NK	0	18S	18,40						
5	6.3	T	0	18S	17,89	17,91					
6	6.3	T	0	18S	17,93						
7	6.4	G	0	18S	18,85	18,85					
8	6.4	G	0	18S	18,85						
9	6.5	B	4	18S	19,01	19,03					
10	6.5	B	4	18S	19,06						
11	6.6	NK	4	18S	19,03	19,04					
12	6.6	NK	4	18S	19,05						
13	6.7	T	4	18S	17,86	17,70					
14	6.7	T	4	18S	17,54						
15	6.8	G	4	18S	17,97	17,96					
16	6.8	G	4	18S	17,96						
17	6.9	Vollblut	0	18S	19,31	19,28					
18	6.9	Vollblut	0	18S	19,26						
19	6.10	Vollblut	4	18S	18,61	18,53					
20	6.10	Vollblut	4	18S	18,45						
21	6.4	G	0	WNT3	35,85	36,37	17,00	17,52	-0,52	1,43	1,00
22	6.4	G	0	WNT3	36,89		18,04		0,52	0,70	
23	6.8	G	4	WNT3	36,81	36,54	18,84	18,58	1,32	0,40	0,48
24	6.8	G	4	WNT3	36,27		18,31		0,80	0,58	

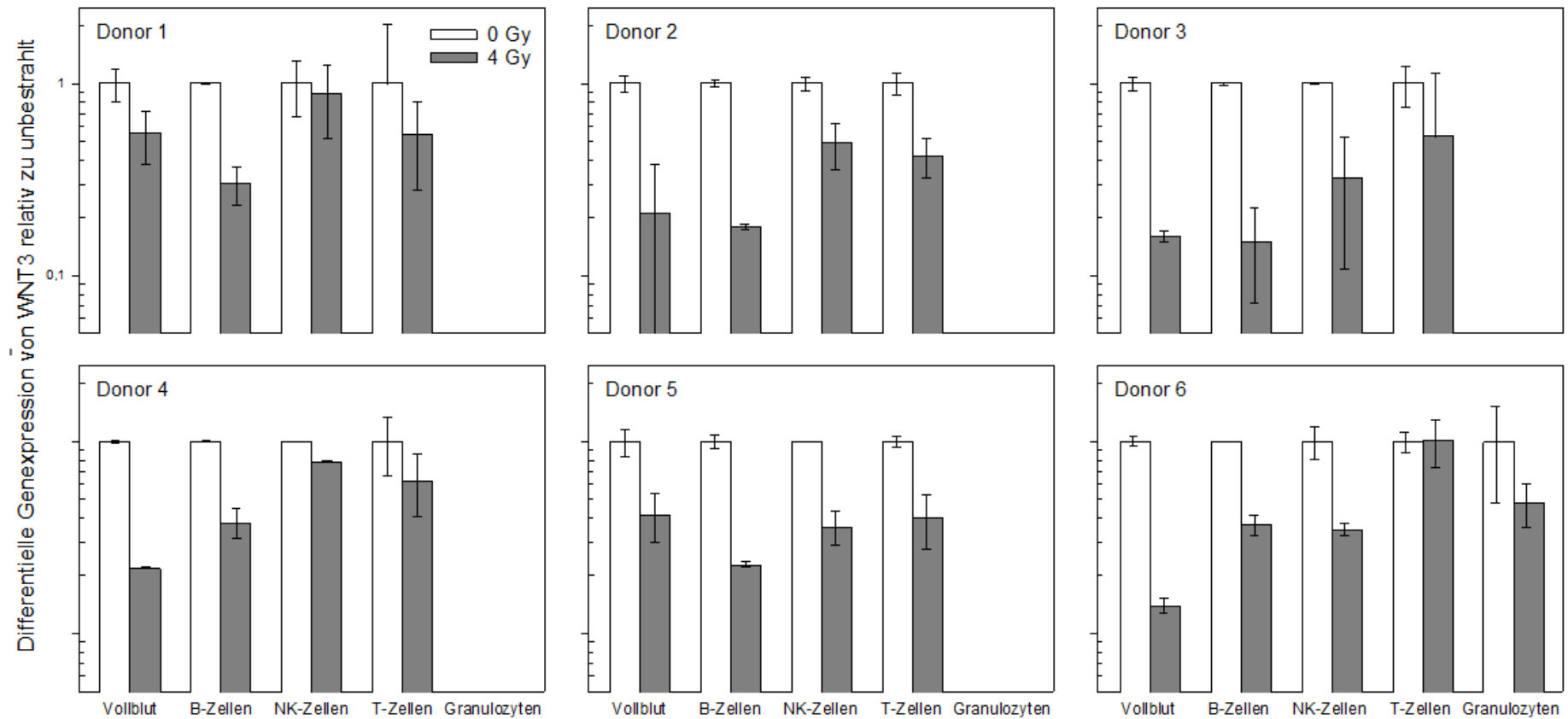
25	6.4	G	0	POU2AF1	38,82	38,47	19,97	19,62	0,35	0,79	1,00
26	6.4	G	0	POU2AF1	38,13		19,28		-0,35	1,27	
27	6.8	G	4	POU2AF1	39,75	39,87	21,78	21,91	2,16	0,22	0,20
28	6.8	G	4	POU2AF1	40,00		22,04		2,42	0,19	
29	6.4	G	0	FDXR	27,84	27,81	8,99	8,96	0,03	0,98	1,00
30	6.4	G	0	FDXR	27,78		8,92		-0,03	1,02	
31	6.8	G	4	FDXR	25,80	25,79	7,84	7,83	-1,11	2,16	2,19
32	6.8	G	4	FDXR	25,77		7,81		-1,15	2,22	
33	6.1	B	0	DDB2	25,39	25,38	6,71	6,70	0,01	0,99	1,00
34	6.1	B	0	DDB2	25,37		6,69		-0,01	1,01	
35	6.2	NK	0	DDB2	23,77	23,80	5,30	5,33	-0,03	1,02	1,00
36	6.2	NK	0	DDB2	23,83		5,37		0,03	0,98	
37	6.3	T	0	DDB2	25,22	25,19	7,31	7,27	0,03	0,98	1,00
38	6.3	T	0	DDB2	25,15		7,24		-0,03	1,02	
39	6.4	G	0	DDB2	29,79	29,73	10,93	10,88	0,06	0,96	1,00
40	6.4	G	0	DDB2	29,67		10,82		-0,06	1,04	
41	6.5	B	4	DDB2	24,07	23,95	5,04	4,92	-1,67	3,17	3,44
42	6.5	B	4	DDB2	23,83		4,80		-1,90	3,73	
43	6.6	NK	4	DDB2	22,50	22,49	3,45	3,44	-1,88	3,68	3,71
44	6.6	NK	4	DDB2	22,48		3,43		-1,90	3,73	
45	6.7	T	4	DDB2	21,87	21,88	4,16	4,18	-3,11	8,63	8,55
46	6.7	T	4	DDB2	21,90		4,19		-3,08	8,47	
47	6.8	G	4	DDB2	26,67	26,62	8,71	8,66	-2,17	4,50	4,64
48	6.8	G	4	DDB2	26,58		8,62		-2,26	4,78	
49	6.9	Vollblut	0	DDB2	25,72	25,74	6,43	6,46	-0,03	1,02	1,00
50	6.9	Vollblut	0	DDB2	25,77		6,48		0,03	0,98	
51	6.10	Vollblut	4	DDB2	22,50	22,53	3,97	4,00	-2,49	5,61	5,50
52	6.10	Vollblut	4	DDB2	22,56		4,03		-2,43	5,39	
1	6.10	Vollblut	4	18S	19,73	19,72					
2	6.10	Vollblut	4	18S	19,71						
3	6.9	Vollblut	0	18S	20,88	20,81					
4	6.9	Vollblut	0	18S	20,74						
5	6.10	Vollblut	4	WNT3	34,58	34,49	14,85	14,76	2,92	0,13	0,14
6	6.10	Vollblut	4	WNT3	34,39		14,68		2,75	0,15	
7	6.9	Vollblut	0	WNT3	32,75	32,74	11,87	11,93	-0,06	1,04	1,00
8	6.9	Vollblut	0	WNT3	32,73		11,99		0,06	0,96	
9	6.3	T	0	18S	19,32	19,31					
10	6.3	T	0	18S	19,29						
11	6.7	T	4	18S	19,24	19,18					
12	6.7	T	4	18S	19,11						
13	6.3	T	0	WNT3	34,28	34,15	14,97	14,85	0,12	0,92	1,00
14	6.3	T	0	WNT3	34,02		14,72		-0,12	1,09	
15	6.7	T	4	WNT3	33,74	34,01	14,56	14,84	-0,29	1,22	1,01
16	6.7	T	4	WNT3	34,29		15,11		0,27	0,83	
17	6.1	B	0	18S	18,68	18,62					
18	6.1	B	0	18S	18,55						
19	6.5	B	4	18S	19,21	19,21					
20	6.5	B	4	18S	19,21						
21	6.1	B	0	WNT3	28,58	28,58	9,96	9,96	0,00	1,00	1,00
22	6.1	B	0	WNT3	28,58		9,96		0,00	1,00	
23	6.5	B	4	WNT3	30,49	30,61	11,28	11,40	1,32	0,40	0,37
24	6.5	B	4	WNT3	30,73		11,52		1,56	0,34	
25	6.2	NK	0	18S	18,16	18,16					
26	6.2	NK	0	18S	18,15						
27	6.6	NK	4	18S	18,60	18,60					
28	6.6	NK	4	18S	18,60						
29	6.2	NK	0	WNT3	29,09	29,28	10,94	11,13	-0,19	1,14	1,00
30	6.2	NK	0	WNT3	29,47		11,32		0,19	0,88	
31	6.6	NK	4	WNT3	31,19	31,26	12,58	12,66	1,46	0,36	0,35
32	6.6	NK	4	WNT3	31,34		12,73		1,61	0,33	
33	6.9	Vollblut	0	18S	20,81	20,86					
34	6.9	Vollblut	0	18S	20,90						
35	6.10	Vollblut	4	18S	20,01	19,89					
36	6.10	Vollblut	4	18S	19,77						
37	6.3	T	0	18S	19,40	19,39					
38	6.3	T	0	18S	19,38						
39	6.7	T	4	18S	19,27	19,26					
40	6.7	T	4	18S	19,26						
41	6.9	Vollblut	0	POU2AF1	25,95	25,97	5,09	5,12	-0,02	1,02	1,00
42	6.9	Vollblut	0	POU2AF1	26,00		5,14		0,02	0,98	
43	6.10	Vollblut	4	POU2AF1	26,92	26,93	7,03	7,04	1,91	0,27	0,26
44	6.10	Vollblut	4	POU2AF1	26,94		7,05		1,93	0,26	
45	6.3	T	0	POU2AF1	28,86	28,97	9,47	9,58	-0,10	1,08	1,00
46	6.3	T	0	POU2AF1	29,07		9,68		0,10	0,93	
47	6.7	T	4	POU2AF1	29,58	29,48	10,32	10,21	0,74	0,60	0,64
48	6.7	T	4	POU2AF1	29,37		10,10		0,53	0,69	
49	6.1	B	0	18S	18,68	18,62					
50	6.1	B	0	18S	18,55						

51	6.5	B	4	18S	19,21	19,21					
52	6.5	B	4	18S	19,21						
53	6.1	B	0	POU2AF1	20,86	20,84	2,24	2,22	0,02	0,99	1,00
54	6.1	B	0	POU2AF1	20,82		2,20		-0,02	1,01	
55	6.5	B	4	POU2AF1	22,16	22,09	2,94	2,88	0,72	0,61	0,63
56	6.5	B	4	POU2AF1	22,03		2,82		0,60	0,66	
57	6.2	NK	0	18S	18,16	18,16					
58	6.2	NK	0	18S	18,15						
59	6.6	NK	4	18S	18,60	18,60					
60	6.6	NK	4	18S	18,60						
61	6.2	NK	0	POU2AF1	31,55	31,60	13,40	13,44	-0,04	1,03	1,00
62	6.2	NK	0	POU2AF1	31,64		13,48		0,04	0,97	
63	6.6	NK	4	POU2AF1	32,52	32,55	13,92	13,95	0,48	0,72	0,70
64	6.6	NK	4	POU2AF1	32,58		13,98		0,54	0,69	

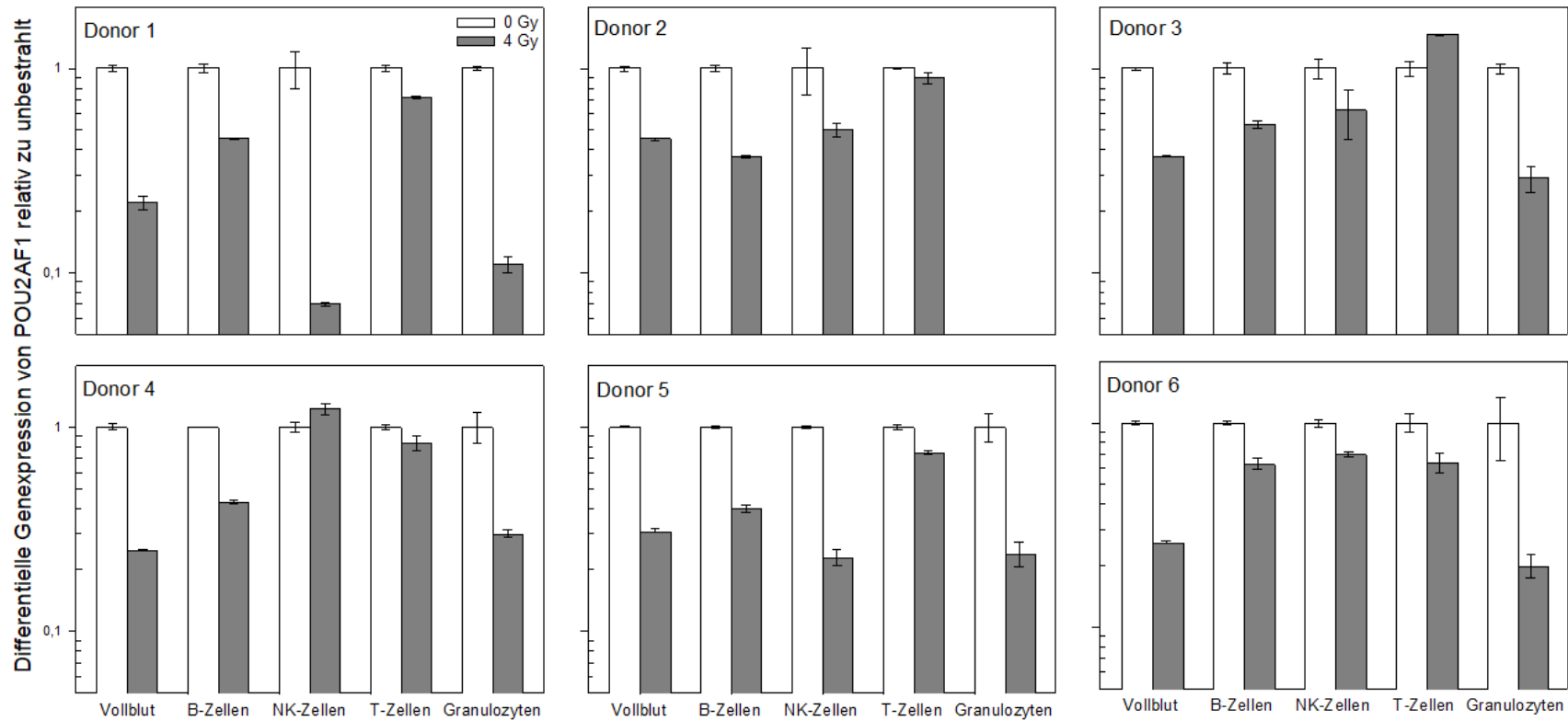
Anhang Tabelle 8: Diese Tabelle zeigt die CT-Werte und „Fold-Changes“ des 6. Probanden für 18S, POU2AF1 und WNT3.

Grafik 7				
FDXR	P-Wert		POU2AF1	P-Wert
B-Zellen	P = 0,001		B-Zellen	P = 0,028
NK-Zellen	P = 0,041		NK-Zellen	P = 0,666
T-Zellen	P = <0,001		T-Zellen	P = 0,021
Granulozyten	P = <0,001		Granulozyten	P = 0,374
DDB2	P-Wert		WNT3	P-Wert
B-Zellen	P = 0,697		B-Zellen	P = 0,059
NK-Zellen	P = 0,094		NK-Zellen	P = 0,780
T-Zellen	P = 0,057		T-Zellen	P = 0,107
Granulozyten	P = 0,065		Granulozyten	/
Grafik 1	P-Wert		Grafik 5	P-Wert
B-Zellen	P = 0,541		B-Zellen	P = 0,004
NK-Zellen	P = 0,475		NK-Zellen	P = 0,699
T-Zellen	P = 1,000		T-Zellen	P = 0,180
Granulozyten	P = 0,930		Granulozyten	P = 0,131
Grafik 4	P-Wert			
B-Zellen	P = 0,062			
NK-Zellen	P = 0,126			
T-Zellen	P = 0,802			
Granulozyten	P = 0,656			

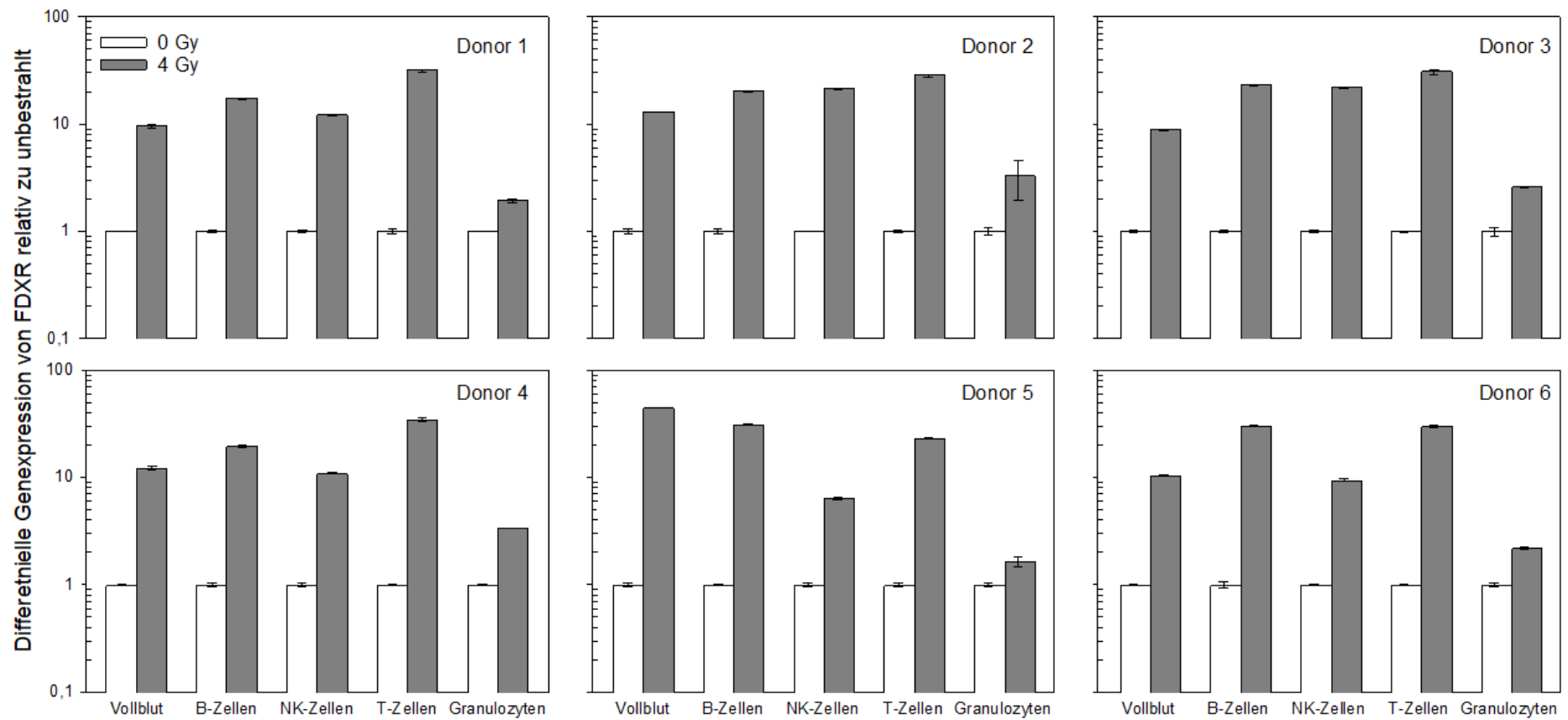
Anhang Tabelle 9: Diese Tabelle zeigt die P-Werte der jeweiligen Zellpopulationen in den jeweiligen Abbildungen.



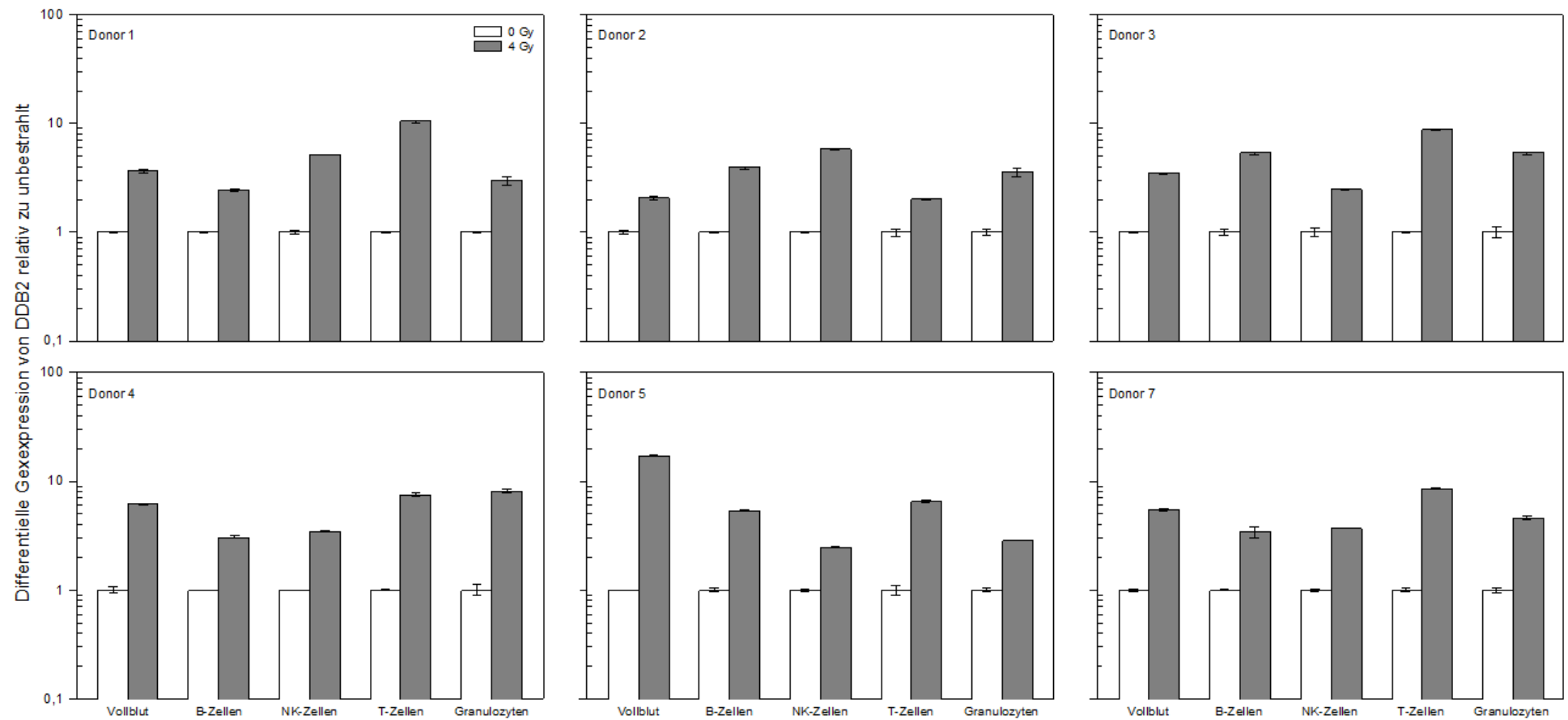
Anhang Abb. 1: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für WNT3, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet.



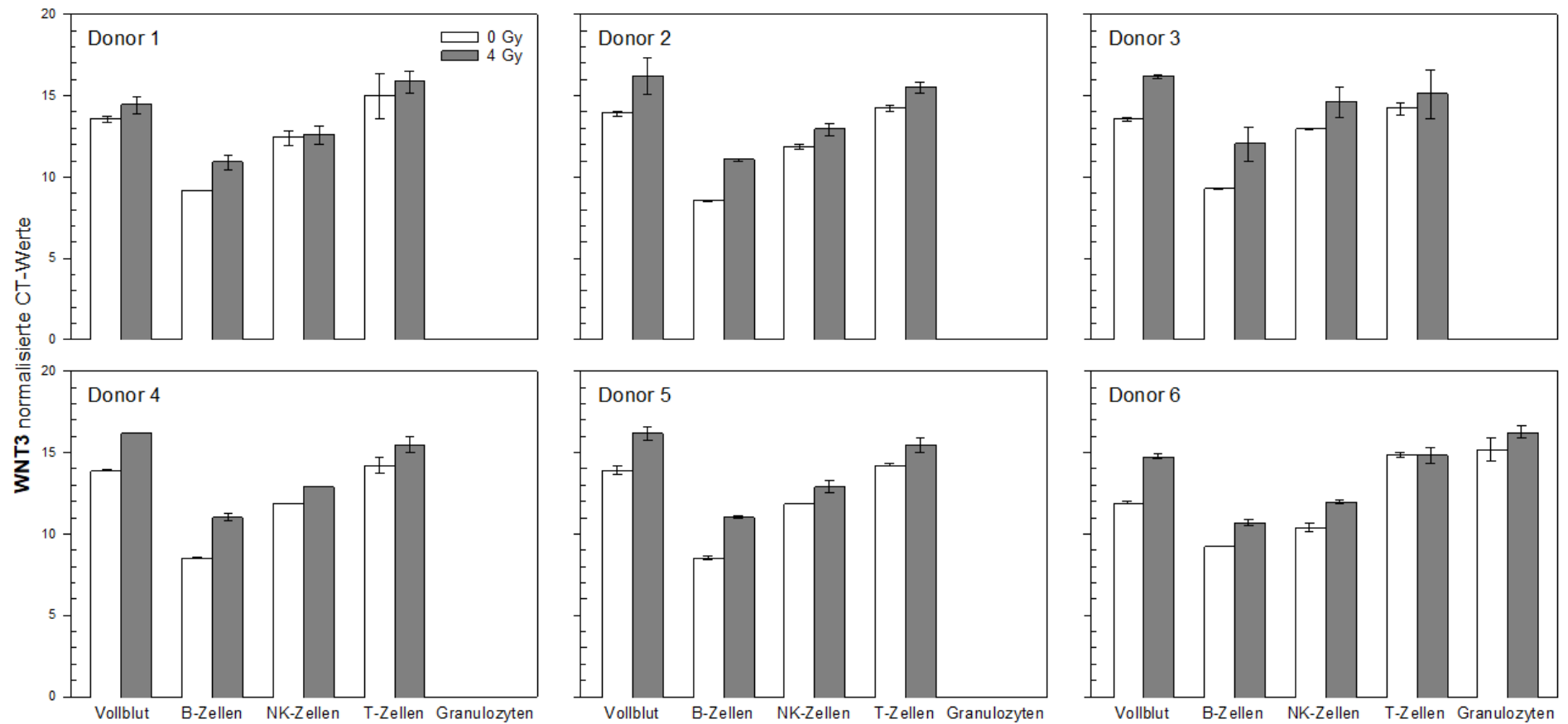
Anhang Abb. 2: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für POU2AF1, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet.



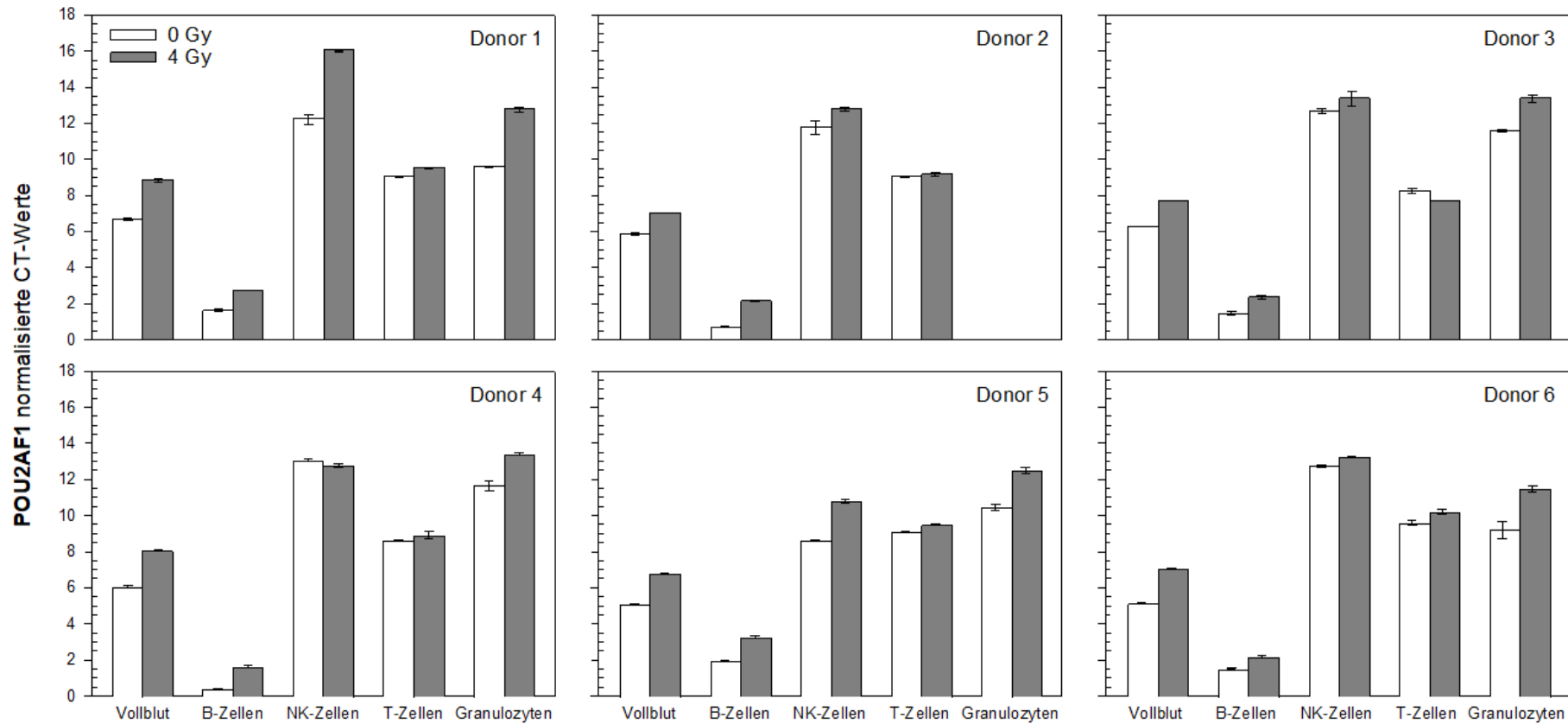
Anhang Abb. 3: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für FDXR, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden.



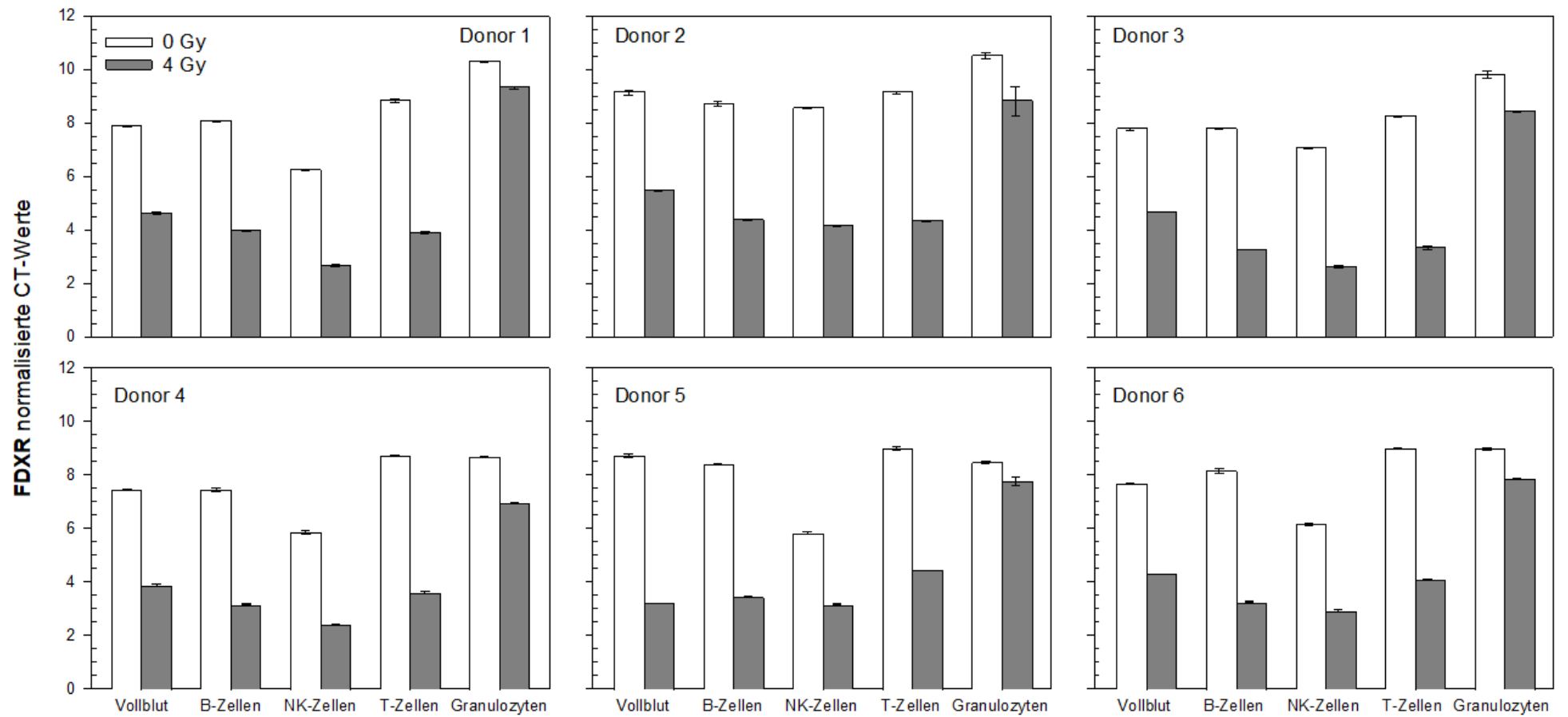
Anhang Abb. 4: Die Abbildung zeigt den Mittelwert der „Fold-Changes“ für DDB2, welche relativ zu den unbestrahlten Proben (Referenzwert 1) berechnet wurden.



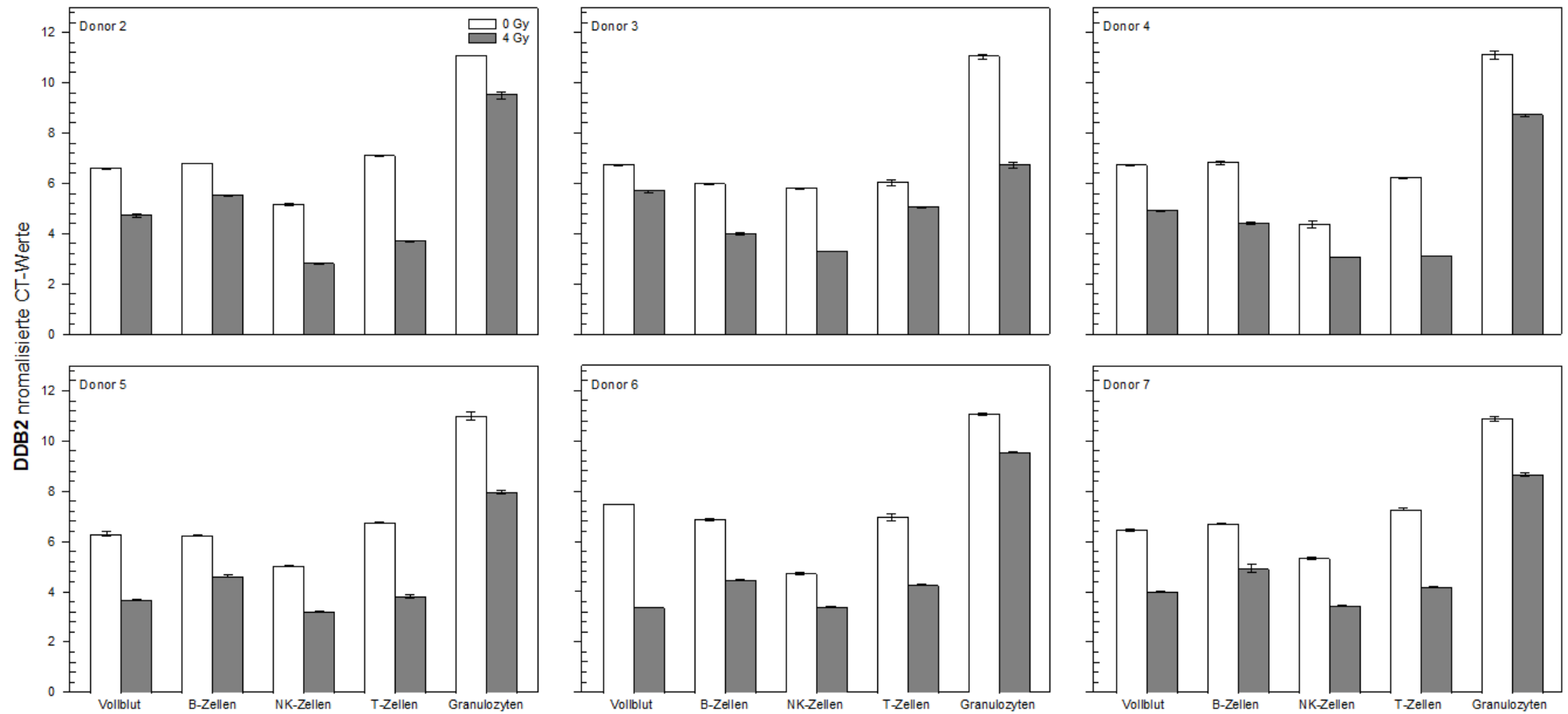
Anhang Abb. 5: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von WNT3 wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet.



Anhang Abb. 6: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von POU2AF1 wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt. Bei Zellpopulationen mancher Donoren waren die Werte nicht plausibel, weshalb man für diese keine Balkendiagramme vorfindet.



Anhang Abb. 7: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von FDXR wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt.



Anhang Abb. 8: Die Mittelwerte der normalisierten CT-Werte von DDB2 wurden für 0 und 4 Gy für die Zellpopulationen und Vollblut dargestellt.

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Michael Abend für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut der Radiobiologie der Bundeswehr zu schreiben, für die intensive Betreuung und tatkräftige Unterstützung. Herr Prof. Abend stand mir in zahlreichen Gesprächen mit seiner Erfahrung und fachlichen Kompetenz zur Seite, gab mir Ratschläge und war mir stets eine große Hilfe bei meiner Doktorarbeit. Frau Prof. Stephanie Combs danke ich in ihrer Rolle als Mentorin recht herzlich für die Unterstützung im Rahmen meiner Promotion sowie bei der Einbindung in das akademische Umfeld. Zudem danke ich Thomas Müller bei der Klärung jeglicher Fragen im Labor. Ein großes Dankeschön gilt zudem meiner Familie.