

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt an der Klinischen Kooperationseinheit Strahlentherapie des
Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg

(Prof. Dr. Dr. Peter Huber)

Auswirkungen ionisierender Strahlung auf mesenchymale Stammzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von Eva Sommer
aus Heidelberg

München 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Strahlentherapie.....	1
1.2. Wirkung von ionisierenden Strahlen auf Zellen.....	1
1.3. Stammzellen.....	2
1.4. Embryonale Stammzellen.....	3
1.5. Adulte Stammzellen.....	3
1.6. Mesenchymale Stammzellen.....	4
1.7. Mesenchymale Stammzellen und Strahlentherapie.....	6
1.8. Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften	7
1.9. Rezeptorkinaseinhibitoren.....	8
1.10. Motivation und Fragestellung.....	9
2. MATERIAL.....	12
2.1. Geräte.....	12
2.2. Verbrauchsmaterial.....	12
2.3. Medien.....	13
2.4. Substanzen.....	13
2.5. Kits.....	14
2.6. Software.....	14
3. METHODEN.....	15
3.1. Zellkulturen.....	15
3.1.1. Zellen.....	15
3.1.2. Zellkulturen.....	15
3.2. Bestrahlung.....	16

3.3. Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren.....	16
3.4. Morphologie der Zellen nach Bestrahlung mit 1, 2, 4 und 10 Gy.....	17
3.5. Zytoskelettfärbung.....	18
3.6. Zeitrafferaufnahmen von Zellen.....	18
3.7. Klonogenes Überleben.....	19
3.8. Proliferationsversuch.....	20
3.9. Apoptosemessung und Zellzyklusbestimmung.....	22
3.10. Osteogene und adipogene Differenzierung.....	25
3.11. Messung der elektrischen Impedanz.....	27
3.12. Genexpressionsanalyse.....	28
3.12.1. Prinzip.....	28
3.12.2. Methode.....	29
4. ERGEBNISSE.....	32
4.1. Morphologie der Zellen.....	32
4.1.1 Morphologie der Zellen nach Bestrahlung mit 1,2,4 und 10 Gy.....	32
4.1.2. Zytoskelettfärbung.....	33
4.1.3. Zeitrafferaufnahmen von Zellen.....	34
4.1.4. Morphologie der MSC-Kolonien.....	35
4.1.5. Morphologie der MSC-Kolonien nach Behandlung mit Rezeptorkinase- inhibitoren.....	36
4.2. Klonogenes Überleben.....	37
4.2.1. Klonogenes Überleben nach Bestrahlung.....	37
4.2.2. Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren.....	39
4.2.3. Klonogenes Überleben nach Bestrahlung und Behandlung mit Rezeptor- kinaseinhibitoren.....	43
4.3. Zellproliferation.....	46

4.3.1. Zellproliferation nach Bestrahlung.....	46
4.3.2. Zellproliferation nach Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren.....	47
4.3.3. Zellproliferation nach Bestrahlung und Behandlung mit Rezeptorkinase- Inhibitoren.....	50
4.4. Apoptosemessung und Zellzyklusbestimmung.....	53
4.5. Osteogene und adipogene Differenzierung.....	59
4.6. Messung der elektrischen Impedanz.....	62
4.7. Genexpressionsanalyse.....	64
4.7.1. Regulierte Gene nach Bestrahlung.....	64
4.7.2. Expression von MSC-Markern, embryonalen Stammzellmarkern, Differen- zierungsmarkern und Wachstumsfaktoren.....	69
5. DISKUSSION.....	72
5.1. Allgemeine Auswirkung der Bestrahlung und Behandlung mit Rezeptor- kinaseinhibitoren auf mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten.....	72
5.2. Auswirkung der Bestrahlung auf die Morphologie, die Motilität und die Adhäsion der Zellen.....	73
5.3. Klonogenes Überleben und Proliferation nach Bestrahlung.....	75
5.4. Apoptose und Zellzyklusphasen nach Bestrahlung.....	78
5.5. Auswirkung der Bestrahlung auf das Differenzierungspotenzial.....	80
5.6. MSC- Marker.....	84
5.7. Wirkung der Rezeptorkinaseinhibitoren auf die Zellen.....	85
5.8. Auswirkung der Bestrahlung auf die DNA und den Zellmetabolismus.....	87
5.9. Schlussfolgerung.....	88
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	90
7. SUMMARY.....	92
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	94

9. LITERATURLISTE.....96

10. ANHANG I: Genexpression nach der Bestrahlung mit 10 Gy: Tabelle mit signifikant
regulierten Genen.....108

11. ANHANG II: Literaturliste zur Tabelle aus Anhang II.....121

1. Einleitung

1.1. Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist neben der Chirurgie und der Chemotherapie die wichtigste Therapiemöglichkeit für neoplastische Erkrankungen. Ziel der Strahlentherapie ist es, Tumorzellen abzutöten oder so zu schädigen, dass sie sich nicht vermehren. Die Strahlung wird dabei mittels physikalischer Verfahren gezielt auf das Tumorgewebe gelenkt, um umliegende Gewebe so weit wie möglich zu schonen. Für die Strahlentherapie von Tumoren werden Geräte verwendet, die elektromagnetische Strahlung mit sehr hohen Energien erzeugen (typischerweise Photonen $> 1 \text{ MeV}$).

1.2. Wirkung von ionisierenden Strahlen auf Zellen

Treffen die durch die Geräte, z.B. Linearbeschleuniger, erzeugten Photonen auf Atome der Zelle, geben sie ihre Energie teilweise oder ganz an Elektronen der Atome ab. Die Elektronen werden dadurch aus ihrer Bindung gedrängt. Diese freien Elektronen führen zur Bildung von freien Radikalen, die Zellstrukturen angreifen (Hall & Giaccia, 2006). Elektromagnetische Strahlen bezeichnet man deshalb als direkt ionisierende Strahlen. Schädigungen von Strukturen außerhalb des Zellkerns sind meist unbedeutend, die Schädigung der DNA hingegen hat für die Zelle oft schwerwiegende Folgen (Munro, 1970). Während Einzelstrangbrüche und Basenschäden leicht repariert werden können und geringe Konsequenzen haben, sind Doppelstrangbrüche häufig letal, mutagen und karzinogen. Bei einer Dosis von 1 Gy treten ca. 1000 Einzelstrangbrüche und 40 Doppelstrangbrüche auf. Die Häufigkeit der Doppelstrangbrüche steigt linear zur Dosis und korreliert mit dem Zellsterben (Hall & Giaccia, 2006). Photonenstrahlung zerstört Zellen also vorwiegend durch Schädigung der DNA. Zellen reagieren auf eine Schädigung der DNA mit der Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten. Während eines temporären Arrests in der G1-, S- oder G2-Phase des Zellzyklus werden DNA-Schäden repariert. Der G1-Kontrollpunkt verhindert die Replikation von geschädigter DNA vor dem Eintritt in die S-Phase. Der G2/M-Kontrollpunkt verhindert den Eintritt von Zellen mit geschädigter DNA in die Mitose. Wenn der Schaden nicht repariert werden kann, kommt es zu einer irreversiblen Wachstumshemmung, die zum Zelltod führt (Pawlik & Keyomarsi, 2004). Es gibt verschiedene Arten des Zelltods: Apoptose, Nekrose und klonogener Zelltod. In der Strahlentherapie spielen vor allem der

clonogene Zelltod (Ross, 1999) und die Apoptose (Bergman & Harris, 1997, Meyn 1997, Ross, 1999) eine Rolle. Die Nekrose wird nur durch massive äußere Einwirkung oder sehr hohe Strahlendosen hervorgerufen. Die Zellstrukturen werden dabei so stark geschädigt, dass die Zelle zerstört wird. Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der aktiv von der Zelle selbst durchgeführt wird. Man unterscheidet einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg der Auslösung. Bei ersterem wird durch die Bindung von TNF und anderen Zytokinen an Rezeptoren der Zellmembran, bei letzterem unter anderem durch Schädigung der DNA eine Signalkaskade aktiviert, die schließlich zum Zelltod führt. Dabei schrumpfen Zellkern und Zytoplasma, so dass es zu einer Kondensation des Chromatins kommt. Unter klonogenem oder reproduktivem Zelltod versteht man den Verlust der Fähigkeit der Zellen, sich immer weiter zu teilen. Diese Zellen sind zwar physiologisch intakt, können sich aber nach Zellschädigung nicht mehr oder nur noch einige Male teilen und keine großen Kolonien mehr bilden. Sie haben ihre Fähigkeit zur Reproduktion verloren. Es besteht häufig ein großer Unterschied beim Grad an schädigender Einwirkung, die nötig ist, um einen „wirklichen“ Zelltod, Nekrose oder Apoptose, oder einen reproduktiven Zelltod auszulösen. So verliert z.B. eine Zelle nach durchschnittlich 2 Gy Bestrahlung ihre reproduktiven Fähigkeiten, doch erst 100 Gy können eine nicht proliferierende Zelle töten (Hall & Giaccia, 2006). Für Stammzellen, deren Funktion darin besteht, neue Zellen zu bilden, ist der reproduktive Zelltod entscheidend. In der Strahlentherapie ist er insgesamt wahrscheinlich von größerer Bedeutung als die Apoptose (Steel, 2001). Der Großteil der soliden Tumore reagiert auf Bestrahlung vor allem mit klonogenem Zelltod (Ross, 1999). Dieser funktionelle Tod ist in der Tumorthherapie ausreichend. Das klonogene Überleben ist daher das wichtigste Maß zur Beurteilung der Radiosensitivität von Zellen.

1.3. Stammzellen

Stammzellen sind nicht differenzierte Vorläuferzellen, aus denen sich reife Zellen entwickeln können, die dann in den verschiedenen Organen und Geweben spezifische Funktionen übernehmen. Stammzellen besitzen per Definition sowohl die Fähigkeit zur Differenzierung, als auch zur Selbsterneuerung. Selbsterneuerung bedeutet, dass sie eine unbestimmte Anzahl identischer Tochterzellen hervorbringen können. Durch asymmetrische Zellteilung sind sie fähig, gleichzeitig eine weitere Stammzelle und eine differenzierte Tochterzellen zu bilden (Morrison et al, 1997).

1.4.Embryonale Stammzellen

Die embryonale Stammzelle ist durch ihre Herkunft definiert. Sie stammt aus der inneren Zellmasse der Blastozyste, dem frühesten Stadium des Embryos. Die embryonale Stammzelle ist pluripotent und kann Zellen aller drei Keimblätter hervorbringen.

1.5. Adulte Stammzellen

Eine adulte Stammzelle ist eine undifferenzierte Zelle in differenziertem Gewebe. Die Funktion der adulten Stammzellen ist es, die Gewebemöostase aufrecht zu erhalten. Sie ersetzen untergegangene Zellen und in begrenztem Rahmen Zellen nach Verletzung oder Krankheit des Gewebes (Leblond, 1964, Holtzer, 1978). Adulte Stammzellen gelten als multipotent. Das heißt, sie können sich in verschiedene Zellen entwickeln, haben aber nicht mehr die Fähigkeit alle Zellen des Organismus zu bilden. Eine adulte Stammzelle soll folgende Voraussetzungen erfüllen: Sie soll sich in Zellen des Gewebes, aus dem sie stammt, differenzieren können und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, solange der Organismus lebt. Adulte Stammzellen wurden vor mehr als 40 Jahren entdeckt. James Till und Ernest McCullough wiesen 1963 die Existenz von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark nach (Till & McCullough, 1961, Becker et al 1963). Friedenstein und Mitarbeiter fanden heraus, dass das Knochenmark auch eine zweite Art von adulten Stammzellen, nämlich mesenchymale Stammzellen enthält (Friedenstein et al, 1966, 1968 und 1970). Bis heute wurden adulte Stammzellen auch aus einer Vielzahl anderer Gewebe isoliert: z.B. aus Blut (Lee OK et al, 2004), Gehirn (Gage et al, 1995, Johe, 1996, McKay 1997), Skelettmuskel (Schultz, 1996), Darm (Slack, 2000), Haut (Ghazizadeh & Taichman, 2001), Pankreas (Zulewski et al, 2001), Leber (Lázaro et al,1998), Pulpa (Gronthos et al, 2002), Retina (Tropepe et al, 2000) und Kornea (McGowan et al, 2007). Früher wurde angenommen, dass sich adulte Stammzellen nur zu Zellen des Gewebes, aus dem sie stammen, weiterentwickeln können. Vor einiger Zeit wurde jedoch entdeckt, dass sich adulte Stammzellen unter bestimmten Bedingungen auch in Zellen anderer Gewebe differenzieren können (z.B. Bjornson et al, 1999, Brazelton et al, 2000). Diese Eigenschaft bezeichnet man als Plastizität. Es gibt bis jetzt jedoch keinen Beweis für die Pluripotenz von adulten Stammzellen. Des Weiteren ist es gelungen, bereits differenzierte Zellen in multipotente Vorläuferzellen zu dedifferenzieren und diese Zellen in andere spezialisierte Zellen zu überführen (Chen, 2004). Hämatopoetische Stammzellen sind die am besten erforschten

adulten Stammzellen. Sie werden seit langem erfolgreich in Form von Knochenmarkstransplantation oder peripherer Blutzelltransfusion zur Therapie von hämatologischen Neoplasien verwendet (Little & Storb, 2004). Die Möglichkeiten der Verwendung anderer adulter Stammzellen als Ersatz für krankes Gewebe werden intensiv erforscht. Zum Beispiel wurden Patienten mit akutem Herzinfarkt erfolgreich mit mesenchymalen Vorläuferzellen aus Knochenmark behandelt (Schächinger et al, 2006), Stammzellen wurden isoliert, aus denen Herzklappen gezüchtet wurden (Hoerstrup et al, 2002, Schmidt et al, 2007) und aus Knochenmarksstammzellen wurde ein Kiefertransplantat hergestellt (Warnke et al, 2004). Stammzellen sollen zukünftig auch zur Behandlung von Korneadefekten (Qu et al, 2007) und Zahnerkrankungen (Yen et al, 2008) genutzt werden. Die Therapiemöglichkeiten von Diabetes (Xu et al, 2007), Alzheimer (Sugaya et al, 2007) und Parkinson (Trzaska et al, 2007) mit adulten Stammzellen werden erforscht.

1.6. Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen wurden erstmals durch Friedenstein und Mitarbeiter 1968 entdeckt und von ihm als fibroblastenähnliche Zellen beschrieben. In den folgenden Jahren bestätigte sich die Hypothese, dass Knochenmarkstroma Stammzellen enthält, die Knochen und Knorpelgewebe bilden können (Beresford, 1989). Pittenger und Mitarbeiter beschrieben 1999 erstmals detailliert die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Die *in vitro* Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen und Unterscheidung von anderen Knochenmarksstromazellen erfolgt durch eine Reihe von Merkmalen, da es keinen Marker gibt, der mesenchymale Stammzellen eindeutig identifiziert. So werden sie durch ihre fibroblastenähnliche Morphologie, die Proliferation in Kultur, die Fähigkeit zur Adhärenz an Plastikoberfläche, die Differenzierung entlang der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Linie und durch mehrere positive und negative Markerproteine charakterisiert (Pittenger et al, 1999). Mesenchymale Stammzellen kommen nicht nur im Knochenmark vor. Sie wurden auch aus Nabelschnurblut (Lee et al, 2003), Periost, Fettgewebe, Synovia, Skelettmuskulatur (Sakaguchi et al, 2005), Plazenta (Fukuchi et al, 2004) und fetaler Lunge, Leber und Milz (in 't Anker et al, 2003) isoliert. Mesenchymale Stammzellen sind Vorläuferzellen für mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bänder, Sehnen und Fettgewebe (Pittenger et al, 1999, Prockop, 1997). *In vitro* konnten sie aber auch in Zellen anderer Gewebe differenziert werden. So konnten sie in Zellen differenziert werden, die in Morphologie und Funktion Kardiomyozyten (Antonitsis et

al, 2007), Hepatozyten (Lee KD et al, 2004) und Zellen des Nervengewebes (Woodbury et al, 2000) ähneln. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass mesenchymale Stammzellen bei Verletzung verschiedener Gewebe in diese einwandern und dort die Zellen ersetzen können (Chapel et al, 2003, François et al, 2006, Jiang et al, 2006). Bei den meisten der oben aufgeführten Beispiele für den Einsatz von adulten Stammzellen zur Therapie verschiedener Krankheiten wurden mesenchymale Stammzellen verwendet. Sie sind im Vergleich zu anderen adulten Stammzellen dafür besonders geeignet, weil sie relativ einfach in größerer Menge gewonnen werden können. In den letzten Jahren entdeckten Forscher, dass mesenchymale Stammzellen auch eine immunsuppressive Wirkung besitzen (Bartholomew et al, 2002, Maitra et al, 2004, Corcione et al, 2006). Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz außerdem in der Therapie der Graft-versus-host-disease (Le Blanc et al, 2004, Ringdén et al, 2006). Es gibt Diskussionen über die Nomenklatur von mesenchymalen Stammzellen. Im Allgemeinen wird der Ausdruck „mesenchymale Stammzelle“ für verschiedene aus dem Stroma stammende Vorläuferzellen benutzt. Die „International Society of Cellular Therapie“ nahm dazu Stellung (Horwitz et al, 2005): So sollte besser der Ausdruck „multipotente mesenchymale Stromazelle“ verwendet werden. Solche Zellen sollen plastikadhärent sein, eine fibroblastenähnliche Morphologie haben, positiv für die Marker CD73 und CD105 und negativ für die Marker CD14, CD34 und CD45 sein.

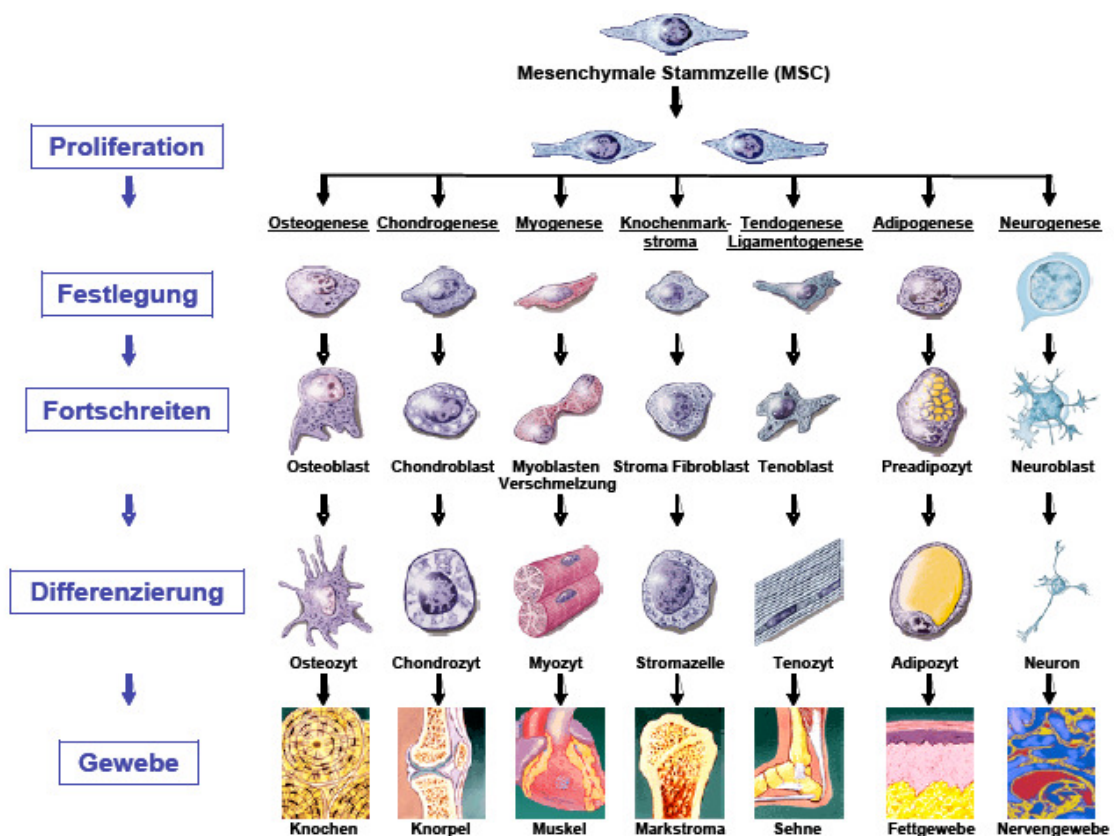


Abb. 1: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Caplan und Bruder, 2001)

1.7. Mesenchymale Stammzellen und Strahlentherapie

In *in vitro* Experimenten wurde nachgewiesen, dass hämatopoetische Stammzellen hoch radiosensitiv sind (Kimler et al, 1985). Dagegen zeigen *in vivo* Daten, dass dennoch zumindest ein Teil der Zellen hohe Strahlendosen überlebt (Briones et al, 1998). Bestrahlung mit höheren Dosen führt zu einer starken Verminderung der Proliferationsrate und induziert Apoptose bei einem großen Anteil der hämatopoetischen Stammzellen (Bertho et al, 2004). Knochenmarkstromazellen sind radioresistenter als hämatopoetische Zellen (Greenberger, 1991). Es wurde jedoch gezeigt, dass auch das Knochenmarkstroma durch Radio- und Chemotherapie geschädigt wird. So war die Anzahl von CFU-Fibroblasten (Colony forming unit – Fibroblasten) im Knochenmark bei Patienten nach einer Radio- und Chemotherapie verringert. Selbst Jahre später war die Anzahl niedriger (Galotto et al, 1999). Die verringerte Anzahl von CFUs nach der Therapie korreliert mit einer Abnahme der Knochendichte (Banfi et al, 2001). In weiteren Studien wurde beschrieben, dass Patienten nach Knochenmarkstransplantationen keine normale Anzahl an osteoblastischen Vorläuferzellen bilden konnten, und dass außerdem die Differenzierung dieser Zellen in Osteoblasten gehemmt war (Lee et al, 2002, Tauchmanovà et al, 2002).

Osteoporose ist eine häufig beobachtete Komplikation nach Knochenmarkstransplantationen. Verantwortlich hierfür ist, den oben aufgeführten Studien zufolge, wahrscheinlich eine Schädigung der mesenchymalen Vorläuferzellen im Knochenmark durch die der Transplantation vorausgegangene Chemo- und Strahlentherapie.

Mehrere Studien berichten, dass mesenchymale Stammzellen, die nach Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation aus dem Knochenmark der Patienten isoliert wurden, vom Empfänger stammen, während hämatopoetische Stammzellen vom Spender stammen. Geschädigte mesenchymale Stammzellen können demnach nicht durch Spenderzellen ersetzt werden (Lee et al, 2002, Rieger et al, 2005, Dickhut et al, 2005). Bis jetzt wurde nur in Tiermodellen eine erfolgreiche Transplantation bewiesen. Bei Affen, deren Knochenmark durch Bestrahlung zerstört wurde, wurde auch langfristig eine Etablierung von mesenchymalen Stammzellen nach allogener oder autogener Infusion nachgewiesen (Devine et al, 2001). Eine Wirkung von transplantierten mesenchymalen Stammzellen bei Menschen konnte aber dennoch festgestellt werden. So kam es zu einer schnelleren hämatopoetischen Erholung und zu weniger Transplantatabstoßungen, wenn sie zusammen mit hämatopoetischen Stammzellen transplantiert wurden (Koç et al, 2000, Le Blanc et al 2007).

In jüngster Zeit wurden Studien durchgeführt, in denen Forscher die Wirkung von Chemotherapeutika auf mesenchymale Stammzellen beschreiben und eine Chemoresistenz entdeckten (Li et al, 2004, Mueller et al, 2006). Über die Wirkung von Strahlen auf mesenchymale Stammzellen gibt es jedoch wenige Studien.

1.8. Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften

Seit einigen Jahren nehmen die Vermutungen zu, dass Tumore nicht aus irgendeiner entarteten Körperzelle entstehen, sondern dass Zellen mit Stammzeleigenschaften für die Bildung von Tumoren verantwortlich sind (Clarke & Becker, 2006). Wenige dieser Zellen begründen demnach den gesamten Tumor. Schon lange ist bekannt, dass entartete Blutstammzellen die Ursache von Leukämie sind. 2003 entdeckten Clarke und Mitarbeiter, dass einige wenige Zellen mit Stammzeleigenschaften, die aus humanen Brusttumoren isoliert und in Mäuse implantiert wurden, in der Lage waren, einen neuen Tumor zu bilden, während zehntausende der „normalen“ Krebszellen keinen Tumor hervorriefen (Al-Hajj et al, 2003). Kurz darauf wurden Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften aus Gehirntumoren isoliert (Singh et al, 2004) und sind bis heute auch in einigen anderen soliden Tumorarten nachgewiesen worden (Clarke & Becker, 2006, Li et al, 2007). Diese Zellen zeigen typische Charakteristika von Stammzellen, wie z.B. die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und die Expression von Stammzellmarkern (Kondo, 2007). Diese Parallelen führten zu der Annahme, dass Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften aus gesunden Stammzellen entstanden sind. Adulte Stammzellen sollen für eine Anhäufung von genetischen Schäden besonders anfällig sein, weil sie das Potential zu unbegrenztem Wachstum und vielfältige Differenzierungsmöglichkeiten haben und ein Leben lang bestehen (Gudjonsson & Magnusson, 2005, Clarke & Becker, 2006). Karzinogene Mutationen wären demnach umso wahrscheinlicher, je älter die Stammzelle wäre. Tatsächlich wurden bei Stammzellen in Kultur spontane Transformationen beobachtet, wenn sie über mehrere Monate kultiviert wurden. In den ersten Wochen gab es keine Transformationen (Rubio et al, 2005). Dies unterstützt die Hypothese, Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften seien möglicherweise entartete adulte Stammzellen. Andere äußern jedoch die Vermutung, dass Tumorzellen nicht aus Stammzellen entstanden sind, sondern nur Stammzeleigenschaften erworben haben (Gudjonsson & Magnusson, 2005, Rapp et al, 2008). Krebszellen mit Stammzeleigenschaften sind möglicherweise auch für die Metastasierung von Tumoren verantwortlich (Crooker et al, 2007). Sie sind gegenüber Strahlen resistenter als andere Tumorzellen (Diehn & Clarke,

2006, Phillips et al, 2006, Kang et al, 2008). Sie könnten deshalb ein Wiederauftreten des Tumors nach der Behandlung begünstigen.

1.9. Rezeptorkinaseinhibitoren

In der Krebstherapie wird häufig eine Kombination von Strahlen- und Chemotherapie verwendet. In der Chemotherapie werden unter anderem Rezeptorkinaseinhibitoren eingesetzt. Rezeptorkinaseinhibitoren sind kleine Moleküle, die membranständige Rezeptorkinasen hemmen. Sie verdrängen ATP kompetitiv von seiner intrazellulären Bindungsstelle und blockieren so die Aktivierung einer Signalkaskade.

Rezeptortyrosinkinasen bestehen aus einer extrazellulären Bindungsstelle für Liganden, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne. Binden Liganden an die Rezeptoren, werden Aminosäurenreste der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert und eine Signalkaskade ausgelöst. Wachstumsfaktoren wie PDGF, VEGF, EGF, TGF β und andere sind Liganden für die Rezeptorkinasen. Mutationen oder Überexpression von Rezeptorkinasen werden mit Krebsentstehung und -progression assoziiert (Krause & Van Etten, 2005).

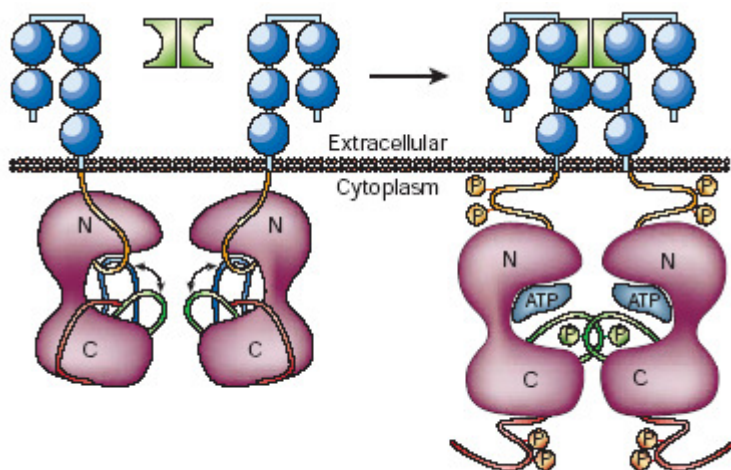


Abb. 2: Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (Blume-Jensen und Hunter, 2001)

Die Bindung des Liganden führt zu einer Rezeptordimerisierung und diese zu einer Konformationsänderung. Dadurch wird die Autophosphorylierung (P) ermöglicht, die zu der Kinaseaktivierung führt. Tyrosinkinaseinhibitoren lagern sich reversibel an die Bindungsstelle für ATP, wodurch die Kinaseaktivierung gehemmt wird.

1.10. Motivation und Fragestellung

Die Anzahl mesenchymaler Vorläuferzellen ist bei Patienten nach einer Radio- und Chemotherapie verringert (Galotto et al, 1999, Lee et al, 2002). Diese Schädigung bleibt jahrelang bestehen und ist wahrscheinlich die Ursache für die Osteoporose, die neben mehreren anderen Folgen häufig als Nebenwirkung von Radio- und Chemotherapie beobachtet wird (Banfi et al, 2001). In den meisten Studien erhielten die Patienten eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie. Es gibt kaum Berichte über die Auswirkungen von ausschließlicher Strahlentherapie.

Adulte Stammzellen nehmen im Organismus eine wichtige Rolle ein. Sie ersetzen untergegangene Zellen nach Verletzung oder Krankheit in vielen Geweben (Leblond, 1964, Holtzer, 1978). Es ist anzunehmen, dass durch eine Ganzkörperbestrahlung nicht nur adulte Stammzellen des Knochenmarks, sondern auch adulte Stammzellen in anderen Geweben geschädigt werden.

Zudem besteht die Vermutung, dass Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften für die Bildung von Tumoren verantwortlich sind (Clarke & Becker, 2006). Diese Zellen könnten möglicherweise aus adulten Stammzellen entstanden sein.

Die Untersuchung der Auswirkung von Strahlung auf Stammzellen ist demnach in doppelter Hinsicht interessant: erstens im Hinblick auf Nebenwirkungen therapeutischer Strahlen auf gesunde adulte Stammzellen und zweitens in Bezug auf die Krebstherapie, da entartete adulte Stammzellen möglicherweise Krebs verursachen können.

In der Krebstherapie wird bislang häufig eine Kombination von Strahlen- und Chemotherapie verwendet. Neuerdings werden zusätzlich Kinaseinhibitoren ausschließlich und in Kombinationen eingesetzt. Die Kombination von Strahlentherapie und Kinaseinhibitoren kann sich als besonders effektiv erweisen (Huber et al, 2005). Deshalb erscheint auch die Untersuchung der Wirkung dieser kombinierten Behandlung auf Stammzellen sinnvoll.

Untersucht wurde in dieser Arbeit der direkte Effekt von Strahlung und Rezeptorkinaseinhibitoren auf mesenchymale Stammzellen. Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden aus dem Knochenmark drei gesunder erwachsener Spender entnommen. Als Vergleichszellen wurden humane Fibroblasten verwendet.
2. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Die unten aufgeführten Versuche wurden mit MSC der 6. bis 10. Passage durchgeführt.
3. Die Zellen wurden mit hochenergetischen Photonenstrahlen mit Dosen von 1, 2, 4 und 10 Gy bestrahlt. Zusätzlich wurden die Zellen in weiteren Versuchen mit Kinaseinhibitoren behandelt. Verwendet wurden drei verschiedene Rezeptor-Kinaseinhibitoren, die besonders PDGF-, VEGF- und TGF β -Rezeptoren hemmen.
4. Es wurden folgende funktionelle Assays durchgeführt:
 - Es wurde die Auswirkung von Strahlung auf die Morphologie und die Motilität von MSC untersucht.
 - Das klonogene Überleben und die Proliferation der MSC nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen und in Kombination mit Tyrosinkinaseinhibitoren wurden überprüft. Ziel der Versuche war es, die Wachstumshemmung und das Überleben der MSC nach den verschiedenen Behandlungen zu beurteilen.
 - Die Apoptose nach einer Bestrahlung von 10 Gy wurde gemessen. Ziel war es zu ermitteln, ob eine Bestrahlung mit hoher Dosis Apoptose induziert.
 - Die oben genannten Versuche wurden zum Vergleich auch mit humanen Fibroblasten durchgeführt.
 - Die osteogene und adipogene Differenzierung nach Bestrahlung wurde bewertet.
 - Zudem wurde die elektrische Impedanz von nicht bestrahlten und bestrahlten MSC und Fibroblasten gemessen. Ziel der Messung war es, die

Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion und Bildung einer konfluenten Zellschicht nach der Bestrahlung zu beurteilen.

- Außerdem wurden mit den MSC transkriptionelle Genexpressionsanalysen mit DNA-Microarrays durchgeführt, um Veränderungen durch die Einwirkung von Strahlung auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen.

2. Material

2.1. Geräte

Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)
Zentrifuge Sigma 3K15 (Sigma, Mannheim)
Mikroskop Leica DMIL (Leica, Solms)
Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg)
Microarray Scanner (Agilent Technologies, Böblingen)
Hybridisation Chamber (Agilent Technologies, Böblingen)
Hybridisation oven and oven rotor (Agilent Technologies, Böblingen)
Nanodrop spectrometer ND- 1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
Linearbeschleuniger Mevatron KD2 (Siemens, Erlangen)
ECIS- Gerät, Model 1600 (Ibidi, in cooperation with Applied BioPhysics, Martinsried)

2.2. Verbrauchsmaterial

2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Böblingen)
Collagen 6-well plates (Becton Dickinson, Heidelberg)
Cryo Tube 1,8 ml (Nunc, Wiesbaden)
Deckgläser (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Impedanz –Array ECIS 8W10E* (Ibidi, in cooperation with Applied BioPhysics, Martinsried)
Hybridisation Chamber gasket slides, 4microarrays/slide (Agilent Technologies, Böblingen)
Kulturflaschen 25 cm² und 75 cm² (Nunc, Wiesbaden)
Kulturflaschen 175 cm² (Becton Dickinson, Heidelberg)
Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
Pipetten, 10 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)
Röhrchen, 2 ml (Becton Dickinson, Heidelberg)
Röhrchen, 5ml mit integriertem Zellsieb (Becton Dickinson, Heidelberg)
Röhrchen, 25ml und 50ml (Greiner.bio-one, Frickenhausen)
24- well plates (Becton Dickinson, Heidelberg)
Zellschaber (Becton Dickinson, Heidelberg)

2.3. Medien

Dulbecos MEM, 1g/l Glucose (Biochrom, Berlin)

Customer Formulation SupplementPack / Endothelial Cell Basal Medium MV2 (Promocell, Heidelberg)

Endothelial Cell Basal Medium MV2 (Promocell, Heidelberg)

MSCBM (Cambrex, Taufkirchen)

MSCGM SingleQuots (Cambrex, Taufkirchen)

2.4. Substanzen

Aceton (Merck, Darmstadt)

Alexa Fluor 633 Phalloidin (Invitrogen., Karlsruhe)

Amphotericin B (Promocell, Heidelberg)

Aqua destillata (B.Braun, Melsungen)

DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Ethanol 100% (Roth, Karlsruhe)

Ethanol 70% (Roth, Karlsruhe)

FCS (Biochrom, Berlin)

Formaldehyd (Merck, Darmstadt)

Gene Expression Wash Buffer1 und 2 (Agilent Technologies, Böblingen)

Gentamycin (Promocell, Heidelberg)

Glucose(Merck,Darmstadt)

Glycerin (Merck,Darmstadt)

β -Glycerophosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Insulin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Isopropanol (Merck,Darmstadt)

Kristallviolett (Serva, Heidelberg)

L-Ascorbic Acid (Sigma-Aldrich, Steinheim)

LY2109761 (Eli Lilly, Indianapolis, USA)

Lysis Reagent (Qiagen, Hamburg)

Mayers Hämalaun (Merck,Darmstadt)

Methanol (Merck,Darmstadt)

1Methyl-3-isobutylxanthine (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ölrot (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim)
PBS (Biochrom, Berlin)
Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)
Propidiumjodid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ribonuklease A (Serva, Heidelberg)
RNase freies Wasser (Qiagen, Hamburg)
Silbernitrat (Roth, Karlsruhe)
SU14816 (Sugen, San Francisco, USA)
SU11657 (Sugen, San Francisco, USA)
Trypsin/ EDTA 0,04% Trypsin, 0,03% EDTA (Promocell, Heidelberg)
Trypsin/ EDTA 0,5g/l Trypsin, 1g/l EDTA in PBS (PAN- Biotech, Aidenbach)
Vectorshield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA)

2.5. Kits

Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies, Böblingen)
Gene Expression Wash Buffer1 und 2 (Agilent Technologies, Böblingen)
Low RNA Input Linear Amplification Kit PLUS, One-Color (Agilent Technologies, Böblingen)
RNA Spike-In Kit, One Color (Agilent Technologie, Böblingen)
RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburg)
Whole Human Genome Oligo Microarray Kit, 4x44K (Agilent Technologies, Böblingen)

2.6. Software

Scan Control Software, version A.7.0.1. (Agilent Technologies, Böblingen)
Feature Extraktion Software 9.1. (Agilent Technologies, Böblingen)
Cell Quest pro, version
Microsoft Excel
SigmaPlot 8.0.
SUMO (Statistical Utility for Microarray and Omics data), implemented by
c.schwager.dkfz.de

3. Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1. Zellen

Die MSC (mesenchymale Stammzellen) wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Dr. med. A.D. Ho, Abt. Innere Medizin V, Medizinische Univ. Klinik Heidelberg zur Verfügung gestellt. Sie wurden von gesunden Spendern aus dem Knochenmark entnommen. Für die Versuche wurden Zellen von drei verschiedenen Spendern verwendet. Die „MSC 283“ stammen von einem 26 Jahre alten männlichen Spender, die „MSC 284“ von einer 52 Jahre alten weiblichen Spenderin und die „MSC 285“ von einem 44 Jahre alten männlichen Spender. Für die Versuche wurden Zellen der 6. Bis 10. Passage verwendet. Als Vergleich für die MSC wurden in den Versuchen humane Fibroblasten verwendet. Es wurden Fibroblasten von zwei verschiedenen Firmen verwendet. Zum einen waren dies primäre Fibroblasten der Firma Promocell (NHDF, Normal Human Dermal Fibroblasts, derived from foreskin, Cat.-No.: C-12300). Nach der Beschreibung der Firma wurden diese Zellen aus gesundem humanem Gewebe, das bei chirurgischen Operationen entnommen wurde, gewonnen. Die Zellen sind nicht transformiert und haben eine begrenzte Lebenszeit. Für die Versuche wurden Zellen der 3. bis 6. Passage verwendet. Zum anderen wurden Fibroblasten (HS 68, human, Caucasian, foreskin, ECACC 89051701) von ATCC verwendet. Die Zellen stammen von einem Neugeborenen, das an der Canavan Krankheit, einer zerebralen degenerativen Erkrankung, die durch ein Defizit des Enzyms Aspartoacylase verursacht wird, litt.

3.1.2. Zellkulturen

Die MSC und die HS68 wurden in 25 cm² oder 75 cm² Kulturflaschen mit 5 oder 10 ml Medium, die Fibroblasten in 175 cm² Kulturflaschen mit 25 ml Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die MSC wurde Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Cambrex) mit Zusatz von MSCGM SingleQuots (Cambrex) ohne Penicillin/Streptomycin, für die Fibroblasten Endothelial Cell Basal Medium MV2 (Promocell) mit Zusatz von Supplementen (Promocell), 250 µg Gentamycin/ 500 ml und 0,005 µg Amphotericin B und für die HS68 DMEM 1g/l Glucose (Biochrom) mit Zusatz von 10% FCS und 3,5 g/l Glucose verwendet.

Das Medium wurde 2x in der Woche gewechselt. Die Zellen wurden 1:2 umgesetzt, wenn sie zu 90% konfluent waren. Hierfür wurden sie 2x mit PBS gewaschen. Danach wurde Trypsin hinzugegeben. Für die MSC und HS68 wurden 500 µl (25 cm² Flasche) oder 1 ml (75 cm² Flasche) Trypsin/ EDTA mit 0,5 g/l Trypsin und 1 g/l EDTA verwendet und für die Fibroblasten 3ml Trypsin/ EDTA mit 0,04% Trypsin, 0,03% EDTA. Die Zellen wurden 2 bis 3 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich alle Zellen gelöst hatten. Die in Trypsin gelösten MSC und HS68 wurden in Medium auf neue Kulturflaschen verteilt. Die in Trypsin gelösten Fibroblasten wurden, nachdem 10ml Medium zugegeben wurde, 10 Minuten bei 800 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in Medium auf neue Kulturflaschen verteilt.

3.2. Bestrahlung

Zur Bestrahlung der Zellen wurden Linearbeschleuniger der Universitätsklinik Heidelberg benutzt, die auch zur Bestrahlung von Tumorpatienten verwendet werden. Die Linearbeschleuniger produzieren hochenergetische Photonenstrahlen mit einer maximalen Energie von 6 MeV. Die Bestrahlungszeit für eine Dosis von 1 Gy lag bei 20 Sekunden. Während der Dauer der Bestrahlung wurden auch die Kontrollzellen aus dem Brutschrank genommen um gleiche Verhältnisse zu schaffen.

3.3. Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren

Zusätzlich zur Bestrahlung wurden die Zellen in einigen Versuchen mit Rezeptorkinaseinhibitoren behandelt. Es wurden drei verschiedene Rezeptorkinaseinhibitoren verwendet: SU14816, SU11657 und LY2109761.

SU14816 gehört zu den Klasse III/V Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren und wurde zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie entwickelt. Es hemmt die Abl-Tyrosinkinase, die bei der chronisch myeloischen Leukämie durch eine Mutation verändert ist (Buchdunger et al, 1996, Deininger et al, 1997). SU14816 hemmt außerdem PDGF (platelet derived growth factor) -Rezeptoren (Buchdunger et al, 1996) und c-kit, welches bei einigen Tumorarten überexprimiert ist (Heinrich et al, 2000, Krystal et al, 2000, Tuveson et al, 2001). Es wird deshalb auch zur Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren, die eine

Mutation von c-kit aufweisen, eingesetzt. SU14816 ist unter dem Namen Imatinib (Glivec) seit 2001 für die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie und gastrointestinalen Stromatumoren zugelassen. SU11657 gehört ebenfalls zu den Klasse III/V Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren. Es hemmt VEGF(vascular endothelial growth factor)-Rezeptoren 1 und 2, PDGF-Rezeptoren (De Bandt et al, 2003, Mendel et al, 2003, Schueneman et al, 2003), c-kit und flt3 (fetal liver tyrosine kinase 3) (O'Farrell et al, 2003, Sohal et al, 2003). Mitglieder der VEGF-Familie sind die stärksten Modulatoren der Angiogenese und Vaskulogenese. Bei Krebserkrankungen stimulieren sie die Bildung von Blutgefäßen, die den Tumor versorgen. Auch PDGF hat einen, allerdings schwächeren, angiogenen Effekt. PDGF stimuliert außerdem das Tumorzellwachstum (Heldin & Westermark, 1999). Die Hemmung von VEGF- und PDGF- Rezeptoren führt zu einer Hemmung der Angiogenese und der Proliferation von Tumorzellen (Mendel et al, 2003, Schueneman et al, 2003). SU11657 gleicht dem Wirkstoff SU11248 (Sunitinib), der von Pfitzer entwickelt und unter dem Namen Sutent vermarktet wird. Sunitinib ist seit 2006 für die Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren und seit 2007 zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Die Kombination von SU11657 mit Strahlen- und Chemotherapie erwies sich als besonders sinnvoll, da SU11657 die Strahlensensibilität von Tumoren erhöhen kann (Huber et al, 2005). LY2109761 ist ein spezifischer Hemmer der TGF- β - Rezeptorkinasen, Typ 1 und 2, wobei es sich um Serin/Threoninkinasen handelt. TGF- β kann sowohl eine sowohl stimulierende, als auch hemmende Wirkung auf Tumorzellen haben. Entitätenspezifisch kann TGF- β eine Wachstumshemmung und Apoptose von Tumorzellen induzieren, aber in späteren Krebsstadien können hohe Konzentrationen von TGF- β auch zum Tumorwachstum führen. Die Expression von TGF- β ist bei verschiedenen Tumorarten mit einer schlechten Prognose erhöht (Derynck et al, 2005). Eine Studie mit einem TGF- β -Rezeptorkinaseinhibitor zeigt, dass dieser sowohl die tumorsupprimierenden, als auch tumorfördernden Effekte von TGF- β blockiert (Halder et al, 2005). Im Allgemeinen wird aber angenommen, dass die Inhibition von TGF- β Signalwegen eine Tumortherapieoption darstellt, z.B. bei malignen Hirntumoren.

3.4. Morphologie der Zellen nach Bestrahlung

Die MSC wurden nach Bestrahlung mit 1, 2, 4 und 10 Gy unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung fotografiert, um mögliche sichtbare Veränderungen durch

Bestrahlung zu erkennen. Die abgebildeten Zellen sind ungefärbte lebende Zellen in Kulturflächen mit Medium.

3.5. Zytoskelettfärbung

Durch diese Methode wurde die Wirkung von Strahlung auf das Zytoskelett der Zellen untersucht. Phalloidin gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 633 wurde verwendet, um das Zytoskelett der Zellen anzufärben. Phalloidin ist das Gift des Knollenblätterpilzes und lagert sich an das Aktingerüst der Zellen.

Die Zellen wurden in Medium auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden mit Medium 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. 24 Stunden später wurden die Zellen gefärbt. Hierfür wurden sie 2x mit PBS gewaschen und mit 3,7% Formaldehydlösung 10 Minuten fixiert, danach 2x mit PBS gewaschen, 3 bis 5 Minuten in Acetonlösung bei -20°C gegeben und anschließend wieder 2x mit PBS gewaschen. 50 µl der methanolischen Stocklösung des Phalloidinfarbstoffes wurde in 1000 µl PBS mit 1% PBT gelöst und auf die Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden mit Eindeckmedium und Deckgläschen abgedeckt. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung fotografiert. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde durch UV- Licht angeregt und emittierte Licht einer langwelligeren Wellenlänge. Durch optische Filter wurde das fluoreszierende rote Licht vor dunklem Hintergrund sichtbar.

3.6. Zeitrafferaufnahmen von Zellen

MSC, NHDF und HS68 wurden in geringer Dichte in Zellkulturflaschen ausgesät und mit 10 und 20 Gy bestrahlt. Diese und Kontrollzellen wurden ungefähr 8 Stunden später bei 200facher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotografiert. Alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 62,5 Stunden wurde ein Bild aufgenommen und dann im Zeitraffer angeschaut, um die Bewegung der Zellen zu beurteilen. Der Zeitraffer zeigte 50 Bilder pro Sekunde. So entstanden Filme von je 15 Sekunden Länge mit 750 Bildern.

3.7. Klonogenes Überleben

In diesem Versuch wurde die Fähigkeit einzelner Zellen, sich nach Bestrahlung und Behandlung mit Kinaseinhibitoren zu einer Kolonie zu vermehren, untersucht. Die Zellen wurden in geringer Dichte ausgesät und nur bestrahlt oder bestrahlt und mit Kinaseinhibitoren behandelt. Die Kolonien wurden gezählt, wenn in den Kontrollflaschen Kolonien gewachsen waren. Es wurden nur Kolonien mit mindestens 50 Zellen gezählt. Es wird davon ausgegangen, dass eine Kolonie aus einer einzelnen Zelle entstanden ist.

Die Zellen wurden in 75 cm² Kulturflaschen mit 10 ml Medium (MSC) oder in 25 cm² Kulturflaschen mit 5 ml Medium (NHDF und HS 68) ausgesät. Jeder Ansatz erfolgte in dreifacher Ausführung. Die Zellen werden in einer Dichte ausgesät, dass sich nach Bestrahlung eine gut zählbare Anzahl von Kolonien ergab (die genaue Anzahl ist in der Tabelle des Ergebnisteils). 24 Stunden nach Aussäen der Zellen wurden LY2109761, SU11657 und SU14816 und DMSO in die Kulturflaschen dazugegeben. In der Stocklösung lagen die Substanzen LY2109761, SU11657 und SU14816 in einer Konzentration von 10mM, gelöst in DMSO vor. Sie wurden in einer Menge zugesetzt, dass die Konzentration der Substanzen im Medium 0,01µM, 0,1µM oder 1µM betrug. Um auszuschließen, dass der Effekt auf die Zellen durch DMSO beeinflusst wird, wurden auch den Zellen für die Kontrolle DMSO in gleicher Menge zugefügt. Zwei Stunden später wurden die Zellen mit 1, 2, 4 und 10 Gy bestrahlt. Zellen ohne zusätzliche Behandlung wurden 24 Stunden nach dem Aussäen bestrahlt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis in den Kontrollflaschen Kolonien gewachsen waren. Dies dauerte bei den NHDF 5 bis 6 Tage, bei den HS68 10 Tage und bei den MSC 21 Tage. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen gefärbt. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen 10 Minuten mit 2 bis 3 ml von einem Gemisch aus 3 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig fixiert, danach mit Leitungswasser gespült und mit Kristallviolett 10 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen wieder mit Leitungswasser gespült und an der Luft getrocknet. Die Kolonien wurden unter dem Mikroskop gezählt. Gezählt wurden alle Kolonien mit mehr als 50 Zellen.

Das relative Überleben der bestrahlten Zellen im Verhältnis zum Überleben der nicht bestrahlten Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$PE = NK/N0$$

PE = „plating efficiency“, Koloniebildungsfähigkeit der Zelle

NK = Anzahl der der Kolonien (Mittelwert aus 3 Ansätzen)

NK0 = Anzahl der eingesäten Zellen

SF = $\text{PED} / \text{PEK} \times 100$

SF = Überlebensfraktion(= surviving fraction), relatives Überleben der bestrahlten Zellen im Verhältnis zum Überleben der nicht bestrahlten Zellen

PEK = PE der nicht bestrahlten Zellen

PED = PE der bestrahlten Zellen

Die Beziehung zwischen der Überlebensfraktion und der Bestrahlungsdosis wurde in einer halblogarithmischen Überlebenskurve dargestellt.

3.8. Proliferationsversuch

Die Proliferation von Zellen wurde bestimmt, indem Zellen in einer festgelegten Anzahl ausgesät wurden, bestrahlt und/ oder mit LY2109761, SU11657 und SU14816 behandelt und über einen bestimmten Zeitraum im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und mit der Anfangszellzahl verglichen.

Für jeden Ansatz wurden Zellen in Microtiterplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät, je 20000 Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung. Für jede Zellart wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet, nur bei den NHDF wurden statt 20000 Zellen pro Vertiefung 10000 Zellen pro Vertiefung ausgesät.

Folgende Behandlungen wurden durchgeführt:

-Bestrahlung mit 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 10 Gy

-Behandlung mit LY2109761, SU11657 und SU14816, jeweils in einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$

-Behandlung mit LY2109761, SU11657 und SU14816, jeweils in einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ und zusätzliche Bestrahlung mit 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 10 Gy

Den Kontrollzellen für die Versuche wurde $0,2\mu\text{l}$ DMSO zugesetzt, da LY2109761, SU11657 und SU 14816 in der Stocklösung in DMSO in einer Konzentration von 10mmol/l

gelöst vorliegen. Für jede Behandlung und die Kontrollzellen wurde je eine Microtiterplatte mit 6 Vertiefungen verwendet.

24 Stunden nach Aussäen der Zellen wurde das Medium durch 2ml Medium ohne FCS ersetzt und LY2109761, SU11657, SU14816 und DMSO wurde in die Microtiterplatte dazugegeben. Zwei Stunden später wurden 2ml Medium mit doppelter Menge an FCS dazugegeben und die Zellen wurden mit 1, 2, 4 und 10 Gy bestrahlt. Zellen ohne zusätzliche Behandlung wurden 24 Stunden nach dem Aussäen bestrahlt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ 5 Tage weiter kultiviert.

Nach 5 Tagen wurden die Zellen gezählt. Es wurden Zellen aus je zwei Vertiefungen zusammen gezählt, sodass für jede Behandlung ein Versuch mit drei Ansätzen entstand. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und Zellen und Medium aus zwei Vertiefungen einer Microtiterplatte in ein Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden 10 min bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1 ml Medium dazugegeben. Die Zellen wurden in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

Der relative Anteil der bestrahlten Zellen im Verhältnis zu den nicht bestrahlten Zellen wurde berechnet:

$$X = ZD/ZK \cdot 100$$

X = relativer Anteil der bestrahlten Zellen im Verhältnis zu den nicht bestrahlten Zellen

ZK = Anzahl der nicht bestrahlten Zellen (Mittelwert aus 3 Ansätzen)

ZD = Anzahl der bestrahlten und/ oder behandelten Zellen (Mittelwert aus 3 Ansätzen)

Die Beziehung zwischen der Überlebensfraktion und der Bestrahlungsdosis wurde in einer halblogarithmischen Überlebenskurve dargestellt.

3.9. Apoptosemessung und Zellzyklusbestimmung

Die Apoptosemessung und die Zellzyklusanalyse wurden mit Hilfe des FACScan Durchflußzytometers durchgeführt. Bei der Durchflußzytometrie werden Zellen einzeln an einem fokussiertem Laserstrahl vorbei geleitet. Das Laserlicht trifft auf die Zellen und wird gestreut. Diese Lichtsignale werden mit einem Photodetektor gemessen und graphisch dargestellt. Die Zelleigenschaften Größe und Granularität bestimmen die Streuung des Laserlichtes. Das Vorwärtsstreulicht (Forward scatter) wird in einem Winkel von 2 bis 6 Grad zur Achse des einfallenden Lichts gestreut und ist ein Maß für die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (Side scatter) ist ein Maß für die Granularität der Zelle und wird im rechten Winkel zum einfallenden Licht gestreut. Je stärker die Granularität der Zelle ist, desto größer ist das Seitwärtsstreulicht. Zur Messung der Apoptose und des Zellzyklus wurde die DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid angefärbt. Durch die Energie des Laserlichts werden Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs angeregt und gelangen auf ein höheres Energieniveau. Das Licht wird emittiert, indem das Elektron auf das ursprüngliche Energieniveau zurückfällt und Energie in Form von Licht größerer Wellenlänge abgibt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist größer, da während des Vorgangs ein Energieverlust durch Wärme entsteht. Durch optische Filter wird das Streulicht und das Licht der Fluoreszenz zu Detektoren geleitet, durch Photomultiplier verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Die Pulshöhe der elektrischen Signale ist proportional zur einfallenden Lichtintensität. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software „Cell Quest pro“.

Je 200000 Zellen mit 5ml Medium wurden auf 25cm² Kulturflaschen verteilt. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Flaschen mit 10 Gy bestrahlt, die andere nicht behandelt. 8, 48 und 96 Stunden (NHDF und HS 68) oder 48, 96, 168 und 288 Stunden (MSC) nach Bestrahlung wurden Zellen aus je einer bestrahlten Zellkulturflasche und einer nicht bestrahlten Zellkulturflasche mit Trypsin gelöst, die Zellen sowie das Medium in 25 ml-Röhrchen überführt und die Röhrchen 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in die Zellen mit 5ml -20°C kaltem 70%igem Alkohol fixiert und bei -20°C aufbewahrt. Frühestens 2 Stunden nach Fixierung der Zellen des letzten Zeitpunktes wurden die Zellen aller Zeitpunkte gleichzeitig gefärbt. Es wurde die Färbung nach Nicoletti verwendet. Hierfür wurden die Zellen 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand (Alkohol) wurde entfernt und in jedes Röhrchen wurde 890 µl PBS, 100 µl RNAase (2 mg/ml) und 10 µl Propidiumjodid (1 mg/ml) gegeben. Die Suspension wurde mit

der Pipette gemischt und mit Röhrcchen mit integrierten Zellsieben filtriert. Nach dem Färben wurden die Zellen mit dem FACScan Durchflußzytometer gemessen. Durch die Fixierung wird die Zellemembran permeabel, so dass der Farbstoff Propidiumjodid die Zellmembran passieren kann. Propidiumjodid färbt die DNA an. Durch die Zugabe von RNAase wird verhindert, dass auch die RNA angefärbt wird.

Bei der Messung der Zellen mit dem Durchflußzytometer wurden je 10000 Zellen aufgenommen. In einem Punkt-Diagramm wurde die Intensität des Seitwärtsstreulichtes (SSC-Hight) gegen die des Vorwärtsstreulichtes (FSC-Hight) aufgetragen (Abb.3a). Zur Messung der Apoptose und zur Zellzyklusbestimmung sollen nur Zellen verwendet werden, die in ihren Zelleigenschaften Größe und Granularität intakten Zellen entsprechen. Durch ein „Gate“ wurden Zellbruchstücke ausgegrenzt. In einem zweiten Diagramm wurde die Pulshöhe von PI (FL-3) logarithmisch gegen die Zellzahl aufgetragen (Abb.3b). Für dieses Diagramm wurden nur die Zellen verwendet, die sich innerhalb des „Gates“ des ersten Diagramms befanden. Es entstanden zwei „Peaks“, die die Anzahl der Zellen während der G1-Phase und die Anzahl der Zellen, die sich in der G2-Phase nach Verdoppelung der DNA befinden darstellen. Die Zellen zwischen den „Peaks“ befinden sich in der Synthese-Phase (S-Phase). Die Zellen, die sich in dem Diagramm vor dem G1-Peak (= Sub- G1-Peak) befinden, stellen den Anteil apoptotischer Zellen dar. Sie weisen einen geringeren DNA-Gehalt bei zelltypischer Morphologie auf. Der Anteil der Zellen in Prozent, die sich in der Apoptose, der G1-Phase, der G2-Phase und der S-Phase befinden wurde gemessen und in einer Tabelle dargestellt (Abb.3c).

FACS-Messung am Beispiel der NHDF (Abb.3a-c):

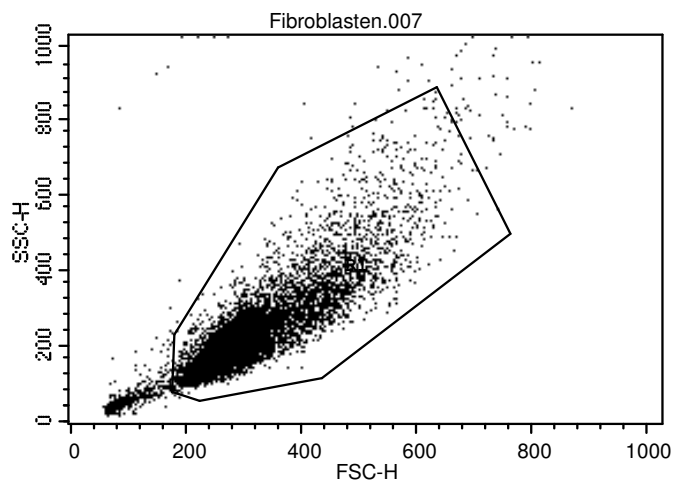


Abb. 3a: Punkt-Diagramm, SSC-Hight gegen FSC-Hight, Eingrenzung von intakten Zellen mit einem "Gate".

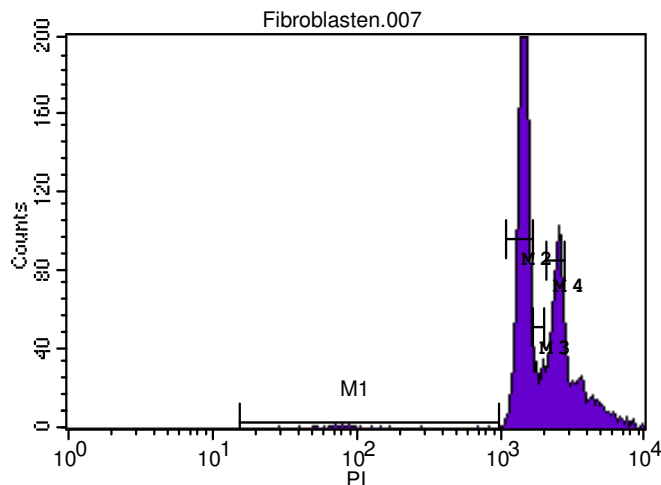


Abb. 3b: PI (log) gegen Zellzahl, Apoptotische Zellen (M1), Zellen in der G1- Phase (M2), in der S-Phase (M3) und G2-Phase (M4).

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	9304	100.00	93.04
M1	16, 1000	43	0.46	0.43
M2	1084, 1700	5764	61.95	57.64
M3	1685, 2035	543	5.84	5.43
M4	2110, 2839	1865	20.05	18.65

Abb. 3c: Tabelle mit gezählten Zellen (Events), Anteil der durch das Gate eingegrenzten Zellen in Prozent (%Gated) und Anteil aller Zellen in Prozent (%Total), die sich in der Apoptose (M1), der G1-Phase (M2), der S-Phase (M3) und der G2-Phase (M4) befinden.

3.10. Osteogene und adipogene Differenzierung

In diesen Versuch wurde die Fähigkeit der MSC zur osteogenen und adipogenen Differenzierung nach Bestrahlung mit 10 Gy untersucht.

Die Zellen wurden wie unten aufgeführt in Multiwell-Platten ausgesät:

In 24-well-Platten wurden je 5000 Zellen in 500 µl Medium pro Vertiefung ausgesät. Es wurden je drei Vertiefungen für die Kontrolle ohne Differenzierungsmedium, für die adipogene Differenzierung ohne Bestrahlung, für die adipogene Differenzierung mit Bestrahlung, für die osteogene Differenzierung ohne Bestrahlung und für die osteogene Differenzierung mit Bestrahlung verwendet.

24 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde das Medium entfernt, auch bei den nicht bestrahlten Zellen, und 500 µl Differenzierungsmedium in die entsprechenden Vertiefungen hinzugegeben. Für die osteogene Differenzierung wurde das Differenzierungsmedium nach Verfaillie und für die adipogene Differenzierung das Differenzierungsmedium nach Pittenger verwendet. Das Medium wurde 2x in der Woche gewechselt.

Zusammensetzung des Mediums für die osteogene Differenzierung:

„Verfaillie osteo Diff „

DMEM (Glucose 1g/l)	
FCS	10 %
L-Glutamine	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
Dexamethason	100 nM
L-Ascorbic acid-2-PO4	200 µM
β-Glycerophosphat	10 mM

Zusammensetzung des Mediums für die adipogene Differenzierung:

„Osiris adipo Diff nach Pittenger“

DMEM (Glucose 4,5g/l)	
FCS	10 %
L-Glutamine	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
Dexamethason	1 μ M
1-Methyl-3-isobutylxanthine	0,5 mM
Insulin	10 μ g/ml

Nach 2 bis 3 Wochen wurden die Zellen gefärbt. Die Zellen der osteogenen Differenzierung wurden mit der Von-Kossa-Färbung gefärbt. Die von Kossa Färbung ist ein standardisiertes Verfahren zur Darstellung der im Verlauf der Differenzierung gebildeten extrazellulären Matrix aus kalziumhaltigen Ablagerungen als Nachweis der osteogenen Differenzierung der MSC. Die Zellen der adipogenen Differenzierung wurden mit der Lipidfärbung mit Ölrot gefärbt. Ölrot ist eine Färbung zur allgemeinen Lipiddarstellung, es werden Lipidtröpfchen in den Zellen als Nachweis der adipogenen Differenzierung dargestellt. Die verwendeten Färbemethoden sind unten aufgeführt.

Von Kossa- Färbung einer Zellkultur

1. Medium abpipetieren
2. mit PBS spülen
3. Zellen mit -20°C kaltem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) bedecken
4. 30 min bei 4°C stehen lassen
5. Methanol-Aceton-Gemisch entfernen und mit Aqua dest. waschen
6. maximal 10 min mit 5%iger Silbernitratlösung bedecken und unter UV- Lampe stellen
7. mit Aqua dest. Spülen
8. 2 min mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung fixieren
9. Natriumthiosulfatlösung entfernen und 2x mit Aqua dest. spülen
10. 1 min 30 sec mit Mayers Hämalaun färben

11. Hämalaun entfernen und 1min und 30 sec mit Leitungswasser bläuen
12. Leitungswasser entfernen und 2x mit Wasser spülen
13. mit Glycerin bedecken

Lipidfärbung einer Zellkultur

1. Medium abpipetieren
2. mit PBS spülen
3. 3 min bei Raumtemperatur mit 4%igem Paraformaldehyd fixieren
4. Paraformaldehyd entfernen und 2x mit Aqua dest. spülen
5. 5 min mit 60%igem Isopropanol bedecken
6. Isopropanol entfernen und 15 min mit Ölrot-Lösung (6 Volumenanteile Stammlösung (= 0,5g Ölrot in 100ml 99%igem Isopropanol) und 4 Volumenanteilen aqua dest.) färben
7. mit 60 %igem Isopropanol spülen
8. 2x mit Leitungswasser spülen
9. 2 min mit Hämalaun färben
10. Hämalaun entfernen und 1 min und 30 sec mit Leitungswasser bläuen
11. Leitungswasser entfernen und 2x mit Wasser spülen
12. mit Glycerin bedecken

Die gefärbte Zellkultur wurde unter dem Mikroskop bei einer 100fachen Vergrößerung beurteilt und fotografiert.

3.11. Messung der elektrischen Impedanz

In diesem Versuch wurden Zellen auf kleinen Goldfilmelektroden kultiviert, die sich am Boden einer Kulturschale befanden und die elektrische Impedanz gemessen. Wenn die Zellen am Boden haften und sich auf der Elektrodenoberfläche ausbreiten, ändert sich die Impedanz. Diese Änderung kann genutzt werden, um Zellmorphologie- und verhalten zu analysieren.

Am Boden der Kulturschale befanden sich eine große Zählelektrode und vier kleine Elektroden. Die große und eine kleine Elektrode wurden an einen phasensensitiven Lock-In-Verstärker angeschlossen. Ein Wechselstromsignal von wenigen Millivolt bei 45 kHz wurde der Kulturschale zugeführt. Das Signal verhält sich wie eine konstante Quelle. Die gemessene Impedanz wird dominiert von der Impedanz an der Grenze zwischen der kleinen Elektrode und dem Kulturmedium. Durch Zellen, die an der Oberfläche der kleinen Elektrode hafteten und sich ausbreiteten, wurde ein Teil der Elektrodenoberfläche blockiert. Dies führte zu einem Anstieg der Impedanz. Die Fähigkeit von Zellen, an der Oberfläche zu haften und eine konfluente Zellschicht zu bilden, kann durch die Impedanzmessung bestimmt werden. Die Impedanzmessung erfasst auch Zellmorphologieänderungen. Morphologieänderungen von adhären Zellen verändern die Impedanz, wobei vor allem die Größe der Zellen, die Größe des Spaltes zwischen den Zellen und die Membrankapazität eine Rolle spielen. Somit wurde indirekt der Zellstress gemessen, der durch die Bestrahlung verursacht wurde.

Der Versuch wurde mit MSC 285 und NHDF durchgeführt. Die Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und mit 10 Gy bestrahlt. 6 Stunden später wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und je 100000 bestrahlte Zellen und nicht bestrahlte Kontrollzellen in mit Elektroden versehenen Wells mit Medium zur Impedanzmessung ausgesät. Gemessen wurde über 50 Stunden.

3.12. Genexpressionsanalyse

3.12.1. Prinzip

Um die Genexpression von bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen zu vergleichen, wurde die RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, linear amplifiziert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die so markierte Sonde wurde auf einen Microarray aufgetragen. Der Microarray besteht aus einem Objektträger, auf dem ca. 40000 genspezifische Spots aufgebracht sind, an welche die fluoreszenzmarkierte Sonde bindet, also hybridisiert. Jedes Gen wird auf dem Array durch ein oder mehrere Oligonukleotide repräsentiert. Mit einem Scanner wurden die Helligkeitsintensitäten der Fluoreszenz gemessen. Diese Helligkeitsintensitäten sind proportional zu der Menge der gebundenen Probe und somit ein Maß für die Genexpressionsstärke. Die Daten der einzelnen Proben wurden verglichen.

3.12.2.Methode

Es wurden je drei Versuche mit MSC 283 und mit MSC 285 durchgeführt. Die Zellen wurden in je zwei 75cm² Kulturflaschen ausgesät, von denen eine mit 10 Gy bestrahlt wurde. 6 Stunden nach Bestrahlung wurden bestrahlte Zellen und nicht bestrahlte Zellen mit 500µl QIAzol Lysis Reagent pro Kulturflasche lysiert. Die Isolierung der RNA aus den Proben wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit durchgeführt nach dem Protokoll des miRNeasy Mini Handbook durchgeführt.

Den Proben wurde Chloroform zugesetzt. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurde die obere wässrige Phase abgenommen und dieser Ethanol zugegeben. Über verschiedene Waschschrte mit RNeasy Mini Säulen wurde die RNA gereinigt. Die gereinigte RNA lag in 50µl RNasefreiem Wasser vor. Die Menge der RNA wurde mit dem Nano Drop Spektrometer über die Messung der optischen Dichte bestimmt und die Qualität der RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyser kontrolliert. Verwendet wurden 500ng Total RNA jeder Probe. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem „One-color Microarray- Based Gene Expression Analysis“- Protokoll von Agilent. 500ng Total RNA in 5,3 µl RNasefreiem Wasser wurde gemischt mit verdünntem „Spike Mix“ und dem T7Promotor Primer. Für die Synthese der cDNA wurde der „cDNA Master Mix“ (*First Strand Buffer, DTT, dNTP mix, MMLV-RT und RNaseOut*), indem unter anderem die Nukleotide für die DNA Synthese und eine Reverse Transkriptase enthalten sind, dazu gegeben. Die Probe wurde für 2 Stunden und 15 Minuten inkubiert. Für die Synthese der cRNA und die Amplifikation wurde der „Transcription Master Mix“ (*Nuclease- free water, 4xTrancription Buffer, DTT, NTP mix, PEG, RNaseOut, Inoergabic pyrophosphatase, T7 RNA Polymerase und Cyanin 3-CTP*), in dem unter anderem die Nukleotide für RNA Synthese, der Farbstoff Cyanin, gebunden an Cytosintriphosphat und die T7 RNA- Polymerase enthalten sind, dazu gegeben. Die T7 RNA-Polymerase amplifiziert die RNA mindestens 100-mal und baut dabei die an Cyanin gebundenen Cytosintriphosphate ein. Die Proben wurden für 2 Stunden inkubiert. Die amplifizierte und gefärbte cRNA wurde durch mehrere Waschschrte aufgereinigt. Die cRNA wurde durch Messung mit dem Nano Drop Spektrometer quantifiziert. Die Konzentration der cRNA und des Cyanins wurde bestimmt. Zur Hybridisierung wurden der amplifizierten und gefärbten cRNA blocking agent, nucleasefreies Wasser und Puffer zugesetzt und diese dann auf den Microarray aufgetragen. Der Microarray wurde in einer Hybridisierungskammer 17 Stunden in einem Ofen

bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Microarray zweimal gewaschen, um nicht gebundene RNA zu entfernen.

Die Microarrays wurden gescannt und die Daten mit der Software extrahiert. Zur Auswertung wurden die Daten normalisiert, um Abbaueffekte, verschiedenen gute Extraktionen und andere Effekte auszugleichen. Die Intensitäten aller Gene wurden zur Normalisierung genutzt. Bestrahlte Zellen wurden mit nicht bestrahlten Zellen in einem t-Test verglichen. Mit dem t-Test wird überprüft, ob sich zwei Gruppen von Messwerten signifikant unterscheiden. Es wurde ein t-Test mit gepaarten Werten durchgeführt. D.h. in dem t-Test wurden die Expressionsunterschiede zwischen bestrahlten Zellen und den Kontrollzellen aus dem gleichen Versuch aus den insgesamt sechs Versuchen verglichen. Um tatsächliche Unterschiede der Genexpressionen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Stammzellen zu identifizieren, wurde der p-Wert berechnet. Hierfür wird eine Nullhypothese formuliert. Diese besagt, dass die Gruppen gleich sind. Der p-Wert gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein gemessener Unterschied durch Zufall entstanden ist. Wenn der p-Wert klein ist, so spricht das also gegen die Nullhypothese. Es wurde ein Signifikanzniveau $\alpha = 5 \times 10^{-3}$ festgelegt. Es wurden nur Ergebnisse mit einem p-Wert, der kleiner oder gleich α , beachtet. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit, dass die Unterschiede der Ergebnisse durch zufällige Fehler entstanden sind, beträgt 0,5% oder weniger.

Die nach der Bestrahlung regulierten Gene wurden in Gruppen nach der „Gene Ontology“ – Datenbank (www.geneontology.org) eingeteilt. Die Beschreibung der Gene erfolgte mit Hilfe des „National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)“ (NCBI), „Gene Ontology“ (GO) und anderer Literatur (siehe Literaturverzeichnis).

Neben dem t-Test wurde die Expression von bestimmten Genen untersucht. Es wurde die Expression von Genen, die Marker für embryonale Stammzellen (Oct-4, Sox-2, Rex-1, Nanog) sind, untersucht. Die Expression von positiven MSC-Marker (VCAM-1, CD 73, CD13 CD 29, CD 44, CD 105), negativen MSC-Markern (CD11b (Immunzellmarker), CD34, CD 45 (Marker für HSC), CD31, CD117) und Wachstumsfaktoren, die an der Erhaltung der undifferenzierten Stammzellphenotyps beteiligt sind (LIF, FGF2, Wnt3a, EGF, HGF, PDGF), wurde beurteilt. Daneben wurden noch Gene untersucht, die Marker für die osteogene Differenzierung (Runx2, BMP-2, BMP-6), für die adipogene Differenzierung (PPARY) und

für die chondrogene Differenzierung (Col2a, Col1a1, Col10a1, Sox-9) sind. Außerdem wurden die Rezeptoren PDGFR, VEGFR, TGFBR1 und 2, KIT und FLT3R untersucht, die durch die drei Rezeptorkinaseinhibitoren gehemmt werden und deren Liganden PDGF, VEGF, TGF β , KITLG und FLT3.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie der Zellen

4.1.1. Morphologie der Zellen nach Bestrahlung mit 1, 2, 4 und 10 Gy

Die MSC wurden drei Wochen nach der Bestrahlung unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung fotografiert. Die Abbildungen zeigen vitale nicht gefärbte MSC in Kulturmedium, nicht bestrahlt und nach Bestrahlung mit 1,2,4 und 10 Gy. Dargestellt sind jeweils repräsentative Aufnahmen (Abb.4).

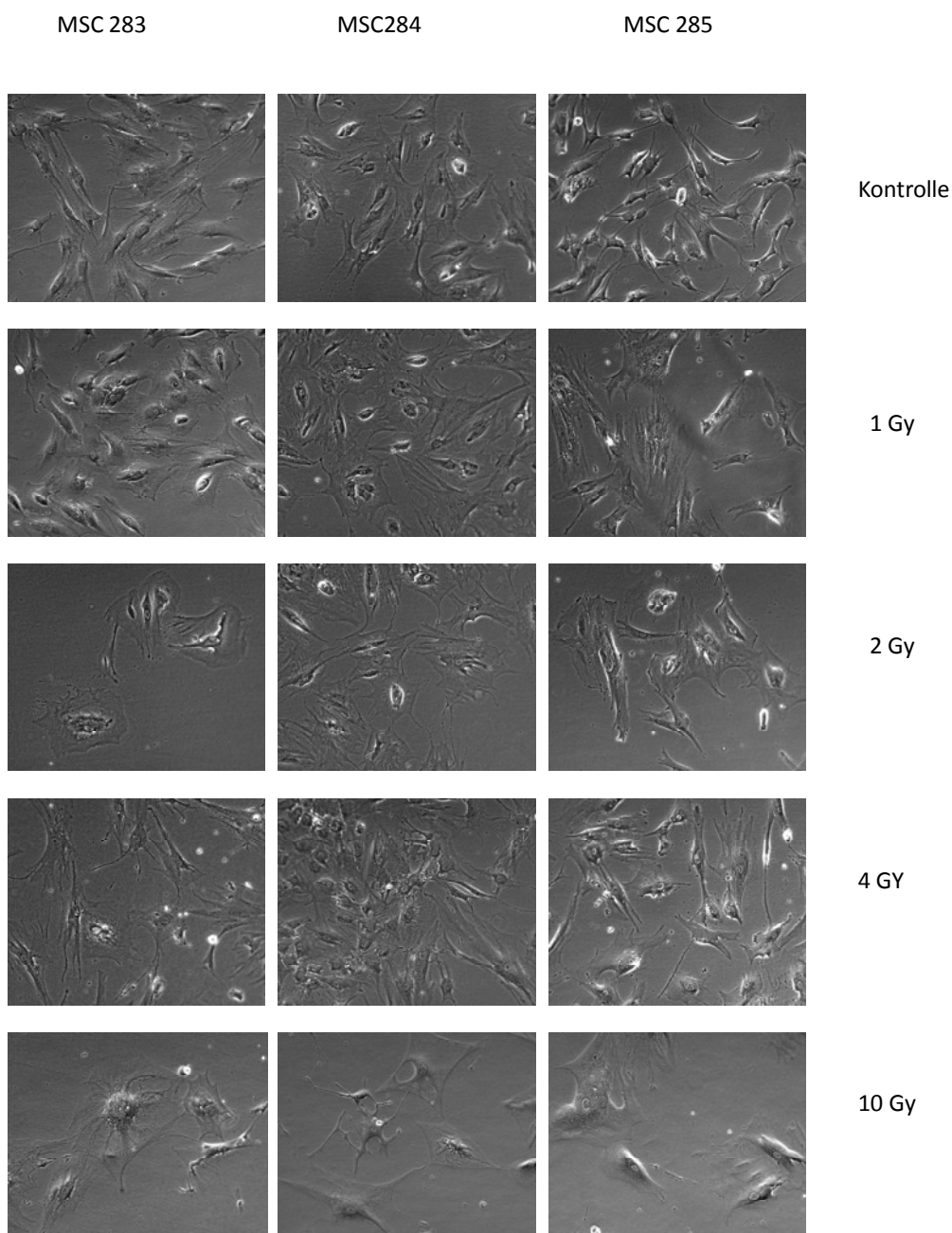


Abb. 4: MSC 3 Wochen nach Bestrahlung mit 1,2,4 und 10 Gy und Kontrollzellen (200fache Vergrößerung). Erst bei einer Dosis von 10 Gy erscheinen die Zellen deutlich verändert. Sie sind größer und unregelmäßig geformt.

Bis zu einer Dosis von 4 Gy zeigten die bestrahlten MSC keine sichtbaren Veränderungen im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kontrollzellen. Die Zellen waren klein, meist spindelförmig. Erst bei einer Dosis von 10 Gy war eine deutliche Veränderung zu erkennen. Die Zellen waren größer, pleomorph und entformt. Es waren auch eindeutig weniger Zellen pro Bildausschnitt zu erkennen.

4.1.2. Zytoskelettfärbung

Die Auswirkungen von Bestrahlung auf die Zytoskelette der Zellen wurden untersucht. Hierfür wurden die Aktinfilamente 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 10 Gy mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phalloidin angefärbt. Die Aktinfilamente der Zellen erscheinen rot vor dunklem Hintergrund. Bei allen Zellen, MSC sowie Fibroblasten, war kein auffälliger Einfluss der Bestrahlung auf das Zytoskelett zu erkennen. Das Zytoskelett erscheint auch nach Bestrahlung intakt (Abb.5 a und b).

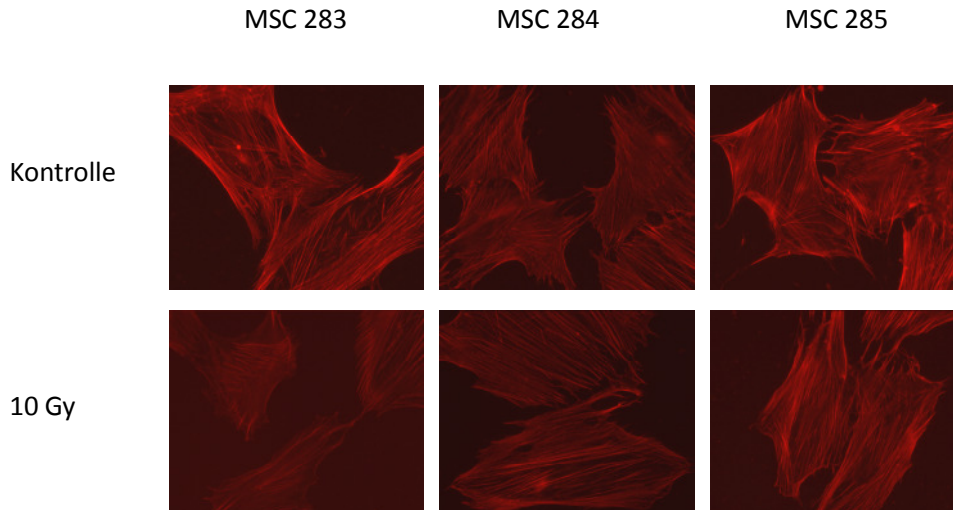


Abb. 5a: Zytoskelettfärbung der MSC, Kontrollzellen und Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy (400fache Vergrößerung). Es ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Das Zytoskelett erscheint bei allen Zellen intakt.

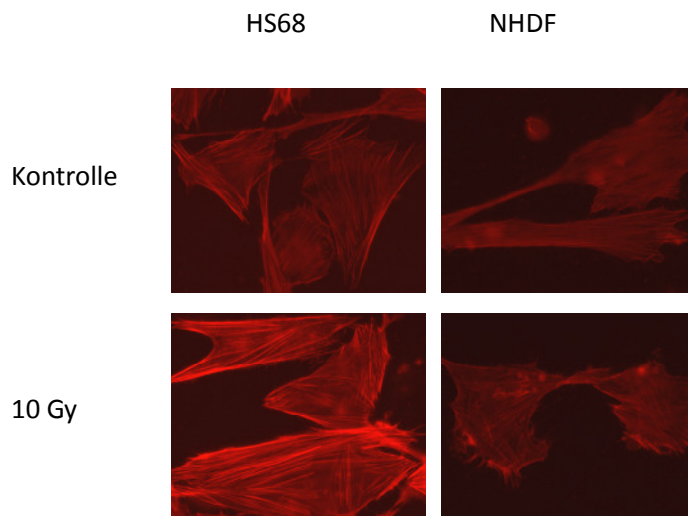


Abb. 5b: Zytoskelettfärbung der Fibroblasten (HS68 und NHDF), Kontrollzellen und Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy (400fache Vergrößerung). Es ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Das Zytoskelett erscheint bei allen Zellen intakt.

4.1.3. Zeitrafferaufnahmen von Zellen

Die Zellen wurden 8 Stunden nach Bestrahlung mit 10 oder 20 Gy über einen Zeitraum von 62,5 Stunden beobachtet. Die Motilität aller Zellen war nach der Bestrahlung deutlich reduziert. Nicht bestrahlte MSC zeigten relativ viel Bewegung. Auch einige Zellteilungen waren sichtbar. Bestrahlte MSC waren größer als die Kontrollzellen, Zellteilungen waren nicht mehr sichtbar und der Bewegungsradius war deutlich eingeschränkt. Die Kontrollzellen bei den NHDF waren klein, zeigten häufige Zellteilungen und große Beweglichkeit. Bestrahlte NHDF bildeten lange dünne Zellausläufer. Die Beweglichkeit war deutlich geringer und es waren keine Zellteilung mehr zu sehen. Bei den HS68 zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei MSC oder NHDF. Die Kontrollzellen zeigten im Vergleich zu bestrahlten Zellen Zellteilungen und mehr Bewegung und waren relativ klein. Bestrahlte Zellen bildeten auch Ausläufer, allerdings nicht so ausgeprägt wie die NHDF. Beispielfhaft ist jeweils ein Bild von Kontrollzellen und von mit 10 Gy und mit 20 Gy bestrahlten Zellen von MSC 285 und NHDF abgebildet (Abb.6).

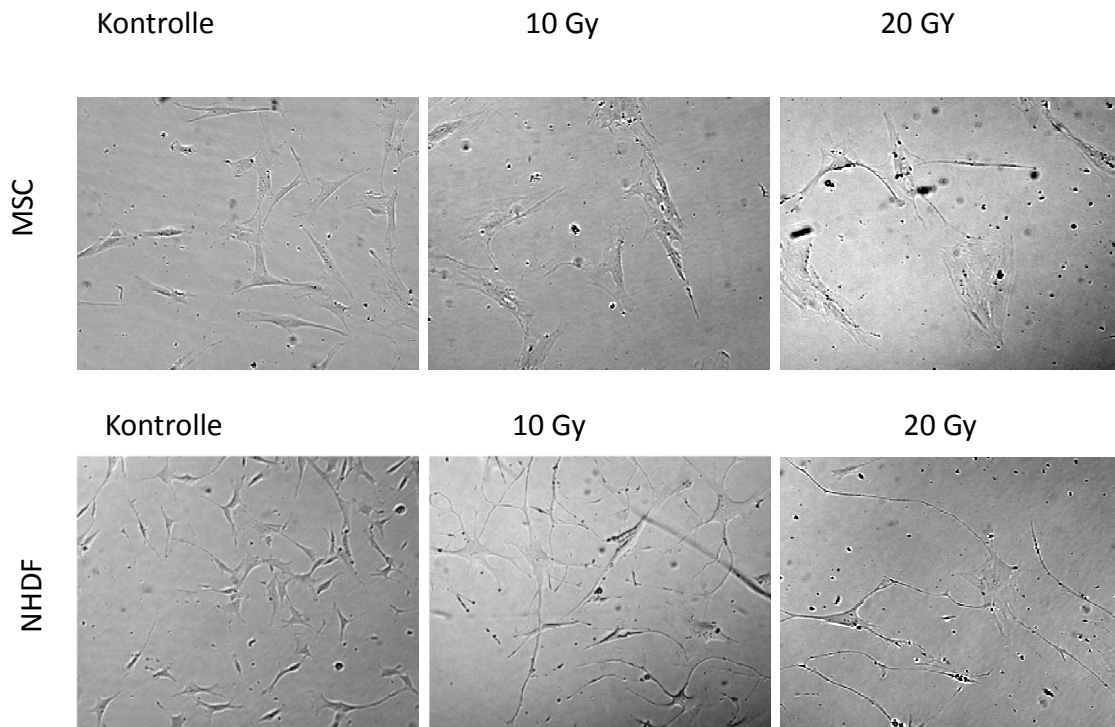


Abb. 6: MSC und Fibroblasten (NHDF), Kontrollzellen und Zellen nach der Bestrahlung mit 10 Gy und 20 Gy, 100fache Vergrößerung. Bestrahlte Zellen sind größer als nicht bestrahlte Zellen und bilden lange dünne Zellausläufer.

4.1.4. Morphologie der MSC-Kolonien:

Um das klonogene Überleben zu untersuchen wurden Zellen in geringer Dichte ausgesät. Nach 3 Wochen waren aus den einzelnen Zellen Kolonien mit 50 und mehr Zellen gewachsen. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen verschiedener Kolonien der MSC des gleichen Spenders ein sehr heterogenes Aussehen hatten. Die Zellen einer Kolonie ähnelten sich jedoch stark (Abb.7a und b). Daraus lässt sich schließen, dass die kultivierten mesenchymalen Stammzellen eine heterogene Population darstellen. Da die Zellen einer Kolonie meist Klone einer einzigen Zelle sind, ist das Aussehen der Zellen innerhalb einer Kolonie sehr ähnlich. Ein Einfluss der Bestrahlung war nicht deutlich erkennbar. Es schien kein bestimmter „Kolonientyp“ häufiger oder seltener aufzutreten als andere.

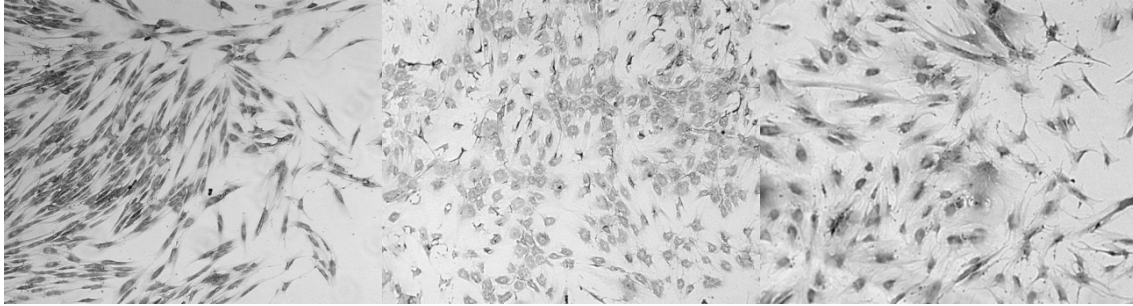


Abb.7a: MSC 284 Kolonienwachstum der Kontrollzellen 3 Wochen nach Aussaat (100fache Vergrößerung)

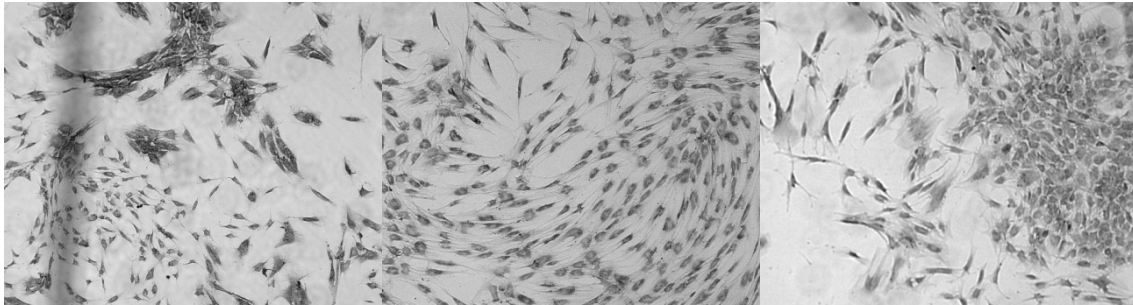


Abb. 7b: MSC 285 Kolonienwachstum der Kontrollzellen 3 Wochen nach Aussaat (100fache Vergrößerung)

4.1.5. Morphologie der MSC-Kolonien nach Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren:

Die Behandlung mit dem VEGFR/PGFR/C-Kit/flt3-Tyrosinkinaseinhibitor SU11657 führte in einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ nach 3 Wochen zu einer drastischen Schädigung aller Zellen bei den MSC, sodass keine Zellen mehr erkennbar waren. Die Morphologie von HS68 und NHDF war nicht deutlich verändert. Auch bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{mol/l}$ wurden die MSC stark geschädigt. Es konnten sich zwar noch vereinzelt Kolonien bilden, die Morphologie dieser Zellen war jedoch deutlich verändert (Abb.8). Die Rezeptorkinaseinhibitoren SU14826 und LY2109761 führten nicht zu einer offensichtlichen Veränderung der Morphologie aller Zellen.

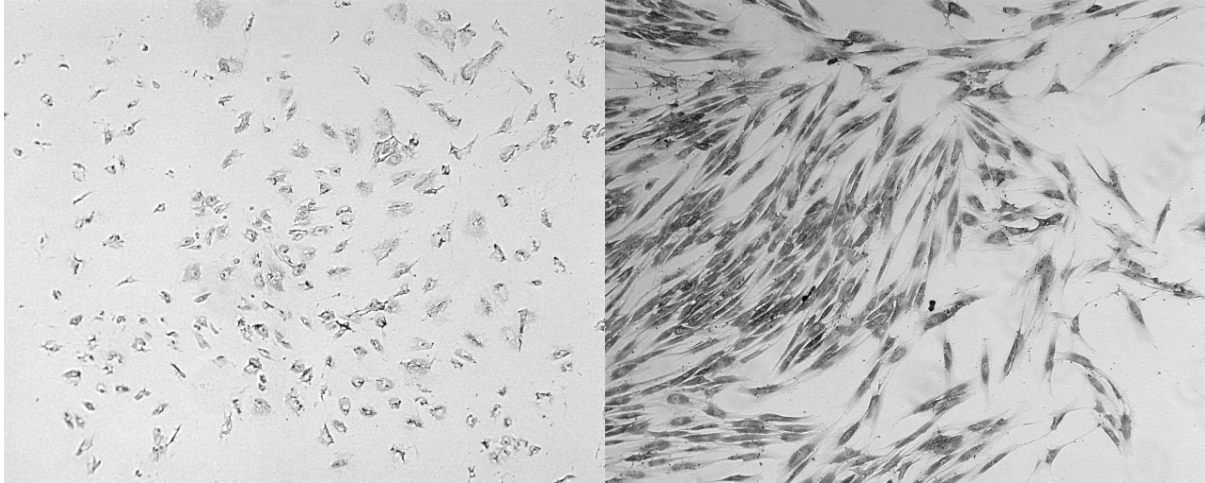


Abb. 8: MSC 284 3 Wochen nach Behandlung mit SU11657 (links) und Kontrollzellen (rechts). Die Morphologie der Zellen war nach der Behandlung deutlich verändert (100fache Vergrößerung).

4.2. Klonogenes Überleben

4.2.1. Klonogenes Überleben nach Bestrahlung

Es wurden 5 Versuche mit MSC (MSC 283, MSC 284, MSC 285) und 4 mit Fibroblasten (HS 68 und NHDF) durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0,1,2,4 und 10 Gy bestrahlt. Die Kolonien wurden gezählt, wenn in den Kontrollflaschen Kolonien gewachsen waren. Da die Zellen eine sehr unterschiedliche Verdopplungszeit haben, dauerte dies bei den NHDF 5-6 Tage, bei den HS68 10 Tage und bei den MSC 21 Tage.

Abbildungen 9a und b zeigen Diagramme in denen die Beziehungen zwischen der Überlebensfraktion und der Bestrahlungsdosis in halblogarithmischen Überlebenskurven dargestellt sind.

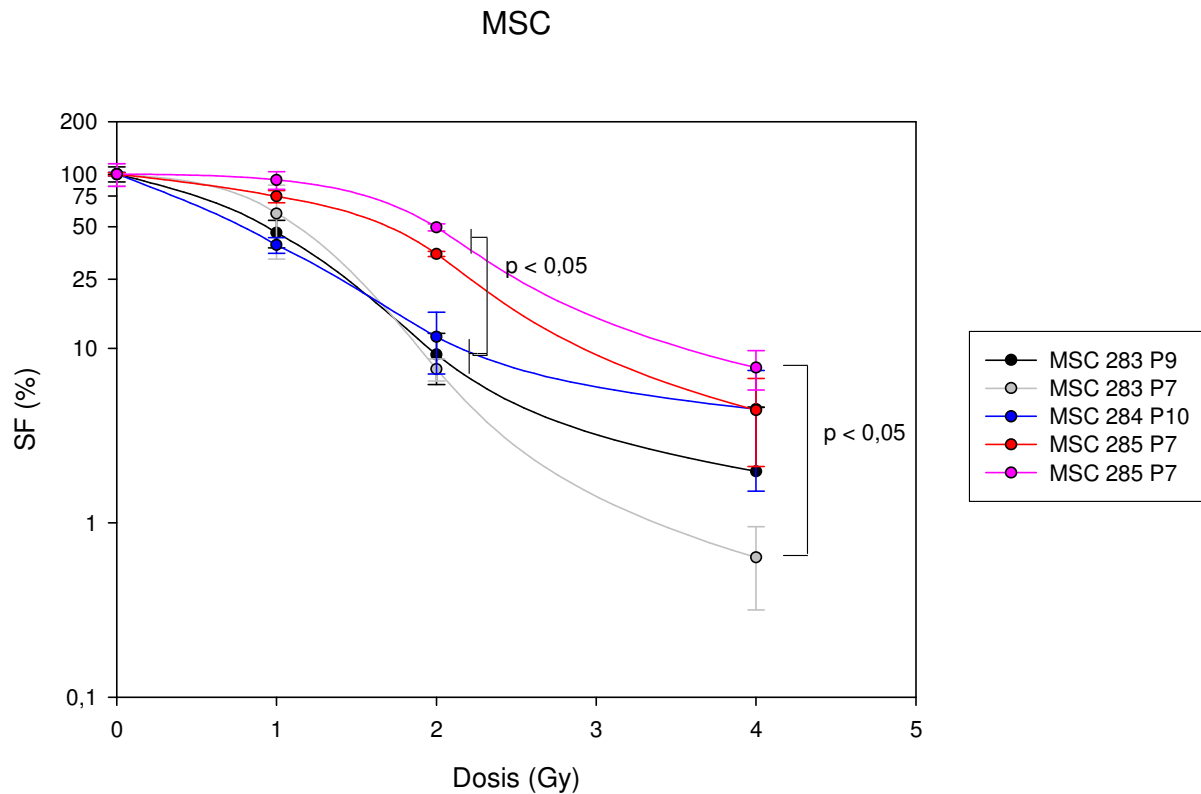


Abb. 9a: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung von MSC 283, MSC 284 und MSC 285 aus verschiedenen Passagen (P), dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen den gekennzeichneten Werten ist der Unterschied signifikant ($p < 0,05$).

MSC und Fibroblasten (NHDF, HS68)

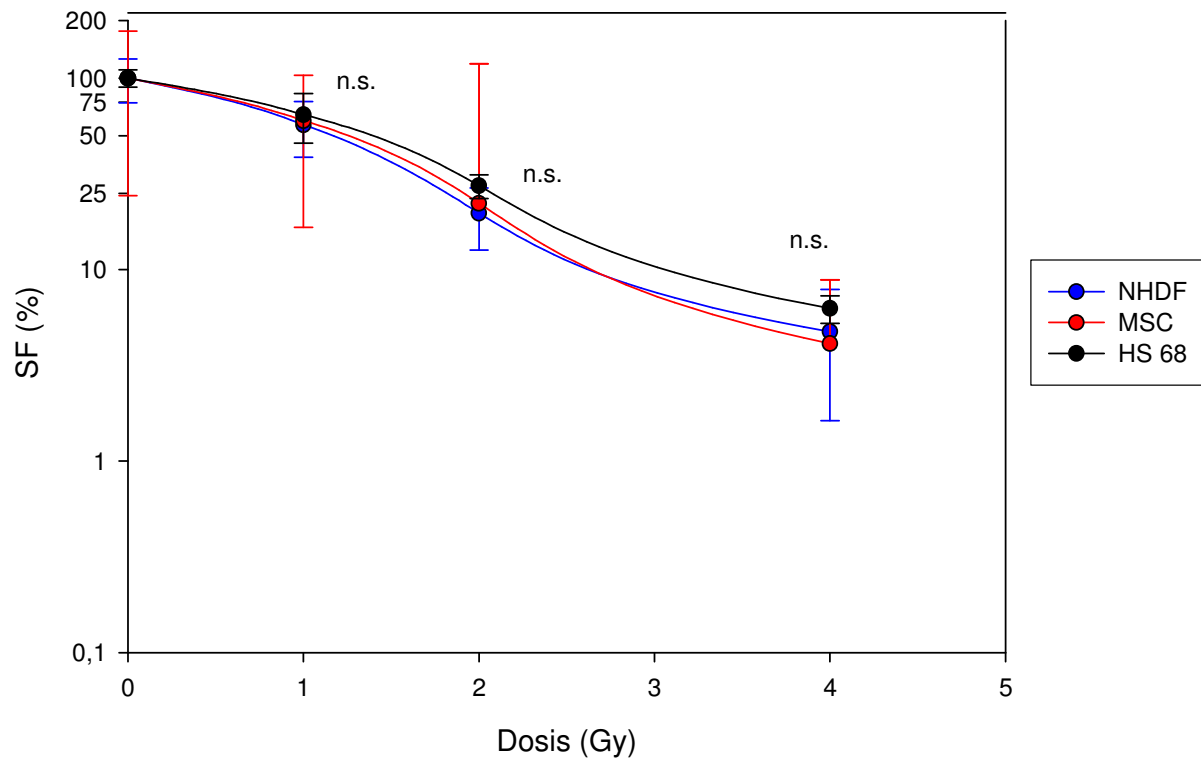


Abb. 9b: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung, Mittelwerte aller MSC aus den oben abgebildeten fünf Versuchsreihen (Abb. 1b) mit Standardabweichung, Fibroblasten und HS68: Mittelwerte aus

sechs bzw. drei Versuchen mit Standardabweichung. Der Unterschied zwischen den drei Zellarten ist nicht signifikant (n.s.).

Tab. 1: Werte zu Abb. 9a und b: Anzahl der ausplattierten Zellen, Bestrahlungsdosis und Mittelwerte aus je drei Versuchen (%) +/- Standardabweichung

Zellen plattiert	Dosis Gy	MSC 283 P7	MSC 283 P9	MSC 284 P10	MSC 285 P7	MSC 285 P7
3000	0	100,00+/-14,27	100,00+/-9,93	100,00+/-2,47	100,00+/-2,12	100,00+/-14,91
3000	1	59,49+/-26,94	46,05+/-8,22	39,18+/-4,01	74,44+/-6,10	92,51+/-13,60
6000	2	7,59+/-1,10	9,21+/- 3,01	11,63+/-4,51	34,83+/-1,22	49,47+/-3,34
12000	4	0,63+/-0,32	1,97+/-2,61	4,49+/-2,97	4,42+/-2,32	7,75+/-2,14
20000	10	0,00+/-0,00	0,00+/- 0,00	0,00+/-0,00	0,00+/-0,00	0,00+/-0,00

Zellen plattiert	Dosis Gy	Fibroblasten	Fibroblasten	HS 68
1000	0	100,00+/-9,52	100,00+/-14,2	100,00+/-10,52
1000	1	60,32+/-3,17	51,64+/-3,92	64,33+/-18,56
2000	2	21,03+/-2,78	17,62+/-3,76	27,39+/-3,86
6000	4	6,22+/-0,4	2,46+/-0,71	6,29+/-1,02
20000	10	0,00+/-0,00	0,00+/-0,00	0,00+/-0,00

Die durchschnittlichen Überlebensfraktionen nach Bestrahlung aller MSC glichen denen der NHDF und HS68, so dass sich ähnliche Kurven ergeben (Abb. 9b). Die MSC der drei verschiedenen Spender reagierten dagegen unterschiedlich auf Bestrahlung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) waren bei 2 und bei 4 Gy erkennbar. MSC 285 waren resistenter als MSC 283 und MSC 284. Bei einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy betrug die Überlebensfraktion der MSC 283 weniger als 10%, MSC 285 hingegen wiesen Überlebensfraktionen von durchschnittlich 42 % auf (Abb. 9a).

4.2.2.Klonogenes Überleben nach Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren

Zunächst wurde der Einfluss des TGF- β -Rezeptor-Serin/Threoninkinaseinhibitors (LY2109761), des Abl/ PDGFR/ c-kit- Tyrosinkinaseinhibitors (SU14816) und des VEGFR-/PDGFR-/ c-kit /flt3 -Tyrosinkinaseinhibitors (SU11657) auf das klonogene Überleben untersucht. Wie bei den Versuchen mit Bestrahlung wurden die Kolonien gezählt, wenn in den Kontrollflaschen Kolonien gewachsen waren (NHDF: nach 5-6 Tagen, HS68: nach 10 Tagen, MSC: nach 21 Tagen). Da sich deutliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den Inhibitoren zeigten, wurden unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. In Abbildungen 10a-c sind die entsprechenden Überlebensfraktionen dargestellt.

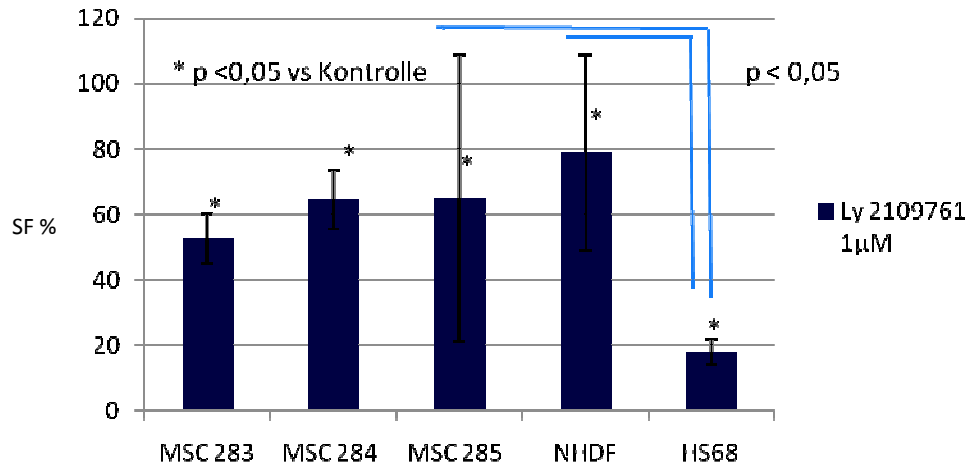


Abb. 10a: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit LY2109761, dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen den durch blaue Linien gekennzeichneten Zelllinien sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$). Bei allen Zellen (gekennzeichnet mit *) ist der Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle (100%) signifikant.

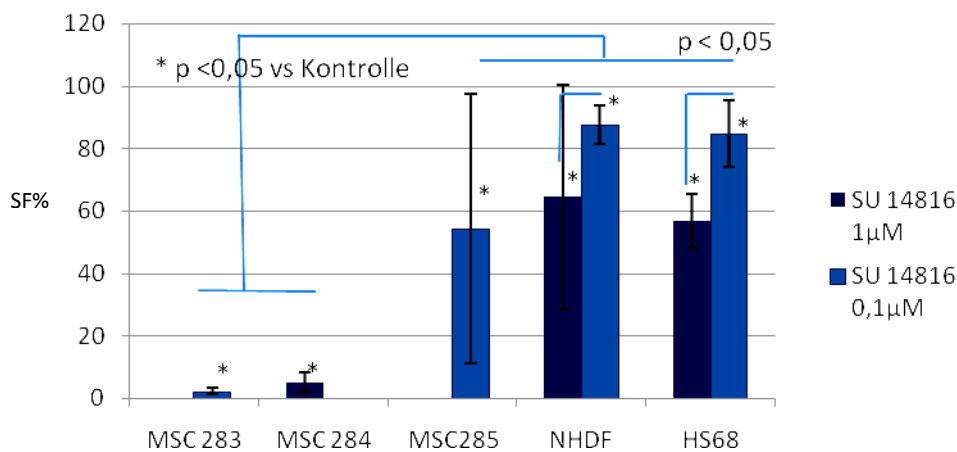


Abb. 10b: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit SU14816, dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen den durch blaue Linien gekennzeichneten Zelllinien sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$). Bei allen Zellen (gekennzeichnet mit *) ist der Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle (100%) signifikant.

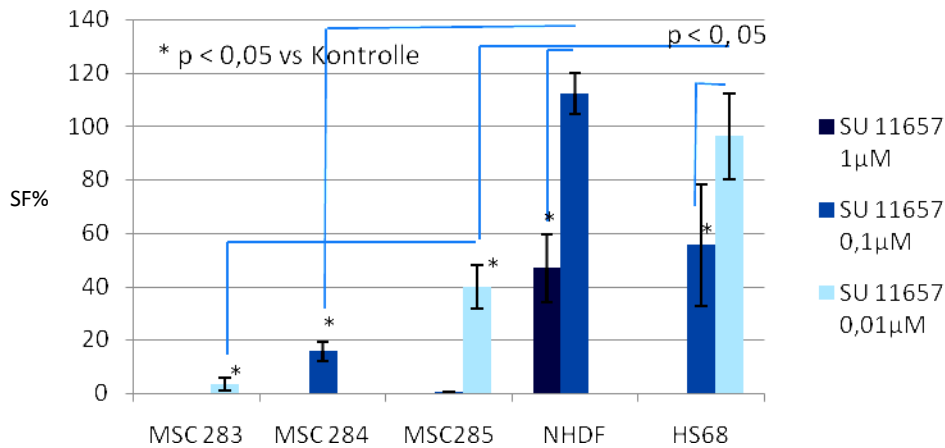


Abb. 10c: Klonogenes Überleben nach Behandlung mit SU11657, dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen durch blaue Linien gekennzeichneten Zelllinien sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$). Bei den mit * gekennzeichneten Zellen ist der Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle (100%) signifikant.

Es wurden für jede Substanz je mindestens drei Versuche mit MSC 283, MSC 284, MSC 285, NHDF und HS68, in denen die Zellen mit LY2109761, SU14816 oder SU11657 in einer Konzentration von 1 µmol/l behandelt wurden, durchgeführt. Alle Substanzen führten in dieser hohen Konzentration zu einer Reduktion der Koloniebildung. Da es nach der Behandlung mit SU11657 und SU14816 bei den MSC und zum Teil auch bei den HS68 zu keiner oder fast keiner Kolonienbildung kam, wurde diese Substanzen zusätzlich in einer Konzentration von 0,1 µmol eingesetzt. Die Konzentration von SU11657 wurde bei den MSC283 und MSC 285 auf 0,01 µmol/l weiterverringert, da auch bei einer Konzentration von 0,1 µmol/l keine Kolonien gewachsen waren. Insgesamt zeigten alle Zellen bei allen drei Substanzen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Koloniebildung.

Der TGF-β-Rezeptor-Serin/Threoninkinaseinhibitor LY2109761 führte in einer Konzentration von 1 µM bei allen Zellen zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) der Koloniebildung (Abb.10a). HS68 reagierten mit einer Überlebensfraktion von 17 % am sensitivsten. Die Überlebensfraktion der MSC lag bei durchschnittlich ca. 60%. Die Überlebensfraktion der NHDF lag bei durchschnittlich über 80%.

Auch der Tyrosinkinaseinhibitor SU14816, der PDGF- Rezeptoren, die Abl-Tyrosinkinase und c-kit hemmt, führte bei allen Zellen zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) der Koloniebildung (Abb.10b). Die MSC reagierten empfindlicher auf SU14816 als die NHDF

und HS68, die sehr ähnlich reagierten. Bei einer Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ überlebten fast keine MSC, bei den Fibroblasten (NHDF und HS68) etwa die Hälfte. Bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{mol/l}$ überlebte ungefähr $1/3$ der MSC, bei den Fibroblasten (NHDF und HS68) betrug die Überlebensfraktion mehr als 80%. Die MSC verschiedener Spender reagierten unterschiedlich ($p < 0,05$) auf SU 14816. Die MSC 283 waren am empfindlichsten, die MSC 284 am resistantesten: Bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ bildeten nur die MSC 284 Kolonien. Die Überlebensfraktion betrug 5%. MSC 283 und MSC 285 bildeten keine Kolonien. Bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ betrug die Überlebensfraktion der MSC 285 durchschnittlich 46%, die der MSC283 aber nur 2%.

Die Zellen reagierten sehr unterschiedlich auf den VEGFR/ PDGFR/ c-kit/ flt3 - Tyrosinkinaseinhibitor SU11567 (Abb.10c). Während die Kolonienbildung der MSC auch bei niedrigen Konzentrationen von $0,1\mu\text{mol/l}$ und $0,01\mu\text{mol/l}$ sehr stark gehemmt wurde, reagierten die Fibroblasten wenig empfindlich. Vor allem der Unterschied zwischen MSC und NHDF war beträchtlich. Eine Konzentration von $0,1\mu\text{mol/l}$, die die Kolonienbildung der MSC fast vollständig hemmte, führte bei den NHDF zu keiner Hemmung des Wachstums. Die Überlebensfraktion der NHDF betrug 112%. Von den HS68 überlebten mehr als die Hälfte. Auch bei zehnfacher Verdünnung dieser Konzentration war das Wachstum der MSC stark gehemmt (3-40% SF). Diese Konzentration führte dann auch bei den HS68 zu keiner signifikanten Reduktion, die Überlebensfraktion betrug fast 100%. Eine hohe Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ überlebten nur die NHDF. Erst bei dieser hohen Konzentration war die Kolonienbildung der NHDF signifikant ($p < 0,05$) reduziert. Diese Konzentration führte bei den MSC zu so einer starken Schädigung, dass keine Zellen mehr erkennbar waren. Die Morphologie der Fibroblasten war unverändert. Auch zwischen den MSC der verschiedenen Spender zeigten sich signifikante Unterschiede. Bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{mol/l}$ bildeten von den MSC nur die MSC 284 Kolonien. Die Überlebensfraktion betrug 15%. Bei einer zehnfachen Verdünnung bildeten auch die MSC 285 und die MSC 283 Kolonien, die Überlebensfraktion der MSC283 betrug allerdings nur 3%. Insgesamt sind die Unterschiede bei diesem Tyrosinkinaseinhibitor am größten. Eine Konzentration, die keinen Effekt bei den NHDF hervorrief, führte selbst noch in zehnfacher Verdünnung bei den MSC zu einer starken Hemmung der Koloniebildung.

4.2.3. Klonogenes Überleben nach Bestrahlung und Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren

Um den kombinierten Effekt der Kinaseinhibitoren mit Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Zellen 2 Stunden vor der Bestrahlung mit den Inhibitoren inkubiert. Die Konzentration der Inhibitoren wurde konstant gehalten, die Strahlendosis wurde variiert.

In den unten aufgeführten Abbildungen 11a-d ist das klonogene Überleben der verschiedenen Zelllinien nach 3 Wochen (MSC), 10 Tagen (HS68) und 7 Tagen (NHDF) nach Bestrahlung und zusätzlicher Behandlung mit dem TGF β R-Serin/Threoninkinaseinhibitor (LY 2109761), dem Abl/ PDGFR/ c-kit- Tyrosinkinaseinhibitors (SU14816) und dem VEGFR- /PDGFR-/ c-kit /flt3 -Tyrosinkinaseinhibitors (SU11657) dargestellt.

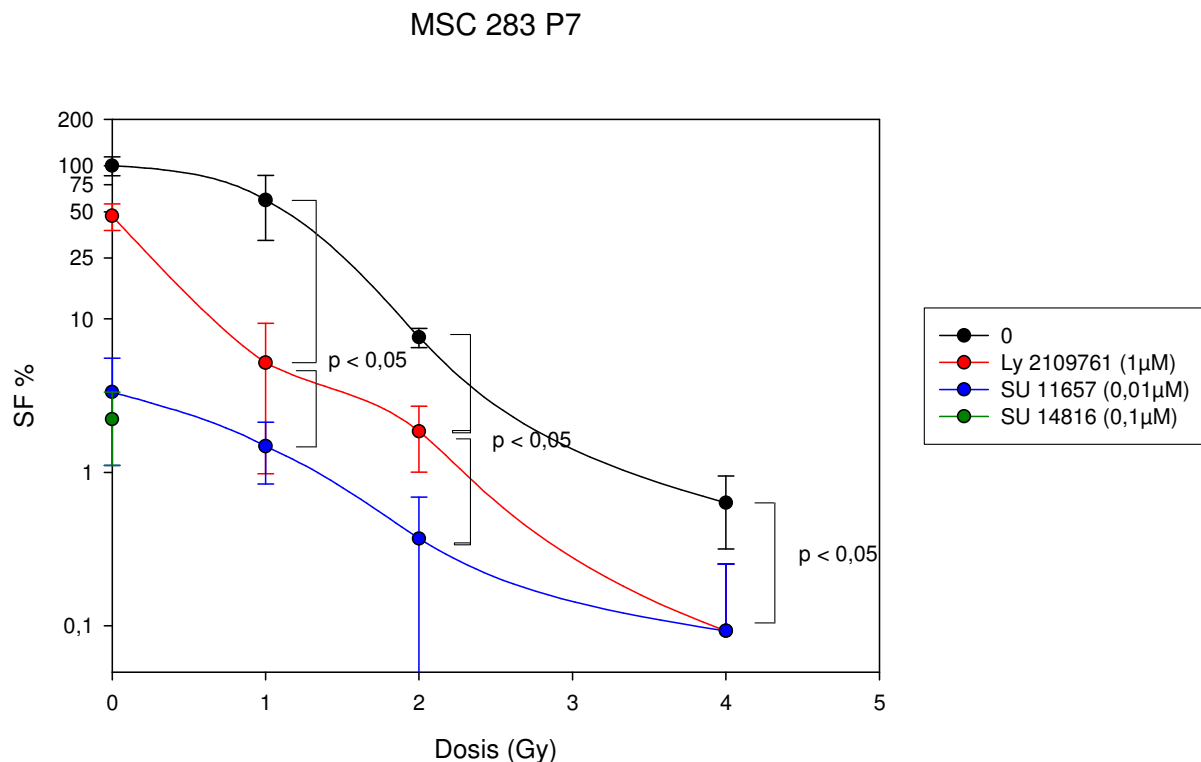


Abb. 11a: Klonogenes Überleben (Überlebensfraktion SF in %) der MSC 283 P7 nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen gekennzeichneten Überlebensfraktionen sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

MSC 285 P7

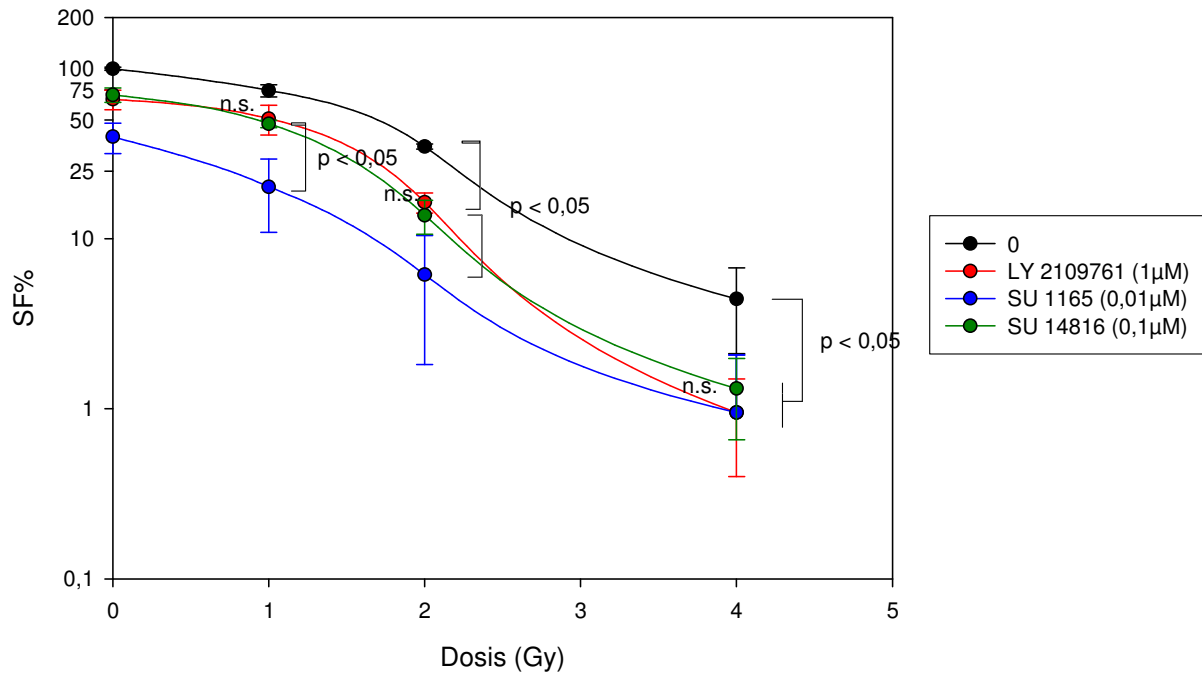


Abb. 11b: Klonogenes Überleben (Überlebensfraktion SF in %) der MSC 285 P7 nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen gekennzeichneten Überlebensfraktionen sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$). Bei den mit n.s. gekennzeichneten Werten sind die Unterschiede zueinander nicht signifikant.

HS 68

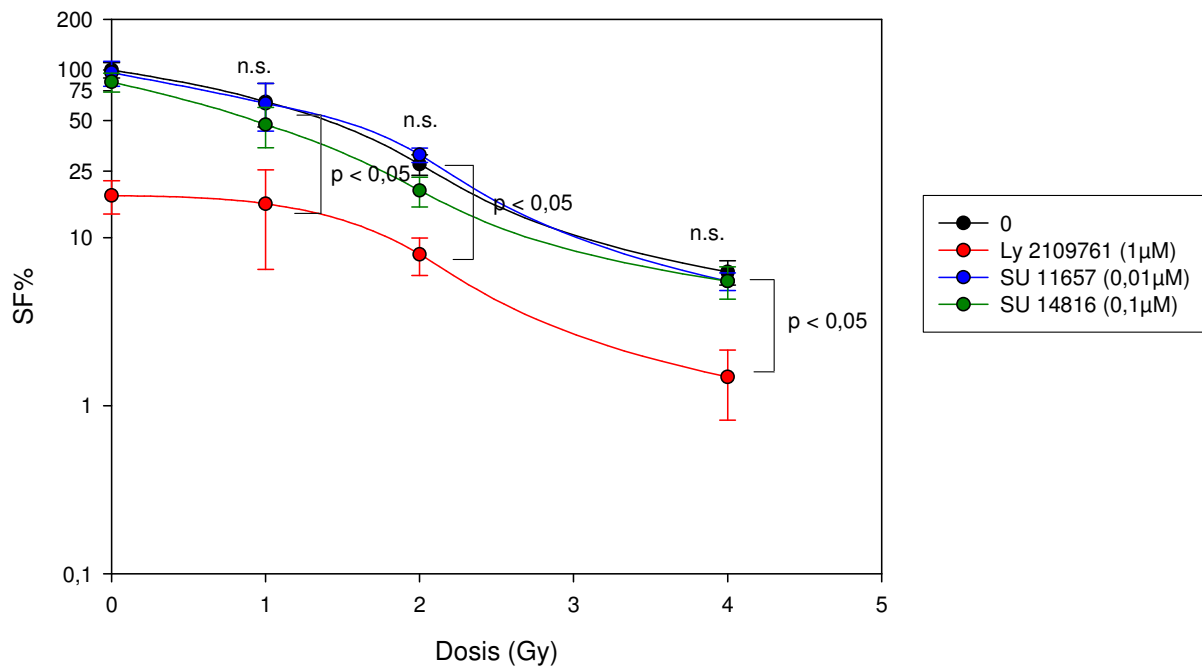


Abb. 11c: Klonogenes Überleben (Überlebensfraktion SF in %) der HS68 nach Bestrahlung und Behandlung mit LY 2109761, SU 11657, SU 14816. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen gekennzeichneten Überlebensfraktionen sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$). Bei den mit n.s. gekennzeichneten Werten sind die Unterschiede zueinander nicht signifikant.

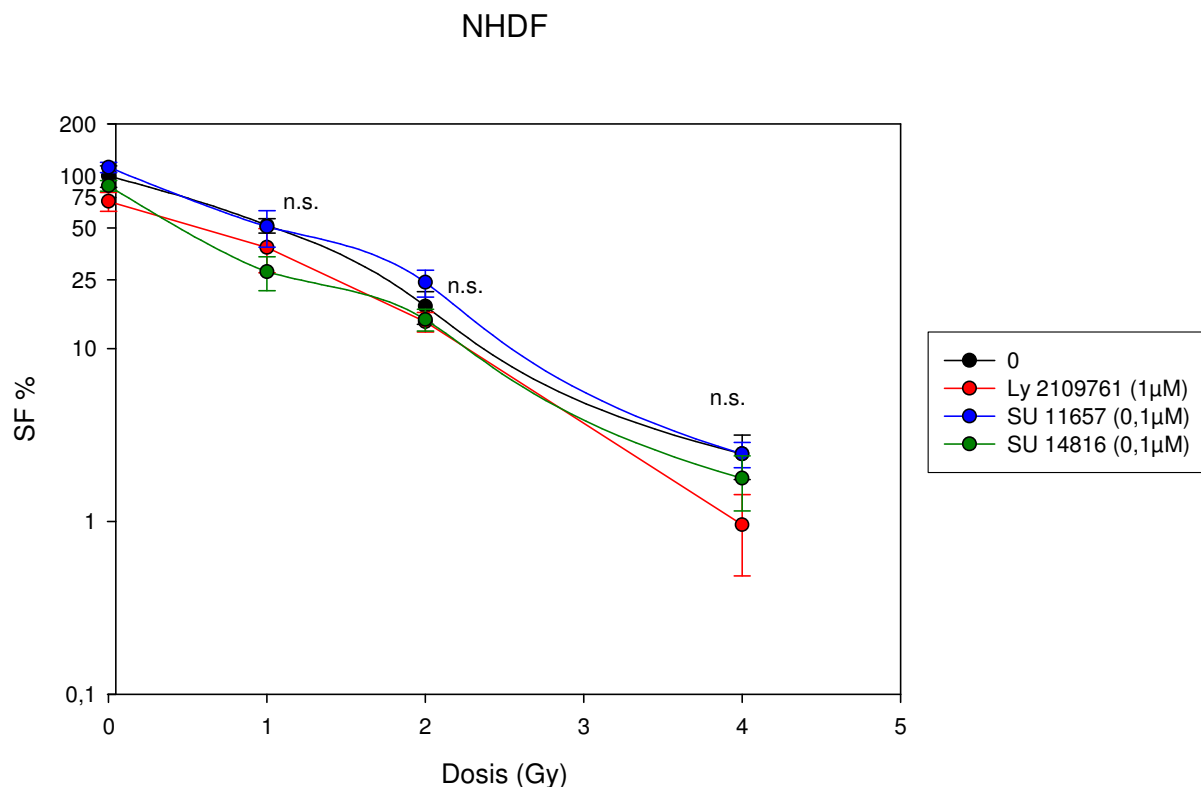


Abb. 11d: Klonogenes Überleben (Überlebensfraktion SF in %) der Fibroblasten nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen den mit n.s. gekennzeichneten Überlebensfraktionen sind die Unterschiede nicht signifikant.

Die Kombination konstanter Inhibitorenkonzentrationen mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen führte zu einer weiteren Reduktion der Überlebensfraktion (Abb.11 a-d). Ein additiver Effekt der kombinierten Behandlung war bei allen Zellen erkennbar. Sowohl auf die Bestrahlung als auch auf die kombinierte Behandlung reagierten die MSC 283 empfindlicher als die MSC 285. Vor allem bei der kombinierten Behandlung mit SU14816 zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Zelllinien. Bei einer Dosis von 1 Gy betrug die Überlebensfraktion der MSC 285 noch mehr als 50 %. Die MSC 283 hingegen bildeten keine Kolonien mehr.

Wie oben bereits beschrieben, scheint SU11657 in Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,01 $\mu\text{mol/l}$ keinen starken Effekt hinsichtlich der Kolonienbildung auf NHDF und HS68 zu haben. Auch die Kombination mit Bestrahlung hemmt das Kolonienwachstum nicht stärker als die Bestrahlung alleine, beide Kurven verlaufen ähnlich. Bei den HS68 führte nur die kombinierte Behandlung mit LY2109761 und mit Bestrahlung zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) der Kolonienbildung im Vergleich zur Bestrahlung alleine. Bei den NHDF verlaufen alle Kurven nah beieinander. Die kombinierte Behandlung mit LY2109761 oder SU14816 scheint die Koloniebildung nur geringgradig zu reduzieren.

4.3. Zellproliferation

Um die Proliferation/ Viabilität der Zellen nach Bestrahlung und/ oder Behandlung mit Kinaseinhibitoren zu bestimmen, wurden die Zellen in einer bestimmten Menge ausgesät, bestrahlt und/ oder mit LY2109761, SU11657 und SU14816 behandelt und 5 Tage inkubiert. Danach wurden die Zellen gezählt.

4.3.1. Zellproliferation nach Bestrahlung

Es wurden für jede Zelllinie mindestens sechs Versuche, in denen die Zellen mit 1,2 4, und 10 Gy bestrahlt wurden, durchgeführt.

In den Diagrammen sind die Beziehungen zwischen der Zellzahl der bestrahlten Zellen und der Bestrahlungsdosis in halblogarithmischen Kurven dargestellt.

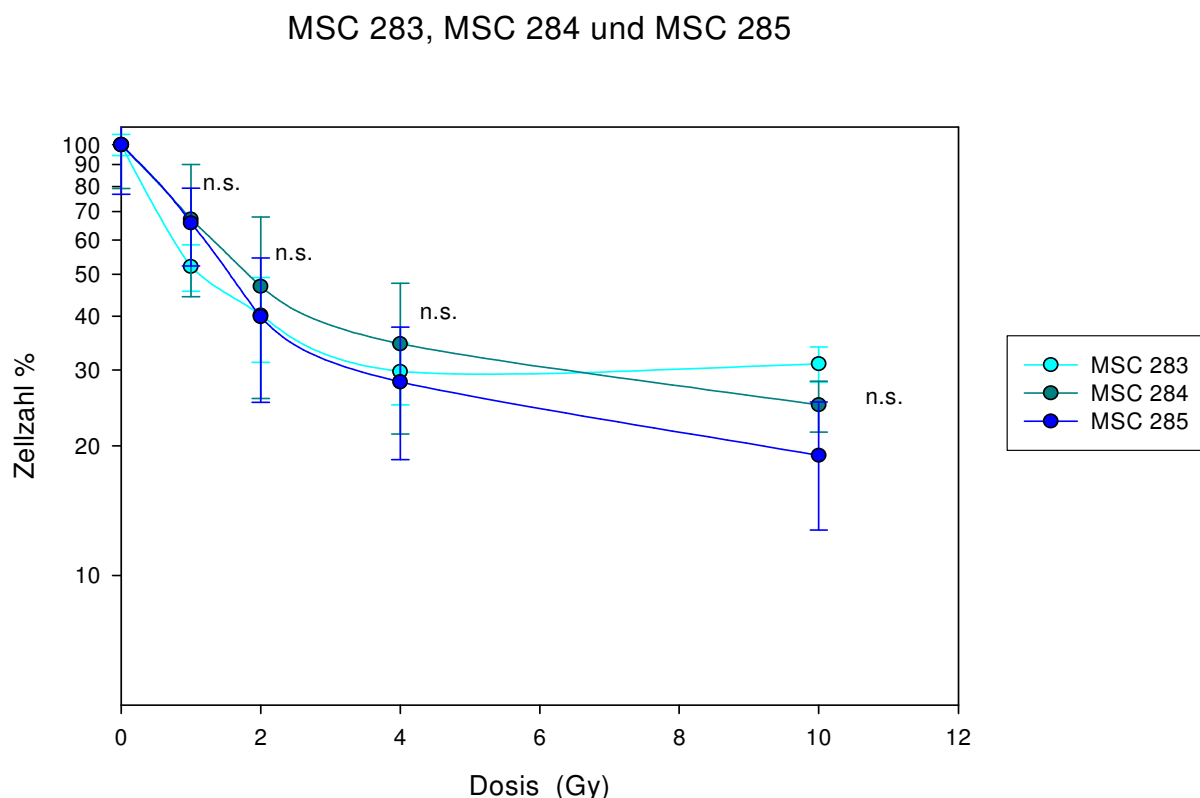


Abb. 12a: Proliferation (% der Zellzahl der nicht bestrahlten Kontrollzellen) der MSC nach Bestrahlung, dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens sechs Versuchen mit Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den 3 Zelllinien sind nicht signifikant (n.s.).

MSC und Fibroblasten (NHDF, HS68)

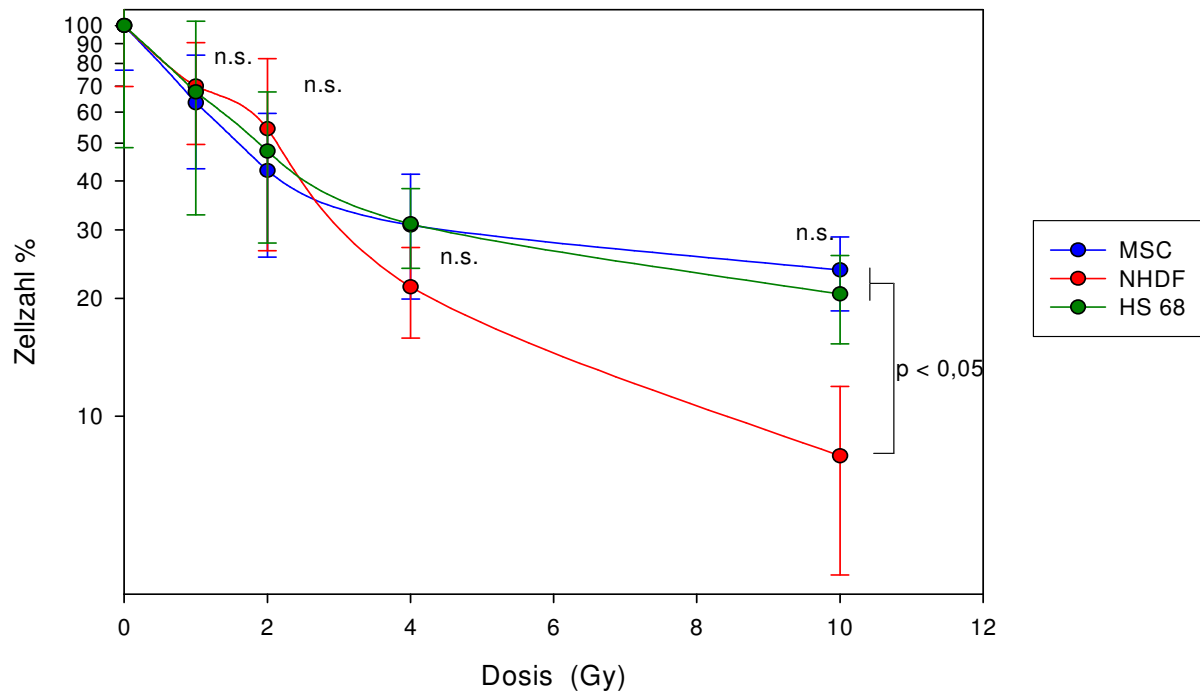


Abb.12b: Proliferation (% der Zellzahl der nicht bestrahlten Kontrollzellen) der MSC und Fibroblasten nach Bestrahlung. MSC: Mittelwerte von MSC 283, MSC 284 und MSC 285 aus Abb. 6b mit Standardabweichung, HS68 und NHDF: Mittelwerte aus mindestens sechs Versuchen mit Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen den Zellen sind als nicht signifikant (n.s.) oder signifikant ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

Die Proliferation der drei MSC-Linien wurde bis zu einer Dosis von 4 Gy ähnlich stark gehemmt (Abb. 12a). Bei 10 Gy war der prozentuale Anteil der Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen der MSC 283 mit 31% etwas größer als der von MSC 284 und 285 mit entsprechend 25 und 19%.

Die Proliferation aller Zellen wurde durch die Bestrahlung gehemmt (Abb. 12b). In der Abbildung ist zu sehen, dass die Proliferation von MSC, HS68 und NDHF bis zu einer Dosis von 2 Gy in vergleichbarem Maß abnimmt. Die Kurve der NHDF fällt bei höheren Dosen steiler ab, d.h. die Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen war nach Bestrahlung mit 4 und 10 Gy niedriger als der der MSC und HS68. Bei 10 Gy betrug er nur noch 8% im Vergleich zu ca. 25% bei MSC und HS68.

4.3.2. Zellproliferation nach Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren

Die Auswirkung des TGF β R-Serin/Threoninkinaseinhibitors (LY2109761), des Abl/ PDGFR/ c-kit- Tyrosinkinaseinhibitors (SU14816) und des VEGFR- /PDGFR-/ c-kit /flt3 - Tyrosinkinaseinhibitors (SU11657) auf die Zellproliferation wurde untersucht.

Es wurden Versuche mit MSC 284, MSC 285, HS68 und NHDF, in denen die Zellen mit $1\mu\text{M}$ LY2109761, SU11657 und SU14816 behandelt wurden, durchgeführt. Die Proliferationsrate nach Behandlung mit LY2109761, SU11657 und SU14816 ohne Bestrahlung sind in den Säulendiagrammen 13a-c dargestellt.

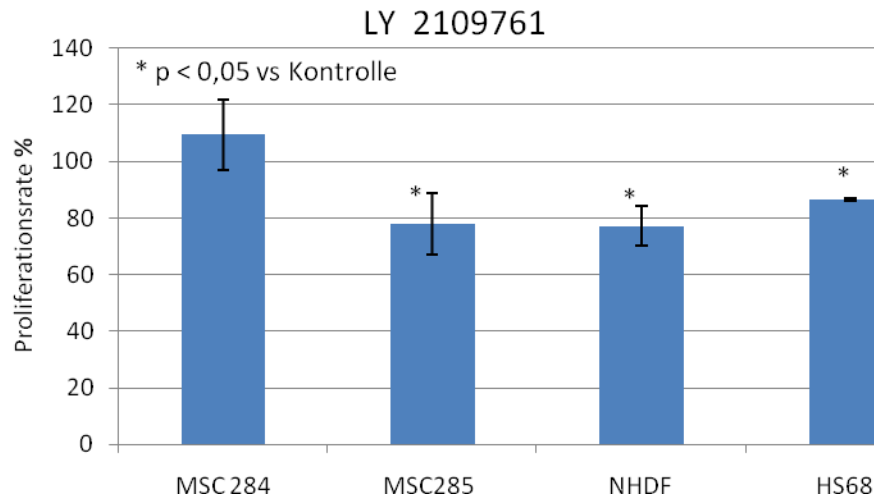


Abb.13a: Proliferation nach Behandlung mit LY2109761. Zellzahl in % im Vergleich zu Kontrollzellen, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Bei den mit * gekennzeichneten Zellen ist der Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle (100%) signifikant

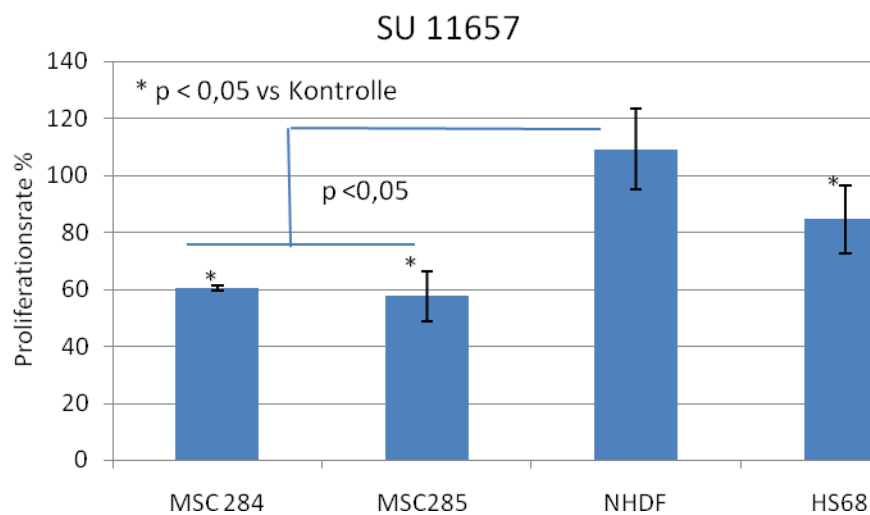


Abb. 13b: Proliferation nach Behandlung mit SU11657. Zellzahl in % im Vergleich zu Kontrollzellen, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Zwischen durch blaue Linien gekennzeichneten Zelllinien sind die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$). Bei den mit * gekennzeichneten Zellen ist der Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle (100%) signifikant.

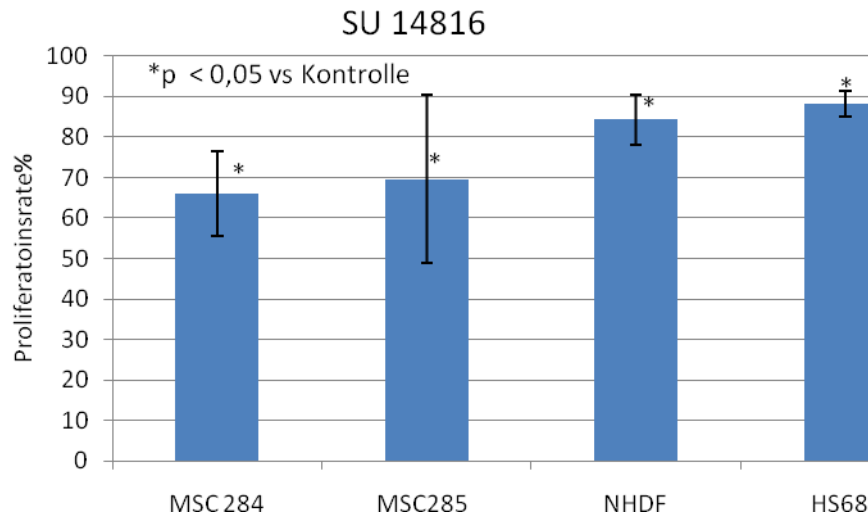


Abb. 13c: Proliferation nach Behandlung mit SU14816, Zellzahl in % im Vergleich zu Kontrollzellen, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Bei allen Zellen (gekennzeichnet mit *) ist der Unterschied zur nicht behandelten Kontrolle (100%) signifikant.

In den meisten Fällen führte die Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren zu einer Reduktion der Zellzahl. Nach einer Behandlung mit LY2109761 war die Zellzahl der MSC 284 nicht signifikant verändert. Bei allen anderen Zellen führte die Behandlung mit LY2109761 zu einer Reduktion der Zellzahl (Abb. 13a). MSC 285 und NHDF reagierten am empfindlichsten mit Überlebensfraktionen von ca. 77%. Ein eindeutiger Unterschied ($p < 0,05$) in der Reaktion war bei der Behandlung mit SU11657 zwischen MSC und NHDF zu erkennen. Die Zellzahl der MSC war auf ca. 60% reduziert. Die NHDF hingegen zeigten keine signifikante Reaktion (Abb. 13b). Auch durch die Behandlung mit SU14816 wurde die Zellzahl der MSC deutlich reduziert (ca. 66% und 70%). Insgesamt schienen die MSC empfindlicher auf SU11657 und SU14816 zu reagieren als die Fibroblasten (NHDF und HS68). Bei der Behandlung mit LY2109761 reagierten die MSC verschiedener Spender unterschiedlich. Die MSC schienen aber in dem Fall nicht empfindlicher zu sein als die Fibroblasten (Abb. 13c).

4.3.3. Zellproliferation nach Bestrahlung und Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren

Um den kombinierten Effekt von Bestrahlung und Rezeptorkinaseinhibitoren zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich zu der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen mit einer konstanten Konzentration (1 μM) von Rezeptor- Kinaseinaseinhibitoren behandelt.

In den unten aufgeführten Abbildungen 14a-d ist die Proliferation der verschiedenen Zelllinien nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU14816 und SU1165 (jeweils in der einer Konzentration von 1 μM) dargestellt.

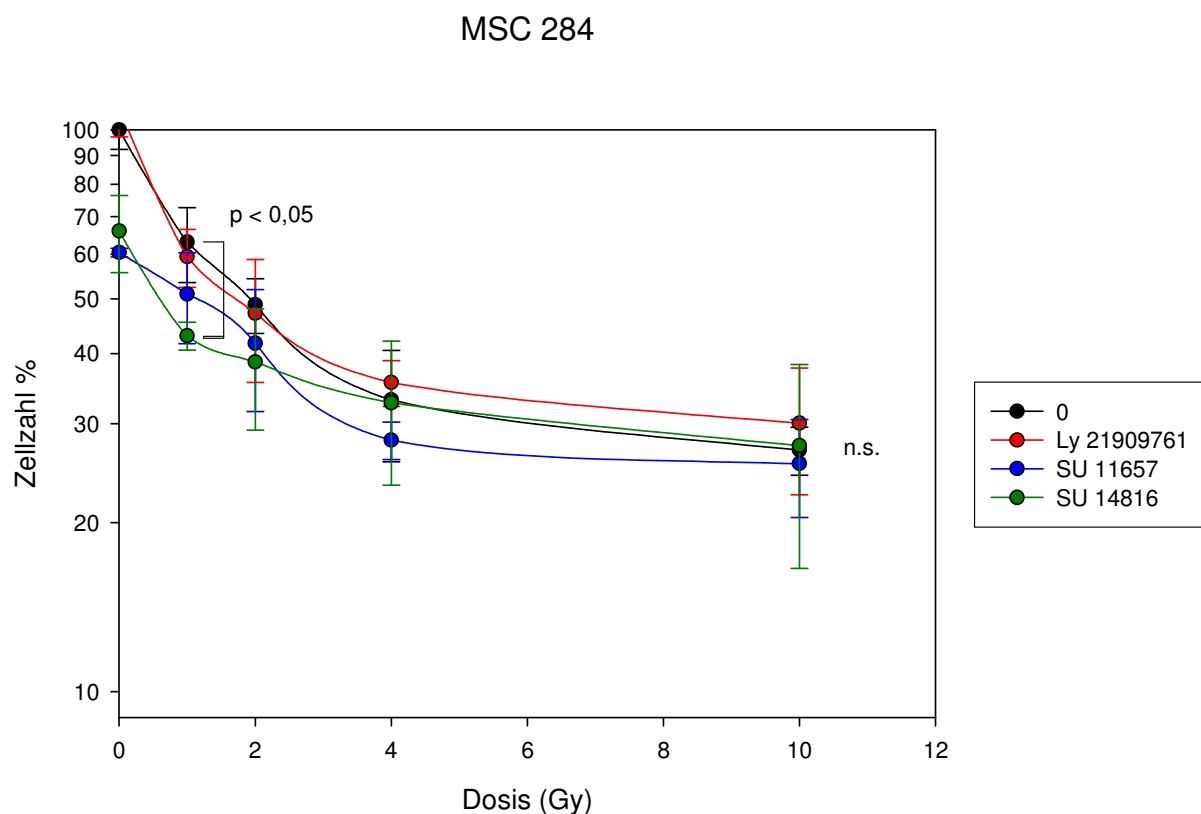


Abb.14a: Proliferationsrate der MSC 284 nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet ($p < 0,05$). Bei einer Dosis von 10 Gy sind die Unterschiede nicht signifikant (n.s.).

MSC 285

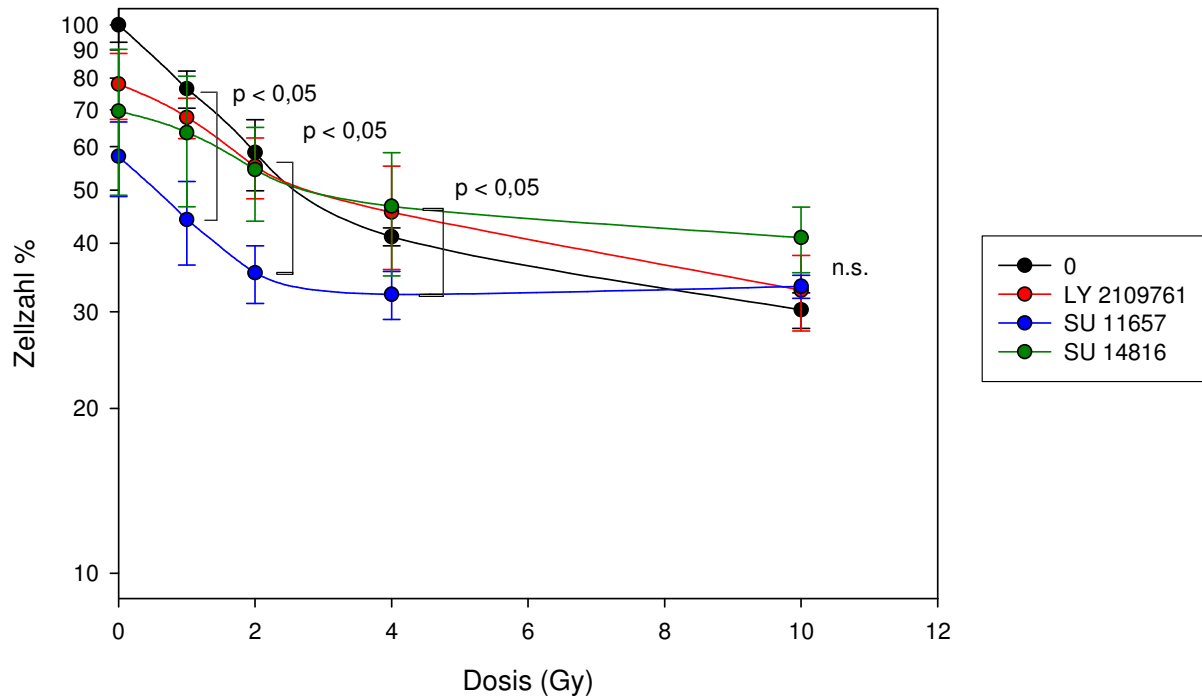


Abb.14b: Proliferationsrate der MSC 285 nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet ($p < 0,05$). Bei einer Dosis von 10 Gy sind die Unterschiede nicht signifikant (n.s.).

NHDF

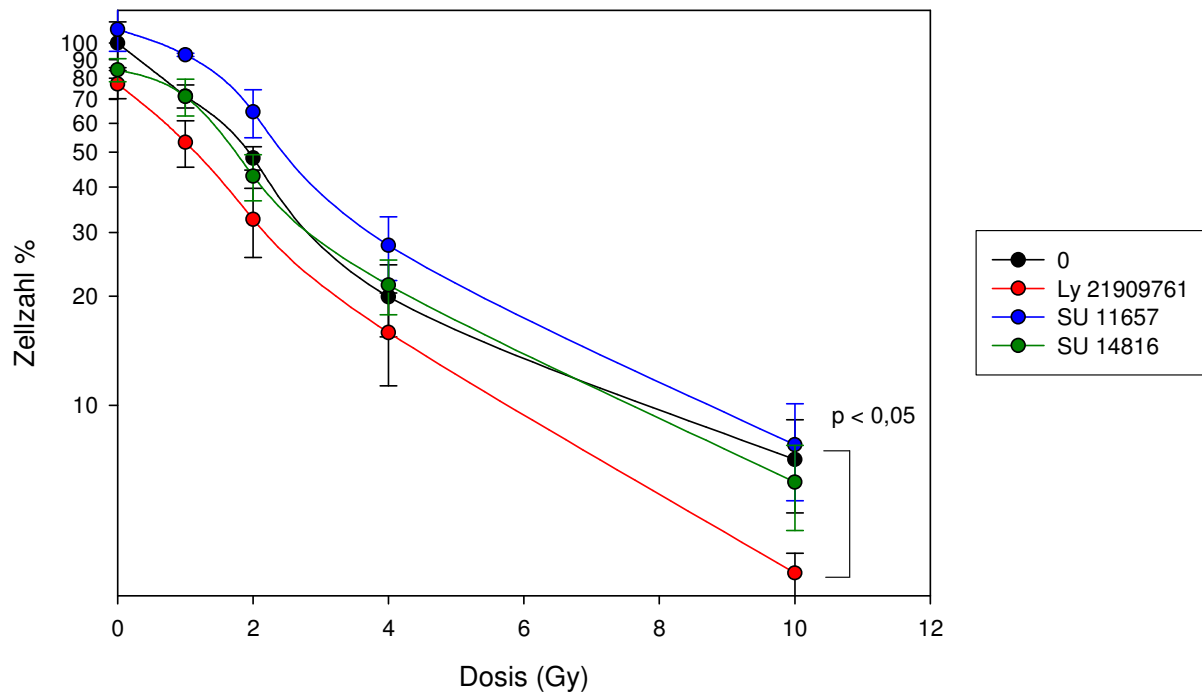


Abb.14c: Proliferationsrate der Fibroblasten nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet ($p < 0,05$).

HS68

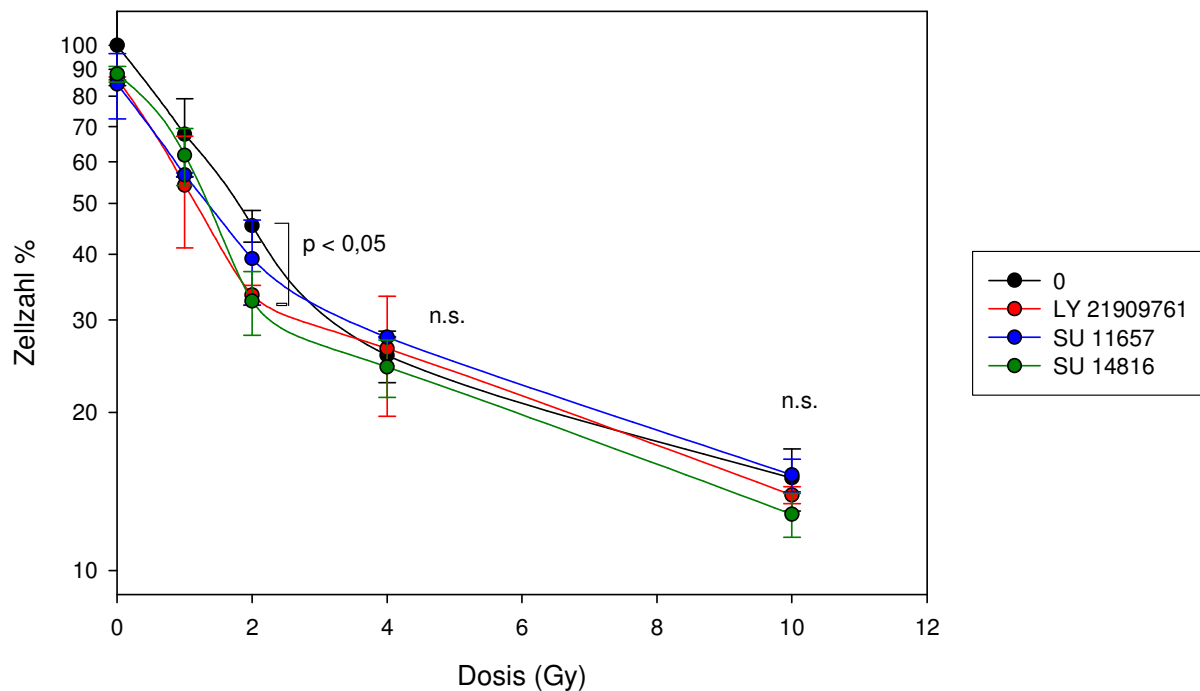


Abb.14d: Proliferation (% der Zellzahl der nicht bestrahlten Kontrollzellen) der HS68 nach Bestrahlung und Behandlung mit LY2109761, SU11657, SU14816, dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet ($p < 0,05$). Bei einer Dosis von 4 und 10 Gy sind die Unterschiede nicht signifikant (n.s.).

Die Bestrahlung reduzierte die Zellzahl bei allen Zellen. Es war nicht immer ein additiver Effekt bei der zusätzlichen Behandlung mit Kinaseinhibitoren erkennbar. Besonders bei der Bestrahlung mit hohen Dosen waren die Effekte von kombinierter Behandlung und Bestrahlung alleine ähnlich. Bei den MSC 284 bewirkte die Bestrahlung alleine keinen deutlich unterschiedlichen Effekt verglichen mit einer Kombination aus einer Behandlung mit LY2109761 und Bestrahlung. Die Kombination von Bestrahlung und den Tyrosinkinaseinhibitoren SU11657 und SU14816 führte bei kleinen Bestrahlungsdosen (1 und 2 Gy) zu einer stärkeren Hemmung des Zellwachstums als Bestrahlung alleine. Bei hohen Dosen von 10 Gy und teilweise auch von 4 Gy verlor sich der Effekt (Abb. 14a). Bei den MSC 285 bewirkte eine Kombination von LY2109761 oder SU14816 mit Bestrahlung ab einer Dosis von 2 Gy keine weitere Reduktion im Vergleich zu nur bestrahlten Zellen, obwohl LY 2109761 oder SU14816 alleine einen deutlichen Effekt auf das Zellwachstum hatten, der auch noch bei einer Dosis von 1 Gy vorhanden zu sein schien. Eine kombinierte Behandlung mit SU11657 führte zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,05$) der Zellzahl bis zu einer Dosis von 4 Gy. Bei einer Dosis von 10 Gy gab es wie bei den MSC 284 keinen deutlichen Unterschied zwischen Bestrahlung alleine und einer kombinierten Behandlung (Abb. 14b).

Die NHDF reagierten auf Bestrahlung alleine und auf eine kombinierte Behandlung mit den Tyrosinkinaseinhibitoren SU 11657 oder SU14816 ähnlich. Nur eine kombinierte Behandlung mit LY 2109761 führte zu einer weiteren Reduktion der Zellzahl, die sich vor allem bei einer Dosis von 10 Gy bemerkbar machte ($p < 0,05$, Abb.14c). Die Kurven der HS68 verliefen ähnlich. Ein Unterschied machte sich am ehesten bei einer Dosis von 2 Gy bemerkbar. Eine Kombination mit SU14826 oder LY2109761 führte bei dieser Dosis zu einer Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu den nur bestrahlten Vergleichszellen ($p < 0,05$). Bei Dosen von 4 und 10 Gy zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Bestrahlung alleine und einer kombinierten Behandlung (Abb.14d).

4.4. Apoptosemessung und Zellzyklusbestimmung

Um den Einfluss von Photonenstrahlung auf die Apoptoserate und den Zellzyklus zu untersuchen wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit einem Durchflußzytometer analysiert.

Für die Messung der Apoptose und des Zellzyklus wurden für MSC und Fibroblasten unterschiedliche Zeitpunkte bestimmt, da die Verdopplungszeit der Fibroblasten sehr viel kürzer war. Für die Fibroblasten wurde als letzter Zeitpunkt 96 Stunden nach Bestrahlung gewählt, weil die Zellen zu diesem Zeitpunkt in den Kulturflaschen schon sehr dicht gewachsen waren. Da die Messung der MSC in den ersten Stunden keine große Veränderung ergab, wurden weitere Zeitpunkte bestimmt und die letzte Messung zwölf Tage nach Bestrahlung durchgeführt. Aus dem Proliferationsversuch ging hervor, dass die Verdopplungszeit der MSC fast 70 Stunden und die der NDHF fast 25 Stunden beträgt. Beide Zellarten wurden also über einen Zeitraum von etwas mehr als ungefähr vier Verdopplungszeiten gemessen.

Die Bestrahlung hatte zu allen Zeitpunkten einen deutlich geringeren Effekt auf den Zellzyklus und die Apoptoserate der Stammzellen als auf die Fibroblasten. Beispielhaft sind hier Histogramme der FACS- Analyse gezeigt. Die Abbildungen 15a und b zeigen MSC 283 und NHDF zu je zwei Zeitpunkten nach der Bestrahlung und die entsprechenden Kontrollzellen ohne Bestrahlung.

Fibroblasten

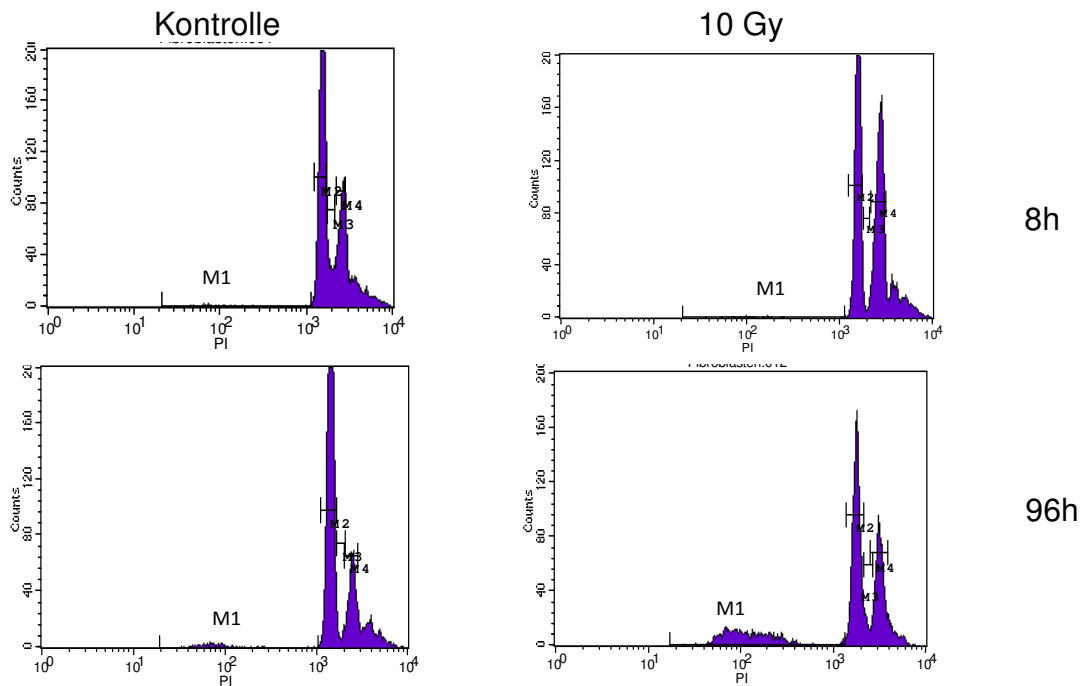


Abb.15a: Fibroblasten (NDHF), Kontrollzellen und mit 10 Gy bestrahlte Zellen 8 und 96 Stunden nach Bestrahlung; PI (log), aufgetragen gegen die Zellzahl; Apoptotische Zellen (M1), Zellen in der G1-Phase (M2), in der S-Phase (M3) und G2-Phase (M4). Nach 8 Stunden befinden sich viele bestrahlte Zellen in der G2-Phase, nach 96 Stunden ist der Anteil apoptotischer bestrahlter Zellen stark gestiegen.

MSC 283

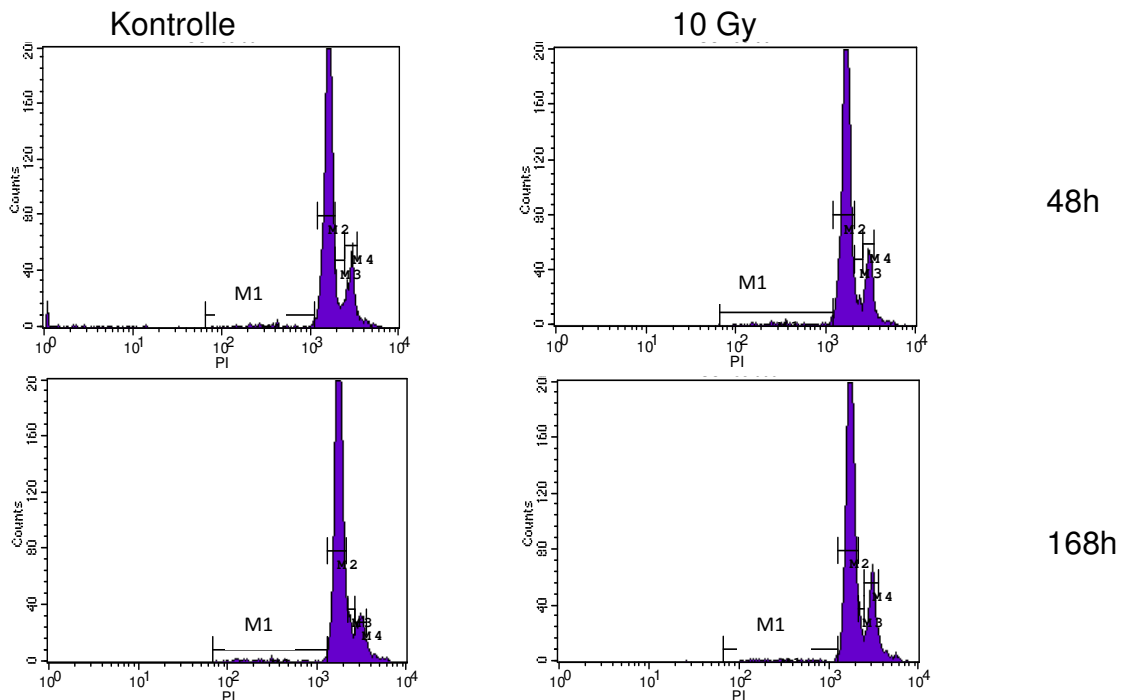


Abb.15b: MSC 283, Kontrollzellen und bestrahlte Zellen (10Gy) 48 und 168 Stunden nach Bestrahlung; PI (log), aufgetragen gegen die Zellzahl; Apoptotische Zellen (M1), Zellen in der G1-Phase (M2), in der S-Phase (M3) und G2-Phase (M4). Unterschied zwischen bestrahlten Zellen und Kontrollzellen sind kaum zu erkennen.

Die Anteile aller Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen wurden in Diagrammen dargestellt. Es wurden Versuchsreihen mit den MSC 283 und 284 und 285 mit den Zeitpunkten 48 und 168 Stunden (Abb. 16a) und zwei Versuchsreihen mit den MSC 285 mit den Zeitpunkten 48, 96, 168 und 288 Stunden (Abb. 16b) durchgeführt. Es wurden je zwei Versuchsreihen mit HS68 (Abb. 16c) und mit NHDF durchgeführt (Abb. 16d) mit den Zeitpunkten 8, 48 und 96 Stunden. Die Versuchsreihen wurden mit doppeltem Ansatz durchgeführt. Abbildung 17 zeigt die Apoptoseraten der verschiedenen Zellen im Vergleich.

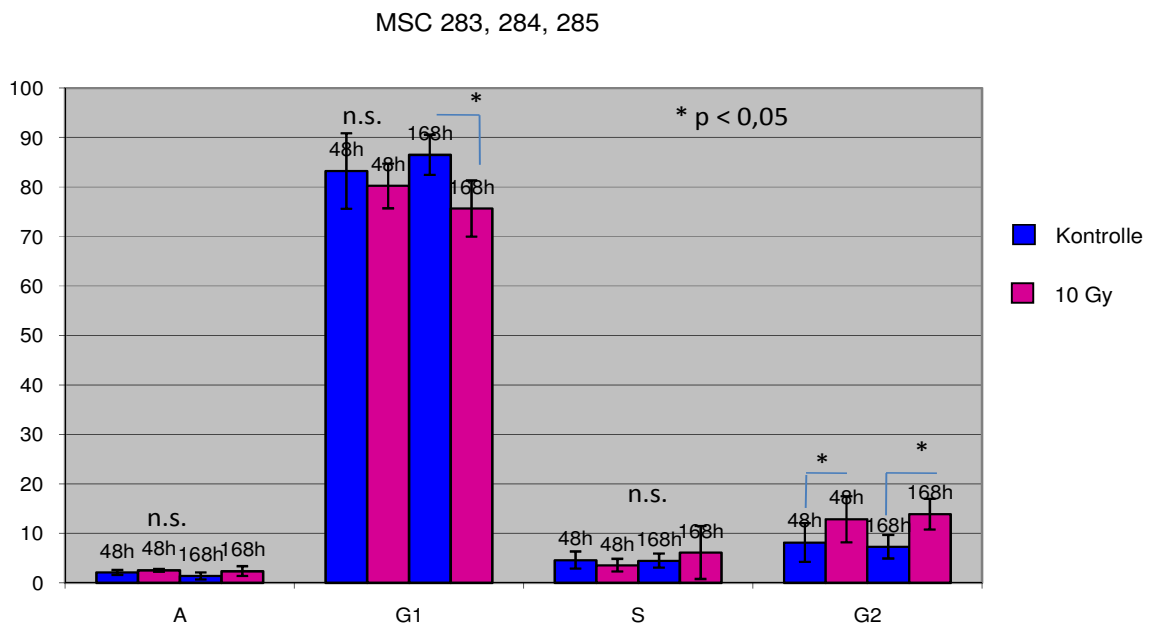


Abb. 16a.: MSC 283, 284, 285: Zellen in der Apoptose (A), der G1 Phase (G1), S Phase (S) und G2 Phase (G2) 48 und 168 Stunden nach Bestrahlung und ohne Bestrahlung, Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen bestrahlten Zellen und Kontrollzellen sind durch blaue Linien und * gekennzeichnet. Die Unterschiede der mit n.s. gekennzeichneten Zellen sind nicht signifikant.

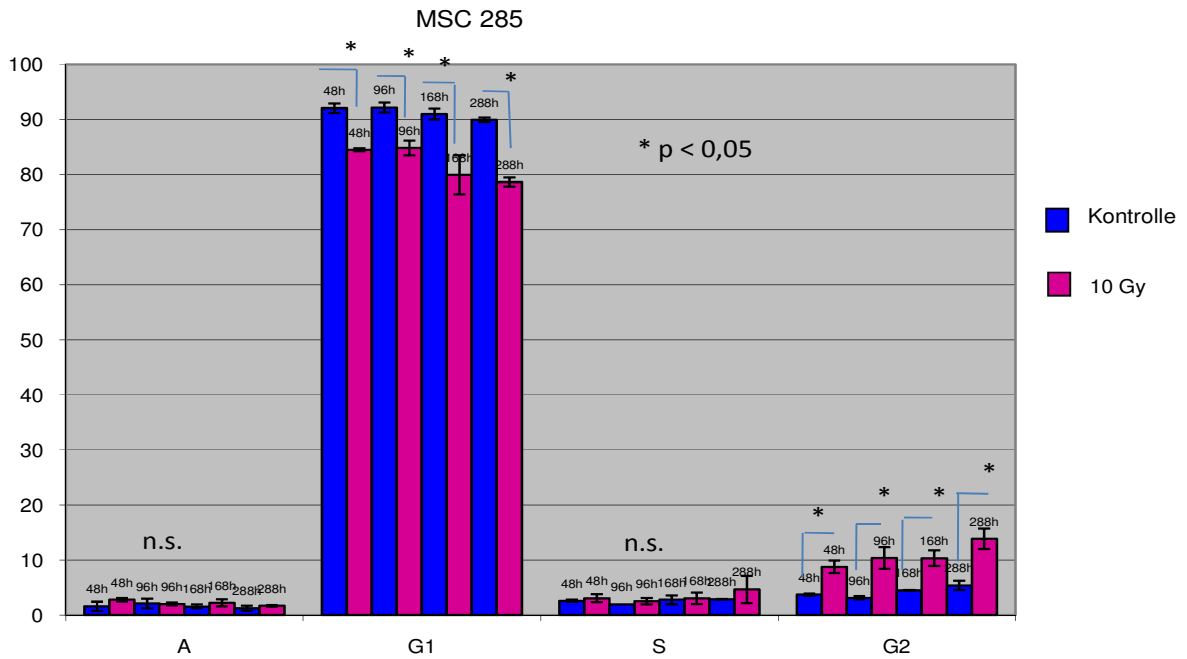


Abb.16b: MSC 285: Zellen in der Apoptose (A), der G1 Phase (G1), S Phase (S) und G2 Phase (G2) 48, 96,168 und 288 Stunden nach Bestrahlung und ohne Bestrahlung, Mittelwerte aus zwei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen bestrahlten Zellen und Kontrollzellen sind durch blaue Linien und * gekennzeichnet. Die Unterschiede der mit n.s. gekennzeichneten Zellen sind nicht signifikant.

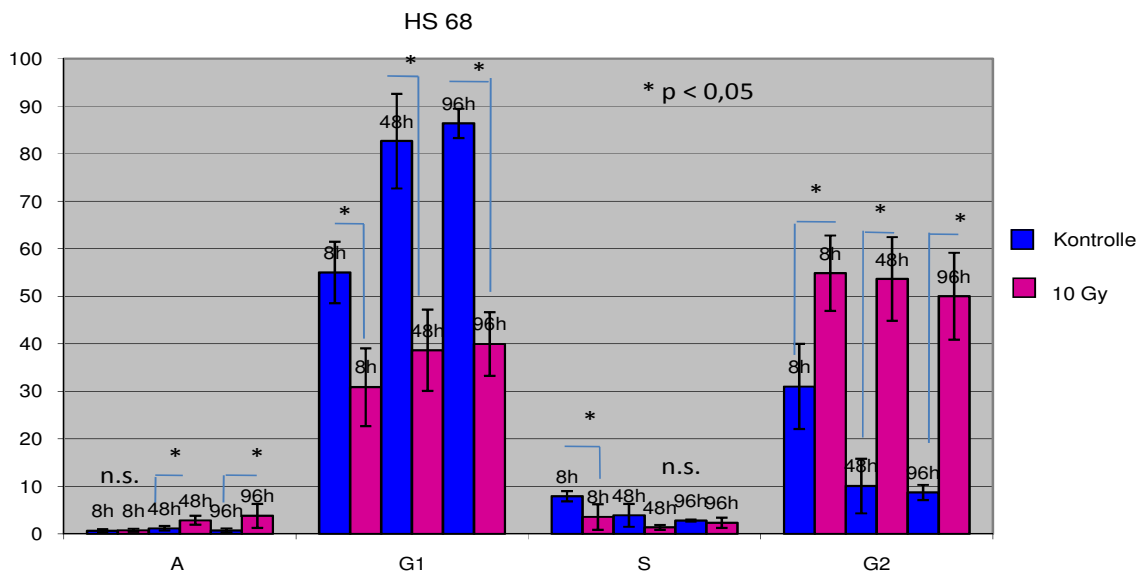


Abb.16c: HS 68: Zellen (%) in der Apoptose (A), der G1 Phase (G1), S Phase (S) und G2 Phase (G2) 8, 48 und 96 Stunden nach Bestrahlung und ohne Bestrahlung, Mittelwerte aus drei Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen bestrahlten Zellen und Kontrollzellen sind durch blaue Linien und * gekennzeichnet. Die Unterschiede der mit n.s. gekennzeichneten Zellen sind nicht signifikant.

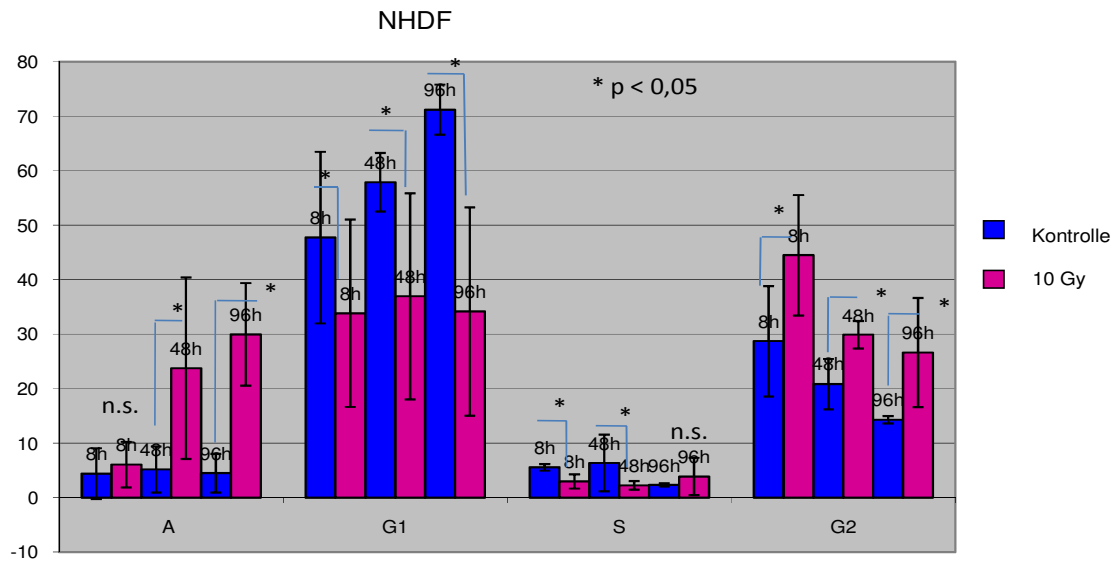


Abb.16d.: NHDF: Zellen (%) in der Apoptose (A), der G1 Phase (G1), S Phase (S) und G2 Phase (G2) 8, 48 und 96 Stunden nach Bestrahlung und ohne Bestrahlung, Mittelwerte aus vier Versuchen mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen bestrahlten Zellen und Kontrollezellen sind durch blaue Linien und * gekennzeichnet. Die Unterschiede der mit n.s. gekennzeichneten Zellen sind nicht signifikant.

Apoptoserate der Zellen im Vergleich

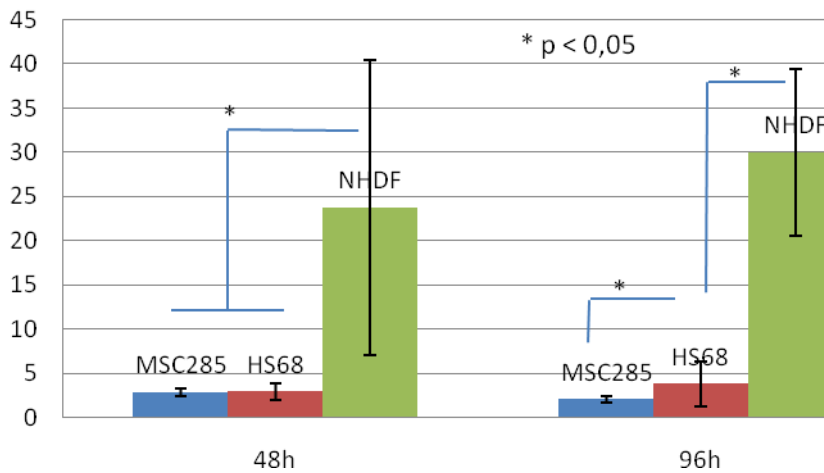


Abb.17: Apoptoserate der Zellen (MSC 285, HS68 und NHDF) 48 und 96 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy im Vergleich. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Zellarten sind durch blaue Linien und * gekennzeichnet

Die Apoptosemessung mit dem FACS-Gerät zeigte, dass weniger als 1% der MSC nach Bestrahlung mit 10 Gy apoptotisch wurden. Die Ergebnisse waren zu jedem Zeitpunkt ähnlich. Über 80% der Kontrollzellen befanden sich zu allen Zeitpunkten in der G1-Phase, nur wenige in der S-Phase oder G2-Phase. Das heißt, dass sich die meisten Zellen zu den gemessenen Zeitpunkten nicht in der Teilung befanden. Nach der Bestrahlung befanden sich deutlich weniger MSC in der G1-Phase, dafür mehr in der G2-Phase (Abb. 16a und b). Wenn sich viele Zellen in der G2-Phase befinden, bedeutet dies meist, dass sich die Zellen schnell teilen. Im Proliferationstest wurde festgestellt, dass sich MSC nach einer Bestrahlung von 10 Gy kaum noch teilen. Demnach befanden sich diese Zellen wahrscheinlich in einem „G2-Arrest“. Der Anteil der bestrahlten Zellen in der G2-Phase stieg im Laufe der Messung an. Bei NHDF und HS68 befanden sich weniger Kontrollzellen in der G1-Phase als bei den MSC und mehr in der G2-Phase, da sich die Zellen wesentlich schneller vermehrten. Gegen Ende der Messung stieg die Anzahl der Zellen in der G1-Phase. Die Zellen vermehrten sich demnach zu Beginn der Messung schnell und später langsamer. Auch in der S-Phase befanden sich anfangs mehr Zellen. Wie bei den MSC war nach Bestrahlung der Anteil der Zellen in der G2-Phase größer (Abb. 16c und d). Im Gegensatz zu den MSC wurde bei beiden Zellarten aber ein deutlicher Anteil der Zellen nach der Bestrahlung apoptotisch. Der Anteil wurde im Laufe der Messung größer. Am Ende der Messung betrug er bei HS68 nur ein paar Prozent, bei den NHDF jedoch 30 Prozent (Abb. 17). Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser drei Versuche, dass ein großer Teil der NHDF und ein kleiner Teil der HS68 nach Bestrahlung mit 10 Gy apoptotisch wurde, während MSC keine oder fast keine Apoptose zeigten.

4.5. Osteogene und adipogene Differenzierung

Es wurde untersucht, ob Photonenstrahlung einen Einfluss auf die osteogene und adipogene Differenzierung der MSC hat. Hierfür wurden die Zellen zwei bis drei Wochen in Differenzierungsmedien kultiviert und anschließend mit van Kossa- und Lipidfärbungen gefärbt, um die Differenzierung deutlich zu machen. Bei der van Kossa- Färbung werden Kalziumablagerungen angefärbt. Sie dient als Nachweis der osteogenen Differenzierung. Die Öl-Rot- Lipidfärbung färbt Fetteinlagerungen in den Zellen an. Mit ihr wird die adipogene Differenzierung nachgewiesen. Hierfür wurden MSC 283 und MSC 285 mit 4 und 10 Gy bestrahlt. 14 und 21 Tage nach Zugabe des jeweiligen Differenzierungsmediums wurden die Zellen gefärbt.

Die osteogene Differenzierung der Zellen erkennt man an den dunkel gefärbten Kalziumablagerungen in der Nähe der Zellen. Die MSC 285 zeigten deutliche Kalziumablagerungen sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den bestrahlten Zellen nach 2 und nach 3 Wochen. Bei den bestrahlten Zellen waren weniger Kalziumablagerungen zu erkennen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen. Nach 3 Wochen waren insgesamt mehr Ablagerungen zu erkennen als nach 2 Wochen. Ein eindeutiger Unterschied zwischen den zwei Bestrahlungsdosen war nicht zu erkennen. Die MSC 283 bildeten allgemein deutlich weniger Kalziumablagerungen als die MSC 285. Nach 2 Wochen waren kaum Ablagerungen sichtbar, sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den bestrahlten Zellen. Nach drei Wochen Behandlung zeigten sich mehr Kalziumablagerungen. Insgesamt zeigte sich jedoch ein ähnliches Ergebnis wie bei den MSC 285. Die osteogene Differenzierung war auch nach Bestrahlung mit 4 und 10 Gy noch möglich, die Kalziumablagerungen waren jedoch auch hier reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Außerdem fiel auf, dass die Kontrollzellen nach dieser Zeit dichter gewachsen waren als die bestrahlten Zellen. Insgesamt entstand der Eindruck, dass durch die Bestrahlung die osteogene Differenzierung nicht wesentlich gehemmt wird, wenn man die geringere Zellzahl der bestrahlten Zellen berücksichtigt (Abb. 18).

Die adipogene Differenzierung der Zellen zeigte sich durch rot gefärbte Fetteinlagerungen. Sie fand sowohl bei Kontrollzellen als auch bei den bestrahlten Zellen nur bei vereinzelt Zellen statt. Ein deutlicher Unterschied zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen war nicht zu erkennen. Auch zwischen den beiden MSC und den verschiedenen Bestrahlungsdosen war kein eindeutiger Unterschied. Der Versuch zeigte, dass auch die

adipogene Differenzierung nach Bestrahlung mit 4 und 10 Gy noch möglich ist. Das Differenzierungspotenzial schien also durch die Bestrahlung nicht bedeutend beeinflusst zu werden (Abb.19).

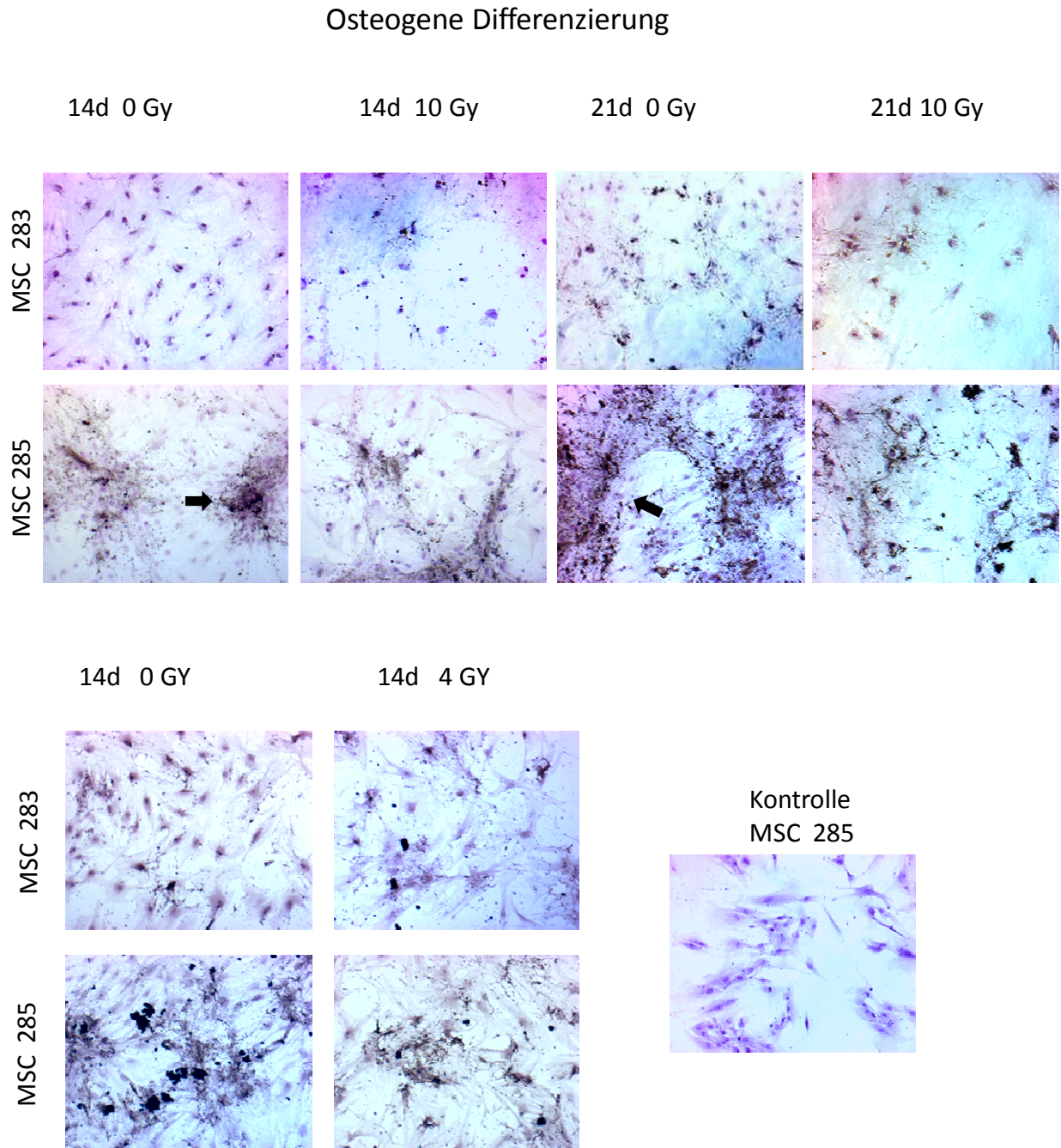


Abb. 18: osteogene Differenzierung von MSC 283 und MSC 285, 14 Tage nach Bestrahlung mit 4 Gy und 10 Gy und 21 Tage nach Bestrahlung mit 10 Gy, sowie nicht bestrahlte Zellen nach 14 Tagen und 21 Tagen und Kontrollzellen ohne Differenzierungsmedium. Die dunklen Kalziumablagerungen sind Anzeichen für die osteogene Differenzierung der Zellen (Pfeil).

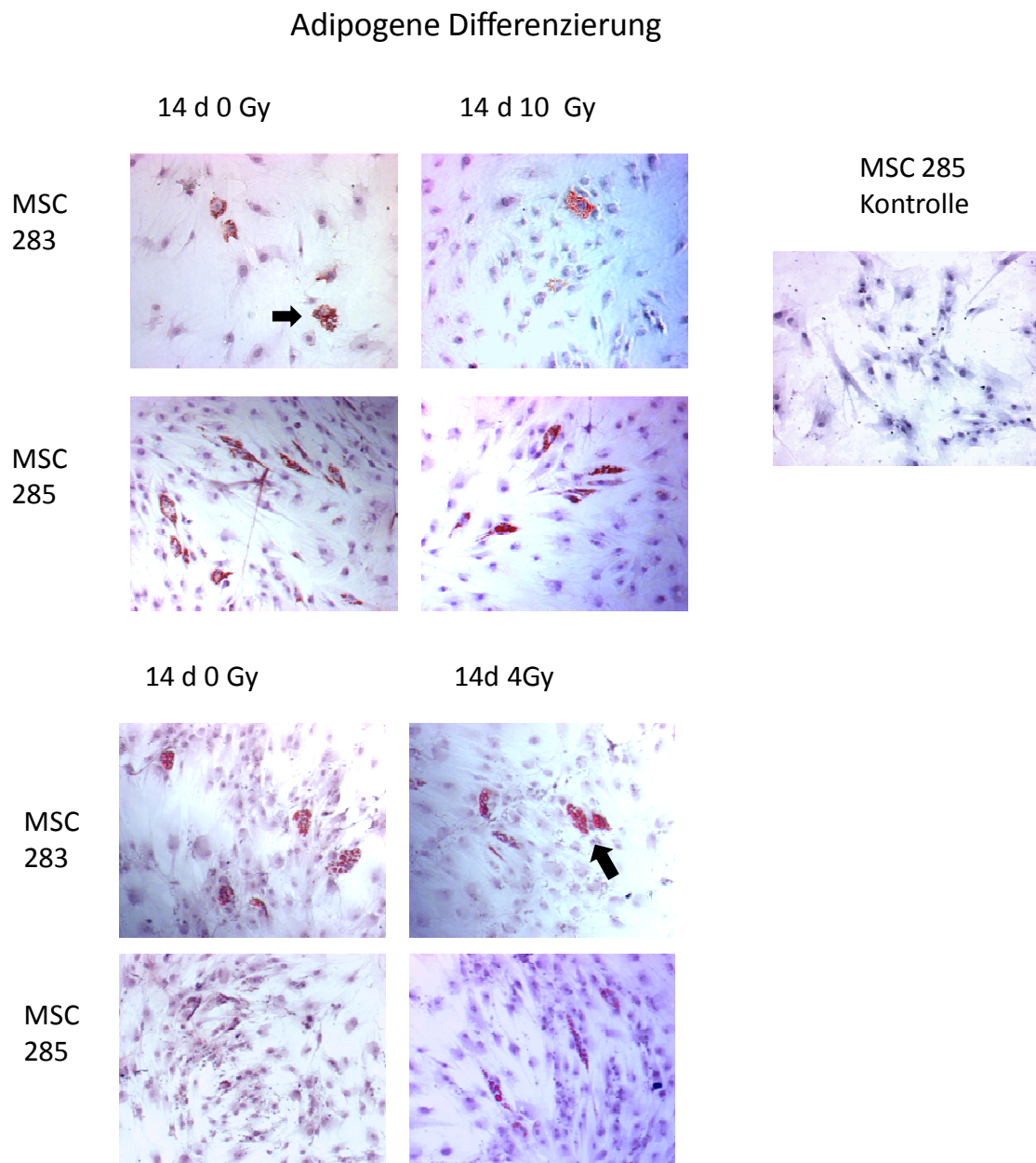


Abb. 19: adipogene Differenzierung von MSC 283 und MSC 285, 14 Tage nach Bestrahlung mit 4 Gy und 10 Gy, sowie nicht bestrahlte Zellen nach 14 Tagen und Kontrollzellen ohne Differenzierungsmedium. Die rot gefärbten Fetteinlagerungen (Pfeil) in den Zellen sind Anzeichen für die adipogene Differenzierung.

4.6. Messung der elektrischen Impedanz

Ein weiter Versuch, um die Einwirkung von Bestrahlung auf die Zellen zu untersuchen, war die Messung der elektrischen Impedanz. Hiermit sollte indirekt der Zellstress gemessen werden, der durch die Bestrahlung verursacht wurde. Durch die Messung wird vor allem die Fähigkeit von Zellen, an der Oberfläche zu haften und eine konfluente Zellschicht zu bilden erfasst. Auch Morphologieänderungen der adhärennten Zellen verändern die Impedanz, wobei hauptsächlich die Größe der Zellen, die Größe des Spaltes zwischen den Zellen und die Membrankapazität eine Rolle spielen.

MSC 285 und NHDF wurden mit 10 Gy bestrahlt. 6 Stunden später wurde die elektrische Impedanz von diesen und von nicht bestrahlten Kontrollzellen über einen Zeitraum von 45 Stunden gemessen.

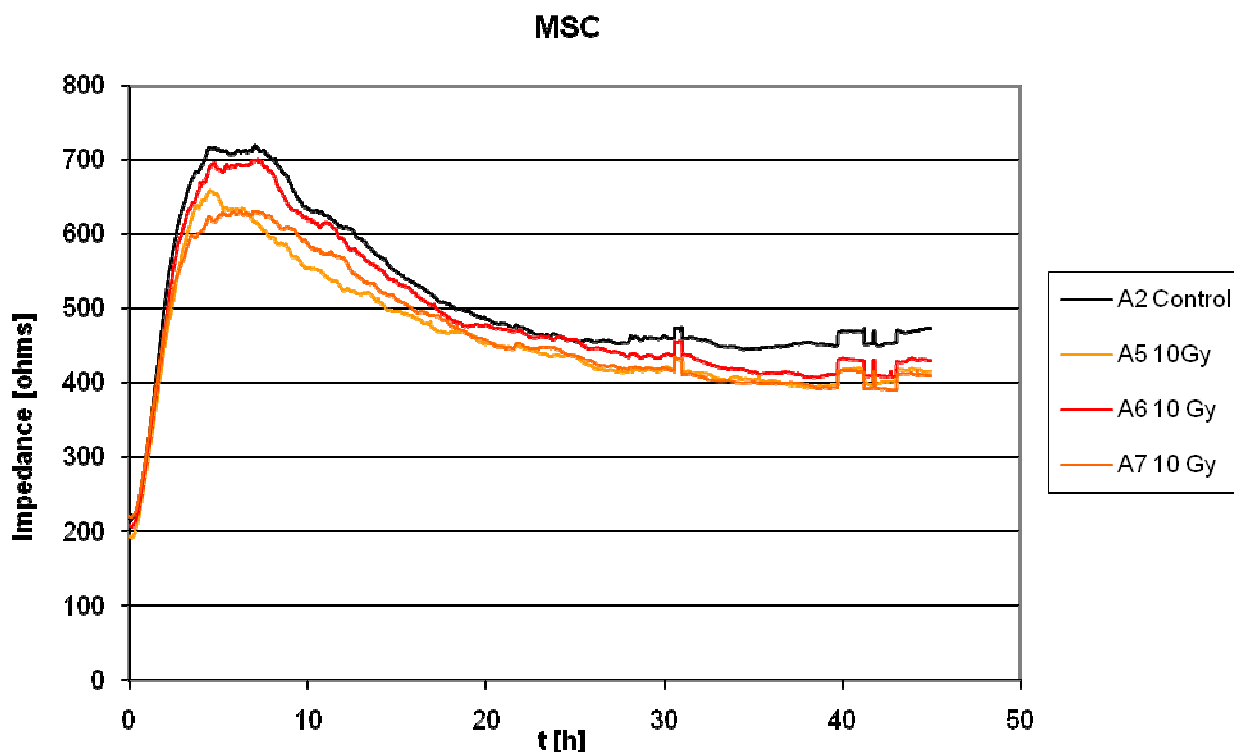


Abb. 20: Elektrische Impedanz der MSC 285, nach Bestrahlung mit 10 Gy und Kontrollzellen, gemessen über 45 Stunden

Der prinzipielle Kurvenverlauf bestrahlter und nicht bestrahlter Zellen gleicht sich in zeitlicher Dynamik und in der Impedanzstärke. Die Impedanz aller Zellen stieg in den ersten Stunden an. Ein Höhepunkt der Impedanz wurde nach ungefähr 4 Stunden erreicht. Die Impedanz blieb für 3-4 Stunden auf diesem Niveau. Während dieses Zeitraums betrug die Impedanz der Kontrollzellen über 700 Ohm. Die Impedanz der bestrahlten Zellen lag

während dieser Zeit zwischen ca. 620 und 700 Ohm. Nach ungefähr 7-8 Stunden fiel die Impedanz langsam und blieb dann ab 20-25 Stunden nach Beginn der Messung bis zum Ende der Messung bei den Kontrollzellen auf gleichem Niveau. Insgesamt zeigten bestrahlte Zellen und Kontrollzellen in ihrem Verhalten keine großen Unterschiede. Die Impedanz der bestrahlten Zellen sank jedoch, wenn auch nur geringgradig weiter bis zum Ende der Messung.

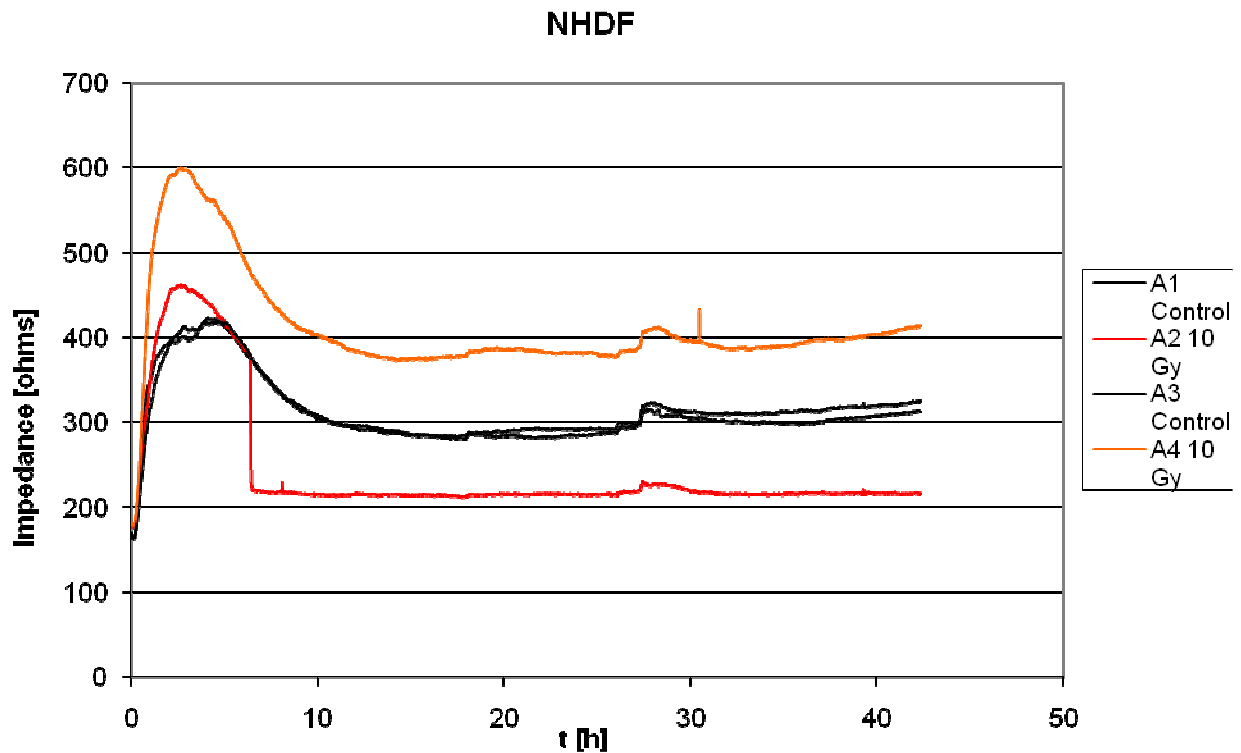


Abb. 21: Elektrische Impedanz der NHDF , nach Bestrahlung mit 10 Gy und Kontrollzellen, gemessen über 45 Stunden

Der Anstieg der Kurve der NHDF war steiler als der Anstieg der Kurve der MSC, aber die erreichten Impedanzstärken waren insgesamt niedriger als die der MSC. Sie lagen bei allen Zellen unter 600 Ohm. Die Kurven fielen auch schneller wieder und blieben ab 10 Stunden nach Beginn der Messung bis zum Ende der Messung auf ähnlichem Niveau, wobei die Impedanz bei allen Zellen zum Ende der Messung wieder zunimmt. Über diesen Zeitraum betrug die Impedanz der NDHF 200-400 Ohm und war damit auch niedriger als die Impedanz der MSC am Ende der Messung. Sie lag nach Abfall der Kurve meist über 400 Ohm. Die Unterschiede zwischen bestrahlten Zellen und Kontrollzellen waren bei den Fibroblasten auffälliger. Der Anstieg der Kurve der bestrahlten Zellen war steiler. Der Höhepunkt wurde nach ca. 2,6 Stunden mit einer Impedanz von 463 und 599 Ohm erreicht. Der Höhepunkt der Kurve wurde bei den Kontrollzellen erst nach ca. 4 und 4,4 Stunden erreicht. Die Impedanz

war mit 423 und 419 Ohm nicht so hoch wie die der bestrahlten Zellen. Die Impedanz der bestrahlten Zellen fiel nach dem Höhepunkt um mehr als 200 Ohm ab, die Impedanz der Kontrollzellen nur um etwas mehr als 100 Ohm. Ein eindeutiger Unterschied zeigte sich nur am Anfang der Messung. Die Kurve der bestrahlten Zellen stieg steiler an und die Impedanz war in den ersten Stunden höher.

Insgesamt zeigten sich definitive, aber nur geringe Unterschiede bei der Messung der elektrischen Impedanz von bestrahlten Zellen und Kontrollzellen, sowohl bei den NHDF als auch bei den MSC. Das heißt, auch nach einer Bestrahlung mit einer hohen Dosis von 10 Gy besitzen beide Zellarten noch die Fähigkeit an der Oberfläche zu haften und eine konfluente Zellschicht zu bilden.

4.7. Genexpressionsanalyse

Um die globale Transkriptionsreaktion der MSC auf die Bestrahlung mit 10 Gy zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile von nicht bestrahlten und bestrahlten Zellen verglichen. Hierfür wurden jeweils drei Versuche mit MSC 283 und MSC 285 durchgeführt. Zum Einen wurden signifikant regulierte Gene bestimmt (4.7.1.), zum Anderen wurde die Expression ausgewählter Markergene und Wachstumsfaktoren untersucht (4.7.2).

4.7.1. regulierte Gene nach Bestrahlung

Um statistisch signifikante Expressionsunterschiede von nicht bestrahlten und bestrahlten Zellen zu erkennen, wurde ein „t-Test“ durchgeführt (Abb. 22). Nur Gene mit einer Signalintensität > 100 wurden berücksichtigt, da bei sehr kleinen Intensitäten Artefakte das Ergebnis verfälschen können.

Von den insgesamt 23643 analysierten Genen wurden mit Hilfe des „t-Tests“ 664 Gene mit einem p-Wert $\leq 5 \times 10^{-3}$ gefunden. Das heißt, es wurden 664 Gene gefunden, deren Expression durch eine Bestrahlung von 10 Gy statistisch signifikant verändert wurde. Die Wahrscheinlichkeit eines falschen Ergebnisses beträgt für jedes dieser Gene weniger als 0,5%. Bei 343 Genen war die Expression nach Bestrahlung verstärkt, bei 321 Genen war die Expression geringer nach Bestrahlung. Durch die Bestrahlung wurden demnach ungefähr

gleich viele Gene hoch- wie herunterreguliert. Eine Beurteilung dieses Ergebnisses wird erst durch die Kenntnis der Funktionen der regulierten Gene möglich.

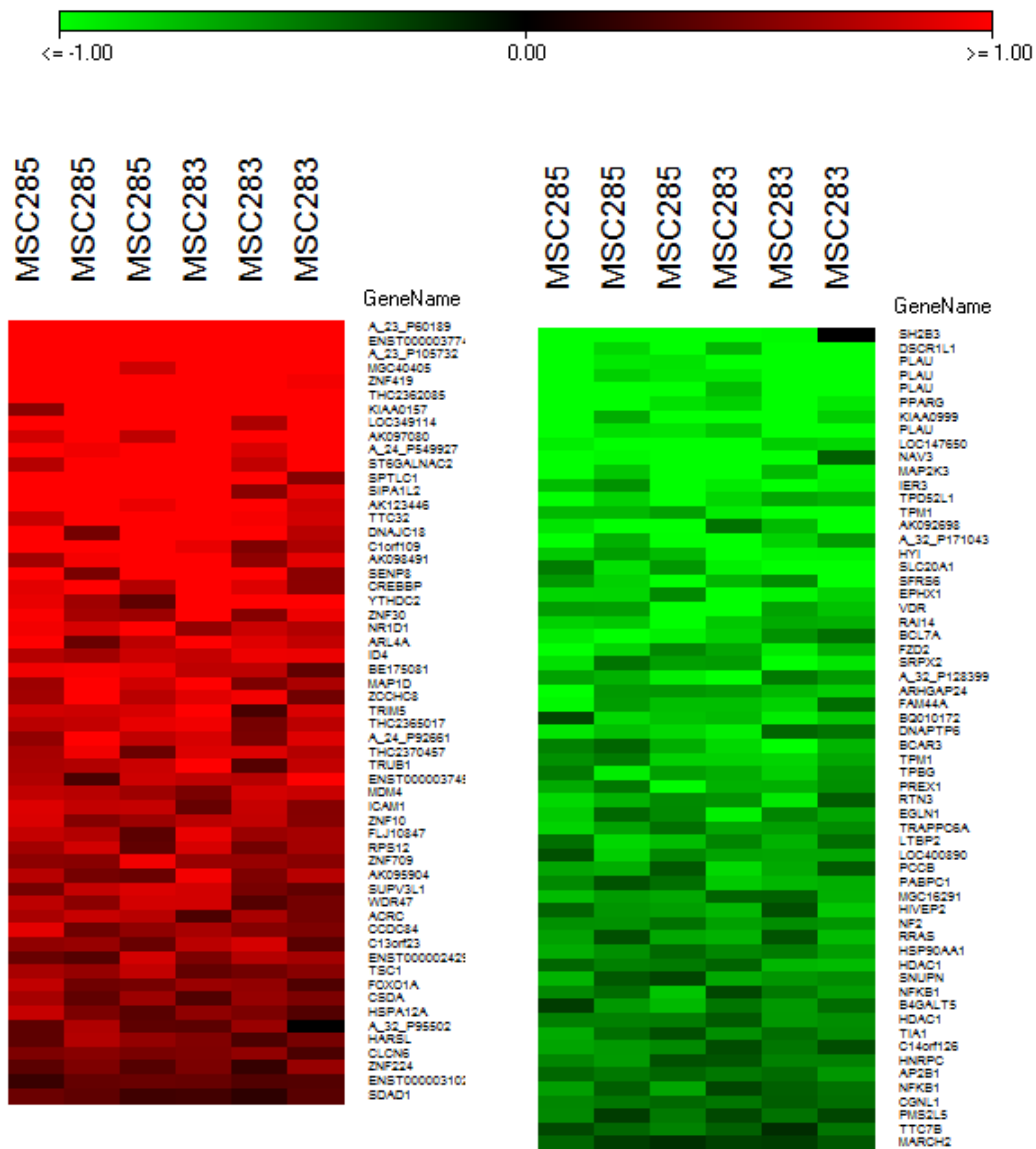


Abb. 22: Die Abbildung zeigt Gene mesenchymaler Stammzellen mit signifikant veränderter Expression (p -Wert $\leq 1 \times 10^{-3}$) 6 Stunden nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die Regulation, d.h. die Expressionsintensität von bestrahlten Zellen im Verhältnis zu nicht bestrahlten Kontrollzellen (\log_2) der Gene ist als \log_2 (Verhältnis) dargestellt. Nach der Bestrahlung hochregulierte Gene sind rot, herunter regulierte Gene grün. Bei allen 6 Versuchen war die Expression dieser Gene nach der Bestrahlung einheitlich hoch- bzw. herunterreguliert.

Die Einteilung dieser Gene in Gruppen nach ihrer biologischen Funktion erfolgte mit Hilfe der „Gene Ontology Database“. Um zunächst eine erste Übersicht zu bekommen, wurden die regulierten Gene nach ihren Funktionen in größere Gruppen zusammengefasst (Tab.2). In dieser Tabelle sind nur Gruppen, die mindestens 10 Gene enthalten, aufgeführt. Es waren Gene reguliert, die direkt mit einer Schädigung durch die Bestrahlung in Verbindung gebracht werden können. Dies betrifft Gene, die Zelltod, Stressantwort, Zellzyklus und Proliferation regulieren. Es waren aber auch sehr viele weitere Gene reguliert. Viele dieser Gene haben eine Funktion in der Genexpression, metabolischen Prozessen und der biologischen Regulierung. Unter den Genen, die in Zusammenhang mit dem Metabolismus stehen, waren sowohl Gene, die in Zusammenhang mit katabolen Prozessen und Proteolyse stehen, als auch Gene, die an der Biosynthese beteiligt sind. Auch viele Gene des RNA- und DNA – Metabolismus wurden reguliert. Weiterhin wurden mehrere Gene reguliert, die an Transport, Signaltransduktion, Organellenorganisation, Adhäsion und Motilität beteiligt sind. Dies macht deutlich, dass die Bestrahlung Auswirkungen auf die gesamte Stoffwechsellage der Zelle hat. Zudem waren interessanterweise auch viele Gene reguliert, die eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und Entwicklung spielen.

GO- terms (biological process)	Anzahl	GO- terms (biological process)	Anzahl
nur übergeordnete Gruppen	der Gene	nur übergeordnete Gruppen	der Gene
gene expression	105	developmental process	62
transcription	81	cell differentiation	40
		system process	22
metabolic process	241		
RNA metabolic process	99	localization	60
DNA metabolic process	27	transport	45
protein metabolic process	90		
lipid metabolic process	22	signal transduction	79
macromolecule metabolic process	19		
proteolysis	16	organelle organisation and biogenesis	31
catabolic process	24		
biosynthetic process	40	biological adhesion	15
generation of precursor metabolites	10	cell motility	15
biological regulation	142	cell death	27
positive regulation of biological process	29	response to stress	41
negative regulation of biological process	44	cell cycle	24
		cell proliferation	18

Tab. 2: In der Tabelle sind die nach Bestrahlung mit 10 Gy signifikant regulierten Gene ($p < 5 \times 10^{-3}$) nach ihrer biologischen Funktion in Gruppen eigeordnet. Die Einteilung erfolgte mit Hilfe der „Gene Ontology Database“. Dargestellt sind nur Gruppen mit mindestens 10 Genen.

Desweiteren wurden Gen-Gruppen identifiziert mit verhältnismäßig vielen regulierten Genen, gemessen an der Gesamtzahl der Gene ($p < 0,05$). Berücksichtigt wurden hier nur Gruppen mit mindestens 5 und höchstens 50 Genen (Tab. 3). Hier wurden signifikant regulierte Gengruppen gefunden, die allgemein eine Rolle bei der Stressantwort spielen und Gene, die spezifisch an der Reaktion von Zellen auf die DNA-Schädigung beteiligt sind, wie z.B. Gene, die Apoptose und DNA-Reparatur regulieren oder Gene, die den Zellzyklus kontrollieren. In Tabelle 4 sind diese einzeln aufgelistet. Überrepräsentiert waren außerdem viele Gene, die metabolische und andere biologische Prozesse negativ regulieren und Gene die mit dem zellulären Katabolismus in Zusammenhang stehen. Weitere Gengruppen sind in der Tabelle aufgelistet.

GO-Terms (biological process), Sel: 5-50, P-Sel <0,05	Anzahl der Gene
apoptosis	26
regulation of programmed cell death/ apoptosis	21
DNA metabolic process	27
DNA repair	15
negative regulation of cell cycle	11
cell cycle checkpoint	5
response to stress	41
response to endogenous stimulus	21
response to DNA damage stimulus	17
response to hypoxia	5
regulation of cell migration/ cell motility/locomotion	5
lipid biosynthetic process	12
cofactor biosynthetic process	5
positive regulation of biosynthetic process	5
negative regulation of biological process	44
negative regulation of metabolic process/ cellular metabolic process	16
negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	15
cellular catabolic process	23
peptidyl-amino acid modification	8
negative regulation of transcription	13
phosphorylation	28
protein amino acid phosphorylation	25
secretion by cell	11
secretory pathway	10
exocytosis	6
small GTPase mediated signal transduction	18
transition metal ion transport	5

Tab. 3: In der Tabelle sind Gen-Gruppen mit mindestens 5 und höchstens 50 nach Bestrahlung mit 10 Gy signifikant regulierten Genen ($p < 5 \times 10^{-3}$). Hier sind nur Gruppen mit verhältnismäßig vielen regulierten Genen, gemessen an der Gesamtzahl der zu der Gruppe gehörenden Gene ($p < 0,05$), abgebildet. Mit gleichen Farben sind funktional ähnliche Gruppen dargestellt.

Response to DNA damage stimulus	
DNA repair	<i>SETX, DCLRE1C, REV3L, FANCC, EPC2, RAD23B, ASTE1, ATM, POLG/APEX1, TDP1, RAD50, CSNK1D, PMS2L5</i>
DNA damage checkpoint	<i>-/PML, NEK11</i>
Apoptosis	
Negative regulation of apoptosis	<i>GSK3B, SELS /ANGPTL4, NOTCH2, PSEN1, HDAC1, NFKB1, AATF, IER3, RTN4</i>
Positive regulation of apoptosis	<i>SETX, ADAMTSL4, F2R, PLAGL1/IGFBP3, STAT1, DNAJB6, NOTCH2, PML, TPD52L1, MAPK1</i>
Neuron apoptosis	<i>-/UNQ188</i>
Cell cycle	
Cell cycle	<i>CARR1/TPD52L1, RAD50, MAPK1, NEK11, TUSC4</i>
Cell cycle arrest	<i>PLAGL1/NOTCH2, RASSF1, RB1</i>
Negative regulation of cell cycle	<i>ATM, BTG/TUSC4, RECK, NF2, DLG1</i>
Cell cycle checkpoint	<i>ATM/RB1, PML</i>
Negative regulation of cell proliferation	<i>FABP3, TSC1, MDM4, SCYE1, BTG3/NF2, NOTCH2, FTH1</i>

Tab. 4: In der Tabelle sind nach der Bestrahlung mit 10 Gy signifikant regulierte Gene ($p < 5 \times 10^{-3}$) abgebildet, die an der Reaktion von Zellen auf eine DNA-Schädigung beteiligt sind. Gene vor den Schrägstrich sind hochreguliert, die Gene danach herunterreguliert.

Wie oben bereits erwähnt, wurde durch die Bestrahlung auch die Expression verschiedener Gene, die an der Differenzierung und Entwicklung beteiligt sind beeinflusst (Tab.5). Wie zu erwarten waren zum Einen Gene reguliert, die in Zusammenhang mit den typischen Entwicklungsrichtungen mesenchymaler Stammzellen stehen. Hierzu gehören das Skelett und das Muskelgewebe. Zum Anderen waren aber auch Gene reguliert, die an der Entwicklung anderer Gewebe beteiligt sind, z.B. des Nervensystems und der Haut. Auffallend waren weiterhin die vielen an der Angiogenese beteiligten Gene, die ausschließlich herunterreguliert waren. Zu den regulierten Genen gehörten auch je ein Markergene der adipogenen und osteogenen Differenzierung, PPARG und BMP6.

Development and differentiation	<i>CSH1/PPARG, FZD2, NOTCH2, SH3BP4</i>
Skeletal development	<i>BMP6, ORS2, UFD1L/VDR</i>
Nervous system development	<i>NTRK2, TSC1, ID4/NOTCH2, SOX11, RTN4, NF2, BAI2</i>
Muscle development	<i>TSC1/DMD, ITGA11, IGFBP3, RB1</i>
Heart development	<i>TSC1/EGLN1, CHD7,</i>
Kidney development	<i>TSC1/CIGALT1, ASL</i>
Skin development	<i>KRT9/-</i>
Mesoderm development	<i>JAK3/-</i>
Blood vessel development	<i>-/CIGALT1, CHD7, ANGPTL4, ARHGAP24, PML, SERPINE1, MYH9</i>

Tab. 5: In der Tabelle sind nach der Bestrahlung mit 10 Gy signifikant regulierte Gene ($p < 5 \times 10^{-3}$) abgebildet, die an Zelldifferenzierung und Entwicklung beteiligt sind. Gene vor den Schrägstrich sind hochregulierten, die Gene danach herunterreguliert.

Eine Tabelle mit allen nach einer Bestrahlung mit 10 Gy signifikant regulierten Genen ($p < 5 \times 10^{-3}$), deren Funktion bekannt ist, befindet sich im Anhang. Die Tabelle enthält auch die Regulierung und eine Beschreibung der Funktion der einzelnen Gene.

4.7.2. Expression von MSC- Markern, embryonalen Stammzellmarkern, Differenzierungsmarkern und Wachstumsfaktoren:

Die Genexpression von Stammzellmarkern, Differenzierungsmarkern und Wachstumsfaktoren von MSC 6 Stunden nach der Bestrahlung mit 10 Gy und von nicht bestrahlten Kontrollzellen wurde gemessen. Untersucht wurde die Expression von MSC-Markern, embryonalen Stammzellmarkern, Markern der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung und Wachstumsfaktoren, die dem Erhalt von Stammzeleigenschaften dienen. Außerdem wurden die Expression der Rezeptoren, die durch die Rezeptorkinaseinhibitoren LY2109761, SU14816 und SU11657 gehemmt werden, und die Expression der dazugehörigen Wachstumsfaktoren untersucht. Außerdem wurde die Expression von drei Genen (SFRS1, NASP und RPIA), die mit einer erhöhten Strahlenresistenz von Zellen in Verbindung gebracht wurden (Amundson et al, 2008) und von einem Gen (BCL2L1), das mit Chemoresistenz in Zusammenhang steht (Amundson et al, 2000) untersucht.

Im Folgenden werden die Gene aufgelistet (Tab. 6). Hinter den Genen ist die durchschnittliche Intensität der Gene angegeben. Die durchschnittliche Intensität ist der Mittelwert der Intensitäten aus sechs Versuchen. In Klammern die Regulierung der bestrahlten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (\log_2) aufgeführt. Gene mit Intensitäten, die kleiner als 100 waren, wurden nicht in die Genexpressionsanalyse mit einbezogen, weil bei sehr kleinen Intensitäten Artefakte das Ergebnis verfälschen. Deshalb steht bei diesen Genen nur „<100“.

Embryonale Stammzellmarker		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
Rex-1	< 100	
Sox-2	< 100	
Nanog	<100	
Oct-4 (POU5F1)	522.189	0,344
Positive MSC- Marker		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
VCAM-1	11846.671	-0,145
CD73 (NT5E)	4255.032	-0,226
CD13 (ANPEP)	3843.267	0,363
CD29 (ITGB1)	28609.886	-0,151
CD44	19344.607	-0,114
CD105 (ENG)	5626.269	-0,496

Negative MSC- Marker		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
CD11b (ITCAM)	< 100	
CD34	< 100	
CD45	<100	
CD117 (KIT)	< 100	
CD31 (PECAM)	< 100	
Wachstumsfaktoren, Erhaltung von Stammzeleigenschaften		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
LIF	2202.853	-0,052
FGF2	8710.990	0,581
Wnt3a	< 100	
EGF	< 100	
HGF	632.190	0,447
PDGFA	2436.531	0,835
PDGFC	4017.217	0,287
Osteogene Differenzierung		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
BMP2	<100	
BMP6	1166.704	1,077
RUNX2	1256.294	0,204
Adipogene Differenzierung		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
PPARG	476.962	-1,031
Chondroge Differenzierung		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
SOX9	192.600	0,121
COL2A1, COL9A1 und 2	< 100	
COL9A3	327.819	1,296
COMP		0,031
DCN	134657.328	-0,108
BGN	1144.027	-0,298
GDF5	608.631	2,741
Rezeptoren, die von den drei verwendeten Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt werden und deren Liganden		
<i>Genname</i>	<i>Expressionsintensität</i>	<i>Regulierung</i>
PGGFRA	46737.235	-1,296
PDGFRB	31999.005	-0,173
PDGFA	2436.531	0,835
PDGFC	4017.217	0,287
VEGFR	<100	
VEGF	2193,682	-0,257
VEGFB	188861,106	0,043
VEGFC	199933.623	-0,173
KIT	<100	
KITLG	1446,953	0,614
FLT3	<100	
FLT3LG	172.827	0,083
TGFBR1	209.203	-0,525
TGFBR2	614.761	-0,165
TGFB1	2073.052	0,692
TGFB2	172.368	0,022
Gene, die in Zusammenhang mit Radio- und Chemoresistenz stehen		
SFRS1	5664.631	-0,299
NASP	2903.430	-0,124
RPIA	3154.365	-0,544
BCL2L1	463.901	0,465

Tab. 6 In der Tabelle sind MSC- Marker, embryonalen Stammzellmarker, Differenzierungsmarker und Wachstumsfaktoren und Rezeptoren aufgeführt mit der durchschnittlichen Expressionsintensität und der Regulierung 6 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu nicht bestrahlten Zellen (log2). Die Hochregulierung der Gene ist rot dargestellt, die Herunterregulierung blau.

Wie zu erwarten waren die positiven MSC-Marker alle mit hohen Intensitäten exprimiert. Nach der Bestrahlung waren sie meist geringgradig herunterreguliert. Die negativen MSC-Marker waren nicht exprimiert. Von den 4 untersuchten Markern für embryonale Stammzellen war nur ein einziger exprimiert (Oct-4). Von den Wachstumsfaktoren, die für den Erhalt der Stammzeleigenschaften mitverantwortlich sind, waren die meisten exprimiert. Nach Bestrahlung waren diese in fast allen Fällen hochreguliert. Die zwei exprimierten Gene der osteogenen Differenzierung (BMP6 und RUNX2) waren hochreguliert. Das Markergen der adipogenen Differenzierung (PPARG) war stark herunterreguliert nach der Bestrahlung. Die Gene der chondrogenen Differenzierung waren unterschiedlich reguliert, wobei zwei dieser Gene (COL9A3 und GDF5) auffallend stark hochreguliert waren. Zu erwähnen ist allerdings, dass die Regulierung nur ein Durchschnittswert ist. Die Regulationen der einzelnen Zelltypen waren zum Teil sehr unterschiedlich. Nur BMP6 und PPARG gehören zu der Gruppe mit den nach Bestrahlung signifikant veränderten Expression ($p < 5 \times 10^{-3}$). Bei diesen Genen war die Regulierung bei allen sechs Versuchen einheitlich hoch- bzw. herunterreguliert. Die Genexpression von BMP6 war nach der Bestrahlung auf das Doppelte erhöht, die Expression von PPARG um die Hälfte reduziert.

Von den Rezeptoren, die durch die in den oben aufgeführten Versuchen verwendeten Kinaseinhibitoren (LY2109761, SU 11657 und SU14816) gehemmt werden, wurden nur die PDGF-Rezeptoren und die TGF- β -Rezeptoren von den MSC exprimiert. kit, flt3 und VEGF-Rezeptoren wurden nicht exprimiert. Die Expression der Rezeptoren war nach der Bestrahlung herunterreguliert. Die entsprechenden Liganden wurden alle von den MSC exprimiert. Die Expressionsintensitäten der meisten Liganden (PDGF, VEGF, KITLG und TGF β 1) waren hoch. Nur die Expressionsintensitäten von flt3 und TGF- β 2 waren niedrig. Die Expression von PDGF (platelet derived growth factor) war nach der Bestrahlung erhöht. Außerdem war auch die Expression von KITLG (Ligand von KIT= SCF, Stammzellefaktor) und TGF β 2 (tumor growth factor beta Typ 2) erhöht. Bei der Expression von TGF β 2 fiel auf, dass sie bei den MSC285 nach Bestrahlung einheitlich stark erhöht war (durchschnittliche Regulierung: 0,945) und bei den MSC 283 geringgradig erniedrigt war (durchschnittliche Regulierung: -0,262) war. Hier wird deutlich, dass man aus dem Durchschnittswert nicht immer auf das Verhalten aller Zellen schließen kann. Die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) war nach der Bestrahlung kaum verändert oder leicht erniedrigt. Auch die Expression von FLTLG (Ligand von FLT3) und TGF β 1 (transforming growth factor beta Typ 1) wurde durch die Bestrahlung kaum verändert.

5. Diskussion

5.1. Allgemeine Auswirkung der Bestrahlung und Behandlung mit Rezeptorkinaseinhibitoren auf mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten

Die leitende Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen von Photonenstrahlung auf humane mesenchymale Stammzellen (MSC). Hierfür wurden Stammzellen von drei Spendern und zum Vergleich humane Fibroblasten (NDHF und HS68) mit hochenergetischen Photonenstrahlen (6MeV) an einem Linearbeschleuniger mit Dosen von 1 bis 10 Gy bestrahlt. Proliferation, klonogenes Überleben, Zellzyklus, Apoptose, osteogene und adipogene Differenzierung, Morphologie, Adhäsion und Motilität nach der Bestrahlung wurden beurteilt. Außerdem wurde eine Genexpressionsanalyse nach der Bestrahlung der Zellen durchgeführt.

Die MSC zeigten sich in den meisten Versuchen relativ resistent gegen die Bestrahlung. Das Wachstum der MSC wurde dosisabhängig gehemmt. Die Wachstumshemmung von MSC und Fibroblasten war insgesamt ähnlich stark. Es gab hier jedoch große Unterschiede zwischen den MSC verschiedener Spender. Apoptose trat bei den MSC aller Spender selbst bei einer Dosis von 10 Gy nicht signifikant auf, während ein deutlicher Anteil der Fibroblasten apoptotisch wurde. Das osteogene und das adipogene Differenzierungspotenzial der MSC blieben auch bei dieser hohen Dosis erhalten. Deutliche Veränderungen der Morphologie waren bei allen Zelltypen erst ab einer Dosis von 10 Gy erkennbar. Wie die Genexpressionsanalyse zeigte, reagierten die MSC auf die Bestrahlung mit der Regulierung von einer großen Anzahl von Genen, die unter anderem DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Wachstum, Stoffwechsel, Motilität, Differenzierung und Entwicklung regeln.

In der Krebstherapie wird häufig eine Kombination von Strahlen- und Chemotherapie angewendet. Deshalb wurde außerdem die Wirkung eines TGF β R-Serin/Threoninkinaseinhibitors (LY 2109761), eines Abl/ PDGFR/ c-kit-Tyrosinkinaseinhibitors (SU14816) und eines VEGFR- /PDGFR- / c-kit /flt3 - Tyrosinkinaseinhibitors (SU11657) zusammen mit Bestrahlung untersucht. Die MSC reagierten auf den TGF β R-Kinaseinhibitor ähnlich empfindlich wie die Fibroblasten, auf die anderen beiden Inhibitoren jedoch wesentlich empfindlicher.

5.2. Auswirkung der Bestrahlung auf die Morphologie, die Motilität und die Adhäsion der Zellen

Die Zellen wurden nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen fotografiert. Die Fotografien nach der Bestrahlung mit 1 bis 4 Gy zeigten keine morphologischen Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen. Erst bei einer Dosis von 10 Gy zeigten sich die Zellen aller Zelltypen vergrößert. Die Zeitrafferaufnahmen nach der Bestrahlung mit hohen Dosen von 10 und 20 Gy bestätigten dieses Ergebnis. Die MSC erschienen nach Bestrahlung etwas größer.

Deutlicher war die Veränderung bei den Fibroblasten. Sie bildeten nach der Bestrahlung mit hohen Dosen lange Zellausläufer aus. Bei Fibroblasten werden unterschiedliche Differenzierungsstadien unterschieden. Die ersten Stadien umfassen mitotisch aktive Stadien, die sich dann zu postmitotischen Fibroblasten entwickeln. Diese postmitotischen Fibroblasten sind differenzierte Funktionszellen, die sich nicht mehr teilen (Fournier et al, 1998). Es wurde weiterhin beschrieben, dass Bestrahlung die Differenzierung von Fibroblasten induziert und die Fibroblasten früher das Stadium der terminalen Differenzierung erreichen (Fournier et al, 2001, Herskind & Rodemann 2001).

Die hier fotografierten mit hohen Dosen bestrahlten Fibroblasten glichen in der Morphologie den von Founier und Mitarbeitern (1998) beschriebenen ausdifferenzierten postmitotischen Fibroblasten. Es ist demnach wahrscheinlich, dass bei den hier nach Bestrahlung mit hohen Dosen fotografierten Fibroblasten um postmitotische differenzierte Fibroblasten handelt.

Die Zytoskelettfärbung zeigte, dass das Aktinzytoskelett nach der Bestrahlung mit 10 Gy intakt aussah, sowohl bei MSC als auch bei NHDF und HS68. Bei den Zeitrafferaufnahmen war zu sehen, dass die Motilität der mit 10 und 20 Gy bestrahlten Zellen deutlich geringer war als die der Kontrollzellen. Während die Bewegungen der bestrahlten Zellen in begrenztem Radius stattfanden, legten die Kontrollzellen weitere Strecken zurück.

Beim Koloniebildungsversuch konnte nebenbei beobachtet werden, dass sich die Morphologie der MSC der einzelnen Kolonien häufig deutlich in Größe und Form unterschied. Die Zellen einer Kolonie glichen sich jedoch. In der Literatur werden zwei verschiedene Typen von MSC beschrieben: kleine runde Zellen, die sich schnell teilen, „rapidly self-renewing cells (RS)“ und größere flache Zellen mit sehr langsamen Proliferationsraten, „flat cells (FC)“ (Docheva et al, 2008). Bei den hier durchgeführten

Koloniebildungsversuchen konnten jedoch nicht eindeutig Zellen dieser zwei Zelltypen bestimmt werden. Es konnten Kolonien mit kleinen runden, mit größeren breiten Zellen sowie mit kleineren und größeren spindelförmigen Zellen unterschieden werden. Nach der Bestrahlung mit Dosen von 1 bis 4 Gy konnte nicht festgestellt werden, dass ein bestimmter Kolonientyp eher auftrat. Wie oben bereits beschrieben traten erst bei einer Dosis von 10 Gy, bei der sich keine Kolonien mehr bildeten, vermehrt größere pleomorphe Zellen auf. Möglicherweise handelt es sich auch hier, wie bei den Fibroblasten, um weiter differenzierte Stadien.

Die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion wurde mit der Impedanzmessung bestimmt. Die gemessene Impedanz ist von verschiedenen Parametern abhängig: von der Barrierefunktion des Zellrasens, dem Fluss zwischen den Zellen und der Membrankapazität der Zellen (Giaever & Keese, 1991). Die Kurven aller Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf mit einem starken Anstieg der Impedanz zu Beginn der Messung und einem anschließenden Abfall der Kurve auf ein bestimmtes Niveau, das größtenteils bis zum Ende der Messung beibehalten wurde. Zum Zeitpunkt der Aussaat, der gleichzeitig der Anfang der Messung war, befanden sich die Zellen in Medium gelöst. Der Anstieg der Impedanz in den ersten Stunden zeigte die Ausbreitung und Anhaftung der Zellen am Boden.

Dieser initiale Anstieg der Impedanz, der durch das Anhaften und Ausbreiten der Zellen am Boden bedingt ist, wurde auch für andere Zellarten beschrieben (Wegener et al, 2000; Keese et al, 2002). In diesen Experimenten blieb die Impedanz nach dem anfänglichen Anstieg jedoch auf einem Level, abgesehen von geringen Schwankungen. Diese Schwankungen stellen die stetigen Bewegungen der Zellen auf der Elektrode dar (Giaever & Keese, 1984; Wegener et al, 2000). Warum die Impedanz erst so stark stieg und anschließend fiel, ist unklar. Möglicherweise stellt dies eine Phase der Anpassung dar. Unregelmäßigkeiten der Messung, z.B. bei den MSC nach 30 Stunden und am Ende der Messung, können durch ein Wechseln des Mediums auftreten. Insgesamt zeigten bestrahlte MSC und Kontrollzellen in ihrem Verhalten keine großen Unterschiede. Jedoch schienen die Kontrollzellen ab einem Zeitpunkt von ungefähr 25 Stunden auf einem Niveau zu bleiben, während die bestrahlten Zellen eine Tendenz zu einem kontinuierlichen Abfall der Impedanz zeigten. Bei den Fibroblasten ergaben sich Unterschiede in der Anfangsphase, später blieben jedoch bestrahlte und nicht bestrahlte Zellen auf vergleichbarem Niveau. Insgesamt lässt sich nicht sagen, dass die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion und zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht nach Bestrahlung eindeutig verändert ist.

Die Genexpressionsanalyse der MSC ergab, dass sehr viele Gene, die mit dem Zytoskelettaufbau und der Zytoskelettorganisation in Zusammenhang stehen, nach der Bestrahlung reguliert waren. Diese Gene waren fast ausnahmslos herunter reguliert. Die einzige Ausnahme bildete das stark hochregulierte Gen PXN, das Paxillin codiert. Paxillin ist Teil des microtubuliassozierten Komplexes. Die Expression von PXN nach Bestrahlung wird mit einer verbesserten Strahlenresistenz assoziiert (Beinke et al, 2003). Auch Gene, die mit Zellbeweglichkeit und Migration in Verbindung stehen, waren herunterreguliert. Teilweise sind es die gleichen Gene, die auch für Zytoskelettorganisation verantwortlich sind, da die Zellbewegung auf dynamischen Veränderungen des Aktinzytoskeletts basiert. Wie oben beschrieben, war die Motilität der Zellen nach einer Bestrahlung tatsächlich stark eingeschränkt, das Zytoskelett selbst schien jedoch nach der Aktinfärbung nicht deutlich verändert. Gene, die an Zelladhäsion und Zellverbindung beteiligt sind, waren sowohl hoch-, als auch herunterreguliert.

5.3. Klonogenes Überleben und Proliferation nach Bestrahlung

Das klonogene Überleben von Stammzellen wurde in Abhängigkeit von Photonenstrahlung mit 1 bis 10 Gy untersucht. Das Überleben der Stammzellen und Fibroblasten nahm etwa logarithmisch zur Strahlendosis ab. Die Überlebenskurven von HS68 und Fibroblasten verliefen ähnlich. Bei einer Dosis von 2 Gy lagen die Überlebensfraktionen bei ca. 27 und 19 Prozent. Auch die durchschnittlichen Überlebensfraktionen der MSC glichen denen der Fibroblasten (Abb.9b). Bemerkenswert ist, dass die Überlebensrate der MSC sich je nach Spender stark unterschied. Bei den MSC 283 und MSC 284 betragen die durchschnittlichen Überlebensfraktionen bei einer Dosis von 2 Gy nur 8,2 Prozent und 11,6 Prozent. Von den MSC285 überlebten jedoch 42,2 Prozent eine Bestrahlungsdosis von 2 Gy (Abb.9a).

In einer Studie des „National Cancer Institute“, New York, in der 60 verschiedene Tumorzelllinien verglichen wurden, wurden Zelllinien mit einer Überlebensfraktion von weniger als 20 Prozent nach einer Bestrahlung mit 2 Gy als radiosensitiv eingestuft (Amundson et al., 2008). Die Fibroblasten reagierten demnach mäßig sensitiv. Die MSC 283 und die MSC 284 zeigten sich radiosensitiv, die MSC 285 waren hingegen relativ resistent.

Auch in der Literatur wird für andere Zellarten beschrieben, dass Zellen verschiedener Spender unterschiedlich auf Bestrahlung reagieren. So variierten z.B. bei Fibroblasten verschiedener Spender die Überlebensfraktionen im Koloniebildungstest bei einer Dosis von 2 Gy zwischen 4 und 63 Prozent (Rave-Fränk et al, 2001).

Eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Radiosensitivität der MSC wäre das Alter der Spender. Es wird beschrieben, dass bei älteren Spendern im Allgemeinen die Proliferationsrate der MSC geringer und die Apoptoserate höher ist als bei jüngeren (Zhou et al, 2008). Das Alter des Spenders der radioresistentesten Zellen (MSC 285) lag mit 44 Jahren zwischen dem der beiden anderen. Das Alter dieser Spender betrug 26 und 52 Jahre. Es war demnach hier kein Einfluss des Alters zu erkennen.

Für Fibroblasten wurde festgestellt, dass die Strahlenresistenz mit dem Ausmaß der Doppelstrangbruchreparatur und des G1- Arrests korreliert (Dikomey et al, 2003). Die Erforschung der Ursachen der unterschiedlichen Strahlenresistenz der MSC war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es wurden jedoch einige Gene angeschaut, die nach Bestrahlung bei resistenten Tumoren von 60 getesteten Tumorzelllinien erhöht waren. Hierzu gehörten RPIA, NASP und SFRSF1 (Amundson et al, 2008). Die drei Gene waren nach Bestrahlung bei den MSC eher herunterreguliert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den MSC verschiedener Spender zeigte sich nicht. Außerdem wurde ein Gen, BCL2L1 (BCL-XL) angeschaut, dessen Expression mit Chemoresistenz korreliert und dem eine einmalige Rolle in der generellen Resistenz auf zytotoxische Substanzen zugeschrieben wird (Amundson et al, 2000). Die Expression dieses Gens war interessanterweise nach der Bestrahlung bei den MSC285 einheitlich stark erhöht, bei den MSC 283 jedoch kaum verändert oder erniedrigt. Möglicherweise spielt dieses Gen auch eine Rolle bei der erhöhten Radioresistenz der MSC285.

Beim Proliferationstest unterschieden sich die Kurven von MSC und NHDF nach Bestrahlung deutlich im Gegensatz zum Koloniebildungsversuch, in dem die Kurven von MSC und Fibroblasten fast gleich verliefen. In dem Proliferationstest wurden alle Zellen fünf Tage nach der Behandlung oder der Bestrahlung gezählt. Auffallend war, dass die absolute Zellzahl der Kontrollzellen der NHDF um ein Vielfaches höher war als die der MSC, da die Generationszeit der NHDF sehr viel kürzer war. Das erschwerte den Vergleich der Kurven. Beim Koloniebildungsversuch hingegen wurden die Kolonien gezählt, wenn die Kontrollzellen Kolonien gebildet hatten. Dies dauerte bei den MSC wesentlich länger. Im Gegensatz zum Proliferationsversuch wurden die unterschiedlichen Generationszeiten berücksichtigt.

Durch eine Bestrahlung mit 10 Gy wurde das Wachstum der MSC vollständig oder fast vollständig gehemmt. Da die MSC morphologisch auch nach Bestrahlung mit 10 Gy noch

intakt erschienen, stellt sich die Frage, ob die Wachstumshemmung reversibel ist, oder ob die Zellen soweit geschädigt wurden, dass die Wachstumshemmung dauerhaft besteht.

Bei Untersuchungen von Patienten, die wegen einer Krebserkrankung Radio- und Chemotherapie erhalten hatten, wurden auch noch Jahre später eine reduzierte Anzahl der MSC im Knochenmark und verringerte Knochendichte festgestellt (z.B. Galotto et al, 1999, Banfi et al, 2001). Da die Patienten aus diesen Studien jedoch meist eine Kombination aus TBI (Ganzkörperbestrahlung) und Chemotherapie erhielten, bleibt unklar, inwieweit die Bestrahlung alleine die MSC geschädigt hatte. Tierversuche zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Bei Mäusen, die eine TBI mit einer Dosis von 10 bzw. 9 Gy erhalten hatten, wurde in einer Studie von einer fast kompletten Erholung der Anzahl der CFU-Fs nach einem Jahr (Bierkens et al, 1991) und in einer anderen von einer langsamen und unvollständigen Erholung der Anzahl der CFU-F (Piersma et al, 1985) berichtet. Bei einem *in vitro* Versuch, bei dem die Proliferation von humanen mesenchymalen Stromazellen über einen Zeitraum von sechs Wochen nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 4 und 12 Gy beobachtet wurde, zeigten überlebende Zellen nach einigen Wochen wieder eine normale Proliferationsrate (Li J. et al, 2007). Es scheint demnach möglich, dass zumindest ein Teil der MSC hohe Bestrahlungsdosen überlebt.

In der Expressionsanalyse der MSC, bei der die durch die Bestrahlung mit 10 Gy regulierten Gene identifiziert werden sollten, waren einige Gene reguliert, die mit der Zellproliferation in Verbindung stehen. Gene, die die Zellproliferation hemmen, waren hauptsächlich hochreguliert (FABP3, TSC, MDM4, SCYE1, BTG3). Die Expression von PLAU und PLAT, die Plasminogen-Aktivatoren codieren, und SERPINE1, einem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor war nach Bestrahlung reduziert. Besonders die starke Herunterregulation von PLAU war auffällig. Die Plasminogen-Aktivatoren sind an der Fibrinolyse beteiligt, indem sie Plasminogen zu Plasmin konvertieren. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass die Plasminogen-Aktivatoren Proliferation und Zellteilung von Fibroblasten fördern (De Petro et al, 1994). PLAU spielt außerdem eine Rolle in Zellproliferation, -migration und Apoptose (Hildenbrand et al, 2008). Ihre Herunterregulation könnte hier möglicherweise eine proliferationshemmende Funktion haben.

5.4. Apoptose und Zellzyklusphasen nach Bestrahlung

Für die Messung der Apoptose und des Zellzyklus wurden für MSC, HS68 und NHDF unterschiedliche Zeitpunkte bestimmt, da die Verdopplungszeiten der verschiedenen Zellarten sehr unterschiedlich waren. Die Messungen zeigten, dass weniger als 1 Prozent der MSC nach Bestrahlung mit 10 Gy apoptotisch wurden. Die Ergebnisse waren zu jedem gemessenen Zeitpunkt von 48 bis 288 Stunden ähnlich. Es zeigte sich keine zeitabhängige Tendenz. Im Gegensatz zu den MSC wurde bei den Fibroblasten ein größerer Anteil der Zellen nach der Bestrahlung apoptotisch. Der Anteil nahm im Laufe der Messung weiter zu. Am Ende der Messung betrug er bei den HS68 nur ungefähr 5 Prozent, bei den NHDF jedoch 30 Prozent. Allerdings wurden die HS68 nur über einen Zeitraum von zwei Verdopplungszeiten gemessen, die NHDF und MSC jedoch über ungefähr vier. Vermutlich wäre bei den HS68 der Anteil der apoptotischen Zellen noch gestiegen.

Weiterhin wurden mit der FACS-Messung die Zellzyklusphasen von Kontrollzellen und mit 10 Gy bestrahlten Zellen verglichen. Über 80 Prozent der Kontrollzellen der MSC befanden sich zu allen Zeitpunkten in der G1-Phase. Dies bedeutet, dass sich die meisten Zellen zu den gemessenen Zeitpunkten nicht in der Teilung befanden. Diese Verteilung verdeutlicht die langsame Vermehrung der MSC. Nach der Bestrahlung befanden sich mehr MSC in der G2-Phase als bei den Kontrollzellen. Wenn sich viele Zellen in der G2-Phase befinden, bedeutet dies in der Regel, dass sich die Zellen schnell teilen. Da im Proliferationstest festgestellt wurde, dass sich MSC nach einer Bestrahlung von 10 Gy nicht oder fast nicht mehr teilen, befanden sich diese Zellen in einem „G2-Arrest“.

Das Auftreten eines G2-Arrestes nach Bestrahlung wurde bereits für andere Zellarten beschrieben (Maity et al, 1994; Pawlik & Keyomarsi, 2004). Bei dem G2-Arrest wird der Zellzyklus angehalten, bevor sich die Zellen teilen, um zu verhindern, dass sich Zellen mit defekter DNA teilen. Die Zellen versuchen in dieser Zeit den Defekt zu reparieren (Pawlik & Keyomarsi, 2004).

Während der Messung über zwölf Tage sammelten sich immer mehr MSC in der G2-Phase an, doch apoptotische Zellen waren kaum vorhanden. Es scheint, dass die Akkumulation der Zellen in der G2-Phase am Ende der Messung noch nicht abgeschlossen war. Bei den NHDF und HS68 befanden sich weniger Kontrollzellen in der G1-Phase als bei den MSC und mehr in der G2-Phase, da sich die Zellen wesentlich schneller vermehrten. Gegen Ende der Messung stieg die Anzahl der Zellen in der G1-Phase. Die Zellen vermehrten sich demnach

zu Beginn der Messung schnell und später langsamer. Da die Zellen zu den späteren Zeitpunkten bereits sehr dicht gewachsen waren, wurde wahrscheinlich dadurch die Vermehrung gehemmt. Wie bei den MSC war nach Bestrahlung der Anteil der Zellen in der G2-Phase größer. Auch hier befanden sich die Zellen in einem „G2-Arrest“. Während sich im Laufe der Messung immer mehr MSC in der G2-Phase ansammelten, nahm der Anteil der bestrahlten Zellen bei den HS68 und NDHF in der G2-Phase mit der Zeit eher ab. Es scheint als würde ein Teil dieser Zellen, die sich zunächst im „G2-Arrest“ befanden, später apoptotisch.

Auch in der Literatur ist beschrieben, dass Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase akkumulierten, bevor sie apoptotisch wurden. Außerdem wurde beobachtet, dass ein langer G2-Arrest mit größerer Strahlenresistenz korreliert (Aldrige & Radford, 1998). Die Strahlensensitivität ist weiterhin auch abhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden. Zellen in der G2-Phase sind sensitiver als Zellen in der G1-Phase (Pawlik & Keyomarsi, 2004; Forrester et al, 2000).

Aufgrund der langsamen Proliferation der MSC, ist davon auszugehen, dass sich wie bei den nicht bestrahlten Kontrollzellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung ein großer Teil der MSC in der G1-Phase befanden. Dies und der lange G2-Arrest wären eine mögliche Erklärung für die hohe Widerstandsfähigkeit der MSC.

Insgesamt zeigte die FACS-Messung, dass die MSC nach einer Bestrahlung mit 10 Gy nicht oder kaum apoptotisch wurden, dass aber die Proliferation vor allem in der G2-Phase, bevor sich die Zellen teilen, gehemmt wurde.

Auch bei der Expressionsanalyse der MSC zeigte sich, dass viele Gene, die Apoptose und Zellzyklus kontrollieren, nach der Bestrahlung reguliert waren.

Gene, die den Zellzyklus kontrollieren, waren meist herunterreguliert. Zu diesen Genen gehörten zum Beispiel Gene, die Zellzykluskontrollpunkte (RAD50) aktivieren, den Übergang von der G1 in die S-Phase (RB1, NEK11, RASSF1, ATF3), den Übergang von der G2 in die M-Phase (TPD52L1, RASSF1, DLG1) kontrollieren oder den Zellzyklus negativ (TUSC4, NF2, DLG1) regulieren (NCBI und GO). Einige wenige Gene waren aber auch hochreguliert, z.B. BTG3, ein p53 Target, und ATM. ATM spielt als proximaler Signaltransducer eine zentrale Rolle in der Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden (Pawlik & Keyomarsi, 2004). Dieses Gen reguliert unter anderem p53 und die Checkpoint Kinase CHK2 und bewirkt dadurch Kontrolle und Arrest der G1/S- und G2/M-Übergänge.

Die Expression vieler Gene, die Apoptose regulieren, war nach Bestrahlung verändert. Zu dieser Gruppe gehören Gene, die die Apoptose negativ oder positiv regulieren. In beiden Fällen waren mehr Gene herunter- als hochreguliert. Es gab jedoch auch einige hochregulierte Gene, die als apoptoseinduzierend gelten. Ein Gen, GSK3, das mit Strahlenresistenz in Verbindung gebracht wird (Watcharasit et al, 2002, Meares & Jape, 2006, Cordes & van Beunigen, 2003), war hochreguliert. Entgegen der Erwartung, dass Gene der Zellzykluskontrolle nach Bestrahlung eher hochreguliert sein müssten, war ein hoher Anteil der Gene herunterreguliert. Wie bei den DNA-Reparaturgenen wäre hier eine vorrausgegangene Expression dieser Gene mit anschließender Herunterregulation eine mögliche Erklärung. Da apoptoseinduzierende und -hemmende Gene sowohl hoch- als auch herunter reguliert waren, ist es außerdem schwierig, anhand der Expressionsanalyse eine generelle Aussage zu machen.

5.5. Auswirkung der Bestrahlung auf das Differenzierungspotenzial

Die Auswirkungen von einer Bestrahlung mit 4 und 10 Gy auf das Differenzierungspotenzial der MSC wurden untersucht. Die osteogene Differenzierung der MSC wurde durch die im Verlauf der Differenzierung gebildete extrazelluläre Matrix aus kalziumhaltigen Ablagerungen beurteilt.

Nach der Bestrahlung waren insgesamt weniger Kalziumablagerungen zu sehen als bei den Kontrollzellen. Bei der Beurteilung der Menge der Kalziumablagerungen musste aber berücksichtigt werden, dass die bestrahlten Zellen weniger dicht gewachsen waren als die Kontrollzellen, da durch die Bestrahlung die Proliferation gehemmt wurde. Die Kontrollzellen teilten sich in den zwei oder drei Wochen jedoch weiter. Die Menge der Kalziumablagerungen von bestrahlten Zellen und Kontrollzellen sollte deshalb in Abhängigkeit von der Zellzahl verglichen werden. Dies ist allerdings ohne eine exakte Methode zur Quantifizierung nicht möglich. Insgesamt entstand der Eindruck, als wäre die osteogene Differenzierung nach Bestrahlung nicht wesentlich reduziert.

Bei den MSC 285 waren die Kalziumablagerungen deutlich stärker ausgeprägt als bei den MSC 283. Wie beim Proliferations- und dem Koloniebildungsversuch zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den MSC verschiedener Spender. Ein deutlicher Unterschied zwischen der Dosis von 4 und von 10 Gy war bei beiden Zelllinien nicht zu erkennen.

Bei der adipogenen Differenzierung konnten sowohl bei den Kontrollzellen, als auch bei den bestrahlten Zellen nur vereinzelt Zellen mit Lipideinlagerungen gefunden werden. Da sich auch bei den Kontrollzellen nur eine geringe adipogene Differenzierung zeigte, war dieser Versuch schwieriger zu beurteilen. Deutliche Unterschiede zwischen mit 10 Gy bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen konnten nicht festgestellt werden.

Dass sich die adipogene Differenzierung nur bei vereinzelt Zellen und die osteogene Differenzierung bei den MSC 283 nur schwach zeigte, lag möglicherweise an der Passagenzahl. Für die Differenzierungsversuche wurden Zellen der 6. bis 9. Passage verwendet. In einer Studie wurde beschrieben, dass das adipogene und osteogene Differenzierungspotenzial bei allen Zellen bis zur 4. Passage erhalten blieb, während bei Zellen der 8. Passage bei 50% bzw. 25% der Zellen ein Verlust des adipogenen bzw. osteogenen Differenzierungspotentials zu erkennen war (Bonab et al, 2006).

Auch Kretlow und Mitarbeiter (2008) beschreiben, dass das Differenzierungspotenzial abhängig von der Passagenzahl, aber auch abhängig vom Alter des Spenders ist. Bei älteren Spendern nimmt das Differenzierungspotenzial ab (Kretlow et al, 2008; Zhou et al, 2008). Hier war jedoch das Differenzierungspotenzial der Zellen (MSC283) des mit 26 Jahren jüngsten Spenders geringer als das der Zellen des 44 Jahre alten Spenders (MSC 285).

Beide Differenzierungsversuche zeigten, dass das Differenzierungspotenzial der MSC durch die Bestrahlung nicht oder nicht wesentlich reduziert wurde. Es konnte allerdings auch keine, wie für die Fibroblasten beschriebene Induktion der Differenzierung durch Bestrahlung (Fournier et al, 2001, Herskind & Rodemann 2001) festgestellt werden.

Wenn eine hohe, auf den Gesamtorganismus letale Dosis von 10 Gy das Differenzierungspotenzial nicht wesentlich beeinflusst, kann davon ausgegangen werden, dass auch die in der Strahlentherapie verwendeten geringen Dosen, wahrscheinlich kaum einen Einfluss auf das Differenzierungspotenzial haben.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass interessanterweise viele Gene, die eine Rolle in Entwicklung und Zelldifferenzierung spielen, nach der Bestrahlung reguliert waren. Auch Gene, die an osteogener und adipogener Differenzierung beteiligt sind, wurden durch die Bestrahlung beeinflusst.

So war die Expression von PPAR γ , dem Markergen der Adipozytendifferenzierung (Nuttall & Gimble, 2004) nach Bestrahlung auf die Hälfte herunterreguliert und die Expression von

BMP6 nach Bestrahlung um das Doppelte erhöht. BMPs (bone morphogenic proteins), vor allem BMP2 und BMP6, fördern die osteogene Differenzierung (Friedmann et al, 2006, Jeon et al, 2006). Die Expression eines weiteren wichtigen Genes der osteogenen Differenzierung, RUNX2 (Jeon et al, 2006) war nur gering verändert. BMP2 war nicht exprimiert. Die mittleren Intensitäten von RUNX2 und BMP6, PPARG waren insgesamt recht hoch, obwohl es sich bei den Versuchen um undifferenzierte MSCs handelte.

Markergene der chondrogenen Differenzierung sind der Transkriptionsfaktor SOX9, die extrazellulären Matrixgene COL2 und 9 (Kollagen Typ II und IX), BGN (Biglycan), DCN (Decorin) und COMP (cartilage oligomeric matrix protein) und die Wachstumsfaktoren GDF (growth and differentiation faktor), BMPs und TGF β (Kolf et al, 2007). COL9A3 war nach Bestrahlung auf das Doppelte hochreguliert und GDF sogar auf das Sechsfache. Die anderen Gene waren nicht oder kaum reguliert. Die Intensitäten von COMP, BGN, DCN und GDF waren insgesamt hoch, COL2 und COL9A und B waren nicht exprimiert. Von den BMPs waren nur BMP1, BMP4, BMP6 und BMP8A exprimiert, teilweise mit recht hohen Intensitäten. Eine deutliche Regulation nach Bestrahlung war lediglich, wie oben bereits erwähnt, bei BMP 6 zu sehen.

Allerdings ist es wichtig zu erwähnen, dass von diesen Differenzierungsgenen nur PPARG und BMP6 zu den regulierten Genen mit einem p-value von $< 5 \times 10^{-3}$ gehören. Die Aussagekraft der Regulation der anderen Gene ist deshalb begrenzt. Die Genexpressionsanalyse lässt somit vermuten, dass die Bestrahlung die osteogene und adipogene Differenzierung der MSC beeinflusst. Wie oben beschrieben zeigte der Differenzierungsversuch jedoch keine wesentliche Beeinflussung durch die Bestrahlung. Die Genexpression wurde jedoch 6 Stunden nach der Bestrahlung analysiert, während die Differenzierung über mehrere Wochen erfolgte. Es ist also denkbar, dass es sich zum Teil um eine kurzzeitige Regulation der Gene ohne Langzeiteffekt handelt.

Desweiteren war die Expression anderer Gene, die an der Entwicklung des Skeletts beteiligt sind, meist erhöht. Hierzu gehörten z.B. OSKAR, ein möglicher Regulator der Osteoklastendifferenzierung (NCBI), und ORS2, das an der embryonalen Skelettmorphogenese beteiligt ist. Aber nicht nur die Expression von Genen, die osteogene und adipogene Differenzierung regulieren, war nach Bestrahlung verändert. Auch Gene, die die embryonale und die fetale Entwicklung regulieren, z.B. CSH1, DISP1, FZD2, CHD7 (NCBI) und SOX11, waren betroffen. Unter anderem war auch NOTCH2 herunterreguliert, dem eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und der Stammzellerhaltung zugeschrieben wird

(Tezuka et al, 2002). Kritisch zu bewerten ist die Einteilung von Genen, die verschiedene Funktionen haben. Ein Beispiel hierfür ist die Expression von TSC1. TSC1 ist an der Entwicklung von vielen Organen beteiligt (GO), hat allerdings auch eine Funktion in der Zellzykluskontrolle (Hengstschläger, 2001) und war möglicherweise aufgrund dieser Funktion nach Bestrahlung hochreguliert.

Es waren auffallend viele Gene, die an der Angiogenese und der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sind, reguliert. Die Funktion der MSC in Angiogenese und Nervenzellentwicklung wurde in verschiedenen Studien beschrieben. In mehreren *in vitro* und *in vivo* Experimenten wurde bereits gezeigt, dass MSC eine Rolle in der Angiogenese spielen. MSC produzieren proangiogene Faktoren in großer Menge (Kagiwada et al, 2008), fördern Endothelzellmigration und -formation *in vitro* (Gruber et al, 2005) und induzieren Neoangiogenese *in vivo* (Al-Khaldi et al, 2003, Wu et al, 2007). Schon häufig wurde bestätigt, dass sich MSC unter bestimmten Bedingungen in Kultur und *in vivo* in neuronale Zellen differenzieren können (Woodbury et al, 2000, Zhao et al, 2002). Aber auch undifferenzierte MSC exprimieren neurale Gene, so dass von einer neuronalen Prädisposition ausgegangen wird (Blondheim et al, 2006, Lamoury et al, 2006). In Kultur können sie spontan neurale Markerproteine exprimieren (Deng et al, 2006). Das erklärt die vermehrte Expression von Genen der Angiogenese und Nervenzellentwicklung in der Genexpressionsanalyse.

Alle an der Angiogenese beteiligten Gene, deren Expression durch die Bestrahlung verändert wurde, waren nach Bestrahlung herunterreguliert. Dies waren hauptsächlich proangiogene Gene, z.B. ECGF1 (endothelial cell growth factor), ARHGAP24, ein wichtiger Modulator der Angiogenese (Su et al, 2004) und ANGPTL4, dessen Expression auffallend stark reduziert war, aber auch zwei Gene, die die Angiogenese hemmen (PML, SERINE1). Auch die Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) wurde durch die Bestrahlung eher verringert. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien, in denen beschrieben wird, dass Bestrahlung die Produktion von proangiogenen Faktoren induziert (Abdollahi et al, 2003).

Die an der Entwicklung des Nervensystems beteiligten Gene waren sowohl hoch-, als auch herunterreguliert. Zu den hochregulierten Genen gehörten ID4, das Neuroblastenproliferation fördert und Neuronendifferenzierung hemmt (GO), TSC1 und NTRK2. NTRK2 wird auch mit therapieresistenten Neoplasien in Verbindung gebracht (Schulte et al, 2005). Zu den herunterregulierten Genen gehörten NOTCH2, SOX11, RTN4, NF2 und BAI2.

Auch die Expression einiger Gene, die an der Entwicklung der Muskeln, des Herzens, der Nieren und der Haut beteiligt sind, war verändert. Zu den einzelnen Gruppen sind jedoch nur wenige Gene zuzuordnen und diese sind meist nicht sehr spezifisch. So war z.B. IGFBP3, ein

Gen, das die Myoblastendifferenzierung fördert (GO), herunterreguliert. Dieses Gen wird außerdem mit Wachstumshemmung und Apoptose in Verbindung gebracht (Rajah et al, 2002).

Erwähnenswert ist die starke Expression nach Bestrahlung von KRT9 (Keratin 9), einem Gen, das eigentlich nur in der Epidermis von Hand- und Fußsohlen exprimiert wird. Es zeigte sich allerdings, dass auch MSC Keratin exprimieren können und sich in der Nähe von Wunden in Keratinozyten, Endothelzellen und Perizyten differenzieren und so die Wundheilung fördern (Wu et al 2007, Sasaki et al, 2008).

Die Genexpressionsanalyse zeigt, dass auch undifferenzierte MSC Gene verschiedener Differenzierungs- und Entwicklungsrichtungen exprimieren, und dass diese Expression durch Bestrahlung beeinflusst wird. Wie schon bei den Apoptose- und Reparaturgenen erscheint die Regulation nicht sehr eindeutig. Nur die proangiogenen Gene sind einheitlich herunterreguliert. Dies lässt auf eine Reduktion der angiogenesefördernden Eigenschaften der MSC nach Bestrahlung schließen.

5.6. MSC-Marker

Abgesehen von den nach Bestrahlung regulierten Genen wurden noch die Intensitäten von MSC-Markern und Wachstumsfaktoren beurteilt. Da sich die MSC nicht eindeutig durch einen Marker charakterisieren lassen, wurde eine Reihe von verschiedenen positiven und negativen Markern verwendet. Zu den hauptsächlich verwendeten Markern gehören die positiven Marker VCAM, CD13, CD44, CD29, CD105 und CD73 und die negativen Marker CD34, CD45, CD11b, CD 117 und CD 31 (Haynesworth et al, 1992, Pittenger et al, 1999, Colter et al, 2001, Silva et al, 2003, Honczarenko et al, 2006, Gonzalez et al, 2007).

Die Intensitäten der positiven MSC-Marker waren wie zu erwarten durchgehend sehr hoch und die Intensitäten der negativen MSC-Marker alle kleiner als 100. Die Intensitäten von Wachstumsfaktoren, die für die Erhaltung von Stammzeleigenschaften verantwortlich sind, wurden ebenfalls untersucht. Zu diesen gehören LIF (Jiang et al, 2002), Wnt3a (Boland et al, 2004), FGF2 (Tsutsumi et al, 2001), HGF, PDGF und EGF (Kolf et al, 2007). Die Intensitäten von LIF, FGF2, HGF, PDGFA und PDGFC waren hoch. Sie waren nach Bestrahlung meist geringgradig hochreguliert. Die Intensitäten von EGF und Wnt3a waren kleiner als 100.

Auch die Expression der embryonalen Stammzellmarker OCT4, SOX2, REX1 und Nanog wurde untersucht. In der Genexpressionsanalyse konnte jedoch nur die Expression von OCT4 nachgewiesen werden. Die Expression der Stammzellmarker OCT4, SOX2, REX1 und Nanog von MSCs wird beschrieben (Izadpanah et al, 2006, Gonzalez et al, 2006), konnte aber nicht immer nachgewiesen werden (Song et al, 2006). In einem der Fälle, in dem die Expression von Stammzellmarkern nachgewiesen wurde, handelte es sich um fetale mesenchymale Stammzellen. Möglicherweise verlieren MSCs mit zunehmendem Alter „embryonale Stammzeleigenschaften“.

5.7. Wirkung der Rezeptorkinaseinhibitoren auf die Zellen

Im Vergleich zur Bestrahlung war die Wirkung der Rezeptorkinaseinhibitoren auf die MSCs stärker als auf die Fibroblasten. Durch den VEGFR/PDGFR/c-kit/flt3-Inhibitor SU11657 und den Abl/PDGFR/C-KIT-Inhibitor SU14816 wurde die Koloniebildung und Proliferation der MSC wesentlich stärker gehemmt als die der Fibroblasten. Beträchtlich war der Unterschied vor allem bei SU11657. Eine Konzentration dieser Substanz, die offensichtlich keinen Effekt bei den NHDF hervorrief, führte bei den MSC selbst noch in zehnfacher Verdünnung zu einer starken Hemmung der Koloniebildung. Auch durch den TGF β R-Inhibitor LY 2109761 wurde das Koloniewachstum der MSC gehemmt. Insgesamt reagierten die MSC hier aber nicht empfindlicher als die Fibroblasten.

SU 11657 hemmt VEGF-Rezeptoren, PDGF-Rezeptoren, c-kit und FLT3. Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass jedoch lediglich der PDGF-Rezeptor A von den MSC exprimiert wurde. Weder VEGF-Rezeptoren, c-kit noch flt3 wurden exprimiert. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass MSC weder VEGF-Rezeptoren (Ball et al, 2007) noch c-kit besitzen. C-kit wird sogar als negativer Marker für MSC benutzt (Colter et al, 2001, Gonzalez et al, 2006).

Die Genexpressionsanalyse zeigte außerdem, dass PDGFA und C in großer Menge produziert wurden. PDGF stimuliert Wachstum und Migration von MSCs (Kilian et al, 2004). Aber auch die Expressionsintensitäten von VEGF und KITLG, dem Ligand für den Tyrosinkinase-Rezeptor c-kit, waren hoch. Lediglich die Expression von FLT3LG, dem Ligand für flt3 war niedrig.

Es wird beschrieben, dass MSC VEGF in großen Mengen sezernieren (Kagiwada et al, 2007), allerdings, wie oben schon erwähnt, keine VEGF-Rezeptoren besitzen. VEGFA kann jedoch an PDGF-Rezeptoren binden und damit die Migration und Proliferation stimulieren (Ball et al, 2007). Der Ligand von c-kit ist der Stammzellfaktor SCF, der von mesenchymalen Zellen sezerniert wird und auf hämatopoetische Vorläuferzellen wirkt (Majumdar et al, 2000). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass allein die Hemmung des PDGF-Rezeptors für die Wachstumshemmung der MSC durch SU11657 ausschlaggebend ist. Die Aktivierung der PDGF-Rezeptoren scheint notwendig für das Überleben der MSC zu sein.

Auffallend ist außerdem, dass die Expression von PDGFA und C nach der Bestrahlung hochreguliert war. Auch in anderen Studien wurde beschrieben, dass Bestrahlung die Produktion von PDGF induziert (Thornton et al, 1996). Zudem wird die Produktion von PDGF mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Verbindung gebracht (Powell & Abraham, 1993). Die Expression der PDGF-Rezeptoren war jedoch bei den meisten Zellen nach Bestrahlung herunterreguliert. Möglicherweise besteht auch hier ein Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und reduzierter Anzahl von PDGF-Rezeptoren.

SU14816 hemmt die ABL-Tyrosinkinase, außerdem PDGF-Rezeptoren und c-kit. Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass ABL1 von MSC stark exprimiert wird. Die ABL-Tyrosinkinase reguliert Zellproliferation, Überleben, Adhäsion, Migration, Stressantwort und Zytoskelettdynamik (Pendergast, 2002). Ob die Wirkung von SU14816 eher durch die Hemmung der ABL1-Tyrosinkinase oder der PDGF-Rezeptoren bedingt ist, bleibt fraglich. Beim Vergleich der MSC untereinander zeigten sich wieder die MSC 283 als sehr viel empfindlicher als die anderen Zellen. MSC284 waren unter den MSCs am resistentesten.

LY 2109761 hemmt die TGF- β -Rezeptorkinasen, Typ 1 und 2. Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass sowohl TGF- β 1- und 2-Rezeptoren exprimiert wurden, sowie TGF- β 1 und 2. Die Expressionsintensitäten des TGF- β 1-Rezeptors und von TGF- β 1 waren allerdings eher niedrig. Die Expressionsintensitäten von TGF- β 2 waren hoch.

5.8. Auswirkung der Bestrahlung auf die DNA und den Zellmetabolismus

Ionisierende Strahlen schädigen die Zellen erheblich, indem sie die DNA zerstören (Munro, 1970). Wie zu erwarten waren nach der Bestrahlung sehr viele Gene reguliert, die direkt mit der DNA- Zerstörung in Zusammenhang stehen. Hierzu gehörten Kontrollgene, die DNA-Defekte erkennen, DNA-Reparaturgene, wachstumshemmende Gene, die die Vermehrung geschädigter Zellen hemmen und Gene, die bei irreparablen Schäden den Zelltod induzieren. Von den nach der Bestrahlung regulierten DNA-Reparaturgenen war bei mehr als der Hälfte die Expression erhöht. Einige Gene waren jedoch auch herunterreguliert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass diese Gene zu einem früheren Zeitpunkt nach der Bestrahlung aktiviert worden waren und die Expression nach ausreichender Transkription herunterreguliert wurde.

Durch die Bestrahlung werden aber nicht allein die DNA, sondern auch andere Strukturen der Zelle z.B. Zellmembranen und Proteine geschädigt. Dies zeigt sich zum Beispiel bei der Expression von Genen des Ubiquitinzyklus. Diese Gene waren vor allem hochreguliert. Ubiquitin markiert defekte Proteine. Diese Proteine werden durch ubiquitinspezifische Peptidasen abgebaut. Weiterhin wurden einige Gene reguliert, die bei Stress oder Verletzung aktiviert werden, sowie Gene, die an der Immunreaktion beteiligt sind. Hierzu gehören die hochregulierten Gene SELS und PTGS1, die eine Rolle in der Antwort auf oxidativen Stress spielen, und AHR und MAPKAPK5, zwei weitere Gene der Stressantwort (Fritsche et al, 2007, Gao et al, 2006, NCBI).

Außerdem waren Gene hochreguliert, die bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen: BMP6, SCYE1 und HRH1. Ein weiteres Gen der Entzündungsreaktion, PLA2G4C, das für die Prostaglandinsynthese verantwortlich ist (Lindbom et al, 2002), war stark herunterreguliert. Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind, waren sowohl hoch-, als auch herunterreguliert.

Desweiteren waren sehr viele Transkriptionsgene reguliert. Unter anderem war die Expression sehr vieler Zinkfingerproteine erhöht. Zinkfingerproteine sind Transkriptionsregulatoren. Auch Gene, die an DNA-Metabolismus, Translation und RNA-Metabolismus beteiligt sind, waren reguliert. Von diesen waren mehr als die Hälfte hochreguliert, darunter auch UPF3B und DCP1B, die „nonsense RNA“ entfernen (NCBI). Die Hochregulation dieser zwei Gene spricht für zerstörte RNA. Sehr viele Gene des Zellmetabolismus und Transports waren reguliert.

Die Gene des Metabolismus codieren hauptsächlich Enzyme. Unter den hochregulierten Genen des Zellmetabolismus befanden sich viele Gene, die in Lipidbiosynthese und -metabolismus und Proteolyse involviert sind. Auch SELS, ein Gen, das für den Katabolismus von falsch gefalteten Proteinen verantwortlich ist (GO), war hochreguliert. Unter den herunterregulierten Genen waren solche, die z.B. in Proteinmetabolismus und Proteolyse, Lipidmetabolismus, Glycolyse und Glycogenbiosynthese involviert sind. Außerdem war die Mehrheit der Transportgene herunter reguliert.

5.9. Schlussfolgerung

Die MSC erwiesen sich in den meisten durchgeführten Versuchen als relativ resistent gegenüber Photonenstrahlung. Es zeigten sich bei den MSC und auch bei den Fibroblasten keine augenscheinlichen morphologischen Veränderungen nach der Bestrahlung mit geringen Dosen. Erst eine Dosis ab 10 Gy bewirkte eine gut sichtbare leichte Größenzunahme der Zellen. Die Motilität war jedoch durch Bestrahlung bei allen Zellarten deutlich eingeschränkt. Die Bestrahlung bewirkte eine dosisabhängige Hemmung des Wachstums der MSC, die vergleichbar mit der der Fibroblasten (NHDF und HS68) war. Die MSC der verschiedenen Spender reagierten bei diesem Versuch jedoch sehr unterschiedlich. Zum Teil wurde das Wachstum der MSC stark gehemmt. Apoptose fand jedoch bei den MSC aller Spender im Gegensatz zu den Fibroblasten nach der Bestrahlung mit 10 Gy nicht statt und auch das osteogene und adipogene Differenzierungspotenzial blieb nach der Bestrahlung mit 10 Gy erhalten.

Bis zur relativ hohen Bestrahlungsdosis von 10 Gy erwiesen sich die MSC damit als relativ resistent. In der klinischen Strahlentherapie am Patienten werden zwar solche und noch höhere Dosen bei der Radiochirurgie/Einzeitbestrahlung z.B. von Hirnmetastasen eingesetzt, in der überwiegenden Mehrzahl werden klinisch jedoch viel kleinere Dosen verwendet (ca. 2 Gy/Fraktion). Es ist somit denkbar, dass die MSC eine solche Bestrahlung größtenteils überleben können, aber in ihrer Vermehrung gehemmt sind. Allerdings ist wiederum unklar, wie sich die Kumulation der Dosen bei 30 x 2 Gy über 6 Wochen auswirken kann, wobei man einschränkend davon ausgehen kann, dass MSC im Blut im Mittel nicht die volle Strahlendosis erhalten.

Die MSC reagierten auf die Bestrahlung mit der Regulierung einer großen Anzahl von Genen. Da die Gene häufig sowohl hoch- als auch herunterreguliert, und sowohl hemmende als auch fördernde Gene reguliert waren, ist es schwer anhand der Genexpressionsanalyse auf

die Reaktion der Zellen zu schließen. Interessanterweise waren viele Gene, die an Differenzierung und Entwicklung, vor allem an embryonaler Entwicklung und Differenzierung von Nerven und Blutgefäßen beteiligt sind, reguliert. Das zeigt, dass auch undifferenzierte MSC Gene verschiedener Entwicklungsrichtungen exprimieren. Zudem waren Gene, GSK3, PXN, NTRK2 und CCT6, exprimiert, die auf eine Strahlenresistenz der MSC hinwiesen. Auch dies spricht für eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der MSC gegen Bestrahlung.

Bei den Versuchen mit den drei Rezeptorkinaseinhibitoren stellte sich heraus, dass die MSC im Gegensatz zu den Fibroblasten auf zwei Inhibitoren sehr empfindlich reagierten. Die Behandlung mit dem Abl/PDGFR/C-KIT-Inhibitor SU14816 und vor allem mit dem VEGFR/PDGFR/c-kit/flt3-Inhibitor SU11657 bewirkte eine sehr starke Wachstumshemmung. Die Wirkung des TGF β R-Inhibitors auf die MSC war weniger stark. Aufgrund des gemessenen Expressionsmusters der Zellen und des Inhibitionsspektrums der Substanzen scheint die Wirkung der beiden ersten Inhibitoren auf die MSC vorwiegend mit der Hemmung der PDGF-Rezeptoren zusammenzuhängen. Hieraus lässt sich schließen, dass im Gegensatz zu den Fibroblasten die PDGF-Rezeptoren für das Überleben und das Wachstum der MSC eine relativ größere Rolle spielen.

6. Zusammenfassung

Auswirkungen ionisierender Strahlung auf mesenchymale Stammzellen

Die leitende Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf humane mesenchymale Stammzellen (MSC). Hierfür wurden Stammzellen und zum Vergleich humane Fibroblasten (NDHF und HS68) mit hochenergetischen Photonenstrahlen (6MeV) an einem Linearbeschleuniger mit Dosen von 1 bis 10 Gy bestrahlt. Proliferation, klonogenes Überleben, Zellzyklus, Apoptose, osteogene und adipogene Differenzierung, Morphologie, Adhäsion und Motilität nach der Bestrahlung wurden untersucht. Die Bestrahlung führte zu einer dosisabhängigen Hemmung des Wachstums von MSC und Fibroblasten. Die Wachstumshemmung von MSC und Fibroblasten war insgesamt quantitativ ähnlich stark. Die MSC der verschiedenen Spender reagierten bei diesem Versuch jedoch unterschiedlich sensitiv. Zum Teil wurde das Wachstum der MSC stark gehemmt. In den weiteren Versuchen zeigten sich die MSC relativ resistent gegenüber Photonenstrahlen. Apoptosen traten bei den MSCs aller Spender selbst nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 10 Gy nicht auf. Im Gegensatz dazu wurde ein deutlicher Anteil der Fibroblasten apoptotisch. Nach der Bestrahlung mit 10 Gy war die Motilität der MSC beträchtlich verringert, das Zytoskelett erschien jedoch intakt und die Zellen erschienen geringfügig vergrößert. Das osteogene und das adipogene Differenzierungspotenzial der MSC blieben auch nach der Bestrahlung mit 10 Gy erhalten. Weiterhin wurde eine Genexpressionsanalyse (Transkriptom) mittels Microarrays nach Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy durchgeführt. Die MSC reagierten auf die Bestrahlung besonders mit der Regulierung von Genen, die DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Apoptose, Wachstum, Stoffwechsel, Motilität, Differenzierung und Entwicklung regeln. Interessanterweise waren neben Genen der adipogenen und osteogenen Differenzierung auch Gene reguliert, die in Zusammenhang mit embryonaler Entwicklung und Differenzierung von Nervengewebe und Blutgefäßen stehen. Auffällig war hier die Herunterregulation von proangiogenen Genen. Zudem waren Gene exprimiert, die auf eine Strahlenresistenz der MSC hindeuten. Darüber hinaus wurde die Wirkung des TGF β R-Serin/Threoninkinaseinhibitors (LY 2109761), des Abl/ PDGFR/ C-Kit-Tyrosinkinaseinhibitors (SU14816) und des VEGFR- /PDGFR-/ C-Kit /flt3-Tyrosinkinaseinhibitors (SU11657) in Kombination mit Bestrahlung untersucht. Auf den TGF β R-Rezeptorkinaseinhibitor reagierten MSC und Fibroblasten ähnlich, auf SU11657 und SU14816 reagierten die MSC jedoch wesentlich empfindlicher als die Fibroblasten. Das

Wachstum der MSC wurde bereits bei der Behandlung mit geringen Konzentrationen stark gehemmt. Die Behandlung mit SU11657 in hohen Konzentrationen führte zu einer nahezu vollkommenen Hemmung des Wachstums der MSC. Morphologisch intakte Zellen waren nicht mehr erkennbar. Aufgrund des gemessenen Expressionsmusters der Zellen und des Inhibitionsspektrums der Substanzen scheint die Wirkung der beiden ersten Inhibitoren auf die MSC vorwiegend mit der Hemmung der PDGF-Rezeptoren zusammenzuhängen. Es wurde außerdem beobachtet, dass die MSC verschiedener Spender auch unterschiedlich empfindlich auf die Behandlung mit den Rezeptorkinaseinhibitoren reagierten. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass MSC relativ resistent für die hier geprüften Endpunkte gegenüber direkter Photonenbestrahlung sind, jedoch vergleichsweise empfindlich auf den Abl/ PDGFR/ C-Kit-Tyrosinkinaseinhibitor und den VEGFR- /PDGFR-/ C-Kit /flt3-Tyrosinkinaseinhibitor reagieren.

7. Summary

Effects of ionizing radiation on mesenchymal stem cells

The intention of this work was the investigation of the effects of photon radiation on human mesenchymal stem cells (MSC). For this purpose stem cells and human fibroblasts (NHDF and HS68) for comparison have been irradiated with high energy photon radiation with a linear accelerator with doses of 1 to 10 Gy. Proliferation, clonogenic survival, cell cycle, apoptosis, osteogenic and adipogenic differentiation, morphology, adhesion and motility after irradiation were investigated. The irradiation caused a dose dependent inhibition of growth of MSC and fibroblasts. Altogether the growth inhibition of MSC and fibroblasts were similar. In this experiment the MSC of different donors reacted with a varying sensitivity. In particular the growth of the MSC was strongly inhibited. In further experiments the MSC were found to be relatively resistant to photon radiation. In the MSCs of all donors apoptosis did not even occur at a dose of 10 Gy. By contrast a noticeable part of the fibroblasts got apoptotic. After irradiation with 10 Gy the motility of the cells was considerably reduced, the cytoskeleton, however, seems to be intact and the cells were slightly enlarged. The osteogenic and the adipogenic differentiation potential remained even after irradiation with a dose of 10 Gy. Furthermore a gene expression analysis was made after irradiation of the cells with a dose of 10 Gy. Mesenchymal stem cells reacted to the irradiation with a regulation of genes particularly involved in DNA repair, cell cycle control, apoptosis, growth, metabolism, motility, differentiation and development. Interestingly, in addition to genes, which regulate the osteogenic and adipogenic differentiation, there were also genes regulated, which are associated with embryonic development and the differentiation of nerve tissue and blood vessels. The down regulation of the proangiogenic factors was noticeable. Furthermore genes were expressed that indicated a radiation resistance of mesenchymal stem cells. Additionally the effects of the TGF β R-serine/threonine kinase inhibitor (LY 2109761), the Abl/ PDGFR/ C-Kit- tyrosine kinase inhibitor (SU14816) and the VEGFR- /PDGFR-/ C-Kit /flt3-tyrosine kinase inhibitor (SU11657) in combination with irradiation were investigated. The reactions to the TGF β R-serine/threonine kinase inhibitor of MSC and fibroblasts were similar. However, MSC were considerably more sensitive to SU 11657 and SU 14816 than fibroblasts. Already with a treatment with low concentrations the growth was highly inhibited. The treatment with high concentrations led to a complete inhibition of growth of the MSCs and morphological intact cells could not be found under these conditions. Based on

the gene expression data and inhibitory spectra of SU 11657 and SU 14816, it is therefore conceivable that the strong effects of these drugs are PDGF dependent. Moreover, it was observed that the MSC of different donors also reacted with a highly varying sensitivity to treatment with receptor kinase inhibitors. Taken together the results show that MSC are relatively resistant to photon radiation, but very sensitive to the Abl/ PDGFR/ C-Kit-tyrosine kinase inhibition and the VEGFR-/PDGFR-/ C-Kit /flt3-tyrosine kinase inhibition.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calve serum</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FLT3	<i>fetal liver tyrosine kinase 3</i>
FLT3LG	Ligand der <i>fetal liver tyrosine kinase 3</i>
GO	Gene Ontology
Gy	Gray
h	Stunde
HGF	<i>hepytocyte growth factor</i>
Hz	Hertz
KIT	Tyrosinkinase C-Kit
KITLG	Ligand für die Tyrosinkinase C-Kit
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymale Stammzellen
p53	Tumorsuppressorprotein 53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor</i> - Rezeptor

PI	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i> - Rezeptor
VEGF	<i>vaskular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vaskular endothelial growth factor</i> -Rezeptor

9. Literaturliste

Abdollahi A, Lipson KE, Han X, Krempien R, Trinh T, Weber KJ, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Howlett AR, Huber PE. SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3755-63

Aldrige DR, Radford IR. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res.* 1998 Jul 1; 58(13): 2817-24

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8.

Al-Khaldi A, Eliopoulos N, Martineau D, Lejeune L, Lachapelle K, Galipeau J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene Ther.* 2003 Apr;10(8):621-9

Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ, Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000;60:6101-10

Amundson SA, Do KT, Vinikoor LC, Lee RA, Koch-Paiz CA, Ahn J, Reimers M, Chen Y, Scudiero DA, Weinstein JN, Trent JM, Bittner ML, Meltzer PS, Fornace AJ Jr. Integrating Global Gene Expression and Radiation Survival Parameters across the 60 Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Res.* 2008 Jan 15;68(2):415-24

Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2007 Oct;6(5):593-7. Epub 2007 Jul 24.

Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med.* 2007 Sep-Oct;11(5):1012-30.

Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R. Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. *Leuk Lymphoma.* 2001 Sep-Oct;42(5):863-70.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002 Jan;30(1):42-8

Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 197.452-454

Beinke C, Van Beuningen D, Cordes N. Ionizing radiation modulates the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (FAK) and its substrates p130cas and paxillin in A549 human lung carcinoma cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 2003 Sep;79(9):721-31.

Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res.* 1989 Mar;(240):270-80.

Bergman PJ, Harris D. Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1997 Jan;27(1):47-57.

- Bertho JM, Mathieu E, Lauby A, Frick J, Demarquay C, Gourmelon P, Gorin NC, Thierry D. Feasibility and limits of bone marrow mononuclear cell expansion following irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2004 Jan;80(1):73-81.
- Bierkens JG, Hendry JH, Testa NG. Recovery of the proliferative and functional integrity of mouse bone marrow in long-term cultures established after whole-body irradiation at different doses and dose rates. *Exp Hematol.* 1991 Feb;19(2):81-6.
- Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999 Jan 22;283(5401):534-7.
- Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, Burshtein A, Cherlow T, Kan I, Barzilai R, Bahat-Stromza M, Barhum Y, Bulvik S, Melamed E, Offen D. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev.* 2006 Apr;15(2):141-64.
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001), Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365
- Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2004 Dec 15;93(6):1210-30.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006 Mar 10;7:14.
- Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000 Dec 1;290(5497):1775-9.
- Briones J, Urbano-Ispizua A, Lawler M, Rozman C, Gardiner N, Marín P, Salgado C, Féliz P, McCann S, Montserrat E. High frequency of donor chimerism after allogeneic transplantation of CD34+-selected peripheral blood cells. *Exp Hematol.* 1998 May;26(5):415-20.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):100-4.
- Caplan A.I. and Bruder S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001, 7(6):259-64
- Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003 Dec;5(12):1028-38.
- Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc.* 2004 Jan 21;126(2):410-1.
- Clarke MF, Becker MW. Stem cells: the real culprits in cancer? *Sci Am.* 2006 Jul;295(1):52-9.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 3;98(14):7841-5.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72. Epub 2005 Sep 1.

Cordes N, van Beuningen D. Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in vitro. *Br J Cancer*. 2003 May 6;88(9):1470-9.

Croker AK, Allan AL. Cancer Stem Cells: Implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med*. 2007 Dec 20

De Bandt M, Ben Mahdi MH, Ollivier V, Grossin M, Dupuis M, Gaudry M, Bohlen P, Lipson KE, Rice A, Wu Y, Gougerot-Pocidallo MA, Pasquier C. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2003 Nov 1;171(9):4853-9.

Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3691-8.

Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1054-64. Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED.

De Petro G, Copeta A, Barlati S. Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1994 Jul;213(1):286-94.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):117-29

Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*. 2001 Feb;29(2):244-55.

Diehn M, Clarke MF. Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Dec 20;98(24):1755-7.

Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A, Brendel C. Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol*. 2005 Oct;84(11):722-7. Epub 2005 Aug 13.

Dikomey E, Borgmann K, Brammer I, Kasten-Pisula U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology*. 2003 Nov 15;193(1-2):125-35

Docheva D, Padula D, Popov C, Mutschler W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mol Med*. 2008 Mar-Apr;12(2):537-52

Forrester HB, Albright N, Ling CC, Deewey WC. Computerized video time-lapse analysis of apoptosis of REC: Myc cells x-irradiated in different phases of cell cycle. *Radiat Res*. 2000 Dec;154(6): 625-39

Fournier C, Kraft-Weyrather W, Kraft G. Survival, differentiation and collagen secretion of human fibroblasts after irradiation with carbon ions and X-rays. *Phys Med*. 1998 Jul;14 Suppl 1:44-7

Fournier C, Scholz M, Weyrather WK, Rodemann HP, Kraft G. Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *Int J Radiat Biol.* 2001 Jun;77(6):713-22.

Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S.(1970)The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3.393-403.

Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P.(1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 6. 230-47.

Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro I.I., Petrakova K.V.(1966)Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 16.381-90

Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem.* 2006 Jun 1;98(3):538-54.

François S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel ALocal irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):1020-9. Epub 2005 Dec 8.

Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann JLightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 22;104(21):8851-6.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells.* 2004;22(5):649-58

Hall Eric J., Giaccia Amato J., *Radiobiology for the Radiobiologist*, 6th edition, Lippincott Williams and Wilkins Publishing, 2006

Gage F.H., Coates P.W., Palmer T.D., Kuhn H.G., Fisher L.J., Suhonen J.O., Peterson D.A., Suhr S.T., Ray J.(1995)Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(25).11879-83.

Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Quarto RStromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol.* 1999 Sep;27(9):1460-6.

Gao Y, Hannan NR, Wanyonyi S, Konstantopolous N, Pagnon J, Feng HC, Jowett JB, Kim KH, Walder K, Collier GR. Activation of the selenoprotein SEPS1 gene expression by pro-inflammatory cytokines in HepG2 cells. *Cytokine.* 2006 Mar 7;33(5):246-51.

Ghazizadeh S., Taichman L.B.(2001).Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *EMBO J.* 20(6).1215-22.

Giaever, I. and Keese, C.R., *Monitoring Fibroblast Behavior with an Applied Electric Field*, PNAS USA 81, 3761-3764 (1984)

Giaever, I. and Keese, C.R., "Micromotion of Mammalian Cells Measured Electrically", PNAS USA 88, 7896-900 (1991).

Gonzalez R, Maki CB, Pacchiarotti J, Csontos S, Pham JK, Slepko N, Patel A, Silva F. Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1030-41

Greenberger JS. Toxic effects on the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol*. 1991 Dec;19(11):1101-9.

Gronthos S., Brahim J., Li W., Fisher L.W., Cherman N., Boyde A., DenBesten P., Robey P.G., Shi S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 81(8):531-5.

Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vögele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng*. 2005 May-Jun;11(5-6):896-903.

Gudjonsson T, Magnusson MK. Stem cell biology and the cellular pathways of carcinogenesis. *APMIS*. 2005 Nov-Dec;113(11-12):922-9.

Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia*. 2005 May;7(5):509-21.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992;13(1):69-80. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI.

Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):925-32

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1283-316.

Hengstschläger M. Tuberous sclerosis complex genes: from flies to human genetics. *Arch Dermatol Res*. 2001 Aug;293(8):383-6.

Herskind C, Rodemann HP. Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Exp Gerontol*. 2000 Sep;35(6-7):747-55.

Hildenbrand R, Gandhari M, Stroebel P, Marx A, Allgayer H, Arens N. The urokinase-system - role of cell proliferation and apoptosis. *Histol Histopathol*. 2008 Feb;23(2):227-36.

Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I143-50.

Holtzer, H. (1978). Cell lineages, stem cells and the 'quantal' cell cycle concept. In: Stem cells and tissue homeostasis. Eds: B.I. Lord, C.S. Potten, and R.J. Cole. (Cambridge, New York: Cambridge University press). 1-28.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1030-41.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; the International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for

- MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5
- Huber PE, Bischof M, Jenne J, Heiland S, Peschke P, Saffrich R, Gröne HJ, Debus J, Lipson KE, Abdollahi A. Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. *Cancer Res*. 2005 May 1;65(9):3643-55.
- in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003 Aug;88(8):845-52
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006 Dec 1;99(5):1285-97.
- Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, Ryoo HM, Choi JY, Yoshida M, Nishino N, Oh BC, Lee KS, Lee YH, Bae SC. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem*. 2006 Jun 16;281(24):16502-11.
- Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y, Dong A, Du Y, Huang X, Wang J, Lei X, Zheng X. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Pflugers Arch*. 2006 Oct;453(1):43-52. Epub 2006 Aug 17.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002 Aug;30(8):896-904.
- Johe K.K., Hazel T.G., Muller T., Dugich-Djordjevic M.M., McKay R.D. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*. 15.10(24):3129-40
- Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, Tadokoro M, Nagaya N, Ohgushi H. Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008 Jun;2(4):184-9
- Kang MK, Her BI, Ko MH, Kim CH, Cha SH, Kang SK. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci*. 2008 Jan 30;9(1):15
- Keese, C. R. Bhawe, K. Wegener, J. Giaever, I. Real-Time Impedance Assay to Follow the Invasive Activities of Metastatic Cells in Culture, *BioTechniques*. 2002 Oct; 33:842-850
- Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R, Jonuleit T. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res*. 2004 Jul 30;9(7):337-44.
- Kimler BF, Park CH, Yakar D, Mies RM. Radiation response of human normal and leukemic hemopoietic cells assayed by in vitro colony formation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1985 Apr;11(4):809-16.
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(2):307-16.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.

Kondo T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. *Cancer Biomark.* 2007;3(4-5):245-50.

Krause DS & Van Etten RA: Tyrosine kinases as targets for cancer therapy; *N Engl J Med.* 2005 Jul 14;353(2):172-87.

Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, Zhang WJ, Hong TH, Zhou G, Baggett LS, Mikos AG, Cao Y. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells *BMC Cell Biol.* 2008 Oct 28;9:60

Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):3319-26.

Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy.* 2006;8(3):228-42.

Lázaro C.A., Rhim J.A., Yamada Y., Fausto N. (1998). Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res.* 58(23):5514-22.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May 1;363(9419):1439-41.

Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, Ljungman P, Lönnies H, Nava S, Ringdén O. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2007 Aug;21(8):1733-8. Epub 2007 May 31.

Leblond, C.P. (1964). Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *Natl Cancer Inst Monogr.* 14,119-50

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1275-84

Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1669-75. Epub 2003 Oct 23

Lee WY, Cho SW, Oh ES, Oh KW, Lee JM, Yoon KH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim CC. The effect of bone marrow transplantation on the osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jan;87(1):329-35.

Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007 Jan;17(1):3-14.

Li J, Kwong DLW, Chan GCF. The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatr Transplantation* 2007;11:379-387

Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol.* 2004 Nov;127(3):326-34

- Lindbom J, Ljungman AG, Lindahl M, Tagesson C. Gene expression of novel cytosolic and secretory phospholipase A(2) types in human airway epithelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Sep;22(9):947-55
- Little M.T., Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar;2(3):231-8.
- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koç ON Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Mar;33(6):597-604.
- Maity a, McKenna WG, Muschel RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol.* 1995 Apr; 13(1): 1-13
- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000 Dec;9(6):841-8
- Meares GP, Jope RS. Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):16989-7001
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 2003 Jan;9(1):327-37.
- Meyn RE. Apoptosis and response to radiation: implications for radiation therapy. *Oncology (Williston Park).* 1997 Mar;11(3):349-56; discussion 356, 361, 365.
- McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, Whikehart DR. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis.* 2007 Oct 18;13:1984-2000.
- McKay R. (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science.* 4.276(5309).66-71.
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):287-98.
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2753-65. Epub 2006 Aug 24.
- Munro TR The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res.* 1970 Jun;42(3):451-70.
- Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.* 2004 Jun;4(3):290-4.
- O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA, Yuen HA, Louie SG, Kim H, Nicholas S, Heinrich MC, Berdel WE, Bello C, Jacobs M, Scigalla P, Manning WC, Kelsey S, Cherrington JM. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 15;9(15):5465-76.

- Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 15;59(4):928-42.
- Pendergast AM. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res.* 2002;85:51-100.Pendergast AM.
- Phillips TM, McBride WH, Pajonk F.The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 20;98(24):1777-85.
- Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, Ottenheim CP. Recovery of hemopoietic stromal progenitor cells after lethal total-body irradiation and bone marrow transplantation in mice.Transplantation. 1985 Aug;40(2):198-201
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DRMultilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7
- Powell SN, Abraham EH. The biology of radioresistance: similarities, differences and interactions with drug resistance. *Cytotechnology.* 1993;12(1-3):325-45
- Prockop DJ.Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):71-4..
- Qu L, Yang X, Wang X, Zhao M, Mi S, Dou Z, Wang H.Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem cells in a rabbit model. *Vet J.* 2007 Nov 16
- Rajah R, Lee KW, Cohen P.Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation. *Cell Growth Differ.* 2002 Apr;13(4):163-71.
- Rapp UR, Ceteci F, Schreck R.Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2008 Jan;7(1):45-51.
- Rave-Fränk M, Virsik-Köpp P,Pradier O, Nitsche M, Grünefeld S., Schmidberger H. I vitro response of humant dermal fibroblasts to x-irradiation: relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001 Dec (12), 77:1163-1174
- Rieger K, Marinets O, Fietz T, Körper S, Sommer D, Mücke C, Reufi B, Blau WI, Thiel E, Knäuf WU.Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* 2005 May;33(5):605-11.
- Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K.Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2006 May 27;81(10):1390-7
- Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer.* 1999 Mar;6(1):41-4.
- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A.Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3035-9.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T.Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005 Aug;52(8):2521-9.

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008 Feb 15;180(4):2581-7.

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J.* 2006 Dec;27(23):2775-83. Epub 2006 Nov 10.

Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Breymann C, Mol A, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. *Circulation.* 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I64-70.

Schueneman AJ, Himmelfarb E, Geng L, Tan J, Donnelly E, Mendel D, McMahon G, Hallahan DE. SU11248 maintenance therapy prevents tumor regrowth after fractionated irradiation of murine tumor models. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4009-16.

Schultz E. (1996) Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol.* 175: 84-94.

Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2003;21(6):661-9

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):396-401.

Slack J.M. (2000) Stem cells in epithelial tissues. *Science.* 287(5457):1431-3.

Sohal J, Phan VT, Chan PV, Davis EM, Patel B, Kelly LM, Abrams TJ, O'Farrell AM, Gilliland DG, Le Beau MM, Kogan SC. A model of APL with FLT3 mutation is responsive to retinoic acid and a receptor tyrosine kinase inhibitor, SU11657. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):3188-97.

Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells.* 2006 Jul;24(7):1707-18.

Steel GG. The case against apoptosis. *Acta Oncol.* 2001;40(8):968-75. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 15;59(4):928-42

Su ZJ, Hahn CN, Goodall GJ, Reck NM, Leske AF, Davy A, Kremmidiotis G, Vadas MA, Gamble JR. A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. *Proc Natl. Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12212-7.

Sugaya K, Kwak YD, Ohmitsu O, Marutle A, Greig NH, Choumrina E. Practical issues in stem cell therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2007 Sep;4(4):370-7.

Tauchmanová L, Serio B, Del Puente A, Risitano AM, Esposito A, De Rosa G, Lombardi G, Colao A, Rotoli B, Selleri C. Long-lasting bone damage detected by dual-energy x-ray absorptiometry, phalangeal osteosonogrammetry, and in vitro growth of marrow stromal cells after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov;87(11):5058-65

Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, Morimura N, Kuroda K, Miyatani S, Hozumi N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):231-9.

Thornton SC, Walsh BJ, Bennett S, Robbins JM, Foulcher E, Morgan GW, Penny R, Breit SN. Both in vitro and in vivo irradiation are associated with induction of macrophage-derived fibroblast growth factors. *Clin Exp Immunol.* 1996 Jan;103(1):67-73

Till J.E., McCulloch E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213-22.

Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R., van der Kooy D. (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 17.287(5460):2032-6.

Trzaska KA, Rameshwar P. Current advances in the treatment of Parkinson's disease with stem cells. *Curr Neurovasc Res.* 2007 May;4(2):99-109.

Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Oct 26;288(2):413-9.

Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA, Demetri GD. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene.* 2001 Aug 16;20(36):5054-8

Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet.* 2004 Aug 28-Sep 3;364(9436):766-70

Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):7951-5.

Wegener, Joachim. Keese, R., Charles, Giaever, Ivar, "Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces" *Experimental Cell Research* 259, 158-166 (2000).

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000 Aug 15;61(4):364-70

Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007 Oct;25(10):2648-59.

Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 2008 Jan;331(1):359-372.

Xu J, Lu Y, Ding F, Zhan X, Zhu M, Wang Z. Reversal of diabetes in mice by intrahepatic injection of bone-derived GFP-murine mesenchymal stem cells infected with the recombinant retrovirus-carrying human insulin gene. *World J Surg.* 2007 Sep;31(9):1872-82.

Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002 Mar;174(1):11-20.

Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. 2008 Jun;7(3):335-43. Epub 2008 Jan 31

Anhang I: Genexpression nach der Bestrahlung mit 10 Gy - Tabelle mit signifikant regulierten Genen

Tabelle: Dargestellt sind signifikant regulierte ($p < 5 \times 10^{-3}$) Gene nach einer Bestrahlung mit 10 Gy aus der Genexpressionsanalyse (4.7.). Die Gene wurden nach der „Gene Ontology“ – Datenbank in Gruppen eingeteilt. In der ersten Spalte befindet sich der Genname, hochregulierte Gene sind rot, herunterregulierte Gene sind blau. In der zweiten Spalte befindet sich die Regulierung (Regulierung der bestrahlten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (\log_2)) und in der dritten die Genbeschreibung. Die Beschreibung der Gene erfolgte mit Hilfe des „National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)“ (NCBI), „Gene Ontology“ (GO) und anderer Literatur (siehe Literaturverzeichnis).

Genexpression , Transkription		
Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
POLR3B	0,452	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B; RNA-Polymerase III: synthetisiert tRNA aus small ribosomal RNA (NCBI)
HDAC1	-0,536	Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression, Kontrolle von Zellproliferation und -differenzierung, negative Regulation von p53 (NCBI,1)
POLR3H	-0,650	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H (22.9kD)
Negative Regulation der Transkription		
CSDA	0,621	Zellzykluskontrolle, bildet Komplex mit CDK4, hemmt G1/S Übergang (2,3)
ARID3B	0,551	DNA-bindendes Protein; embryonales „patterning“ (“Anlegen von Zellmustern”), Zelllinien -Genregulation, Zellzykluskontrolle, transkriptionale Regulation (NCBI)
MDM4	0,698	Inhibitor von p53 (induziert durch p300/CBP) (4,5,6)
MEIS2	0,604	Transkription, wichtig für Entwicklung; RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktor, Transkriptions- Corepressor (NCBI,7)
ZNF 8	0,570	Negative Regulation der Transkription (GO)
TBX2	-0,816	Transkriptionsfaktor; Regulierung der Entwicklung (NCBI)
DNAJB6	-0,476	Negative Regulation der Transkription (GO)
Positive Regulation der Transkription		
BMP6	1,077	osteogene Differenzierung (NCBI,8)
PLAGL1	0,479	DNA-bindendes Protein; antiproliferativ (NCBI)
MAP2K3	-1,013	Aktivierung von MAPK14, MAPK14: Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulierung und Entwicklung (NCBI)
SCAP	-0,455	Transport
Regulation der Transkription		
ACAD8	0,253	acyl-coenzyme A dehydrogenase family, member 8
TAF2	0,587	Transkription, Coaktivator (Teil des Transkriptionsfaktors IID, der erforderlich für die Initiierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II ist) (NCBI)
X RNF6	0,632	Transkriptionsregulation (NCBI)
ATF3	1,610	gehört zu ATF3/CREB- Familie von Transkriptionsfaktoren; Expression von ATF3 wird induziert durch DNA- Schädigung nach Bestrahlung=> hemmt Zellwachstum und Zellzyklus (Übergang G1 in S-Phase) (NCBI,9)
CREBBP	0,878	Repressor von c-myc , Schutz vor vorzeitigem Eintritt in S-Phase und vor Apoptose, Coaktivator von p53, Überexpression=> TNF alpha induzierter Zelltod (10,11)
CDK9	0,291	Zellzyklusregulation; CDK9 und RNA -Polymerase II=> zellzyklusabhängige Transkription (NCBI,12)
NR1D1	0,824	circardianer Rhythmus (13,14,15)
NDNL2	0,305	Teil von Proteinkomplex, spielt Rolle in Chromosom-Dynamik (16)
SUV420H1	0,521	suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)
ZBTB2	0,687	zinc finger and BTB domain containing 2
ZFP90	1,234	Regulation der Transkription (GO)
ZNF10	0,668	Transkriptionshemmung (NCBI)
ZNF 131	0,483	Transkriptionsfaktor, spielt Rolle in Entwicklung und Karzinogenese (194)
ZNF 181	0,889	Regulation der Transkription (GO)
ZNF224	0,410	Transkriptionshemmung (17)
ZNF226	0,594	Regulation der Transkription (GO)
ZNF23	0,686	hemmt Zellwachstum (18)
ZNF283	0,542	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 284	0,711	Regulation der Transkription (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
ZNF 30	0,830	Regulation der Transkription (GO)
ZNF350	0,560	(=ZBRK1), hemmt Transkription von Gad45a; spielt Rolle bei Antwort auf DNA-Schädigung; wird abgebaut nach DNA-Schädigung; Hemmung von ZBRK1=> Zellen reagieren sensibel auf DNA-Schädigung (19)
ZNF 385	0,516	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 419	1,329	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 420	0,631	Regulation der Transkription (GO)
ZNF44	1,227	Regulation der Transkription (GO)
ZNF546	1,262	Regulation der Transkription (GO)
ZNF558	0,523	Regulation der Transkription (GO)
ZNF568	0,600	Regulation der Transkription (GO)
ZNF572	1,377	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 615	0,560	Regulation der Transkription (GO)
ZNF585B	0,651	Regulation der Transkription (GO)
ZNF624	0,798	Regulation der Transkription (GO)
ZNF630	0,712	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 671	0,634	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 709	0,626	Regulation der Transkription (GO)
ZNF 8	0,570	Regulation der Transkription (GO)
ZSCAN5	0,542	zinc finger and SCAN domain containing 5
ASCC1	-0,357	activating signal cointegrator 1 complex subunit 1
BAZ1A	-0,706	Transkriptionsregulierung(20)
CHD7	-1,073	Expression während embryonaler Entwicklung; Mutation => CHARGE- Syndrom (NCBI,21,22,23)
DLX1	-1,253	Transkriptionsfaktor; Regulierung von Signalen von TGFβ- Superfamilie; Differenzierung von Neuronen (NCBI,24)
HIVEP2	-0,566	bindet an DNA; Promotor und Verstärker von vielen Genen, u.a. kappa-B- Motiv (NCBI)
MEIS3	-0,637	Meis homeobox3
NFKB1	-0,541	Transkriptionsregulator; stimuliert die Expression von Genen, die in viele biologische Funktionen involviert sind; Tumorpromotor, aber auch Tumorsuppressor, hemmt p53, antiapoptotische Funktion, proinflammatorisch (NCBI,25)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,26)
PHOX2A	-0,830	zentrale Rolle in Entwicklung des autonomen Nervensystems; reguliert Expression von von Enzymen der catecholaminergen Biosynthese (NCBI)
PML	-0,389	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor, Expression zellzyklusabhängig, reguliert p53; Bestrahlung=> (ATM)-hCds1/Chk2-PML => Apoptose (27,28)
PPARG	-1,180	Adidozytendifferenzierung (NCBI)
SCML1	-0,580	Sex comb midleg-like 1(Drosophila)
SOX11	-1,156	Regulation von embryonaler Entwicklung; Entwicklung des Nervensystems (NCBI)
STAT1	-0,435	Transkriptionsaktivator, aktiviert durch Interferon-alpha, Interferon-gamma, EGF, PDGF and IL6; Expression von Genen, die wichtig für Zelllebensfähigkeit in Reaktion auf Pathogene sind (NCBI,29,30,31)
TFDP2	-0,682	Transkription; Zellzyklusregulation (32)
VDR	-0,860	Vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D3) receptor, Regulation der Transkription (GO)
ZNF239	-0,703	DNA- und RNA-bindendes Protein; involviert in Transkription und post-transkriptionale Regulation ; unterdrückt Transkription (NCBI,33)
Translation, RNA Metabolismus		
ALKBH8	0,830	alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli), Translation (GO)
RPS12	0,627	40s-Untereinheit von Ribosom (NCBI), Translation (GO)
SECISBP2	0,674	Inkorporation von Selenocystein in Proteine; Selenoproteine: Antioxidanz, Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (NCBI,34), Translation (GO)
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35)
ZCCHC8	0,777	RNA-Metabolismus (36)
KIAA1604	0,617	mRNA-Processing (GO)
RP11-78J21.1	0,518	mRNA-Processing (GO)
PTBP2	0,569	Regulation von RNA-Splicing; moduliert Zellzyklus (G1 Arrest) und Differenzierung durch pos. Regulation von p27(Kip1), einem CDK Inhibitor (NCBI, 37), mRNA-processing (GO)
SETX	0,442	DNA/RNA Helikase- Domäne; involviert in DNA- Reparatur, RNA- Processing (38,39)
TRUB1	0,707	TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 1 (E. coli), tRNA-Processing (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
INT6	0,757	DEAD box Protein; interagiert mit RNA-Polymerase II, involviert in snRNA-processing (NCBI)
PAPPDC2	0,650	Enzym; PMN (neutrophile Granulozyten)- Aktivierung (40)
PPWD1	0,535	peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1
UPF3B	0,382	mRNA- Export und mRNA- Kontrolle, entfernt „nonsense- mRNA“(NCBI), katabolischer Prozess, mRNA (GO)
DCP1B	0,958	Regulation von mRNA- Zerfall, Zerfall von „nonsense- mRNA“(NCBI), katabolischer Prozess, mRNA (GO)
RP9	0,529	pre-mRNA -Splicing (41), bindet an Nukleinsäure (GO)
MITF2*	0,570	Translationsinitiierung (NCBI), bindet an kleine ribosomale Untereinheit (GO)
LARP2*	0,797	RNA-bindendes Protein; möglicherweise beteiligt an small RNA Biogenese (NCBI,42), bindet an mRNA (GO)
KRR1*	0,680	small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast) (NCBI), bindet an mRNA (GO)
DHX32*	0,391	DEAD box Protein; DEAD box Proteine: Translationsinitiierung, RNA-Splicing, involviert in Embryogenese, Spermatogenese, Zellwachstum und-teilung.(NCBI)
DDX46*	0,459	RNA Helikase, pre-mRNA- Splicing (43)
HARSL*	0,485	(=HARS2) histidyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial; Proteinbiosynthese, verbindet tRNA mit Aminosäure(NCBI)
COP55	-0,604	wichtiger Regulator von verschiedenen Signalwegen, pos. Regulation von E3 Ubiquitin-Ligase, Abbau von CDKN1B/p27Kip1, Coaktivator von JUN/AP1 Transkriptionsfaktoren (NCBI,44,45,46,47), Translation (GO)
SCAP	-0,455	positive Regulation der Translation (GO)
TUFM	-0,322	mitochondrialer Elongationsfaktor (NCBI)
METTL3	-0,837	posttranskriptionale Methylierung von Adenosin in mRNA (NCBI), RNA –Modifikation (GO)
TTF2	-0,506	RNA polymerase II termination- Aktivität =>pre-mRNA- Splicing; reduziertes TTF2 ist für die Retention von RNA- Polymerase II an mitotischen Chromosomen verantwortlich (NCBI,48), mRNA-Processing (GO)
PABPC1	-0,576	Translation, RNA-Metabolismus, RNA-Transport (NCBI,49), mRNA-Processing (GO), mRNA-Stabilität (GO)
SFRS6	-0,835	RNA- Splicing (NCBI,50)
IARS	-0,540	Isoleucine-tRNA synthetase; Aminoacyl-tRNA- Synthetasen verbinden Aminosäuren mit Nukleotidtriplets (NCBI)
EXOSC6	-0,610	Teil von Exosom; mRNA-Abbau (von instabiler RNA) (NCBI), rRNA-Processing (GO)
RBMS2	-0,796	DNA-Replikation, Gentranskription, Zellzyklusprogression, Apoptose (NCBI)
HNRCP*	-0,461	RNA-Metabolismus und Transport (NCBI)
DNA-Reparatur		
SETX	0,442	DNA/RNA Helikase- Domäne; involviert in DNA- Reparatur (38,39)
DCLRE1C	0,598	V(D)J Rekombination, DNA-Reparatur (NCBI,51)
REV3L	0,556	Polymerase zeta => Transläsionsynthese; Mutation, Reparatur von DNA , Zellzykluskontrolle (52,53)
FANCC	1,181	DNA-Reparatur; Reparatur von Querverbindungen (NCBI,54,55)
EPC2	0,389	DNA- Reparatur, Chromatinmodifikation, Transkription (IEA)
RAD23B	0,769	Nukleotid –Exzisionsreparatur; involviert in ubiquitinmedierte Proteolyse (NCBI)
ZNF350*	0,560	(=ZBRK1)hemmt Transkription von Gad45a; spielt Rolle bei Antwort auf DNA-Schädigung; wird abgebaut nach DNA-Schädigung; Hemmung von ZBRK1=> Zellen reagieren sensibel auf DNA-Schädigung (19)
ASTE1	0,674	asteroid homolog 1 (Drosophila), DNA-Reparatur (GO)
ATM	0,643	wichtige Zellzykluskontrollpunkt-Kinase, reguliert p53 and BRCA1, Checkpoint Kinase CHK2, checkpoint Proteinase RAD17 und RAD9, DNA-Reparaturprotein NBS1 (NCBI)
POLG	0,356	Polymerase, gamma; Reverse Transkriptase, mitochondriale DNA -Replikation, Basen Exzisionsreparatur (56)
APEX1	-0,466	DNA-Reparatur (NCBI), Basenexcisionsreparatur (GO)
TDP1	-0,450	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1; DNA-Reparatur nach Bestrahlung (NCBI, 57, 58)
RAD50	-0,670	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten (NCBI)
CSNK1D	-0,561	Caseinkinase; Kontrolle von Prozessen, einschließlich DNA- Replikation und – Reparatur (NCBI, 59)
PMS2L5	-0,375	postmeiotic segregation increased 2-like 5; Mismatch-Repair-Gen (60)
NEK11	-0,629	aktiviert in G1/S Arrest; involviert in DNA- Replikation und Antwort auf DNA-Schädigung (NCBI, 61,62,GO), DNA- Schädigungskontrollpunkt (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
PML	-0,389	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor, Expression zellzyklusabhängig, reguliert p53; Bestrahlung=> (ATM)-hCds1/Chk2-PML => Apoptose (27,28) Antwort auf DNA-Schädigung (GO), DNA- Schädigungskontrollpunkt (GO)
MMS19L*	-0,462	DNA-Reparatur (NER =Nucleotide excision repair) und Transkription (63)
DNA- Metabolismus		
SUPV3L1	0,626	Zellzyklus, Chromatinerhaltung (Down-Regulation von SUPV3L10: Zellzyklusstörungen und Apoptose durch p53), DNA duplex unwinding (64,65,66)
ATM	0,643	wichtige Zellzykluskontrollpunkt-Kinase, reguliert p53 and BRCA1, Checkpoint Kinase CHK2, Checkpoint Proteinasen RAD17 und RAD9, DNA-Reparaturprotein NBS1, DNA Rekombination (NCBI)
DCLRE1C	0,598	V(D)J Rekombination, DNA-Reparatur (NCBI,51)
REV3L	0,556	Polymerase zeta => Transläsionsynthese; Mutation, Reparatur von DNA , Zellzykluskontrolle, DNA- Replikation (52,53)
POLG	0,356	Polymerase, gamma; Reverse Transkriptase, mitochondriale DNA Replikation (56)
TFDP2	-0,682	Transkription; Zellzyklusregulation (32)
RAD50	-0,670	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten, DNA-Rekombination (NCBI)
TPD52L1	-0,923	Zellzyklusproliferation, reguliert Apoptose induzierende MAP3K5 positiv (NCBI,67)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen und Proteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionentransport involviert sind (NCBI)
NT5E	-0,557	Ecto-5-prime-Nucleotidase(Mononukleotid => Nukleosid); Adenosinsynthese (NCBI)
Entwicklung, Zelldifferenzierung		
DISP1 *	0,767	Embryonale Entwicklung, Differenzierung (NCBI), hedge hog Rezeptor(GO)
CSH1*	0,756	Wachstumskontrolle; vor allem in Placenta, hochreguliert während Entwicklung (NCBI)
PPARG	-1,180	Adidozytendifferenzierung (NCBI), Fettzelldifferenzierung (GO)
FZD2	-0,784	Rezeptor für Wnt- Signalproteine, Expression während fetaler Entwicklung (NCBI), Epithelzelldifferenzierung (GO)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,26), Stammzellerhaltung (GO)
SH3BP4	-0,604	Embryonale Hämatopoese (GO)
PGEA1*	-0,663	(=CBY1) hemmt Beta-Catenin (Transkriptionsaktivator); Adipozytendifferenzierung (NCBI, 68)
TRIM37*	-0,476	Entwicklung und Onkogenese
TSPAN15*	-1,375	Transmembranprotein; Signaltransduktion, Regulation von Entwicklung, Wachstum und Bewegung (NCBI)
Entwicklung des Skeletts		
BMP6	1,077	osteogene Differenzierung (NCBI, 8)
OSKAR*	0,619	Expression in Preosteoklasten oder Osteoklasten; möglicherweise Regulator der Osteoklastendifferenzierung (NCBI)
OSR2	0,846	embryonale Skelettmorphogenese, pos. Regulation der Zellproliferation
UFD1L	0,495	Abbau von geschädigten Proteinen, Abbau der Mitosespindel nach Mitose (NCBI)
VDR	-0,860	Vitamin D(1,25 dihydroxyvitamin D3)- Rezeptor
Entwicklung des Nervensystems		
NTRK2	0,627	aktiviert Mitglieder des MAPK- Signalweg, Zelldifferenzierung; Therapieresistenz von Neoplasien (NCBI, 69)
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35), Entwicklung des Gehirns (GO)
ID4	0,795	Neuroblasten Proliferation (GO),negative Regulation von Astrozyten- und Neuronendifferenzierung (GO)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,26)
SOX11	-1,156	Regulation von embryonaler Entwicklung; Entwicklung des Nervensystems (NCBI)
RTN4	-0,479	hemmt Wachstum von Nervenzellen (NCBI)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionentransport involviert sind (NCBI), Schwannzellproliferation (GO)
BAI2	-0,617	Gehirnspezifischer Angiogenesehemmer (NCBI, GO)
Entwicklung der Muskeln		
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35), Herzmuskeldifferenzierung (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
DMD	-1,226	Dystrophin; verbindet Zytoskelett mit Zellmembran (NCBI)
ITGA11	-0,477	Alpha Intgrin, Membranprotein; exprimiert in mesenchymalen Geweben, bindet Collagen (NCBI,70)
IGFBP3	-0,335	Wachstumshemmung, induziert Apoptose; Bestrahlung induziert IGFBP3 (NCBI,71,72,73,74), Myoblastendifferenzierung der quergestreiften Muskulatur (GO)
RB1	-0,387	Zellzykluskontrolle, spielt Rolle bei Differenzierung und Alterung; G1 Arrest nach Bestrahlung (96,96,98,99), Spindel (GO)
Entwicklung des Herzens		
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35), Herzmuskeldifferenzierung (GO)
EGLN1	-0,642	reguliert HIF-1, HIF-1: Anpassung der Zelle an wenig Sauerstoff; reduzierte Aktivität von PDHs (EGLN1=PDH2) => Stabilisierung von HIF1 alpha (wird bei Normoxie abgebaut) (75)
CHD7	-1,073	Expression während embryonaler Entwicklung; Mutation => CHARGE- Syndrom (NCBI,21,22,23)
Entwicklung der Nieren		
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35)
C1GALT1	-0,410	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1; Angiogenese, Entwicklung der Niere, Zelldifferenzierung (76)
ASL	-0,376	Argininosuccinat- Lyase (NCBI)
Entwicklung der Haut		
KRT9	1,238	Keratin, exprimiert nur Epidermis von Handfläche und Sohle (NCBI)
Entwicklung des Mesoderms		
JAK3	0,628	Signaltransduktion; vor allem exprimiert in Immunzellen (NCBI)
Entwicklung der Blutgefäße		
C1GALT1	-0,410	core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1; Angiogenese, Entwicklung der Niere, Zelldifferenzierung (76)
CHD7	-1,073	Expression während embryonaler Entwicklung; Mutation => CHARGE- Syndrom (NCBI,21,22,23)
ANGPTL4	-2,569	Serum- Hormon, Glucose Homöostase, Lipidmetabolismus, Apoptose- Überlebens-Faktor von vaskulären Endothelzellen, proangiogen (NCBI,77)
ARHGAP24	-0,930	wichtiger Modulator der Angiogenese, proangiogen (78)
PML	-0,389	Transkriptionsfaktor, Tumorsupressor; Expression zellzyklusabhängig und reguliert p53; Bestrahlung=> (ATM)-hCds1/Chk2-PML => Apoptose, negative Regulation der Entwicklung der Blutgefäße (27,28)
SERPINE1	-1,014	=PAI =Plasminogen activator inhibitor, hemmt u-PA; TGFβ/PAI-1 schützt vor plasminogeninduzierter Apoptose von Fibroblasten und Fibronectin- Proteolyse; Proliferation und Zellteilung (79,80), negative Regulation der Entwicklung der Blutgefäße (GO)
MYH9	-0,470	Teil des kontraktiven System von Zellen (keine Muskelzellen), Motilität und Chemotaxis (NCBI, 81)
ECGF1*	-0,627	endothelial cell growth factor 1; Angiogenese; Expression induziert durch Bestrahlung, schützt vor durch DNA-Schäden induzierter Apoptose (NCBI,187,188)
DSCR1L1*	-1,311	hemmt Calcineurinaktivität und Angiogenese (193)
Programmierter Zelltod/ Apoptose		
Negative Regulation der Apoptose		
GSK3B	0,345	Regulation von Zellzyklus und Apoptose; antiapoptotisch bei TNF alpha induzierter Apoptose; nach DNA- Schädigung: Aktivierung von p53; nach Bestrahlung: involviert in ECM- abhängiges Zellüberleben und Strahlenresistenz (NCBI,82,83,84)
SELS	0,438	reguliert Zytokinproduktion in Makrophagen, spielt Rolle in der Kontrolle von Entzündungen (NCBI,85), Antiapoptose (GO)
ANGPTL4	-2,569	Serum- Hormon, Glucose -Homöostase, Lipidmetabolismus, Apoptose- Überlebens-Faktor von vaskulären Endothelzellen, proangiogen (NCBI,77)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,26), Antiapoptose (GO)
PSEN1	-0,229	reguliert Amyloid Precursor Protein Processing; Mutation bei Alzheimer (NCBI), Antiapoptose (GO)
HDAC1	-0,536	Schlüsselrolle in Regulation der Genexpression, Kontrolle von Zellproliferation und – differenzierung, neg. Regulation von p53 (NCBI,1), Antiapoptose (GO)
NFKB1	-0,541	Transkriptionsregulator, stimuliert die Expression von Genen, die in viele biologische Funktionen involviert sind. Tumorpromotor, aber auch Tumorsupressor, hemmt p53, proinflammatorisch (NCBI,25), antiapoptotische Funktion (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
AATF	-0,474	hindert MAP3K12 induzierte Apoptose; DNA-Zerstörung=> Che-1 Akkumulation => Aktivierung von p53 und Erhalt von G2/M- Checkpoint (NCBI,186), Antiapoptose (GO)
IER3	-0,946	Überexpression=> Apoptose und Zellzyklusbeschleunigung, Unterbrechung der Expression => Weniger Apoptose und langsamerer Zellzyklus; schützt aber in vivo T-Zellen vor Apoptose (NCBI,86,87,88), Antiapoptose (GO)
RTN4	-0,479	hemmt Wachstum von Nervenzellen (NCBI), neg. Regulation der Antiapoptose (GO)
Positive Regulation der Apoptose		
SETX	0,442	DNA/RNA Helikase- Domäne; involviert in DNA- Reparatur (38,39)
ADAMTSL4	0,911	Positive Regulation der Apoptose (GO)
F2R	0,924	involviert in Thrombininduzierte Gerinnung, aktiviert durch Proteolyse (NCBI,89), Caspaseaktivierung (GO)
PLAGL1	0,479	DNA-bindendes Protein; antiproliferativ (NCBI), Apoptoseinduktion (GO)
FOXO1A*	0,524	Zellzyklus und Apoptose, proapoptotisch (zusammen mit TNF alpha), Tumorsuppressor, Wachstumskontrolle bei Tumorzellen (90,91)
IGFBP3	-0,335	Wachstumshemmung, induziert Apoptose; Bestrahlung induziert IGFBP3 (NCBI,71,72,73,74),
STAT1	-0,435	Transkriptionsaktivator, aktiviert durch Interferon-alpha, Interferon-gamma, EGF, PDGF und IL6; Expression von Genen, die wichtig für die Zelllebensfähigkeit in der Reaktion auf Pathogene sind, (unterschiedliche Reaktion auf Bestrahlung) (NCBI,29,30,31), Caspaseaktivierung (GO)
DNAJB6	-0,476	Negative Regulation der Caspaseaktivierung (GO)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,77), Apoptoseinduktion (GO)
PML	-0,389	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor; Expression zellzyklusabhängig und reguliert p53; Bestrahlung=> (ATM)-hCds1/Chk2-PML => Apoptose(27,28), Apoptoseinduktion (GO)
TPD52L1	-0,923	Zellzyklusproliferation, reguliert Apoptose induzierende MAP3K5 positiv (NCBI,67)
MAPK1	-0,650	Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulierung und Entwicklung; zytotoxisch, Bestrahlung => Expression von MAPK1(NCBI,92), Apoptoseinduktion (GO)
TAI1	-0,489	RNA-bindendes Protein, nucleolytische Aktivität gegen CTL(Zytotoxische Lymphozyten)-Zielzellen, involviert in Apoptoseinduktion (NCBI), Apoptoseinduktion (GO)
ING5*	-0,466	interagiert mit p53, hemmt Zellwachstum, induziert Apoptose (NCBI)
Apoptose von Neuronen		
UNQ188	-1,126	Apoptose von Neuronen (GO)
Zellzyklus		
CARR1	0,378	induziert Apoptose, Zellzyklusregulation (93,94)
CDK9*	0,291	Zellzyklusregulation; CDK9 und RNA Polymerase II=> zellzyklusabhängige Transkription (NCBI,12)
TPD52L1	-0,923	Zellzyklusproliferation, reguliert apoptoseinduzierende MAP3K5 positiv (NCBI,67), G2/M Übergang (GO)
RAD50	-0,670	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur, Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten, DNA-Rekombination (NCBI)
MAPK1	-0,650	Proliferation, Differenzierung, Transkriptionsregulierung und Entwicklung; zytotoxisch, Bestrahlung => Expression von MAPK1(NCBI,92)
NEK11	-0,629	aktiviert in G1/S Arrest; involviert in DNA- Replikation und Antwort auf DNA-Zerstörung (NCBI,61,62)
TUSC4	-0,294	Tumorsuppressor; involviert in DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Regulation von Apoptose (93)
Zellzyklusarrest , negative Regulation des Zellzyklus , Zellzykluskontrollpunkt		
PLAGL1	0,479	DNA-bindendes Protein; antiproliferativ (NCBI), Zellzyklusarrest (GO)
ATM	0,643	wichtige Zellzykluskontrollpunkt-Kinase, reguliert p53 and BRCA1, Checkpoint Kinase CHK2, Checkpoint Proteinasen RAD17 und RAD9, DNA-Reparaturprotein NBS1 (NCBI), negative Regulation des Zellzyklus (GO), Zellzykluskontrollpunkt (GO)
BTG3	0,321	antiproliferativ, p53 Target (NCBI,94), negative Regulation des Zellzyklus (GO)
ATF3*	1,610	gehört zu ATF3/CREB- Familie von Transkriptionsfaktoren; Expression von ATF3 wird induziert durch DNA- Schädigung nach Bestrahlung=> hemmt Zellwachstum und Zellzyklus (Übergang G1 in S-Phase) (NCBI,9)
CREBBP*	0,878	Repressor von c-myc , Schutz vor vorzeitigem Eintritt in S-Phase und vor Apoptose, Coaktivator von p53, Überexpression=> TNF alpha induzierter Telltod (10,11)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,26) , Zellzyklusarrest (GO)
RASSF1	-0,508	induziert Zellzyklusarrest G1 und G2/M (hemmt cyclin D1), Tumorsuppressor (NCBI,95), Zellzyklusarrest (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
RB1	-0,387	Zellzykluskontrolle, spielt Rolle bei Differenzierung und Alterung; G1 Arrest nach Bestrahlung (96,96,98,99), Zellzyklusarrest (GO), Zellzykluskontrollpunkt (GO)
TUSC4	-0,294	Tumorsuppressor; involviert DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Regulation von Apoptose (93), negative Regulation des Zellzyklus (GO)
RECK	-0,914	neg. Regulator von MMP9, MMP9: baut Kollagen IV und V ab; Schlüsselenzym von Tumorerkrankung und Metastase (NCBI), negative Regulation des Zellzyklus (GO)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen und Proteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionentransport involviert sind (NCBI), negative Regulation des Zellzyklus (GO)
DLG1		discs large homolog (Drosophila), G1- DNA- Schädigungskontrollpunkt (GO), negative Regulation des Zellzyklus (GO)
PML	-0,389	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor, Expression zellzyklusabhängig, reguliert p53; Bestrahlung=> (ATM)-hCds1/Chk2-PML => Apoptose(27,28), Zellzykluskontrollpunkt (GO)
Zellteilung		
RB1	-0,387	Zellzykluskontrolle, spielt Rolle bei Differenzierung und Alterung; G1 Arrest nach Bestrahlung (96,96,98,99)
MYH9	-0,470	Teil des kontraktile System von Zellen (keine Muskelzellen), Motilität und Chemotaxis (NCBI, 81)
STAG2	-0,481	Untereinheit von Cohesin (Cohesin hält Geschwisterchromosomen zusammen von der DNA-Replikation bis zur Trennung); Transkriptionsregulierung (100)
TACC1	-0,853	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
Zellproliferation		
CDK9	0,291	Zellzyklusregulation; CDK9 und RNA Polymerase II=> zellzyklusabhängige Transkription (NCBI,14)
OSR2	0,846	embryonale Skelettmorphogenese, pos. Regulation der Zellproliferation
USP8	0,350	Ubiquitinspezifische Peptidase; Abbau von EGFR, endosomaler Verkehr (101, 102, 103)
ID4	0,795	Proliferation von Neuroblasten (GO)
STAT4	-0,909	Transkriptionsfaktor; Differenzierung von T-Helferzellen (NCBI)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen und Proteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionentransport involviert sind (NCBI), Gliazellproliferation (GO)
DLG1	-0,383	discs large homolog (Drosophila), Endothelzellproliferation (GO)
TBX2	-0,816	Transkriptionsfaktor; Regulierung von Entwicklung (NCBI), Mitose (GO)
Negative Regulation der Zellproliferation		
FABP3	0,723	FABPS Metabolismus von langkettigen Fettsäuren, Modulation von Zellwachstum- und Proliferation; FABP3 Wachstumshemmung von Epithelzellen (NCBI)
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, negative Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35)
MDM4	0,698	Inhibitor von p53 (induziert durch p300/CBP) (4,5,6)
SCYE1	0,436	Proliferationshemmung, Apoptose (NCBI, 104,105)
BTG3	0,321	antiproliferativ, p53 Target (NCBI,94)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen und Proteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionentransport involviert sind (NCBI)
NOTCH2	-0,563	Schlüsselrolle in Entwicklung; Differenzierung (NCBI,26)
FTH1	-0,484	Eisenspeicherung (NCBI)
Zytoskelett		
PREX1	-0,677	aktiviert RAC1, RAC1: GTPase, reguliert viele zelluläre Prozesse, Kontrolle von Zellwachstum, Zytoskelett-Reorganisation, Aktivierung von Proteinkinasen (NCBI,106), Aktinfilamentpolymerisation (GO)
ACTG1	-0,415	Aktin, gamma; Zytoskelett (keine Muskelzellen) (NCBI)
ABI2	-0,506	Regulator von Zell-/Gewebeorganisation; Abi/WAVE Komplex=> Regulation von Aktin-Polymerisation (107,108)
ARHGAP24	-0,930	wichtiger Modulator der Angiogenese, proangiogen (NCBI,78)
DMD	-1,226	Dystrophin; verbindet Zytoskelett mit Zellmembran (NCBI)
DNMBP	-0,722	verbindet Dynamin und Aktinzytoskelett, spielt Rolle bei Zellverbindungen (109,110)
FARP1	-0,425	verbindet Zytoskelett mit Zellmembran, exprimiert in Chondrozyten (NCBI)
FHOD3	-1,187	Aktinskelettorganisation (NCBI)
PKP4	-0,698	Organisation von Desmosomen und anderen adhären Verbindungen (NCBI,111)
LMOD1	-1,115	Komponente des kontraktile Systems von glatten Muskelzellen (112)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionentransport involviert sind (NCBI)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
TRIB2	-1,118	Apoptose (113)
RAPH1	-1.010	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1
RAI14	-0,803	retinoic acid induced 14
EPB41L5	-1,224	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
WASPIP*	-0,634	Aktinzytoskelett-Organisation, wichtig für Migration (NCBI,113,114)
SEPT5*	-0,605	reguliert Zytoskelettorganisation (NCBI)
Microtubulizytoskelett		
PXN	1,321	Paxillin; focal adhesion-associated protein, Substrat von FAK (Focal adhesion kinase); FAK: Regulation von vielen zellulären Prozessen, Überleben und Tod, Proliferation und Migration; Bestrahlung => Expression von PXN => verbesserte Strahlenresistenz (115,116,117,118,119), Microtubuliassoziierter Komplex (GO)
TBX2	-0,816	Transkriptionsfaktor; Regulierung von Entwicklung (NCBI), Mitose (Spindel) (GO)
RB1	-0,387	Zellzykluskontrolle, spielt Rolle bei Differenzierung und Alterung; G1 Arrest nach Bestrahlung (96,96,98,99), Spindel (GO)
MARK1	-0.493	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1, Regulation von microtubulibasierendem Transport (120)
RASSF1	-0,508	induziert Zellzyklusarrest G1 und G2/M (hemmt cyclin D1), Tumorsuppressor (NCBI,95), Spindel (GO)
RANBP9	-0,399	Interaktion mit vielen anderen Proteinen, u.a. mit CDK11 (Apoptose) und HIPK2 (DNA-Reparatur) (NCBI), Microtubuliassoziierter Komplex (GO)
CEP63	-0,129	Centrosomprotein; Organisation von Mikrotubuli (NCBI)
SDCCAG8	-0,914	serologically defined colon cancer antigen 8, Centrosom (GO)
PDE4DIP	-0,695	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin), Centrosom (GO)
Aktinzytoskelett		
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35)
PDE4DIP	-0,695	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin), Centrosom (GO)
MYOM1	-1,230	Myomesin 1; Strukturkomponente von Sakomer; Muskelkontraktion (NCBI)
MYH9	-0,470	Teil des kontraktile System von Zellen (keine Muskelzellen), Motilität und Chemotaxis (NCBI,81)
TPM1	-0,908	involviert in kontraktiles System von Muskelzellen und Zytoskelett von anderen Zellen, Unterdrückung von TMP1=> Zelltransformation, Anoikis, Metastasierung (NCBI,121,122)
VCL	-0,537	Zytoskelettprotein; assoziiert mit Zell-Zell-und Zell-Matrix- Verbindungen; verankert F-Aktin an der Membran (NCBI)
CGNL1	-0,443	cingulin-like; verbindet Apical Junctional Complex (AJC) mit Zytoskelett; (AJC: wichtiger Regulator von Signalwegen) (123)
Zellbeweglichkeit, Zellmigration, Zelladhäsion, Zellverbindung		
PXN	1,321	Paxillin; focal adhesion-associated protein, Substrat von FAK (Focal adhesion kinase); FAK: Regulation von vielen zellulären Prozessen, Überleben und Tod, Proliferation und Migration; Bestrahlung => Expression von PXN => verbesserte Strahlenresistenz (115,116,117,118,119), Zellbeweglichkeit (GO), Zelladhäsion (GO), Zellverbindung (GO)
F2R	0,924	involviert in thrombininduzierte Gerinnung, aktiviert durch Proteolyse (NCBI,82), Zellbeweglichkeit (GO)
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35), Zelladhäsion (GO),
ICAM1	0,939	Entzündungsreaktion (124,125,126),Zell- Zelladhäsion (GO)
CLDN12	0,523	integrales Membranprotein, Tight junction (127), Zell-Zelladhäsion (GO), Zellverbindung (GO)
CNTNAP3	0,497	Zelladhäsion (GO)
SCYE1	0,436	Proliferationshemmung, Apoptose (NCBI, 104,105), Leukozytenmigration (GO)
ACTG1	-0,415	Aktin, gamma; Zytoskelett (keine Muskelzellen) (NCBI), Zellbeweglichkeit (GO)
TPM1	-0,908	involviert in kontraktiles System von Muskelzellen und Zytoskelett von anderen Zellen, Unterdrückung von TMP1=> Zelltransformation, Anoikis, Metastasierung (NCVI,121,122), Zellbeweglichkeit (GO)
TPBG	-0,681	Hochreguliert während früher embryonaler Stammzellendifferenzierung (128), Zellbeweglichkeit (GO), Zelladhäsion (GO)
MYH9	-0,470	Teil des kontraktile System von Zellen (keine Muskelzellen), Motilität und Chemotaxis (NCBI,81), Blutgefäßendothelzellmigration (GO), Leukozytenmigration (GO)
ABI2	-0,506	Regulator von Zell-/Gewebestrukturorganisation; Abi/WAVE Komplex=> Regulation von Aktin-Polymerisation (107,108), Zellmigration (GO), Zelladhäsion (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
FN1	-0,853	Fibronectin; Zelladhäsion und Migration (NCBI), Zellmigration (GO)
ITGA11	-0,477	Alpha-Intgrin, Membranprotein; exprimiert in mesenchymalen Geweben, bindet Collagen (NCBI, 70), Zellmigration (GO), Zelladhäsion (GO)
NF2	-0,557	Protein interagiert mit Zelloberflächenproteinen und Proteinen, die in Zytoskelettdynamik und Regulierung von Ionen-transport involviert sind (NCBI), negative Regulation von Zellmigration (GO), Zelladhäsion (GO)
RRAS	-0,557	aktives RRAS =>Zelladhäsion, Membranprotrusion (129,130,131), negative Regulation von Zellmigration (GO)
VCL	-0,537	Zytoskelettprotein; assoziiert mit Zell-Zell- und Zell-Matrix- Verbindungen; verankert F-Aktin an der Membran (NCBI),negative Regulation von Zellmigration (GO), Zelladhäsion (GO), Zellverbindung (GO)
RRAS2	-0,899	Ras-Protein Signaltransduktion, Zellmigration (132), positive Regulation von Zellmigration (GO)
DLG1	-0,838	discs large homolog (Drosophila), Zelladhäsion (GO)
PSEN1	-0,229	reguliert Amyloid Precursor Protein Processing; Mutation bei Alzheimer (NCBI), Zelladhäsion (GO)
PARVA	-0,645	Aktinbindendes Protein, fokale Adhäsion; Zellausbreitung und Migration; Apoptose (NCBI,133,134), Zelladhäsion (GO), Zellverbindung (GO)
PKP4	-0,698	Organisation von Desmosomen und anderen adhären-ten Verbindungen (NCBI,111), Zelladhäsion (GO)
TNS3	-1,168	Tensin 3; (EGF=> neg. Regulation von TNS3 => Zellmigration) (189,190), Zellverbindung (GO)
ARHGAP24	-0,930	wichtiger Modulator der Angiogenese, proangiogen (78), Zellverbindung (GO)
CGNL1	-0,443	cingulin-like; verbindet Apical Junctional Complex (AJC) mit Zytoskelett; (AJC: wichtiger Regulator von Signalwegen) (123), Zellverbindung (GO)
Transport		
FABP3	0,723	FABPS Metabolismus von langkettigen Fettsäuren, Modulation von Zellwachstum- und Proliferation; FABP3 Wachstumshemmung von Epithelzellen (NCBI)
EXOC1	0,550	Vesikeltransport (NCBI), Exozytose (GO), Proteintransport (GO)
PLDN	0,333	Synaptische Vesikelexozytose (NCBI, GO)
EXOC8	0,181	Exozytose (135,GO), Proteintransport (GO)
VSP29	1,002	retrograder Transport von Proteinen von Endosomen in das Trans-Golgi – Netzwerk (NCBI)
F2R	0,924	involviert in thrombininduzierte Gerinnung, aktiviert durch Proteolyse (NCBI,82), Proteintransport (GO)
UPF3B	0,382	mRNA- Export und mRNA- Kontrolle (entfernt "nonsense- mRNA")(NCBI), Nukleinsäuretransport (GO)
SDAD1	0,303	60s Ribosomenbiogenese; exprimiert während fetaler Entwicklung (136), Proteintransport (GO)
AP2B1	-0,459	auf zytoplasmatischer Seite von Vesikeln der Plasmamembran, verbindet Clathrin mit Rezeptor (NCBI)
TRAPPC6A	-0,618	trafficking protein particle complex 6A, Vesikeltransport (GO)
STX1A	-0,570	Syntaxin 1A; Exozytose von Neurotransmittern; Syntaxin ist verantwortlich für Vesikelfusion (NCBI)
RTN3	-0,655	Apoptose induzierend (NCBI,137,138,139,140)
RAB6B	-1,055	Regulierung von Transport und Übergang von Anaphase in Metaphase während der Mitose; vor allem im Gehirn exprimiert (141), Golgi-Vesikeltransport (GO), Proteintransport (GO)
STEAP2	-1,260	Membranprotein; lokalisiert an Plasmazellmembranen von Golgi-Apparat und Vesikeln; Eisen-transport (NCBI), Golgi-Vesikeltransport (GO), Endozytose (GO)
SH3BP4	-0,604	Kontrolle von Endozytose (NCBI), Endozytose (GO)
RUFY1	-0,599	Endozytose, Proteintransport (142,GO)
RABEP1	-0,288	reguliert Endosom(143), Endozytose (GO), Proteintransport (GO)
MARCH2	-0,275	membrane-associated ring finger (C3HC4) 2; Endozytose, Ubiquitinzyklus, Endozytose (GO)
RPH3AL	-0,936	Regulation von Sekretion in Gehirn und sekretorischen Geweben (144), Exozytose (GO)
EXOC4	-0,579	Exozytose (GO), Proteintransport (GO)
LMAN2L	-0,330	Export von Glycoproteinen aus ER(145), Golgi-Vesikeltransport (GO), Proteintransport (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
SNUPN	-0,518	transportiert snRNPs (spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein) in den Zellkern (146), Proteintransport (GO)
RANBP17	-0,424	Proteinimport (NCBI), Proteintransport (GO), Nukleinsäuretransport (GO)
NUDT4	-0,764	Regulierung von intrazellulärem Verkehr (NCBI), Nukleinsäuretransport (GO)
ATG10	-1.222	autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae) Proteintransport (GO)
Ionentransport		
CLCN6	0,477	chloride channel 6; Spannungsabhängiger Chloridkanal (NCBI), Anionentransport (GO)
TSC1	0,562	Zellzykluskontrolle, neg. Regulation des Zellzyklus, kontrolliert G1/S Übergang (35), Kationentransport (GO), Nukleinsäuretransport (GO)
KCNMA1	0,388	Spannungs- und kalziumsensitiver Natriumkanal (NCBI), Kationentransport (GO)
SLC30A6	-0,411	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6; Zinkionentransport, Kationentransport (GO)
SLC25A37	-0,862	solute carrier family 25, member 37; Kationentransport (GO)
STEAP1	-1,706	Oberflächenantigen, exprimiert bei Zell-Zell-Verbindungen (NCBI), Kationentransport (GO)
HCN2	-1,036	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2, Kationentransport (GO)
FTH1	-0,484	Eisenspeicherung (NCBI), Kationentransport (GO),
STEAP2	-1,260	Membranprotein; lokalisiert an Plasmamembranen von Zellmembran von Golgi-Apparat und Vesikeln; Eisentransport (NCBI)
CCBE1	-0,698	collagen and calcium binding EGF domains 1, Anionentransport (GO)
SLC20A1	-0,866	Natriumabhängiger Phosphatsymporter; Rezeptor für Retrovirus (NCBI,147,148), Anionentransport (GO)
VDR	-0,860	Vitamin D (1,25 dihydroxyvitamin D3)-Rezeptor
Ubiquitinzyklus		
USP8	0,350	Ubiquitinspezifische Peptidase; Abbau von EGFR, endosomaler Verkehr (101,102,102)
USP15	0,835	Ubiquitinspezifische Peptidase (NCBI)
HECTD2	0,645	Ubiquitinzyklus (GO)
SENP8	0,892	bindet an Ubiquitinligase => optimale Ubiquitinligase- Aktivität (NCBI)
UFD1L	0,495	Abbau von geschädigten Proteinen, Abbau der Mitosespindel nach Mitose (NCBI)
ARIH2	0,366	spielt Rolle in Hämatopoese; Ubiquinierung und Wachstumshemmung (149,150)
TRIM5	0,776	tripartite motif-containing 5, hemmt Retrovirusinfektion (NCBI,151,152,153)
RAD23B	0,769	Nukleotid –Excisionsreparatur; involviert in ubiquitinmedierte Proteolyse (NCBI)
RNF20	-0,639	Ubiquitin-Ligase; Ubiquinierung und Methylierung von Histon H3; Histonmodifikation Spielt wichtige Rolle bei transkriptionaler Regulation (NCBI)
USP34	-0,335	ubiquitin specific peptidase 34
MARCH2	-0,275	membrane-associated ring finger (C3HC4) 2; Endozytose, Ubiquitinzyklus
ATG10	-1,222	autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)
Metabolismus		
GMPPA	0,512	GDP-mannose pyrophosphorylase A; Synthese von Oligosacchariden (NCBI), biosynthetischer Prozess (GO)
SPTLC1	1,087	Serine palmitoyltransferase, Schlüsselenzym der Sphingolipidsynthese (NCBI), biosynthetischer Prozess (GO)
COQ7	0,739	involviert in Ubiquinonbiosynthese, Gluconeogenese (NCBI), Coenzymbiosynthese (GO)
MTHFR	1,360	NADPH (NCBI), Coenzymbiosynthese (GO)
LIAS	0,389	lipoic acid synthetase; Fettsäuresynthese (NCBI), Coenzymbiosynthese (GO)
GGT6	0,774	gamma-glutamyltransferase 6 homolog, Coenzymbiosynthese (GO)
MMAB	0,754	Enzym, synthetisiert Adenosylcobalamin aus Vitamin B12 (NCBI), Cobalaminbiosynthese (GO)
PTGS1	1,395	(=COX1; COX3); Gewebemöostase, Zell-Zell- Signalgebung, reguliert Angiogenese in Endothelzellen (NCBI), biosynthetischer Prozess, Lipidmetabolismus (GO)
SCD	1,094	Stearoyl-CoA- Desaturase, Synthese von ungesättigten Fettsäuren; Regulation von Zellwachstum und Differenzierung, Zellüberleben (NCBI,154), biosynthetischer Prozess (GO)
IDI1	0,926	Enzym, Cholesterolsynthese (NCBI), biosynthetischer Prozess, Lipidmetabolismus (GO)
BMP6	1,077	osteogene Differenzierung (NCBI,8) positive Regulation der Aldostereonbiosynthese (GO)
FDFT1	0,303	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase, Lipidmetabolismus (NCBI,GO)
HMGCS1	1,351	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble), Lipidmetabolismus (GO)
HSD17B1	1,214	Enzym (155), Sterolbiosynthese (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
FABP3	0,723	FABPS: Metabolismus von langkettigen Fettsäuren, Modulation von Zellwachstum- und Proliferation; FABP3: Wachstumshemmung von Epithelzellen (NCBI), Phospholipidbiosynthese (GO)
SELS	0,438	reguliert Zytokinproduktion in Makrophagen, spielt Rolle in der Kontrolle von Entzündungen (NCBI,85), Katabolismus von falsch gefalteten oder unvollständig synthetisierten Proteinen (GO)
ACAD8	0,253	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8, Ureazyklus (GO)
CRYM	2,357	Crystallin; in Linse, bindet Schilddrüsenhormon, mögliche Rolle bei Regulation oder Entwicklung (NCBI)
MFN1	0,402	Mediator der mitochondrialen Fusion (NCBI)
NPL	1,310	N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
ADAMTS6	0,911	Metalloproteinase; Umbau der ECM, Proteolyse (GO)
MAP1D	0,782	methionine aminopeptidase 1D, überexprimiert bei Colonkrebs (157), Proteolyse (GO)
KLK9	1,254	kallikrein-related peptidase 9, Proteolyse (GO)
PIP5K3	0,451	phosphatidylinositol-3-phosphate/phosphatidylinositol 5-kinase, type III; Lipidkinase; reguliert zelluläre Prozesse, Membranverkehr, Zytoskelettorganisation (NCBI) Proteinmetabolismus (GO)
BTN2A1	1,173	involviert in Lipid-, Fettsäure- und Sterolmetabolismus (NCBI), katalytische Aktivität (GO)
ST6GALNAC2	1,094	alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2 , katalytische Aktivität (GO), Sialyltransferase (GO)
B4GALT4	1,286	Glycolipidbiosynthese (NCBI), katalytische Aktivität (GO),N-acetylglucosaminsynthetase (GO)
ADC	-1,350	Arginine Decarboxylase, Polyaminbiosynthese (GO)
HSP90AA1	-0,544	Aktivierung/Reifung von über 100 Proteinen => involviert in Signaltransduktion und transkriptionale Regulierung, Zellzyklusregulierung, zentrale Rolle bei Stressantwort, Apoptoseinhibitor, Mitoseregulation (158,159,160,161), positive Regulation der Oxidbiosynthese (GO)
C1QTNF2	-0,758	C1q and tumor necrosis factor related protein 2; Transport, Aktivierung von MAPK, pos. Regulierung von Fettsäureoxidation, Glucoseimport (NCBI), positive Regulation der Glycogenbiosynthese (GO)
DMD	-1,226	Dystrophin; verbindet Zytoskelett mit Zellmembran (NCBI), Peptidbiosynthese (GO)
SCAP	-0,455	Negative Regulation der Cholesterolsynthese (GO)
AGPAT5	-0,543	Enzym; Phospholipidbiosynthese (NCBI,GO)
DPM3	-0,566	Untereinheit von Dolichyl-Phosphate Mannosyltransferase; Biosynthese von GPI-anchored Proteine (NCBI,GO)
LDHA	-0,715	Lactatdehydrogenase A (NCBI); anaerobe Glykolyse(GO)
EPHX1	-0,835	Microsomale Epoxidehydrolase 1 (NCBI), Katabolismus von aromatischen Verbindungen (GO)
LYSMD2	-0,739	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2
PCCB	-0,678	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide, Fettsäurekatabolismus (GO)
CRYL1	-0,463	crystallin, lambda 1; Uranatzyklus, Glucosemetabolismus (alternativer Weg) (NCBI)
UAP1	-0,877	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1
ARSG	-0,470	Arylsulfatase G, Hormonbiosynthese, Modulation von Zell-Signaling, Abbau von Makromolekülen (NCBI)
HSD11B1L	-0,587	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1-like
ALDH1B1	-0,545	Aldehyddehydrogenase; Alkoholmetabolismus (NCBI)
GSTM	-0,763	glutathione S-transferase M2 (muscle); Detoxifizierung von Karzinogenen, Medikamenten, Toxinen und Oxidativen- Stressprodukten (NCBI)
HYAL2	-0,395	hyaluronoglucosaminidase 2, hydrolisiert Hyaluronan; Hyaluronan soll in Zellproliferation, Migration and Differenzierung involviert sein (NCBI), Lysosom (GO)
GGH	-0,714	gamma-glutamyl hydrolase (NCBI), Lysosom (GO)
LHPP	-0,489	phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
ENDOGL1	-0,248	endonuclease G-like 1
P4HA3	-0,525	Komponente von Prolyl 4-Hydroxylase, einem Schlüsselenzym der Collagensynthese (NCBI), Proteinmetabolismus (GO)
CTSF	-0,332	Cathepsin F; Cysteinproteinase (NCBI), Lysosom (GO), Proteolyse (GO)
HLCS1	-0,633	Holocarboxylase synthetase (NCBI), Proteinmodifikation (GO)
STK38	-0,755	Zellproliferation, Centrosomduplikation (162,163), Proteinmodifikation (GO)
HK2	-0,689	Hexokinase; Glykolyse (phosphoryliert Glucose=>Glucose-6-phosphate) (NCBI), Carbohydratphosphorylierung (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
RPIA	-0,544	ribose 5-phosphate isomerase A (ribose 5-phosphate epimerase), Glycolyse (GO)
AHCYL1	-0,587	IP(3) bindet und aktiviert NA+/COO3- Cotransporter (164)
B4GALT5*	-0,507	Biosynthese von Glycokonjugaten und Saccharidstrukturen (NCBI)
HADHSC*	-1,051	Hydroxyacyl-Coenzyme A -Dehydrogenase; Betaoxidation,Oxidation von 3-Hydroxyacyl-CoAs (NCBI)
CYP4V2*	-0,706	Cytochrom P450 Protein; Monooxygenase =>Metabolismus von Medikamenten, Synthese von Cholesteol, Steroiden und anderen Lipiden (NCBI)
Antwort auf Stress		
AHR	0,342	Transkriptionsfaktor; involviert in Metabolismus von xenobiotischen Substanzen (aromatische Hydrocarbone, Benzimidazole und Flavonoide), reguliert Cytochrom P450; (UVB Stress induziert AHR => EGF => ERK1/2 und COX2) (NCBI,165,166)
MAPKAPK5	0,507	aktiviert durch MAPK1/ERK, MAPK14/p38-alpha, and MAPK11/p38-beta, Antwort auf Zellstress und inflammatorische Zytokine,aktiviert HSP27 (NCBI)
PTGS1	1,395	(=COX1; COX3); Gewebemöostase, Zell-Zell- Signalgebung, reguliert Angiogenese in Endothelzellen (NCBI), Antwort auf oxidativen Stress (GO)
SELS	0,438	reguliert Zytokinproduktion in Makrophagen, spielt Rolle in der Kontrolle von Entzündungen (NCBI,85), Antwort auf oxidativen Stress (GO)
Antwort auf Verletzung		
HRH1	1,020	Histamin-Rezeptor; Kontraktion von glatten Muskelzellen, gesteigerte Kapillarpermeabilität, Catecholaminausschüttung(NCBI) , Entzündungsreaktion (GO)
BMP6	1,077	osteogene Differenzierung (NCBI,8), Entzündungsreaktion (GO)
SCYE1	0,436	Proliferationshemmung, Apoptose (NCBI,104,105), Entzündungsreaktion (GO)
F2R	0,924	involviert in thrombininduzierte Gerinnung, aktiviert durch Proteolyse (NCBI,89), Wundheilung(GO), Blutkoagulation (GO)
PLA2G4C	-1,018	Enzym; Entzündung, Prostaglandinbiosynthese (167)
PLAU	-1,414	plasminogen activator, urokinase; Abbau der ECM, bei chronischen Entzündungen Umbau von Bindegewebe; Tumorzellmigration und -proliferation; Proliferation und Zellteilung (168,169), Wundheilung, Fibrinolyse (GO)
PLAT	-0,354	tissue-type plasminogen activator; konvertiert Proenzym Plasminogen zu Plasmin; Plamin=> Fibrinolyse, Zellmigration, Gewebeumbau; Proliferation und Zellteilung (170), Wundheilung, Blutkoagulation (GO)
SERPINE1	-1,014	=PAI = plasminogen activator inhibitor, hemmt u-PA; TGFβ/PAI-1 schützt vor plasminogeninduzierter Apoptose von Fibroblasten und Fibronectin-Proteolyse; Proliferation und Zellteilung (79,80), Wundheilung, Fibrinolyse (GO)
Immunantwort		
DCLRE1C	0,598	V(D)J Rekombination, DNA-Reparatur (NCBI,51)
ALKBH8	0,830	Immunantwort (GO)
PSMB10	-0,569	Teil von Immunoproteasom=> Processing von IMHC- Peptiden; induziert von Interferon gamma (NCBI,171), humorale Immunantwort (GO), ubiquitinabhängiger Proteinkatabolismus (GO)
FTH1	-0,484	Eisenspeicherung (NCBI)
PREX1	-0,677	aktiviert RAC1, RAC1: GTPase, reguliert viele zelluläre Prozesse, Kontrolle von Zellwachstum, Zytoskelettorganisation, Aktivierung von Proteinkinasen (NCBI,106), Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (GO)
MRPL52	-0,504	Immunantwort (GO)
RAFTLIN*	-0,553	Rolle in B-Zell-Aktivierung (Regulation von B-Zell Antigen Rezeptor), Signalinitiierung (184)
Extrazelluläre Matrix		
MFAP2	-0,399	Antigen von Elastin-assoziierten Mikrofibrillen; Zelladhäsion, Migration ; ECM-Ablagerung (NCBI,172),ECM- Microfibrille (GO)
COL4A1	-0,283	Kollagen IV (Basalmembran) (NCBI)
LTBP2	-0,612	ECM-Protein, Mitglied von TGFβ latent Komplex, strukturelle Komponente von Mikrofibrillen, Zelladhäsion (NCBI,173)
Signaltransduktion		
MAP3K2	0,306	Protein Kinase; NF-kappaB Signalweg (NCBI)
DUSP5	-0,764	Phosphatase; negative Regulierung von MAP-Kinasen (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), MAPK assoziiert mit Proliferation und Differenzierung (NCBI),MAP-Kinase Tyrosin/Serinephosphatase (GO)
KLF9	-0,806	Transkriptionshemmung oder – aktivierung (NCBI), Progesteronrezeptorsignalweg (GO)
STK38	-0,755	Zellproliferation, Centrosmduplikation (162,163), , Proteinkinase-Kaskade (GO)

Genname	Regulierung	Beschreibung und Funktion der Gene
TSPAN4 *	-0,392	Zelloberflächenglycoprotein; Signaltransduktion: Regulierung von Zellentwicklung, Wachstum und Beweglichkeit
YWHAЕ*	-0,250	Signaltransduktion, Zellteilung, Regulierung der Insulinsensitivität
RSPO3*	-1,491	Signaltransduktion (NCBI)
Nicht eingordnete Gene		
AKAP 10	0,582	A-kinase anchor proteins; bindet Proteinkinase A (PKA); PKA- und G-Protein-Signaltransduktion (NCBI), Mitochondrium (GO)
PIK3R	0,481	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4; PIK : Insulinmetabolismus (NCBI)
HPS3	0,563	spielt Rolle in Organellenbiogenese (NCBI)
TRIM7	0,895	Initiierung der Glykogensynthese (NCBI)
CSNK1A1L	1,182	casein kinase 1, alpha 1-like
PRKRIP1	0,720	PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible)β, PRKR: Stress-Kinase; mRNA- Translation, Zellproliferation , Apoptose; Abbau von p53 durch GSK3- Aktivierung (174)
PAK1IP1	0,599	PAK1 interacting protein 1, PAK1: Serin/Threonin p21-aktivierende Kinase, reguliert Zellsterblichkeit und –morphologie (NCBI)
IGSF4	0,587	fördert Zytotoxizität von NK Zellen IFN-gamma Sekretion von T8 Zellen (175,176)
MT1H	0,641	Metallothionein; Schutz der Zelle vor Hydrogenperoxid und S-nitrosothiol (177), bindet Metallionen (GO)
MT1X	0,467	metallothionein 1X, bindet Metallionen (GO)
RHOУ	0,809	Filopodiumformation, "Stressfaser"- Loslösung, WNT1 Signalwirkung=> Regulation von Zellmorphologie, Zytoskelettorganisation, Zellproliferation (NCBI)
CEP164	0,610	centrosomal protein; involviert in PC (Primary cilia)- Formation (PC= "Antenne", mechano- und chemosensorische Erkennung) (178)
KRIT1	0,500	Stabilisierung von Zell-Zellverbindungen (179)
SCRIB	0,729	involviert in Migration (180)
HIST1H2AE	0,739	Histon1, H2ae; Histon, basisches Kernprotein, verantwortlich für Nucliosomstruktur (NCBI)
ARL4A	0,822	bindet Cytohesine; Rekrutierung von Zytokinen an Plasmamembran (NCBI,185)
KREMEN1	0,721	blockiert zusammen mit DKK1 WNT/beta-catenin Signalweg
GOLGA8B	0,331	golgi autoantigen; peripheres oder transmembranes Protein des Golgikomplex, Autoimmun target (191)
FLJ11021	0,913	spielt möglicherweise Rolle in Tumorphiliferation- und progression (192)
THC2365017	0,757	RPL23A ribosomal protein L23a, partial (89%), 60s Untereinheit von Ribosom; involviert in Wachstumshemmung (NCBI)
ANKK1	0,788	serine/threonine kinase domain ; interagiert mit DRD2 (=> Alkohol- und Nikotinabhängigkeit); exprimiert in Placenta und Rückenmark (NCBI)
MKRN2	0,444	Ribonucleoprotein (NCBI)
RIOK3	0,922	RIO kinase 3 (yeast)
CCT6A	0,386	Chaperone; faltet viele Proteine, einschließlich Aktin und Tubulin; assoziiert mit Radioresistenz (NCBI,195)
PPP1R14C	1,542	hemmt Serin/Threonin- Proteinphosphatase (196)
FAM44B	0,555	Entdeckung oder Auflösung von syntel. Anhaftungen bei Mitosespindeln (197)
NAV3	-1,395	Protein enthält Domäne, die charakteristisch für ATPasen ist, die mit vielen zellulären Aktivitäten assoziiert sind; v.a. exprimiert im Nervensystem (NCBI)
POMC	-0,541	proopiomelanocortin; Polypeptidhormon- Precursor => viele biologisch aktive Peptide => involviert in viele Zellfunktionen; Energiehomöostase, Melanozytenstimulation, Immunmodulation (NCBI)
UPP1	-1,204	uridine phosphorylase 1; Enzym: Uridin => Uracil; Uridin: Nucleosid essentiell für RNA – Synthese und Biomembransynthese (181,182), Uridinphosphorylase (GO)
BCAR3	-0,700	Proliferation von Brusttumorzellen (NCBI), Antwort auf Medikamente (GO)
H2AFJ	-0,375	Histon (NCBI), Nucleosomaufbau (GO)
SALF	-1,030	(=STON1-GTF2A1L) Fusionsprotein von STON1 und GTF2A1L; Transkription von RNA-Polymerase II- Promoter, Endozytose (NCBI, IEA)
CHCHD3	-0,274	Proteinimport (183)
HEBP1	-0,751	Kalziummobilisation und Chemotaxis (Monozyten und dendritische Zellen) (NCBI)
LANCL1	-0,336	Membranprotein; peptidmodifizierende Enzymkomponente (NCBI)
PRKCBP1	-0,441	Rezeptor für aktiviertes C-Kinase Protein (NCBI)

*Gene nicht nach GO eingeteilt

Anhang II: Literaturliste Tabelle Genexpression

- 1 EMBO J. 2002 Nov 15;21(22):6236-45. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao TP.
- 2 Mol Cell Biol. 2006 Mar;26(6):2387-98. Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. Sourisseau T, Georgiadis A, Tsapara A, Ali RR, Pestell R, Matter K, Balda MS.
- 3 Eur J Biochem. 2004 Feb;271(3):648-60. A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization. Coles LS, Bartley MA, Bert A, Hunter J, Polyak S, Diamond P, Vadas MA, Goodall GJ.
- 4 Cancer Cell. 2006 Apr;9(4):273-85. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, Wahl GM.
- 5 DNA Cell Biol. 2002 Jul;21(7):519-25. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. Sabbatini P, McCormick F.
- 6 Mol Cell Biol. 2008 Feb;28(4):1218-29. MDMX promotes proteasomal turnover of p21 at G1 and early S phases independently of, but in cooperation with, MDM2. Jin Y, Zeng SX, Sun XX, Lee H, Blattner C, Xiao Z, Lu H.
- 7 J Biol Chem. 2000 Jul 7;275(27):20734-41. Three-amino acid extension loop homeodomain proteins Meis2 and TGIF differentially regulate transcription. Yang Y, Hwang CK, D'Souza UM, Lee SH, Junn E, Mouradian MM.
- 8 J Orthop Res. 2007 May;25(5):665-77. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, Sharff KA, Montag AG, Haydon RC, He TC.
- 9 Oncogene. 2002 Oct 24;21(49):7488-96. ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. Fan F, Jin S, Amundson SA, Tong T, Fan W, Zhao H, Zhu X, Mazzacurati L, Li X, Petrik KL, Fornace AJ Jr, Rajasekaran B, Zhan Q.
- 9a Oncogene. 2003 Jul 3;22(27):4235-42. Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. Kool J, Hamdi M, Cornelissen-Steijger P, van der Eb AJ, Terleth C, van Dam H.
- 10 2005 Jan 7;280(1):361-74. Effects of depletion of CREB-binding protein on c-Myc regulation and cell cycle G1-S transition. Rajabi HN, Baluchamy S, Kolli S, Nag A, Srinivas R, Raychaudhuri P, Thimmapaya B.
- 11 Int J Mol Med. 2002 Sep;10(3):269-75. TNF α induces acetylation of p53 but attenuates its transcriptional activation in rheumatoid synoviocytes. Nakazawa M, Aratani S, Hatta M, Araya N, Daitoku H, Kawahara K, Watanabe S, Nakamura H, Yoshino S, Fujii R, Fujita H, Fukamizu A, Nishioka K, Nakajima T.
- 13 Nat Struct Mol Biol. 2007 Dec;14(12):1207-13. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP, Rastinejad F.
- 14 Science. 2007 Dec 14;318(5857):1786-9. Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szewergold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB, Lazar MA.
- 15 J Biol Chem. 2003 Sep 26;278(39):37672-80. The orphan nuclear receptor Rev-Erb α is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ target gene and promotes PPAR γ -induced adipocyte differentiation. Fontaine C, Dubois G, Duguay Y, Helledie T, Vu-Dac N, Gervois P, Soncin F, Mandrup S, Fruchart JC, Fruchart-Najib J.
- 16 Mol Cell Biol. 2008 Feb;28(4):1197-206. Identification of the proteins, including MAGEG1, that make up the human SMC5-6 protein complex. Taylor EM, Copsey AC, Hudson JJ, Vidot S, Lehmann AR.
- 17 FEBS Lett. 2003 Jan 16;534(1-3):93-100. A novel zinc finger transcriptional repressor, ZNF224, interacts with the negative regulatory element (AldA-NRE) and inhibits gene expression. Medugno L, Costanzo P, Lupo A, Monti M, Florio F, Pucci P, Izzo P.
- 18 Exp Cell Res. 2007 Jan 15;313(2):254-63. Characterization of ZNF23, a KRAB-containing protein that is downregulated in human cancers and inhibits cell cycle progression. Huang C, Jia Y, Yang S, Chen B, Sun H, Shen F, Wang Y.

- 19 Mol Cell Biol. 2003 Oct;23(20):7305-14. Degradation of transcription repressor ZBRK1 through the ubiquitin-proteasome pathway relieves repression of Gadd45a upon DNA damage. Yun J, Lee WH.
- 20 Mol Endocrinol. 2007 Aug;21(8):1791-806. Novel regulatory role for human Acf1 in transcriptional repression of vitamin D3 receptor-regulated genes. Ewing AK, Attner M, Chakravarti D
- 21 J Med Genet. 2006 Mar;43(3):211-217. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, Martinovic J, Clément-Ziza M, Delezoide AL, Aubry MC, Pelet A, Chemouny S, Craud C, Audollent S, Esculpavit C, Goudefroye G, Ozilou C, Fredouille C, Joye N, Morichon-Delvallez N, Dumez Y, Weissenbach J, Munnich A, Amiel J, Encha-Razavi F, Lyonnet S, Vekemans M, Attié-Bitach T.
- 22 Hum Mol Genet. 2005 Nov 15;14(22):3463-76. Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. Bosman EA, Penn AC, Ambrose JC, Kettleborough R, Stemple DL
- 23 Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2007 Jan;79(1):50-7. Embryonic expression profile of chicken CHD7, the ortholog of the causative gene for CHARGE syndrome. Aramaki M, Kimura T, Udaka T, Kosaki R, Mitsunashi T, Okada Y, Takahashi T, Kosaki K.
- 24 Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15577-82. Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S, Shimizu K, Nakamura S, Ruddle FH, Hirai H
- 25 Cell Death Differ. 2006 May;13(5):759-72. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. Perkins ND, Gilmore TD.
- 26 J Bone Miner Res. 2002 Feb;17(2):231-9. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, Morimura N, Kuroda K, Miyatani S, Hozumi N
- 27 J Biol Chem. 2004 Jan 16;279(3):1838-44. Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression. Xu ZX, Zhao RX, Ding T, Tran TT, Zhang W, Pandolfi PP, Chang KS.
- 28 Nat Cell Biol. 2002 Nov;4(11):865-70. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. Yang S, Kuo C, Bisi JE, Kim MK.
- 29 J Biol Chem. 2004 Oct 29;279(44):45603-12. Protein kinase Cdelta regulates apoptosis via activation of STAT1. DeVries TA, Kalkofen RL, Matassa AA, Reyland ME.
- 30 Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 10;101(6):1714-9. Links STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR
- 31 J Biochem Mol Biol. 2002 Nov 30;35(6):583-9. Gamma irradiation-reduced IFN-gamma expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY.
- 32 Oncogene. 1995 Jun 1;10(11):2085-93. Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. Zhang Y, Chellappan SP
- 33 Nucleic Acids Res. 2002 Nov 1;30(21):4634-42. In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. Dreuillet C, Tillit J, Kress M, Ernoult
- 34 Mol Cell Biol. 2006 Jul;26(13):4895-910. The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function. Papp LV, Lu J, Striebel F, Kennedy D, Holmgren A, Khanna KK. Queensland Institute of Medical Research, 300 Herston Road
- 35 Arch Dermatol Res. 2001 Aug;293(8):383-6. Tuberous sclerosis complex genes: from flies to human genetics. Hengstschläger M.
- 36 Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 23;338(3):1359-67. Zcchc8 is a glycogen synthase kinase-3 substrate that interacts with RNA-binding proteins. Gustafson MP, Welcker M, Hwang HC, Clurman BE.
- 37 Mol Cell Biol. 2005 Feb;25(4):1283-97. Polypyrimidine tract-binding protein enhances the internal ribosomal entry site-dependent translation of p27Kip1 mRNA and modulates transition from G1 to S phase. Cho S, Kim JH, Back SH, Jang
- 38 J Cell Biol. 2007 Jun 18;177(6):969-79. Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. Suraweera A, Becherel OJ, Chen P, Rundle N, Woods R, Nakamura J, Gatei M, Criscuolo C, Filla A, Chessa L, Fusser M, Epe B, Gueven N, Lavin MF

- 39 J Cell Biol. 2007 Jun 18;177(6):969-79. Epub 2007 Jun 11. Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. Suraweera A, Becherel OJ, Chen P, Rundle N, Woods R, Nakamura J, Gatei M, Criscuolo C, Filla A, Chessa L, Fusser M, Epe B, Gueven N, Lavin MF.
- 40 J Biol Chem. 2006 Apr 7;281(14):9490-7. Identification and functional characterization of a presqualene diphosphate phosphatase. Fukunaga K, Arita M, Takahashi M, Morris AJ, Pfeffer M, Levy BD.
- 41 Exp Cell Res. 2004 Nov 1;300(2):283-96. PAP-1, the mutated gene underlying the RP9 form of dominant retinitis pigmentosa, is a splicing factor. Maita H, Kitaura H, Keen TJ, Inglehearn CF, Ariga H, Iguchi
- 42 Annu Rev Biochem. 2002;71:375-403. Epub 2001 Nov 9. The La protein. Wolin SL, Cedervall T.
- 43 EMBO J. 2002 Sep 16;21(18):4978-88. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. Will CL, Urlaub H, Achsel T, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R.
- 44 Jab1-dependent p27 nuclear-to-cytoplasm translocation. Malicet C, Hoffmeister A, Moreno S, Closa D, Dagorn JC, Vasseur S, Iovanna JL.
- 45 Arthritis Rheum. 2006 Dec;54(12):3878-84. Jun activation domain-binding protein 1 binds Smad5 and inhibits bone morphogenetic protein signaling. Haag J, Aigner T.
- 46 J Cancer Res Clin Oncol. 2005 Dec;131(12):789-96. Jun activation domain-binding protein 1 is required for mitotic checkpoint activation via its involvement in hyperphosphorylation of 53BP1.
- 47 Am J Pathol. 2006 Sep;169(3):889-902. JAB1 determines the response of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to tumor necrosis factor-alpha. Wang J, Li C, Liu Y, Mei W, Yu S, Liu C, Zhang L, Cao X, Kimberly RP, Grizzle W, Zhang HG.
- 48 Cell Cycle. 2004 Sep;3(9):1151-3. Rescue of the TTF2 knockdown phenotype with an siRNA-resistant replacement vector. Jiang Y, Price DH
- 49 J Biol Chem. 2007 Aug 24;282(34):25067-75. Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. Siddiqui N, Mangus DA, Chang TC, Palermino JM, Shyu AB, Gehring K.
- 50 Biochim Biophys Acta. 2003 Jan 27;1625(2):141-52. Human transformer 2beta and SRp55 interact with a calcitonin-specific splice enhancer. Tran Q, Coleman TP, Roesser JR.
- 51 Cancer Sci. 2005 Feb;96(2):134-41. Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage. Chen L, Morio T, Minegishi Y, Nakada S, Nagasawa M, Komatsu K, Chessa L, Villa A, Lecis D, Delia D, Mizutani S.
- 52 Mutat Res. 2002 Dec 29;510(1-2):71-80 is essential for error-prone translesion synthesis past UV or benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA lesions in human fibroblasts. Li Z, Zhang H, McManus TP, McCormick JJ, Lawrence CW, Maher VM.
- 53 Cell Res. 2008 Jan;18(1):174-83. DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. Gan GN, Wittschieben JP, Wittschieben BØ, Wood RD
- 54 Nature. 1992 Apr 30;356(6372):763-7. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M.
- 55 Mol Cell. 2004 Aug 27;15(4):607-20 Fanconi anaemia gene FANCC promotes homologous recombination and error-prone DNA repair. Niedzwiedz W, Mosedale G, Johnson M, Ong CY, Pace P, Patel
- 56 J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36403-9. Characterization of novel reverse transcriptase and other RNA-associated catalytic activities by human DNA polymerase gamma: importance in mitochondrial DNA replication. Murakami E, Feng JY, Lee H, Hanes J, Johnson KA, Anderson KS
- 57 DNA Repair (Amst). 2007 Oct 1;6(10):1485-95. TDP1 facilitates repair of ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. El-Khamisy SF, Hartsuiker E, Caldecott KW.
- 58 J Biol Chem. 2005 Jun 10;280(23):22029-35. Substrate specificity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1). Raymond AC, Staker BL, Burgin AB Jr.
- 59 Oncogene. 2005 Dec 1;24(54):7964-75. Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. Stöter M, Bamberger AM, Aslan B, Kurth M, Speidel D, Löning T, Frank HG, Kaufmann P, Löhler J, Henne-Bruns D, Deppert W, Knippschild U.

- 60 *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Nov 15;204(3):1257-64. Cloning, characterization and chromosomal assignment of the human genes homologous to yeast PMS1, a member of mismatch repair genes. Horii A, Han HJ, Sasaki S, Shimada M, Nakamura
- 61 *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32716-27.. Nucleolar Nek1 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y
62. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39655-65.. Nek1, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y.
- 63 *DNA Repair (Amst).* 2006 Aug 13;5(8):914-24.. Identification of MMS19 domains with distinct functions in NER and transcription. Hatfield MD, Reis AM, Obeso D, Cook JR, Thompson DM, Rao M, Friedberg EC, Queimado L
- 64 *Biochemistry.* 2004 Apr 27;43(16):4781-90. Purified human SUV3p exhibits multiple-substrate unwinding activity upon conformational change. Shu Z, Vijayakumar S, Chen CF, Chen PL, Lee WH.
- 65 *Biol Cell.* 2007 Jun;99(6):323-32. Down-regulation of human RNA/DNA helicase SUV3 induces apoptosis by a caspase- and AIF-dependent pathway. Szczesny RJ, Obriot H, Paczkowska A, Jedrzejczak R, Dmochowska A, Bartnik E, Formstecher P, Polakowska R, Stepien PP.)
- 66 *FEBS J.* 2005 Oct;272(19):5008-19. Human ATP-dependent RNA/DNA helicase hSuv3p interacts with the cofactor of survivin HBXIP. Minczuk M, Mroczek S, Pawlak
- 67 *J Biol Chem.* 2004 Apr 16;279(16):16050-6. Positive regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by hD53L1. Cho S, Ko HM, Kim JM, Lee JA, Park JE, Jang MS, Park SG, Lee DH, Ryu SE, Park BC.
- 68 *Mol Cell Biol.* 2007 Jun;27(12):4347-54. Chibby promotes adipocyte differentiation through inhibition of beta-catenin signaling. Li FQ, Singh AM, Mofunanya A, Love D, Terada N, Moon RT, Takamaru K.
- 69 *Oncogene.* 2005 Jan 6;24(1):165-77. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. Schulte JH, Schramm A, Klein-Hitpass L, Klenk M, Wessels H, Hauffa BP, Eils J, Eils R, Brodeur GM, Schweigerer L, Havers W
- 70 *Matrix Biol.* 2002 Oct;21(6):513-23. Analysis of the human integrin alpha11 gene (ITGA11) and its promoter. Popova SN, Bergman C, Velling T, Gullberg MK, Gullberg D
- 71 *Nature.* 1995 Oct 19;377(6550):646-9. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N.
- 72 *Cell Growth Differ.* 2002 Apr;13(4):163-71. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation. Rajah R, Lee KW, Cohen P.
- 73 *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2109-11. Insulin-like growth factor binding protein-3: insulin-like growth factor independence comes of age. Cohen P.
- 74 *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jun;90(6):3568-74.. p53-Dependent and p53-independent induction of insulin-like growth factor binding protein-3 by deoxyribonucleic acid damage and hypoxia. Grimberg A, Coleman CM, Burns TF, Himmelstein BP, Koch CJ, Cohen P, El-Deiry WS.
- 75 *J Biol Chem.* 2007 Jan 19;282(3):1788-96. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J.
- 76 *Kidney Int.* 2007 Mar;71(5):448-53. Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. Li GS, Zhang H, Lv JC, Shen Y, Wang HY.
- 77 *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1521-8. Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamandé N, Favier J, Philippe J, Sibony M, Gasc JM, Corvol P, Germain S.
- 78 *Proc Natl. Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12212-7. A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. Su ZJ, Hahn CN, Goodall GJ, Reck NM, Leske AF, Davy A, Kremmidiotis G, Vadas MA, Gamble JR.
- 79 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Jan;38(1):78-87. Plasminogen activation induced pericellular fibronectin proteolysis promotes fibroblast apoptosis. Horowitz JC, Rogers DS, Simon RH, Sisson TH, Thannickal VJ.
- 80 *Cell Commun Adhes.* 2002 Sep-Dec;9(5-6):239-47. Cell adhesion induces the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in anchorage dependent cells. Chang H, Shyu KG, Lin S, Wang BW, Liu YC, Lee CC.

- 81 Mol Biol Cell. 2007 Aug;18(8):3144-55. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. Dulyaninova NG, House RP, Betapudi V, Bresnick
- 82 Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 11;99(12):7951-5. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS.
- 83 J Biol Chem. 2007 Jun 8;282(23):16989-7001. Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. Meares GP, Jope RS.
- 84 Br J Cancer. 2003 May 6;88(9):1470-9. Cell adhesion to the extracellular matrix protein fibronectin modulates radiation-dependent G2 phase arrest involving integrin-linked kinase (ILK) and glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) in vitro. Cordes N, van Beuningen D.
- 85 Cytokine. 2006 Mar 7;33(5):246-51. Activation of the selenoprotein SEPS1 gene expression by pro-inflammatory cytokines in HepG2 cells. Gao Y, Hannan NR, Wanyonyi S, Konstantopolous N, Pagnon J, Feng HC, Jowett JB, Kim KH, Walder K, Collier GR.
- 86 Apoptosis. 2003 Jan;8(1):11-8. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. Wu MX.
- 87 Oncogene. 2003 May 22;22(21):3343-51. The early response gene IEX-1 attenuates NF-kappaB activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death. Arlt A, Kruse ML, Breitenbroich M, Gehrz A, Koc B, Minkenberg J, Fölsch UR, Schäfer H.
- 88 J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):14612-21. Divergent regulation of the growth-promoting gene IEX-1 by the p53 tumor suppressor and Sp1. Im HJ, Pittelkow MR, Kumar R.
- 89 J Thromb Haemost. 2004 May;2(5):804-12. Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets. Dorsam RT, Tuluc M, Kunapuli SP.
- 90 J Biol Chem. 2005 Apr 1;280(13):12096-102. FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT.
- 91 Oncogene. 2008 Jan 3;27(1):9-19. Epub 2007 Jun 25. Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. Goto T, Takano M, Albergaria A, Briese J, Pomeranz KM, Cloke B, Fusi L, Feroze-Zaidi F, Maywald N, Sajin M, Dina RE, Ishihara O, Takeda S, Lam EW, Bamberger AM, Ghaem-Maghami S, Brosens JJ.
- 92 J Radiat Res (Tokyo). 2004 Jun;45(2):213-20. Mitogen-activated protein kinases: specificity of response to dose of ionizing radiation in liver. Narang H, Krishna M.
- 93 J Biol Chem. 2003 Aug 29;278(35):33422-35. Epub 2003 Jun 18. Identification and characterization of a cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 as a novel mediator of apoptosis signaling by retinoid CD437. Rishi AK, Zhang L, Boyanapalli M, Wali A, Mohammad RM, Yu Y, Fontana JA, Hatfield JS, Dawson MI, Majumdar AP, Reichert U.
- 94 J Biol Chem. 2006 May 12;281(19):13188-98. Cell cycle- and apoptosis-regulatory protein-1 is involved in apoptosis signaling by epidermal growth factor receptor. Rishi AK, Zhang L, Yu Y, Jiang Y, Nautiyal J, Wali A, Fontana JA, Levi E, Majumdar AP.
- 94 EMBO J. 2007 Sep 5;26(17):3968-80. Epub 2007 Aug 9. The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1. Ou YH, Chung PH, Hsu FF, Sun TP, Chang WY, Shieh
- 95 Oncogene. 2004 Oct 28;23(50):8216-30. Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. Rong R, Jin W, Zhang J, Sheikh MS, Huang Y.
- 96 Exp Biol Med (Maywood). 2006 Jul;231(7):1271-81. Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. Knudsen ES, Knudsen KE.
- 97 Mol Cell. 2005 Jun 10;18(6):623-35. Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. Benevolenskaya EV, Murray HL, Branton P, Young RA, Kaelin WG Jr.
- 98 Cell Cycle. 2005 Feb;4(2):330-8. Multiple functions of D-type cyclins can antagonize pRb-mediated suppression of proliferation. Baker GL, Landis MW, Hinds PW.
- 99 Oncogene. 2004 Apr 8;23(15):2587-99. Differential regulation of apoptotic genes by Rb in human versus mouse cells. Young AP, Longmore

- 100 J Biol Chem. 2004 Feb 20;279(8):6553-9. Evidence of a transcriptional co-activator function of cohesin STAG/SA/Sc3. Lara-Pezzi E, Pezzi N, Prieto I, Barthelemy I, Carreiro C, Martínez A, Maldonado-Rodríguez A, López-Cabrera M, Barbero JL.
- 101 J Biol Chem. 2006 May 5;281(18):12618-24. The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. Row PE, Prior IA, McCullough J, Clague MJ, Urbé S.
- 102 Traffic. 2006 Aug;7(8):1017-31. A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. Mizuno E, Kobayashi K, Yamamoto A, Kitamura N, Komada M.
- 103 J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1658-69. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. Alwan HA, van Leeuwen JE.
- 104 J Leukoc Biol. 2004 May;75(5):772-6. Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II): a novel inducer of lymphocyte apoptosis. Murray JC, Heng YM, Symonds P, Rice K, Ward W, Huggins M, Todd I, Robins RA.
- 105 J Biol Chem. 2002 Mar 8;277(10):8388-94. Interaction of the C-terminal domain of p43 and the alpha subunit of ATP synthase. Its functional implication in endothelial cell proliferation. Chang SY, Park SG, Kim S, Kang CY.
- 106 J Biol Chem. 2007 Aug 10;282(32):23708-15. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. Hernández-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, Hernández-García R, Calderón-Salinas JV, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, Vázquez-Prado J.
- 107 Hum Reprod. 2006 Jun;21(6):1380-6. The expression of Abl interactor 2 in leiomyoma and myometrium and regulation by GnRH analogue and transforming growth factor-beta. Luo X, Levens E, Williams RS, Chegini.
- 108 FEBS Lett. 2006 Nov 27;580(27):6464-70. 7 NESH (Abi-3) is present in the Abi/WAVE complex but does not promote c-Abl-mediated phosphorylation. Hirao N, Sato S, Gotoh T, Maruoka M, Suzuki J, Matsuda S, Shishido T, Tani.
- 109 J Cell Biol. 2006 Oct 9;175(1):135-46. Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. Otani T, Ichii T, Aono S, Takeichi M.
- 110 J Biol Chem. 2003 Dec 5;278(49):49031-43. Tuba, a novel protein containing bin/amphiphysin/Rvs and Dbl homology domains, links dynamin to regulation of the actin cytoskeleton. Salazar MA, Kwiatkowski AV, Pellegrini L, Cestra G, Butler MH, Rossman KL, Serna DM, Sondek J, Gertler FB, De Camilli P.
- 112 Genomics. 2001 Apr 15;73(2):127-39. Leiomodins: larger members of the tropomodulin (Tmod) gene family. Conley CA, Fritz-Six KL, Almenar-Queralt A, Fowler VM.
- 113 Trends Cell Biol. 2007 Nov;17(11):555-62. WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. Antón IM, Jones GE, Wandosell F, Geha R, Ramesh N.
- 114 J Cell Biol. 2006 Apr 10;173(1):121-32. Formation of a WIP-, WASp-, actin-, and myosin IIA-containing multiprotein complex in activated NK cells and its alteration by KIR inhibitory signaling. Krzewski K, Chen X, Orange JS, Strominger JL.
- 115 Int J Radiat Biol. 2003 Sep;79(9):721-31. Ionizing radiation modules of the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (FAK) and its substrates p130cas and paxillin in A549 human lung carcinoma cells in vitro. Beinke C, Van Beuningen D, Cordes N.
- 116 Front Biosci. 2002 Jan 1;7:d143-50. Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130CAS: effects on cell spreading and migration. Panetti TS.
- 117 J Biol Chem. 2000 Aug 25;275(34):26436-40. Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. Herreros L, Rodríguez-Fernández JL, Brown MC, Alonso-Lebrero JL, Cabañas C, Sánchez-Madrid F, Longo N, Turner CE, Sánchez-Mateos P.
- 118 J Biol Chem. 1997 Mar 14;272(11):7437-44. Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. Mazaki Y, Hashimoto S, Sabe H.
- 119 J Biol Chem. 1995 Mar 10;270(10):5039-47. Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. Salgia R, Li JL, Lo SH, Brunkhorst B, Kansas GS, Sobhany ES, Sun Y, Pisick E, Hallek M, Ernst T, et al.
- 120 J Biol Chem. 2006 Sep 15;281(37):27586-99. Structural variations in the catalytic and ubiquitin-associated domains of microtubule-associated protein/microtubule affinity regulating kinase (MARK) 1 and MARK2. Marx A, Nugoor C, Müller J, Panneerselvam S, Timm T, Bilanz M, Mylonas E, Svergun DI, Mandelkow EM, Mandelkow E.
- 121 Oncogene. 2003 Sep 18;22(40):6194-203. Loss of expression of tropomyosin-1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. Raval GN, Bharadwaj S, Levine EA, Willingham MC, Geary RL, Kute T, Prasad GL.

- 122 *Oncogene*. 2005 Jul 28;24(32):5043-52. Silencing of the Tropomyosin-1 gene by DNA methylation alters tumor suppressor function of TGF-beta. Varga AE, Stourman NV, Zheng Q, Safina AF, Quan L, Li X, Sossey-Alaoui K, Bakin AV.
- 123 *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):46014-22. JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin. Ohnishi H, Nakahara T, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M
- 124 *Blood*. 2005 Jul 15;106(2):584-92. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Lusinskas FW.
- 125 *Cell Signal*. 2007 Jun;19(6):1238-48. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ.
- 126 *Med Sci Monit*. 2007 May;13(5):BR107-11. Low-dose irradiation stimulates TNF-alpha-induced ICAM-1 mRNA expression in human coronary vascular cells. Voisard R, Wiegmann D, Baur R, Hombach V, Kamenz J
- 127 *Int J Colorectal Dis*. 2007 Jun;22(6):651-9. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. Gröne J, Weber B, Staub E, Heinze M, Klamann I, Pilarsky C, Hermann K, Castanos-Velez E, Röpecke S, Mann B, Rosenthal A, Buhr HJ.
- 128 *Exp Cell Res*. 2006 Jun 10;312(10):1713-26. Cell surface 5T4 antigen is transiently upregulated during early human embryonic stem cell differentiation: effect of 5T4 phenotype on neural lineage formation. Ward CM, Eastham AM, Stern PL.
- 129 *Mol Biol Cell*. 2005 Jan;16(1):84-96. R-Ras controls membrane protrusion and cell migration through the spatial regulation of Rac and Rho. Wozniak MA, Kwong L, Chodniewicz D, Klemke RL, Keely PJ.
- 130 *J Cell Sci*. 2003 Sep 15;116(Pt 18):3729-38. The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal. Furuhielm J, Peränen J.
- 131 *Cancer*. 2003 Feb 1;97(3):575-85. R-Ras promotes tumor growth of cervical epithelial cells. Rincón-Arango H, Rosales R, Mora N, Rodríguez-Castañeda A, Rosales C.
- 132 *J Biol Chem*. 2007 Sep 21;282(38):27713-20. Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. Erdogan M, Pozzi A, Bhowmick N, Moses HL, Zent R.
- 133 *J Cell Biol*. 2004 Sep 13;166(6):901-12. Phosphorylation of actopaxin regulates cell spreading and migration. Clarke DM, Brown MC, LaLonde DP, Turner CE.
- 134 *J Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):41695-705. Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins
- 135 *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51743-8. Ral GTPases regulate exocyst assembly through dual subunit interactions. Moskalenko S, Tong C, Rosse C, Mirey G, Formstecher E, Daviet L, Camonis J, White MA.
- 136 *Cell Cycle*. 2004 Apr;3(4):486-90. Expression and localization studies of hSDA, the human ortholog of the yeast SDA1 gene. Babbio F, Farinacci M, Saracino F, Carbone ML, Privitera E.
- 137 *Apoptosis*. 2006 Nov;11(11):1923-32. Adaptor FADD is recruited by RTN3/HAP in ER-bound signaling complexes. Xiang R, Liu Y, Zhu L, Dong W, Qi Y.
- 138 *Cell Biol Int*. 2007 Aug;31(8):825-30. Anti-apoptotic activity of Bcl-2 is enhanced by its interaction with RTN3. Zhu L, Xiang R, Dong W, Liu Y, Qi Y.
- 139 *Mol Biol Rep*. 2004 Sep;31(3):159-64. Mammalian apoptosis-inducing protein, HAP, induces bacterial cell death. Gan M, Qi Y, Wan Q, Kuang E, Liu Q, Liu X.
- 140 *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(2):249-55. Co-involvement of the mitochondria and endoplasmic reticulum in cell death induced by the novel ER-targeted protein HAP. Xu H, Zhou Q, Liu X, Qi YP.
- 141 *Exp Cell Res*. 2007 Oct 1;313(16):3408-20. A role for the Rab6B Bicaudal-D1 interaction in retrograde transport in neuronal cells. Wanschers BF, van de Vorstenbosch R, Schlager MA, Splinter D, Akhmanova A, Hoogenraad CC, Wieringa B, Franssen JA.
- 142 *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):30219-26. Interaction between tyrosine kinase Etk and a RUN domain- and FYVE domain-containing protein RUFY1. A possible role of ETK in regulation of vesicle trafficking. Yang J, Kim O, Wu J, Qiu Y
- 143 *EMBO J*. 2003 Jan 2;22(1):78-88. Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. Mattera R, Arighi CN, Lodge R, Zerial M, Bonifacino JS

- 144 *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 26;316(1):218-25. Identification and characterization of Noc2 as a potential Rab3B effector protein in epithelial cells. Manabe S, Nishimura N, Yamamoto Y, Kitamura H, Morimoto S, Imai M, Nagahiro S, Sein S, Sasaki T
- 145 *Exp Cell Res.* 2003 Aug 1;288(1):70-83. VIPL, a VIP36-like membrane protein with a putative function in the export of glycoproteins from the endoplasmic reticulum. Neve EP, Svensson K, Fuxe J, Pettersson RF
- 146 *beta Mol Biol Cell.* 2005 Oct;16(10):4660-71. Cross-talk between snurportin1 subdomains. Ospina JK, Gonsalvez GB, Bednenko J, Darzynkiewicz E, Gerace L, Matera AG.
- 147 *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Aug;293(2):C606-20. Deciphering PiT transport kinetics and substrate specificity using electrophysiology and flux measurements. Ravera S, Virkki LV, Murer H, Forster IC.
- 148 *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Dec;291(6):C1377-87. Characterization of transport mechanisms and determinants critical for Na⁺-dependent Pi symport of the PiT family paralogs human PiT1 and PiT2. Böttger P, Hede SE, Grunnet M, Høyer B, Klaerke DA, Pedersen L.
- 149 *Blood.* 2005 Dec 15;106(13):4114-23. The E3 ubiquitin-protein ligase Triad1 inhibits clonogenic growth of primary myeloid progenitor cells. Marteijs JA, van Emst L, Erpelinck-Verschueren CA, Nikoloski G, Menke A, de Witte T, Löwenberg B, Jansen JH, van der Reijden BA.
- 150 *Blood.* 2007 Nov 1;110(9):3128-35. Gfi1 ubiquitination and proteasomal degradation is inhibited by the ubiquitin ligase Triad1. Marteijs JA, van der Meer LT, van Emst L, van Reijmersdal S, Wissink W, de Witte T, Jansen JH, Van der Reijden BA
- 151 *J Virol.* 2005 Apr;79(7):3930-7. Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates. Song B, 151Javanbakht H, Perron M, Park DH, Stremlau M, Sodroski
- 152 *J Virol.* 2006 Oct;80(19):9754-60. Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. Anderson JL, Campbell EM, Wu X, Vandegraaff N, Engelman A, Hope TJ.
- 153 *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19331-8. GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. Skurat AV, Dietrich AD, Zhai L, Roach PJ.
- 154 *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25339-49. Epub 2005 Apr 25. Stearoyl-CoA desaturase is involved in the control of proliferation, anchorage-independent growth, and survival in human transformed cells. Scaglia N, Igal RA.
- 155 *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Mar 27;248(1-2):38-46. Links Structural basis of the multispecificity demonstrated by 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 5. Lin SX, Shi R, Qiu W, Azzi A, Zhu DW, Dabbagh HA, Zhou
- 156 *Gene.* 2005 Oct 10;359:99-110. Analysis of full length ADAMTS6 transcript reveals alternative splicing and a role for the 5' untranslated region in translational control. Bevitt DJ, Li Z, Lindrop JL, Barker MD, Clarke MP, McKie
- 157 *Oncogene.* 2006 Jun 8;25(24):3471-8. MAP1D, a novel methionine aminopeptidase family member is overexpressed in colon cancer. Leszczyniecka M, Bhatia U, Cueto M, Nirmala NR, Towbin H, Vattay A, Wang B, Zabludoff S, Phillips PE
- 158 *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Nov 16;363(2):241-6. Hsp90--from signal transduction to cell transformation. Brown MA, Zhu L, Schmidt C, Tucker PW.
- 159 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 25;100(24):13791-6. Epub 2003 Nov 12. Regulation of survivin function by Hsp90. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC.
- 160 *Cell.* 2007 Oct 19;131(2):257-70. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. Kang BH, Plescia J, Dohi T, Rosa J, Doxsey SJ, Altieri DC.
- 161 *Cell Cycle.* 2004 Dec;3(12):1530-6. Hsp90 activation and cell cycle regulation. Burrows F, Zhang H, Kamal A.
- 162 *Mol Cell.* 2007 Feb 23;25(4):625-34. Centrosome-associated NDR kinase regulates centrosome duplication. Hergovich A, Lamla S, Nigg EA, Hemmings BA.
- 163 *J Biol Chem.* 2004 Jun 4;279(23):24444-51. Human Mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases. Devroe E, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Silver
- 164 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 20;103(25):9542-7. IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1 (pNBC1). Shirakabe K, Priori G, Yamada H, Ando H, Horita S, Fujita T, Fujimoto I, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K.

- 165 Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2005 Jun;1(1):9-21. Role of the aryl hydrocarbon receptor in drug metabolism. Ramadoss P, Marcus C, Perdew GH
- 166 Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 22;104(21):8851-6. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J
- 167 J Interferon Cytokine Res. 2002 Sep;22(9):947-55 gene expression of novel cytosolic and secretory phospholipase A(2) types in human airway epithelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. Lindbom J, Ljungman AG, Lindahl M, Tagesson C
- 168 Thromb Haemost. 2004 Mar;91(3):450-6. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M.
- 169 J Immunol. 2007 Sep 1;179(5):3297-304. Urokinase-type plasminogen activator stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-1 production is mediated by plasmin-dependent signaling through annexin A2 and inhibited by inactive plasmin. Zhang Y, Zhou ZH, Bugge TH, Wahl LM.
- 170 Exp Cell Res. 1994 Jul;213(1):286-94. Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. De Petro G, Copeta A, Barlati S.
- 171 DNA Seq. 2007 Aug;18(4):257-64. Molecular characterization, expression and mapping of porcine LMP2 and MECL-1 genes. Liu Y, Li HJ, Qiu XT, Guo HW, Li YH, Zhang Q.
- 172 Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(12):2303-13. The intracellular form of human MAGP1 elicits a complex and specific transcriptional response. Segade F, Suganuma N, Mychaleckyj JC, Mecham R
- 173 Matrix Biol. 2007 May;26(4):213-23. LTBP-2 specifically interacts with the amino-terminal region of fibrillin-1 and competes with LTBP-1 for binding to this microfibrillar protein. Hirani R, Hanssen E, Gibson MA.
- 174 J Biol Chem. 2007 Oct 26;282(43):31675-87. The eIF2alpha kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. Baltz D, Pluquet O, Papadakis AI, Kazemi S, Qu LK, Koromilas AE.
- 175 Blood. 2005 Aug 1;106(3):779-86. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M.
- 176 J Biol Chem. 2005 Jun 10;280(23):21955-64. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, Walzer T, Comeau MR, Rauch CT, Wolfson MF, Sorensen RA, Van der Vuurst de Vries AR, Branstetter DG, Koelling RM, Scholler J, Fanslow WC, Baum PR, Derry JM, Yan W.
- 177 Biochemistry. 2002 Jul 2;41(26):8360-7. S-nitrosothiols react preferentially with zinc thiolate clusters of metallothionein III through transnitrosation. Chen Y, Irie Y, Keung WM, Maret W
- 178 J Cell Biol. 2007 Oct 22;179(2):321-30. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. Graser S, Stierhof YD, Lavoie SB, Gassner OS, Lamla S, Le Clech M, Nigg EA
- 179 J Cell Biol. 2007 Oct 22;179(2):247-54. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH.
- 180 Oncogene. 2007 Apr 5;26(16):2272-82. The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge. Dow LE, Kauffman JS, Caddy J, Zarbalis K, Peterson AS, Jane SM, Russell SM, Humbert PO.
- 181 Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(10):1759-65. The role of thymidine phosphorylase and uridine phosphorylase in (fluoro)pyrimidine metabolism in peripheral blood mononuclear cells. Temmink OH, de Bruin M, Laan AC, Turksma AW, Cricca S, Masterson AJ, Noordhuis P, Peters GJ.
- 182 Biochim Biophys Acta. 2002 Jul 18;1587(2-3):133-44. Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update. Pizzorno G, Cao D, Leffert JJ, Russell RL, Zhang D, Handschumacher RE
- 183 FEBS Lett. 2007 Jul 24;581(18):3545-9. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. Xie J, Marusich MF, Souda P, Whitelegge J, Capaldi RA.
- 184 EMBO J. 2003 Jun 16;22(12):3015-26. The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction. Saeki K, Miura Y, Aki D, Kurosaki T, Yoshimura A.

- 185 *Curr Biol.* 2007 Apr 17;17(8):711-6. The Arl4 family of small G proteins can recruit the cytohesin Arf6 exchange factors to the plasma membrane. Hofmann I, Thompson A, Sanderson CM, Munro S.
- 186 *J Biol Chem.* 2007 Jul 6;282(27):19685-91. The prolyl isomerase Pin1 affects Che-1 stability in response to apoptotic DNA damage. De Nicola F, Bruno T, Iezzi S, Di Padova M, Floridi A, Passananti C, Del Sal G, Fanciulli M.
- 187 *FEBS Lett.* 2006 Feb 20;580(5):1294-302. Protection against DNA damage-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. Jeung HC, Che XF, Haraguchi M, Zhao HY, Furukawa T, Gotanda T, Zheng CL, Tsuneyoshi K, Sumizawa T, Roh JK, Akiyama
- 188 *Clin Cancer Res.* 1999 Oct;5(10):2948-53. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. Sawada N, Ishikawa T, Sekiguchi F, Tanaka Y, Ishitsuka H.
- 189 *Nat Cell Biol.* 2007 Aug;9(8):961-9. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. Katz M, Amit I, Citri A, Shay T, Carvalho S, Lavi S, Milanezi F, Lyass L, Amariglio N, Jacob-Hirsch J, Ben-Chetrit N, Tarcic G, Lindzen M, Avraham R, Liao YC, Trusk P, Lyass A, Rechavi G, Spector NL, Lo SH, Schmitt F, Bacus SS, Yarden Y.
- 190 *Mol Cancer Res.* 2004 Apr;2(4):225-32. Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of a novel tensin family member, tensin3. Cui Y, Liao YC, Lo SH.
- 191 *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(2): R95-R102. Giantin is the major Golgi autoantigen in human anti-Golgi complex sera. Kazuhisa Nozawa,¹ Marvin J Fritzler,² Carlos A von Mühlen,³ and Edward KL Chan
- 192 *Int J Oncol.* 2007 Feb;30(2):421-8. A novel gene, RSRC2, inhibits cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. Kurehara H, Ishiguro H, Kimura M, Mitsui A, Ando T, Sugito N, Mori R, Takashima N, Ogawa R, Fujii Y, Kuwabara Y.
- 193 *J Surg Res.* 2007 Sep;142(1):129-36. Down syndrome candidate region 1-like 1 (DSCR1-L1) mimics the inhibitory effects of DSCR1 on calcineurin signaling in endothelial cells and inhibits angiogenesis. Gollogly LK, Ryeom SW, Yoon SS.
- 194 *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1773(4):546-55. Epub 2006 Dec 15 Nuclear trafficking of the POZ-ZF protein Znf131. Donaldson NS, Daniel Y, Kelly KF, Graham M, Daniel JM.
- 195 *Oncol Rep.* 2005 Nov;14(5):1293-8. Identification of candidate radioresistant genes in human squamous cell carcinoma cells through gene expression analysis using DNA microarrays. Higo M, Uzawa K, Kouzu Y, Bukawa H, Nimura Y, Seki N, Tanzawa H.
- 196 *J Biol Chem.* 2002 Apr 12;277(15):13312-20. KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. Liu QR, Zhang PW, Zhen Q, Walther D, Wang XB, Uhl GR.
- 197 *J Cell Biol.* 2007 Oct 22;179(2):187-97. Bod1, a novel kinetochore protein required for chromosome biorientation. Porter IM, McClelland SE, Khoukoli GA, Hunter CJ, Andersen JS, McAinsh AD, Blow JJ, Swedlow JR.

