

Aus dem Institut für Radiobiologie  
der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München

Leiter: PD Dr. V. Meineke  
(Mentor: PD Dr. M. Abend)

vorgelegt über den

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.- Prof. Dr. Dr. habil. W. Schmahl

## **Strahleninduzierte Änderungen von Zellproliferation, Zelltod und Genexpression in A549 Zellen**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig – Maximilians – Universität München

von

Marion Gabriele Greubel

aus

Rednitzhembach

München 2006

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ. -Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent:	Univ. -Prof. Dr. R. Köstlin

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b><u>Seite</u></b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
<b>Verzeichnis der Gene</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Stand des Wissens</b>	<b>3</b>
2.1 Zelltod	3
2.1.1 Apoptose und Nekrose	3
2.1.1.1 Apoptose	3
2.1.1.2 Nekrose	6
2.1.2 Mikrokernbildung	7
2.1.3 Abnormale Zellen	9
2.2 Zellzyklus	10
2.2.1 Ablauf des Zellzyklus	10
2.2.2 Synchronisation von Zellen	13
2.3 Untersuchungsmethoden	13
2.3.1 MAA-Assay	14
2.3.2 Durchflusszytometrie	14
2.3.3 Genexpressionsarray	15
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Reagenzien und Bezugsquellen	18
3.2 Geräte und Labormaterialien	19
3.3 Verwendete Lösungen	21
3.4 Zellen und Zellkulturbedingungen	24
3.5 Röntgenbestrahlung	24
3.6 Wachstumskurve	24
3.7 Vitalitätstest	26
3.8 MAA-Assay	27
3.9 BrdU-DNA-Doppelmarkierung	28

3.9.1	Versuchsansatz	29
3.9.2	Zweiparameter Messung am Durchflusszytometer	31
3.10	Genexpressionsarray	33
3.10.1	Versuchsplanung	33
3.10.2	Zellansatz	35
3.10.3	RNA-Isolation	35
3.10.3.1	Isolation der Gesamt-RNA	36
3.10.3.2	DNase-Verdau und Probenaufreinigung	38
3.10.4	Quantifizierung der RNA, Überprüfung der Reinheit und Integrität	39
3.10.4.1	Spektralphotometrie	39
3.10.4.2	Neutrale Gelelektrophorese zur Quantifizierung	40
3.10.5	PCR zur Überprüfung der DNA-Freiheit	40
3.10.6	Konvertierung der mRNA in radioaktiv markierte cDNA	42
3.10.7	Hybridisierung und Exposition eines Phosphorscreens	46
3.10.7.1	Hybridisierung	46
3.10.7.2	Exposition auf einen Phosphorscreen	48
3.10.8	„Strippen“ der Membranen	49
3.10.9	Auswertung	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1	Zellwachstum und Vitalität	52
4.2	Proliferation	53
4.3	Zelltod	57
4.4	Genexpression	60
4.4.1	Isolation der Gesamt-RNA	60
4.4.2	Kovertierung der mRNA in radioaktiv markierte cDNA	61
4.4.3	Hybridisierung und Autoradiographie	62
4.4.4	Auswertung	63
4.4.4.1	Exprimierte Gene	63
4.4.4.2	Differentiell exprimierte Gene	64
4.4.4.2.1	Anzahl der differentiell exprimierten Gene gegen die Zeit	64
4.4.4.2.2	Verhalten der differentiell exprimierten Gene gegen die Zeit	66
4.4.4.2.3	Geneinteilung nach biologischer Funktion gemäß des Herstellers (Clontech)	67

4.4.4.2.4	Geneinteilung nach biologischer Funktion gemäß der Software Panther <sup>R</sup> (Applied Biosystems)	77
4.4.4.2.5	Zellproliferation und Zelltod kodierende Gene	79
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
5.1	In vitro Versuche	81
5.2	Zeitlicher Zusammenhang zwischen Proliferation, Zelltod und Genexpression	81
5.3	Genexpressionsuntersuchung	83
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>100</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>137</b>

**Verzeichnis der Abkürzungen**

A	Österreich
aqua dest.	Destilliertes Wasser
Art. Nr.	Artikelnummer
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	etwa
CA	Kalifornien
cDNA	copy-DNA
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
D	Deutschland
d	Days (Tage)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
F	Frankreich
Fa.	Firma
FCS	Foetales Kälberserum
FIN	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GB	Großbritannien
ggf.	gegebenenfalls
Gy	Gray
G <sub>0</sub> -Phase	Gap <sub>0</sub> -Phase (Ruhephase)
G <sub>1</sub> -Phase	Gap <sub>1</sub> -Phase (präsynthetisches Intervall)
G <sub>2</sub> -Phase	Gap <sub>2</sub> -Phase (postsynthetisches Intervall)
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HSW	High Salt Wash Solution

IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase(n)
kbp	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
LSW	Low Salt Wash Solution
M	Mol
mA	Milliampere
MAA	Summe <u>m</u> ikrokernhaltiger, <u>a</u> poptotischer und <u>a</u> bnormaler Zellen
mg	Milligramm
min.	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MN	Mikrokern(e)
MO	Missouri
mRNA	messenger RNA
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Normal (chemische Einheit)
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
O.D.	Optical Density (Optische Dichte)
pg	Pikogramm
p.r.	post radiationem (nach Strahlenexposition)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PBSA	Bovines Serum Albumin in PBS
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-Polymerasekettenreaktion
S	Schweden
SAR	scaffold attachment region
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulphat)

---

sec.	Sekunde(n)
sog.	so genannt
S-Phase	Synthese-Phase
TAE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

**Verzeichnis der Gene**

<b>Array- lokalisation</b>	<b>Genbezeichnung</b>	<b>Locus Link</b>
A01cd1	tubulin, alpha, ubiquitous	10376
A09cd1	oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	5018
A09cd6	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast)	10245
A11cd1	poly(rC) binding protein 2	5094
A15ef1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2	610
A20ab2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	216
A21ef7	trophinin associated protein (tastin)	10024
A22ab4	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	1973
A23gh3	roundabout homolog 4, magic roundabout (Drosophila)	54538
A24ab2	aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	218
A24gh7	purine-rich element 8470binding protein B	5814
B14ab2	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	8470
B16gh6	neurexin 2	9379
B23cd1	ribosomal protein L4	6124
B23cd4	thioredoxin	7295
B24ab2	Rho GTPase activating protein 6	395
C18cd3	voltage-dependent anion channel 2	7417
C22ef5	prohibitin	5245
C22ef6	calpain, small subunit 1	826
C22ef7	stress 70 protein chaperone, microsomal-associated, 60kD	6782
C23cd3	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	6628
C24gh6	nuclear receptor co-repressor/HDAC3 complex subunit	79718
D03cd1	ribosomal protein L7	6129
D10gh8	keratin associated protein 4.10	85285
D13gh6	metallothionein 1G	4495
D17gh6	metallothionein 1X	4501
D18ef7	thymidylate synthetase	7298

<b>Array- lokalisation</b>	<b>Genbezeichnung</b>	<b>Locus Link</b>
D23gh3	hypothetical protein FLJ10815	55238
E17ab7	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	4192
E18gh2	hypothetical protein FLJ20309	54891
E21cd3	ribosomal protein L5	6125
E22ef7	heat shock 70kD protein 8	3312
E22ef8	SRY (sex determining region Y)-box 8	30812
F01gh6	tubulin, beta, 5	10382
F03gh6	tubulin, beta, 2	10383
F04ab6	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	3710
F09cd4	tubulin, alpha 3	7846
F11cd1	ribosomal protein L34	6164
F21cd1	ribosomal protein, large, P0	6175
G01cd3	ribosomal protein S27 (metallopanstimulin 1)	6232
G01cd8	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	23641
G18ef3	translocating chain-associating membrane protein	23471
G22cd1	ribosomal protein L10a	4736
G22cd8	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	934
H06ef2	selenoprotein T	51714
H12cd1	tubulin, alpha, ubiquitous	10376
H12cd7	actin, beta	60
H13ef5	prothymosin, alpha (gene sequence 28)	5757
H15ab8	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	5634
H19cd1	ribosomal protein S13	6207
H20ab7	metallothionein 1L	4500
H20gh5	hypothetical protein 24432	65057
I02gh7	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	56993
I13cd4	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	7345

<b>Array- lokalisation</b>	<b>Genbezeichnung</b>	<b>Locus Link</b>
I22gh6	aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4)	1109
I23ef1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	3189
J14ab6	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	3838
J14ef1	hematological and neurological expressed 1	51155
J22ab7	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 17	3151
K03ef8	PRO0246 protein	29041
K12cd5	chromosome 1 open reading frame 8	9528
K13ef5	heat shock 70kD protein 1A	3303
K13ef6	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	396
K15ef4	nucleolar protein family A, member 3 (H/ACA small nucleolar RNPs)	55505
K15ef5	CD4 antigen (p55)	920
K15gh6	caspase recruitment domain protein 14	79092
K18ef7	endothelin 3	1908
K22ef1	carboxypeptidase D	1362
K23ef4	AD-012 protein	55833
L04ab7	metallothionein 2A	4502
L06cd6	WAS protein family, member 3	10810
L11cd2	TNF receptor-associated factor 1	7185
L16ab5	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	2030
L17ab8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	5709
L23cd4	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	8925
M01ab7	mevalonate (diphospho) decarboxylase	4597
M10ef6	RAD23 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	5887
M19ab3	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	8553
M22ef2	mitochondrial solute carrier	51312
M24ab5	growth hormone secretagogue receptor	2693

<b>Array-lokalisierung</b>	<b>Genbezeichnung</b>	<b>Locus Link</b>
M24cd1	triosephosphate isomerase 1	7167
N07gh2	hypothetical protein FLJ10103	55070
N08ef4	homeo box A5	3202
N09gh5	hypothetical protein FLJ13055	64748
N13gh2	hypothetical protein FLJ10120	55073
N17ef8	likely ortholog of rat golgi stacking protein homolog GRASP55	26003
N21cd8	paired immunoglobulin-like receptor alpha	29992
O02gh2	hypothetical protein FLJ20514	54960
O13gh1	splicing factor, arginine/serine-rich 6	6431
O14ab2	aquaporin 8	343
O16ab4	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	1999
O16ab8	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	5355
O21ef5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1026
P05ab5	calreticulin	811
P08ab2	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6	522
P08gh5	hypothetical protein IMAGE3455200	79001
P12cd1	tubulin, alpha, ubiquitous	10376
P12cd4	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	7534
P12cd7	actin, beta	60
P12cd8	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597
P14ab2	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	10476

## 1 Einleitung

Seit Entdeckung der Radioaktivität vor gut 100 Jahren und der damit beginnenden radiobiologischen Forschung sind die Auswirkungen von radioaktiver Strahlung auf die Zelle untersucht worden.

Mit der Einführung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden gewinnt die Untersuchung auf der RNA- und Proteinebene immer größere Bedeutung. Ziel ist es zu erklären, wie die Zelle durch ionisierende Strahlen induzierte Strahlenschäden prozessiert. Dabei werden seit langem bekannte Phänomene wie der Einfluss ionisierender Strahlen auf die Proliferation und den Zelltod untersucht. Ein entscheidender Schwerpunkt der heutigen wissenschaftlichen Forschung stellt die Untersuchung von Signaltransduktionswegen dar. Über sie werden die genannten Prozesse wie Zellproliferation aber auch Zelltod durch die Zelle aktiv gesteuert.

Dazu erfasst die Zelle über Signaltransduktionswege Informationen aus der gesamten Zelle, die im Zellkern zu einer adäquaten Antwort führen. Die Strahlung kann Einfluss auf den Zellzyklus haben. So ist bekannt, dass die Zellen im Zellzyklus nach Strahlenexposition in bestimmten Phasen verharren, was im Zusammenhang mit ablaufenden Reparaturprozessen diskutiert wird. Eine Vielzahl an Genen, die diese Prozesse steuern helfen ist mittlerweile definiert worden. Wenn der Strahlenschaden die Reparaturkapazitäten der Zelle übersteigt, kann eine aktive Form der Selbstzerstörung, die so genannte Apoptose eingeleitet werden. Intensive Untersuchungen der Apoptose führten in wenigen Jahren zu einem detaillierten Verständnis und der Definition einer Vielzahl entscheidender, diesen Prozess kontrollierender Gene. Inzwischen wurde auch für verschiedene Nekroseformen eine aktive Beteiligung der Zelle nachgewiesen. Die Mikrokern-Bildung (MN) beruht vermutlich ebenfalls auf einem aktiven, von der Zelle kontrollierten Prozess und kann als eine Vorstufe der Apoptose angesehen werden. Als Reaktion der Zellen auf Strahlung ist auch die Bildung abnormaler Zellen (wie z.B. multinukleärer Zellen und Riesenzellen) bekannt. Trotz dieser Kenntnisse ist das Verständnis um die dabei beteiligten Gene des Normalgewebes aber auch in Tumoren unzureichend. Tumoren sind häufig durch einen reduzierten Zelltod und/oder eine erhöhte Proliferation charakterisiert. Behandlung mit ionisierenden Strahlen greifen mitunter nicht, so dass ein Rezidiv entsteht. Ein größeres Verständnis der Regulation von Zelltod und

Proliferation in Tumoren ist Voraussetzung für eine weitere Verbesserung der Effizienz der Strahlentherapie sowohl von humanen als auch tierischen Tumoren.

Durch die Suche nach den zugrunde liegenden Mechanismen des Zelltodes und der Kontrolle des Zellzyklus auf Genexpressionsebene sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit zum Verständnis der Kontrolle dieser biologischen Prozesse auf Genexpressionsebene beigetragen werden.

Hierzu wurden Untersuchungen an Tumorzellen durchgeführt, die in einer bestimmten Zellzyklusphase bestrahlt wurden. Als Modell dienten humane Lungenkarzinomzellen (A549), welche nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fluoreszenzmikroskopisch (Ermittlung der Zelltodesform und Zelltodesrate mit Hilfe des MAA-Assays), durchflusszytometrisch (Bestimmung der Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus) und mit einem Genexpressions-Mikroarray untersucht wurden. Bei letzterem wurde die Expression von 11.835 Genen gleichzeitig ermittelt. So sollten die Gene gefunden werden, die im zeitlichen Zusammenhang mit Zelltod und Zellzyklusänderungen relativ zur Kontrolle hoch- oder herunterreguliert bzw. differentiell exprimiert werden.

### **Zielsetzung der Arbeit**

Ionisierende Strahlung beeinflusst den Zellzyklus und das Überleben der Zellen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der ionisierenden Strahlung auf Zellzyklus und Zelltod auf Genexpressionsebene zu überprüfen, um die Gene zu finden, welche für das eben genannte Geschehen speziell in der S-Phase verantwortlich sind.

Als Modell dienten die humanen Lungenkarzinomzellen A549, welche nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den Methoden des MAA-Assays, der Durchflusszytometrie und einem Genexpressionsarray untersucht wurden. Bei letzterem wurde die Expression von 11.835 Genen gleichzeitig ermittelt. So sollten die strahleninduzierten Gene gefunden werden, die im zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten von Zelltod und Zellzyklusänderungen stehen.

Mit der Doktorarbeit sollte ein Beitrag zur Erweiterung des Verständnisses der Regulation von Zelltod und Proliferation in Tumoren geleistet werden. Dies ist Voraussetzung für eine weitere Verbesserung der Effizienz der Strahlentherapie sowohl von humanen als auch tierischen Tumoren.

## **2 Stand des Wissens**

### **2.1 Zelltod**

Es gibt unterschiedliche Formen des Zelltodes wie Apoptose, Nekrose, Mikrokernbildung, Multinukleation und Mitosestörungen (Abend 2003).

Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet, da sie durch gezielte Aktivierung von Signaltransduktionswegen erfolgt. Weiterhin wurde erkannt, dass Signaltransduktionswege vermutlich auch bei Zelltodesformen wie Mikrokernbildung, Multinukleation, Mitosestörungen und Nekrose eine Rolle spielen.

Die einzelnen Formen des Zelltodes können ineinander übergehen. So kann beispielsweise eine Verschiebung von Mitosestörung zur Apoptose stattfinden; dies ist aber von der Zelllinie und Art und Intensität des Stressors abhängig (Übersicht siehe Abend 2003). Heute geht man davon aus, dass es eine Art Apoptose-Nekrose-Kontinuum gibt, da auch bei bestimmten Formen der Nekrose eine Beteiligung derselben Moleküle wie bei dem Prozess der Apoptose vermutet wird (Banasiak et al. 2000, Martin 2001, Wilson et al. 2002).

#### **2.1.1 Apoptose und Nekrose**

##### **2.1.1.1 Apoptose**

Die Apoptose war die erste Zelltodesform, die mit einem selbstständigen Eingreifen der Zelle über Signaltransduktion in Verbindung gebracht wurde (Übersicht siehe Abend 2003, Weiland 1999). Sie ist als Zelltodesform in mehrfacher Hinsicht wichtig für den Organismus:

- Sie spielt für die Entwicklung der Embryonen eine Rolle, da nur mit Hilfe des gezielten Zelltodes die Entstehung von dreidimensionalen Gebilden wie Organen möglich ist.
- Sie ist wichtig für die Kontrolle der Zellzahl, als Gegenspieler der Mitose.
- Einzelne geschädigte und im Rahmen der Tumorgenese entartete Zellen werden eliminiert (Übersicht siehe Abend 2003, Weiland 1999, Lawen 2003).

Zur Entwicklung von Tumoren kann es kommen, wenn die Elimination geschädigter Zellen nicht gelungen ist (Weiland 1999, Sun 2000, Lawen 2003).

### Morphologie

Für die Apoptose sind folgende morphologische Kennzeichen typisch:

- Die Zellorganelle kondensieren (Nias 1998).
- Die Zellen runden sich ab und verlieren den Kontakt zu Nachbarzellen (Lawen 2003).
- Die Zellen schrumpfen.
- Entlang der Kernmembran kondensiert die DNA (Übersicht siehe Abend 2003, Weiland 1999, Abend et al. 1999, Nias 1998, Lawen 2003, Lang et al. 2003). Diese Kondensation kann mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid und DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylidol), welche den Zellkern anfärben, fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.
- Das Zytoplasma stülpt sich typisch aus. Dieser Vorgang wird auch als Knospung, bzw. „budding“ bezeichnet.
- So genannte apoptotische Körperchen werden als Endprodukte ausgeformt. Dabei handelt es sich um kleine, mit einer intakten Zellmembran umgebene Strukturen (Pyknosen), die durch Abschnürung entstehen.
- Aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen spalten die DNA in Fragmente in der Größe von 30, 300, 700 und 1.000 kbp. Diese DNA-Fragmente können gelelektrophoretisch nachgewiesen werden und imponieren als die „Sprossen einer Leiter“. Sie wird deshalb auch als DNA-Leiter bezeichnet.
- Es kommen keine Entzündungsreaktionen vor, da die Membran der Zelle und ihrer Organellen (Lysosomen) in ihrer Funktionstüchtigkeit weitgehend erhalten bleibt.
- Die Zellen werden durch die Nachbarzellen phagozytiert und damit eliminiert (Abend 2003, Weiland 1999, Abend et al. 1999, Nias 1998, Lawen 2003). Die Phagozytose wird dabei hauptsächlich über Signale, Vitronectinrezeptoren und CD14 vermittelt. Phosphatidylserinrezeptoren, die durch die Zelle von der Innenseite der Zellmembran auf die Zellmembranoberfläche nach außen transferiert werden, stellen die Voraussetzung zur Phagozytose dar (Weiland 1999).

## Signaltransduktion

Die Apoptose wird über Signaltransduktionsmoleküle gesteuert, welche beispielsweise durch ionisierende Strahlung aktiviert werden können.

Bei der Durchführung des Apoptoseprogramms können drei Phasen unterschieden werden.

### 1. Initiationsphase

Bei der Initiation spielen Rezeptoren eine Rolle, die über eine intrazelluläre „Todesdomäne“ verfügen. Typische Todesrezeptoren sind der Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor (TNF-R)1, welcher zu der TNF-R Familie gehört und eine zytosolische Todesdomäne (DD) besitzt (Lawen 2003), die Fas- (auch Apo-1 oder CD95 genannt) und TRAIL-Rezeptoren, welche ebenfalls über eine Todesdomäne verfügen. Diese lösen mithilfe von Caspasen (Abend 2003, Abend et al. 1999, Lawen 2003, Shankar, et al. 2004) wie Interleukine-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) das Programm für die Apoptose aus. Daran ist u.a. auch p53 beteiligt (Weiland 1999, Nias 1998, Jasty et al. 1998, Sanchez-Carbayo et al. 2002). Ebenso können die Freisetzung von Ceramiden und Schäden an der DNA über das Tumorsuppressorgen p53 die Apoptose induzieren. Ceramide sind Produkte des Sphingomyelinstoffwechsels und werden auch als „Todeslipid“ bezeichnet (Abend 2003, Abend et al. 1999, Lawen 2003).

### 2. Integrationsphase

In der darauffolgenden Phase ist unter anderem die Bcl-2 Protein-Familie (Weiland 1999, Nias 1998, Jasty et al. 1998, Lawen 2003) beteiligt. Verschiedene Signale, die auf der mitochondrialen Ebene über die Bcl-2-Familie registriert werden, sind ebenso an der Regulation beteiligt wie die Transkriptionsfaktoren E2F-1, die Protein-Kinasen C und A (PKC, PKA), sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, SCF und NGR. Auch durch Aktivierung der p53-Zielgene (wie CDKN1A, PCNA, GPX, S100A2 und PTGF-beta) werden die p53-abhängigen Signaltransduktionswege zur Apoptose in Gang gesetzt (Sun 2000, Sheikh et al. 1999). Strahleninduzierte Sauerstoffradikale, sog. „reactive oxygen intermediates“ (ROI), sind als Mediatoren für Apoptose nachgewiesen worden (Wang 1996).

### 3. Exekutionsphase

In dieser letzten Phase werden Caspasen aktiviert, die proteolytische Proteine spalten und damit den für die Apoptose typischen Abbau der Zelle und ihrer Strukturen in Gang setzt.

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

#### 2.1.1.2 Nekrose

Für die Nekrose wurden ebenfalls spezifische Signaltransduktionswege z.B. unter Beteiligung des TNF-Rezeptors aufgezeigt (siehe Übersichtsarbeit: Abend 2003). Typisch für die Nekrose ist eine Dilatation des Endoplasmatischen Reticulums, eine Schwellung (Abend 2003, Lawen 2003) des Zytosols, welche mit zystiformen Evaginationen des Zytoplasmas gekoppelt ist. Die Mitochondrien können kondensieren oder ihre normale Größe behalten. Verklumpungen des Chromatins sind genauso typisch wie die Degeneration des Zellkerns (Endprodukt mit geballter Zellkernmasse sog. Pyknose) und das Auftreten von Entzündungsreaktionen.

Im Unterschied zur Apoptose tritt bei der Nekrose schnell eine Änderung in der Mitochondrienmembran auf; dies führt rasch zu einer Dysfunktion der Mitochondrien. Charakteristisch sind geöffnete mitochondriale Poren (mitochondrial permeability transition pores, (PT)), wodurch eine Unterdrückung des elektrochemischen Gradienten entsteht. Es werden Sauerstoffradikale freigesetzt, die ATP- (Adenosin-Triphosphat) Produktion wird unregelmäßig und es findet ein zunehmender Wasserzustrom statt, was schließlich zur Schwellung der Mitochondrien führt (Abend 2003).

### 2.1.2 Mikrokernbildung

Mikrokerne (MN) sind schon seit langem als Howell-Jolly-Körperchen in Blutzellen bekannt (Almassy et al. 1987).

#### Entstehung:

- Vermutlich werden azentrische Chromosomenfragmente spontan mit einer Kernmembran umhüllt (passiver Prozess). Die Fragmente entstehen durch Doppelstrangbrüche nach ionisierender Bestrahlung oder vermutlich durch aktive Spaltung beschädigter DNA Schleifen (aktiver Prozess) (Abend et al. 1999).
- Einschluss von ganzen (meist beschädigten) Chromosomen oder auch von Chromosomenfragmenten (Heddle et al. 1991, Almassy et al. 1987, Cimini et al. 1997) nach der Zellteilung in einem oder einigen Neben-/Sekundärkerne.

#### Ursachen:

- Verhaken der Chromosomen (Heddle et al. 1991, Almassy et al. 1987).
- Spindel- und Kinetochordefekte
- Fragmentierung. Fragmente können durch Zerreißen entstehen, die durch chromosomale Brücken zwischen den Kernen der Tochterzellen, durch falsche Anordnung der Chromatiden in der Äquatorialebene oder durch chromosomale Brücken zwischen den Kernen der Tochterzellen, verursacht werden (Heddle et al. 1991).
- Phagozytose apoptotischer Körperchen (Heddle et al. 1991).

Es wird vermutet, dass verschiedene Formen des Zelltodes wie Apoptose und MN-Bildung dieselben genetischen Programme zur Spaltung von DNA auf der höheren Chromatinorganisationsebene (DNA-Schleifen) verwenden. Beide Formen haben die Spaltung von DNA gemeinsam (Abend 2003). Die DNA-Fragmente in der Größe von an der SAR (Scaffold attachment region) aufgehängten DNA-Schleifen, die während eines frühen Apoptosestadiums entstehen, wurden auch bei MN gefunden. Dies wurde als ein Hinweis darauf interpretiert, dass MN-Bildung als eine Vorstufe der Apoptose gesehen werden kann (Abend et al. 1999, Abend 2003).

Almassy et al. (1987) haben in MN in gamma-bestrahlten humanen Lymphozyten einen DNA-Inhalt von 6 % oder weniger des Interphasekerns gefunden, wobei die MN aus azentrischen Fragmenten bestanden. Die restlichen MN, mit einem DNA-

Inhalt von 6-20 % des Hauptkerns, entstanden hauptsächlich aus Schäden am Spindelapparat. Die meisten MN waren in der Lage, DNA während der S-Phase zu synthetisieren, und einige von ihnen taten das auch, wenn sich der Hauptkern selbst nicht in der S-Phase befand (Almassy et al. 1987).

### Morphologie

- Im Lichtmikroskop sind MN als rund bis oval geformte Gebilde sichtbar (Belka et al. 2003, Almassy et al. 1987, Meek 2000).
- Sie können eine Größe bis zu einem Drittel des Hauptkerns erreichen (Belka et al. 2003).
- Sie müssen wie der Hauptkern eine Kernmembran und eine homogene Verteilung der Chromosomen aufweisen, sowie eine DNA-spezifische Reaktion zeigen (Almassy et al. 1987).
- MN müssen deutlich vom Hauptkern abgetrennt sein (Almassy et al. 1987, Abend et al. 1999).
- Sie müssen nach der vollständigen Mitose innerhalb des Zytoplasmas der neuen Zelle liegen (Abend et al. 1999).
- Sie besitzen eine, im Elektronenmikroskop sichtbare, für Kerne typische Doppelmembran mit Kernmatrix und Kernporen (Belka et al. 2003).

### Vorkommen und Funktion

Das Auftreten der Mikrokerne erfolgt nach einer Zellteilung und ist dosisabhängig (Almassy et al. 1987). Wie hoch die Neigung zur Ausbildung von MN ist, ist abhängig von der Zelllinie (Abend 2003, Belka et al. 2003). Es bleibt eine Zelle zurück, die jedoch in ihrer erhaltenen Funktion eingeschränkt ist und ihre Klonogenität verloren hat (Abend 1999, 2003, Belka et al. 2003). Betrachtet man Apoptose und MN-Bildung unabhängig voneinander, kommen bei der Apoptose auf internukleosomaler Ebene DNA-Degenerationen in Form von DNA-Leitern vor, die durch internukleosomale Spaltung der DNA durch freigesetzte Endonuklease entstanden sind, die in Mikrokernen fehlen (Abend et al. 1999, Abend 2003).

### 2.1.3 Abnormale Zellen

Nach Strahlenexposition entstehen neben mikrokernhaltigen und apoptotischen Zellen auch nekrotische Zellen (bspw. Riesen- und sog. Schattenzellen) oder Mitosefehlerzellen (Zellen mit pulverisiertem Zellkern, multinukleäre Zellen wie bi- und tetranukleäre Zellen). (Belka et al. 2003). Sie wurden kürzlich unter dem Begriff „abnormale Zellen“ zusammengefasst und stellen eine Gruppe abgestorbener Zellen dar, die mit dem im Folgenden erwähnten MAA-Assay erfasst werden. Neben mikrokernhaltigen und apoptotischen Zellen können folgende Formen des Zelltodes nach Bestrahlung gefunden werden:

#### 1. Nekrotische Zellen:

Riesenzellen entstehen im Rahmen nekrotischer Prozesse durch Schwellung der Zellen. Damit einher geht eine Vergrößerung des Zellkerns, der bis zu dreimal größer als der Zellkern normaler Zellen sein kann. Sogenannte Schattenzellen („Geistzellen“) sind Zellen, die bereits in Auflösung begriffen sind. Die DNA imponiert als eine schwach sichtbare hypodense und zweidimensional erscheinende ovale Struktur. Diese Zellen werden auch „clouds“, „hedgehogs“ oder NDCN (nondetectable cell nuclei) genannt (Meintières et al. 2003).

#### 2. Mitosefehlerzellen:

Die multinukleären Zellen können auch in die Kategorie des reproduktiven Zelltodes eingeordnet werden (Abend 2003). Es ist seit langem bekannt, dass schon geringe Strahlendosen (<1 Gy) zu Störungen im normalen Ablauf des Zellzyklus führen können (Hug et al. 1975). Zur Entstehung der multinukleären Zellen werden die Theorie der Fusion von zwei oder mehr Zellen kurz nach der Bestrahlung und die Theorie der Beeinträchtigung der Zytokinese diskutiert (Brathen et al. 2000). Atypische Zellen mit mehrfachem DNA-Gehalt bilden sich häufig vor dem postmitotischen Zelltod aus (Belka et al. 2003).

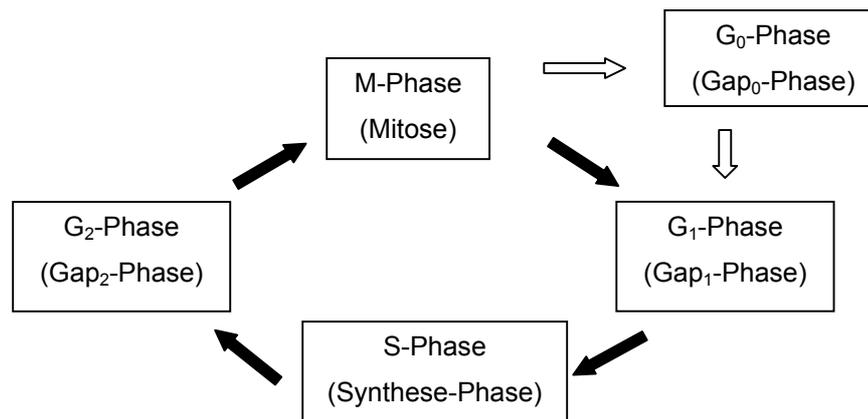
Zellen mit pulverisiertem Zellkern können ebenso in die Kategorie des reproduktiven Zelltodes eingeordnet werden (Abend 2003). Das gesamte Genom dieser in der Mitose arretierten Zellen imponiert durch eine Vielzahl an Chromosomenfragmenten, die im Fluoreszenzmikroskop von gleicher Größe erscheinen.

## 2.2 Zellzyklus

### 2.2.1 Ablauf des Zellzyklus

Der Zellzyklus kann in die Teilungsphase (Mitose) und die intermitotische Phase (Interphase) unterteilt werden. Die Interphase setzt sich wiederum aus der G<sub>1</sub>-Phase (präsynthetisches Intervall), der S-Phase (Synthese-Phase) und der G<sub>2</sub>-Phase (postsynthetisches Intervall) zusammen (Abb. 2.1). Wenn die Zelle nicht in der Zellteilung ist, kann sie in der G<sub>0</sub>-Phase verharren, welche wiederum in die G<sub>1</sub>-Phase übergeht, wenn die Mitose eingeleitet wird (Fritz-Niggli 1988, Hug et al. 1975, Trott et al. 1986). Die G<sub>0</sub>-Phase wird auch Ruhephase genannt. Der Zellzyklus wird als Intervall zwischen der Mitose in einer Zelle bis zur folgenden Mitose in den beiden Tochterzellen definiert (Nias 1998).

Die DNA-Synthese findet während der S-Phase statt. Die anderen zellulären Strukturen werden hauptsächlich während der Interphase (oder auch intermitotischen Phase) synthetisiert (Nias 1998). Der Zellzyklus wird durch den periodischen Wechsel in der Aktivität von cyclinabhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinase, cdk) in Gang gehalten. Deren Aktivierung bewirkt den Übergang einer Zelle von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase, von der G<sub>2</sub>- in die M-Phase wie auch das Durchlaufen der S-Phase. Cycline sind Proteine, die periodisch während des Zellzyklus synthetisiert und dann auch aktiv abgebaut werden. Durch Interaktion der Cycline mit ihren korrespondierenden cdks wird die Aktivität der cdks gesteuert. Für den Übergang der Zelle von G<sub>1</sub>- in die S-Phase sind hauptsächlich Cyclin D mit Cdk4, Cyclin E mit Cdk2 und Cyclin A mit Cdk2 verantwortlich. Cyclin A mit CDK2 ist auch für den Durchlauf einer Zelle durch die S-Phase notwendig (Iliakis et al. 2003, Nias 1998, Goldberg 2001).



**Abb. 2.1** Schematische Darstellung des Zellzyklus

Die periodische Synthese und der Abbau der Cycline während des Zellzyklus stehen im Gegensatz zu den cyclinabhängigen Kinasen, deren Niveau nur wenig während des Zellzyklus variiert. Eine weitere Ebene der Regulation wird durch inhibitorisch wirkende Moleküle (cdk inhibitors, kurz CKI) gewährleistet. Von diesen ist p21 ein wichtiges Protein. Die cyclinabhängigen Kinasen sind auf Grund ihrer zentralen Rolle im Zellzyklusablauf ein ideales Ziel für Prozesse, die den Zellzyklusablauf hemmen sollen. Nach Bestrahlung blockieren die Zellen den weiteren Verlauf des Zellzyklus durch Hemmung der Aktivität der cyclinabhängigen Kinase, die den Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus katalysieren würde. (Iliakis et al. 2003, Wharton 2001). Für die Hemmung und Aktivierung von Enzymen, die den Zellzyklus beeinflussen, spielen auch Proteasomen eine wichtige Rolle, denn sie zerstören schnell die regulierenden Proteine (Goldberg et al. 2001).

Das Protein TP53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Es reguliert auf Transkriptionsebene die Zellantwort auf DNA-Schädigung. Dieses Gen kontrolliert zusammen mit andern Genen (z.B. c-myc, c-fos und vielen anderen Kinasen und Phosphatasen) grundlegende biologische Prozesse wie Reparatur, Proliferation und Apoptose (Weiland 1999, Nias 1998, Jasty et al. 1998, Sanchez-Carbayo et al 2002, Lawen 2003). So kann die Transition durch den Zellzyklus am G<sub>1</sub>-Checkpoint (durch Induktion von p21-Genexpression), oder am G<sub>2</sub>-Checkpoint angehalten werden. Dadurch wird der Übergang entweder in die S-Phase (DNA-Synthesephase) oder aus der abgeschlossenen S-Phase in die Mitose gehemmt. Zur selben Zeit induzierten die Gene die Reparaturmechanismen (Weiland 1999, Nias 1998, Jasty et

al. 1998, Meek 2000). Sind die Schäden zu groß, wird über die Beeinflussung von Bcl-2 Familienmitgliedern und die Aktivierung von Caspasen Apoptose ausgelöst (Weiland 1999, Nias 1998, Jasty et al. 1998).

Schon Strahlendosen um 1 Gy können zu Störungen im Zellzyklus führen (Hug et al. 1975, Trott et al. 1986). Nach Bestrahlung wird der Eintritt in die Synthesephase und die Mitose verzögert. Die Mitoseverzögerung ist umso ausgeprägter, je kürzer der Abstand zwischen Bestrahlung und Teilung ist.  $G_1$ -Zellen reagieren schwächer als Zellen in der  $G_2$ -Phase (Eder et al. 1986). Viele Tumorzellen oder Zelllinien haben die Möglichkeit am  $G_1/S$ -Checkpoint innezuhalten verloren (Gilbertz et al. 1998, Syljuasen et al. 2001), wogegen der strahleninduzierte  $G_2$ -Block normalerweise bei allen Zellen ausgeprägt ist (Gilbertz et al. 1998). Ist die Mitose eingeleitet, findet keine Verzögerung mehr statt. Werden also Schäden frühzeitig im Zellzyklus gesetzt, können sie bis zur Teilung teilweise repariert werden (Eder et al. 1986). Normale menschliche diploide Zellen, die mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, können aber auch eine permanente Zellzyklushemmung zeigen (Suzuki et al. 2001).

Werden die Zellen bestrahlt, kann es unabhängig von der Position der Zellen im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu einem Block und zur Akkumulation der Zellen in der  $G_2$ -Phase kommen. Nach Strahlenexposition mit 10 Gy können Säugetierzellen nach einer Mitoseverzögerung in der Regel noch mindestens eine Zellteilung durchlaufen. Die Dauer der Mitoseverzögerung nach Bestrahlung ist von der Strahlendosis abhängig (im Mittel bewirkt 1 Gy eine Verzögerung um 2 h). Bei sehr hohen Dosen von 100 Gy sterben die Zellen schon vorher den so genannten Interphasetod. In Abhängigkeit von der individuellen Empfindlichkeit der Zellen kann dies schon bei niedrigeren Dosen erfolgen. Bei geringeren Strahlendosen können die Zellen erst nach der ersten bzw. zweiten Zellteilung verzögert absterben, häufig wegen der defekten Mitose (Hug et al. 1975, Trott et al. 1986). Dies wird auch reproduktiver Zelltod genannt (Hall 1988).

Die Zellen sind in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich strahlenempfindlich. Eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit liegt im Übergang von der  $G_1$ -Phase zur S-Phase, gegen Ende der  $G_2$ -Phase sowie in der Mitose vor (Trott et al. 1986). Die höchste Überlebensfraktion findet man bei der Bestrahlung in der S-Phase; je nach Zellart kann es ein weiteres Maximum bei einer langen  $G_1$ -Phase geben (Eder et al. 1986).

### 2.2.2 Synchronisation von Zellen

Zur Untersuchung der Auswirkungen von radioaktiver Strahlung auf Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus muss man die Zellen synchronisieren. Wegen der Spanne der individuellen Verdopplungszeiten tritt ein Verfall im Grad der Synchronisation auf, sobald die folgende Verdopplungsphase durchlaufen wird. Es gibt unterschiedliche Formen der Synchronisation. Sie lassen sich in die physikalischen und die chemischen Methoden unterteilen.

#### Physikalische Synchronisation

- Selektion nach Mitosestadium  
Säugetierzellen, die in Monolayerkulturen wachsen, runden sich in der Mitose ab, haften deshalb nicht mehr so gut an der Wachstumsfläche und können dadurch leicht von den anderen durch Klopfen gegen die Kulturflasche getrennt werden.
- Sortieren nach Volumen mithilfe der Durchflusszytometrie.

#### Chemische Synchronisation

Arretierung der Zellen in einer Zellzyklusphase mit anschließender Aufhebung der Blockade. Diese wird mit bestimmten Wirkstoffen (z.B. Colchicin) erreicht (Nias 1998).

### 2.3 Untersuchungsmethoden

Da die Mechanismen des Zelltodes sowohl von zelltypspezifischen Eigenschaften als auch von der Höhe der Strahlendosis abhängig sind, ist für eine genaue Aussage die parallele Betrachtung mehrerer Parameter nötig. Diese stellen Indikatoren für die verschiedenen Arten des Zelltodes dar. Nur so kann eine individuelle Aussage über den Gesamtumfang des induzierten Zelltodes gemacht werden (Belka et al. 2003).

Folgende Untersuchungsmethoden dienen zur Erfassung von Parametern für den Zelltod, aber auch zur Zellzyklusbestimmung.

### 2.3.1 MAA-Assay

Der MAA-Assay ist eine fluoreszenzmikroskopische Methode, basierend auf Änderungen der Kernmorphologie. MAA berücksichtigt MN-haltige, apoptotische und abnormale Zellen (beinhaltet z.B. Mitosestörungen und nekrotische Zellen) (Stäßen 2001). Betrachtet man diese Formen des Zelltodes im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Zellen, kann eine umgekehrte Korrelation mit der Klonogenität gezeigt werden. Diese zelltypunabhängige Korrelation kann nur gezeigt werden, wenn unterschiedliche Formen des Zelltodes mit einbezogen werden. Ein Wechsel von einer Zelltodesform zu einer anderen (z.B. Apoptose zu Mitosestörung oder Mikrokernbildung zu Apoptose) kann mit einer Erhöhung der Intensität des Stressors gefunden werden (Port et al. 2005).

Es kann eine Korrelation zwischen diesen Zelltodesformen und der Strahlungsdosis hergestellt werden. Diese Methode ist für die Diagnostik von Strahlenschäden geeignet. Zur Frühdiagnostik, also innerhalb von drei Tagen nach Bestrahlung, kann der Test nicht herangezogen werden, da die Daten erst nach ein bis zwei Wochen zur Verfügung stehen und Mehrfachmessungen durchgeführt werden müssen (Stäßen 2001).

### 2.3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie kann in weiten Teilen der molekularen Radiobiologie eingesetzt werden:

- Untersuchung von Mikrokernen in Zellen (Zang et al. 1999, Heddle 1991, Nüsse et al. 1984).
- Bestimmung von apoptotischen Zellen (Nias 1998, Endresen et al. 2005), durch Sub-G<sub>1</sub> Peak, Phosphatidylnachweis auf der äußeren Zellmembran oder DNA-Fragmentnachweis (Nias 1998).
- Beurteilung der Position der Zellen im Zellzyklus (Endresen et al. 2005).

#### Prinzip der Durchflusszytometrie

Vereinzelt in Suspension befindliche Zellen werden in das Durchflusszytometer gestellt und durch Erzeugung eines Unterdrucks angesaugt. Durch eine dünne Kapillare werden die Zellen nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigespült. Das

Laserlicht regt die Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. angefärbter Zellkerne) zur Fluoreszenz an. Das emittierte Licht wird von einer Sammellinse gesammelt und an ein optisches System von Spiegeln und Filtern weitergegeben, welche die Lichtsignale an entsprechende optische Detektoren weiterleiten. Diese Detektoren wandeln die optischen Signale in elektronische Signale in Form von Spannungsimpulsen um, welche wiederum an einen Computer zur Analyse weitergeleitet werden. Der Computer verarbeitet die Daten weiter. Die Daten werden dann, je nach gewählter Einstellung des Programms, in Häufigkeitsverteilungen oder „dot plots“ dargestellt (BD Biosciences 1999). Aus diesen „dot plots“ können Histogramme erstellt werden, aus denen wiederum, z.B. bei der BrdU-DNA-Doppelmarkierung die Zellzyklusphasen abgelesen werden können. Dies wird auch im Material- und Methodenteil nochmals dargestellt (Kap. 3.9).

### **2.3.3 Genexpressionsarray und Datenanalyse**

Nach Strahlenexposition kann mit Hilfe des Genexpressionsarrays ein Screening nach differentiell exprimierten Genen durchgeführt werden.

Der Genexpressionsarray erfasst die Kopienanzahl der messenger-RNA (mRNA). Die mRNA ist die Abschrift der DNA und bringt die genetische Information des Kerns zu den Ribosomen im Zytoplasma, wo wiederum die Proteinsynthese stattfindet. (Lockart et al. 2000, Nias 1998). Zur Proteinsynthese werden die Aminosäuren mit Hilfe der transfer-RNA (tRNA) nach Vorgaben der mRNA als Schablone (Template) zusammengebaut. Diese Vorgänge geschehen kontinuierlich; deswegen besteht während des gesamten Zellzyklus ein Bedarf an mRNA (Nias 1998). Somit liefert das Profil der RNA-Expression ein Bild von dem Status einer Zelle, welches vermutlich, wenn auch indirekt, den funktionellen Status von allen Proteinen reflektiert (Young 2000, Misteli 2001). Eine typische Säugetierzelle beinhaltet 10-30 pg Gesamt-RNA. Ein Großteil davon ist rRNA und tRNA. Der Anteil der mRNA liegt bei 1-5 % der Gesamt-RNA, abhängig vom Zelltyp und ihrem physiologischen Stand der Zelle (Lashkari et al. 1999).

Unterschiede in der Genexpression sind verantwortlich für morphologische und phänotypische Unterschiede. Ebenso weisen sie auch auf zelluläre Antworten auf umweltbedingte Stimuli und Störungen hin. Im Gegensatz zum Genom sind die

Transkriptome höchst dynamisch und ändern sich sehr schnell (Lockart et al. 2000). Seitdem es die Array-Technologie gibt, können die Veränderungen der Genexpression umfassend untersucht werden. Genexpressionsanalysen wurden für viele Gewebe und vor allem Tumore entwickelt (Port et al. 2005). Diese Methode erlaubt die Untersuchung von mehreren tausend Genen gleichzeitig. Es existieren cDNA-Mikroarrays von 5.000 oder mehr Genen (Wang et al. 1999, Pollack et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden 11.835 Gene gleichzeitig untersucht. Unter diesen Genen befanden sich neun Haushaltsgene („housekeeping genes“) wie beispielsweise Ubiquitin. Bei diesen Genen handelt es sich um Gene, deren Genprodukte ständig benötigt werden. Deshalb werden sie in fast allen Zellen des Organismus auf fast gleich bleibendem Niveau exprimiert. Die anderen Gene sind solche, deren Transkripten Schlüsselrollen in verschiedenen biologischen Prozessen zugeschrieben werden.

Genexpressionsarrays sind eine semiquantitative Methode. Deshalb müssen die Ergebnisse noch mit einer quantitativen Methode wie der RTQ-PCR untersucht und validiert werden (Port et al. 2005). In einer Arbeit wurden kürzlich semiquantitative Messungen der differentiellen Genexpression mit quantitativen Messungen der differentiellen Genexpression unter Nutzung der RTQ-PCR verglichen. In 94 % der Fälle stimmten die Bestimmungen über Mikroarray über die Hoch- oder Herunterregulation der bestimmten Gene mit denen der RTQ-PCR überein (Port et al. 2005).

Um die Ergebnisse der Mikroarrays miteinander vergleichen zu können, müssen die Werte normalisiert werden. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten. Die Normalisierung der Daten kann mithilfe von Ubiquitin oder mittels der einzelnen Daten gegen die Gesamtgenexpression erfolgen (Rhee et al. 1999, Staßen 2001, Port et al. 2005). In einem Versuch wurden jedoch Schwankungen bei der Ubiquitin-Normalisierung festgestellt. Bei diesem wurde eine Abhängigkeit von Schwankungen in den Zellkulturbedingungen vermutet. Diese Aussage konnte jedoch nicht bestätigt werden (Staßen 2001). In einer Arbeit wurde gezeigt, dass mit beiden Verfahren gleiche Ergebnisse erzielt werden konnten (Staßen et al. 2003).

### Prinzip des BD Atlas™ Plastic Human 12K Microarrays

Die Gesamt-RNA wird mit Hilfe eines kommerziellen, auf Silica-Basis beruhenden Kits isoliert. Anschließend wird aus dieser die mRNA mit Hilfe von „magnetic beads“ separiert. Danach erfolgt durch Zugabe eines speziellen Primercocktails und weiterer Reagenzien die Synthese einer copy-DNA (cDNA), die komplementär zur mRNA ist. Bei diesem Vorgang werden Nukleotide eingebaut, die mit  $^{33}\text{P}$  versehen sind. Diese radioaktiv markierte cDNA wird nun auf eine vom Hersteller vorgefertigte Plastikmembran hybridisiert. Auf dieser Membran befinden sich immobilisierte cDNA-Fragmente der Gene. Die Zuordnung der Gene ist aus den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Jeder Auftragungsort der cDNA ist durch ein Koordinatensystem eindeutig gekennzeichnet. Die radioaktiv gekennzeichneten cDNA-Proben werden mit den auf die Membran immobilisierten komplementären cDNA-Spezies hybridisiert und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Hierbei entstehen je nach Anzahl der Kopien punktförmige Schwärzungen unterschiedlicher Größe und Intensität. Diese korrelieren linear mit der Anzahl der entsprechenden mRNA-Spezies der Proben. Sowohl auf dem hier verwendeten Atlas Array, wie auch auf den anderen Membran der Atlas Array-Systeme befinden sich je 9 „housekeeping genes“ an bestimmten Positionen. Sie dienen als Kontrolle, ob die Hybridisierung auch gleichmäßig und erfolgreich abgelaufen ist. Mit Hilfe der Atlas Imager 2.7 Software (Clontech) könnten die Schwärzungen in Grauwerte konvertiert und mittels des Koordinatensystems bestimmten Genen zugeordnet werden. Nach Normalisierung können zwei Membranen, auf denen unbestrahlte und korrespondierende bestrahlte Proben hybridisiert wurden, miteinander verglichen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Reagenzien und ihre Bezugsquellen

- (Alpha 33P) dATP, Fa. Hartmann Analytic, Braunschweig, D
- Albumin Bovine, Art. Nr. A3059, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Anti-BrdU (Bromdesoxyuridin) Pure, Art. Nr. 347580, Fa. Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- Agarose Typ I-A, Low EOO, Art. Nr. A0169, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- BD Atlas <sup>TM</sup> Plastic Human 12K Microarray, Art. Nr. 634811, Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D
- BD Atlas Pure Total RNA Labeling System, Art. Nr. 634562, Fa. Biosciences Clontech, Heidelberg, D
- BrdU (5-Bromo-2-desoxyuridine) 250 mg, Art. Nr. 15240.01, Fa. Serva, Heidelberg, D
- DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol), Art. Nr. 18860, Fa. Serva, Heidelberg, D
- DMEM, Art. Nr. 31966-021, Fa. GIBCO, Karlsruhe, D
- DNA-Längenstandard (1kb), Art. Nr. 15615-024, Fa. GIBCO, Karlsruhe, D
- Ethanol für Molekularbiologie, Art. Nr. 1.08543.0250, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Ethanol unvergällt, Art. Nr. 1.00986.2500, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Ethidium bromid Aqueous solution for molecular biology, E1510, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- FACSSFlow<sup>TM</sup> 20 I, Art. Nr. 342003, Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D
- Foetal Calf Serum Gold 500 ml, Art. Nr. A15-649, Fa. PAA Laboratories GmbH Pasching, A
- HotStarTaq Master Mix Kit, Art. Nr. 203443, Fa. Qiagen, Hilden, D
- 2-Mercaptoethanol, Art. Nr. 8.05740.0250, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Maus-Anti-Immunglobulin (Kaninchen) FITC-konjugiert, Art. Nr. F0261, Fa. DAKO, Hamburg, D
- Natriumchlorid, Art. Nr. 1.06404.5000, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Natriumhydrogencarbonat, Art. Nr. 1.06329.0500, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Nichtessentielle Aminosäure (MEM), Art. Nr. 11140-035, Fa. GIBCO, Karlsruhe, D

- PBS (phosphate buffered saline) ohne Kalzium und Magnesium, Art. Nr. 1000-3, Fa. Sigma, St. Louis, MO USA
- Pepsin 70FIP U7g, Art. Nr. 7180, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Propidiumjodid, Art. Nr. 110.50, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Human  $\beta$ -Aktin Primerset, Laboratorium für Molekulare Biologie AG Dr. Arnold, München, D
- Ribonuclease A 100 g, Art. Nr. R-5125, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- RNeasy<sup>®</sup> MiniKit (250), Art. Nr. 74106, Fa. Qiagen, Hilden, D
- RNase-Free DNase Set, Art. Nr. 79254, Fa. Qiagen, Hilden, D
- RNase Contamination Removal Fluid, Art. Nr. 724000, Fa. Biohit, Helsinki, FIN
- Salzsäure rauchend 37%, Art. Nr. 1.13386.2500, Fa. Merck, Darmstadt, D
- SDS (Sodiumdodecylsulfate), Art. Nr. L4390, Fa. Sigma, Deisenhofen, D
- Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint eco plus, Art. Nr. 0016.2, Fa. Roth, Karlsruhe, D
- TAE Easy Sol (EDTA) 50x Buffer, Art. Nr. TAE50x01, Qbiogene, Heidelberg, D
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (zur Analyse) 500 g, Art. Nr. 1.06448.0500, Fa. Merck, Darmstadt, D
- Trypsin-EDTA Lösung 100 ml, Art. Nr. 25300-054, Fa. GIBCO, Karlsruhe, D

### 3.2 Geräte und Labormaterialien

- Dosimeter, PTW, Freiburg, D
- Durchflusszytometer FACSCalibur, Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D
- Elektrophoresekammer GNA 100 mit Stromversorger 2301 Macrodrive 1, Fa. LKB Produkter AB, Bromma, S
- FALCON Pipetten, Fa. Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
  - 1 ml Art. Nr. 35 6521
  - 2 ml Art. Nr. 35 6507
  - 5 ml Art. Nr. 35 6543
  - 10 ml Art. Nr. 35 7551
  - 25 ml Art. Nr. 35 6543

- FALCON Kulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>, Art. Nr. 35 3110 , Fa. Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
- FALCON Röhrchen 15 ml, Art. Nr. 352096, Fa. Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, F
- FALCON Röhrchen 50 ml, Art. Nr. 35 2070, Fa. Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, F
- Filmkassette, Fa. BioRad, München, D
- Fluoreszenzmikroskop DMRB, Fa. Leica, Heidelberg, D
- Hybridisierungsöfen: Heraeus Heraehybrid 12 mit Zubehör, Fa. Kendro, Hanau, D
- Imaging Screen K, Art. Nr. 1707842, Fa. BioRad, München, D
- Invertoskop Labovert Typ 520572, Fa. Leitz, Wetzlar, D
- Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf, Hamburg, D
- Molecular-Imager<sup>®</sup>FX (Phosphorimager), Fa. BioRad, München, D
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Fa. Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
- Geldokumentationsgerät, Fa. peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
- Röntgenröhre, Isovolt E20/10-1, Fa. Seifert, Ahrensburg, D
- Schüttelwasserbad, Köttermann Labortechnik, Fa. Köttermann GmbH und CoKG, Uetzel Häusingen, D
- Screen Eraser-K (Phosphorimager, Schirm), Fa. BioRad, München, D
- Szintillationsgefäße, Art. Nr. 0794.1, Fa. Roth, Karlsruhe, D
- Szintillationsmessgerät: LS 6500 Multi Program Scintillation Counter, Fa. Beckmann Coulter, Krefeld, D
- Thermomixer Modell 5436 und Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Köln, D
- Thermostat Typ 5320, Fa. Eppendorf, Köln, D
- Vecta Shield, Art. Nr. H-1000, Fa. Alexis, Grünberg, D
- Zentrifuge Labofuge 400R Heraeus Instruments, Fa. Hettich, Tuttlingen, D
- Zentrifuge Modell 2 K15, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Harz, D
- Zentrifuge Modell 5415 C, Fa. Eppendorf, Köln, D
- Zentrifuge Rotanta/RP Typ 4300, Fa. Hettich, Tuttlingen, D
- Zytozentrifuge: Shandon Cytospin 3, Fa. Life Sciences International, Astmoor, GB

### 3.3 Verwendete Lösungen

#### *Durchflusszytometrie*

##### **BrdU-Stammlösung (1 mM)**

30,71 mg BrdU werden in 100 ml PBS gelöst, portioniert und bei -20°C eingefroren.

##### **BrdU-Gebrauchslösung**

Stammlösung (1 mM) wird 1:100 verdünnt. Die Endkonzentration in der Kultur soll 10 uM betragen, somit werden zu einer 5 ml Kultur 50 µl Stammlösung gegeben.

##### **Farbstofflösung Propidiumiodid**

50 mg Propidiumiodid ad 500 ml PBS

In brauner Flasche und lichtgeschützt bei 4°C lagern.

##### **HCL 1N**

82,8 ml 37 % HCl ad 1 l aqua dest.

##### **Kaninchen-anti-Maus IgG, FITC-konjugiert**

Verdünnung 1:50 in PBSA

Pro Probe: 4 µl Kaninchen-anti-Maus IgG zu 196 µl PBSA

##### **Maus-anti-BrdU**

Verdünnung 1:10

Pro Probe: 20 µl Maus-anti-BrdU zu 180 µl PBSA geben.

##### **(1x) PBS**

1 Päckchen PBS ad 1.000 ml aqua dest.

##### **Pepsinlösung 0,5 % (zum Lysieren der Zellen)**

0,5 g Pepsin (70u/g) in 95 ml aqua dest. lösen und 5 ml 1 N HCl dazugeben.

Bei 4°C maximal 1 Woche haltbar.

**PBSA 1 %**

1 g Albumin, Rinder ad 100 ml PBS

**RNase Stammlösung 1 mg/ml (0,1 %)**

Es werden 100 mg Ribonuklease A in 100 ml PBS gelöst in 2 ml Eppendorfgefäße portioniert und bei -20°C eingefroren.

**RNase Lösung (0,01 %)**

Verdünnung der Stammlösung 1:10

Zu 1 ml RNase Stammlösung werden 9 ml PBS gegeben

Es werden 2 ml pro Probe benötigt

***RNA-Isolation und Mikroarray*****TAE-Puffer**

0,5x TAE- Puffer aus 10 ml 50xTAE- Puffer-Konzentrat ad 990 ml aqua dest.

**1%iges Agarosegel**

1 g Agarose ad 100 ml 0,5 x TAE-Puffer, Agarosepulver unter Erhitzen lösen, Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung 1 %ig (10 mg/ml)

**DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)-Stammlösung**

gelöst in einer Konzentration von 100 µg/ml aqua dest.; Gebrauchslösung: 1 µg/ml

**20 % SDS**

100 g SDS ad 500 ml aqua dest. bei 65°C bis sich das Salz aufgelöst hat.

**20 x SSC**

175,3 g NaCl

88,2 g Na<sub>3</sub>Citrat x 2H<sub>2</sub>O

ad 1.000 ml aqua dest., pH = 7,0

- **“High Salt Wash” Lösung (Atlas Array)**  
80 ml 20x SSC (= 2x SSC)  
4 ml 20 % SDS (= 0,1 % SDS)  
ad 716 ml aqua dest.
- **“Low Salt Wash” Lösung 1 (Atlas Array)**  
1 ml 20 x SSC  
1 ml 20 % SDS (= 0,1 % SDS)  
ad 198 ml aqua dest.
- **“Low Salt Wash” Lösung 2 (Atlas Array)**  
1 ml 20 x SSC (= 0,1x SSC)  
ad 199 ml aqua dest.
- **“Stripping”-Lösung**  
5,3 g (0,1 M)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ / 500 ml aqua dest.  
Auf 80°C zum Lösen erwärmen.

### **3.4 Zellen und Zellkulturbedingungen**

Die Untersuchungen wurden an der Zelllinie A549 durchgeführt. In diesem Fall handelte es sich um adhärent wachsende humane Lungenkarzinomzellen. Diese wurden einmal in der Woche mit dem Medium DMEM passagiert, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % nichtessentiellen Aminosäuren angereichert wurde. Vor Gebrauch wurde das Medium auf 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung erfolgte ohne Antibiotikazusatz bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 10 %.

### **3.5 Röntgenbestrahlung**

Bei der Röntgenröhre handelte es sich um das Modell Isovolt E20/10-1 (Fa. Seifert, Ahrensburg, D). Der Abstand der Röhre zur Kulturflasche betrug ca. 40 cm, die Dosisleistung war ca. 1 Gy/min.; dabei wurde ein Röhrenstrom von 13 mA bei 240 kV verwendet.

Die Einhaltung der Dosis wurde durch ein mit Hilfe eines Sr-90-Referenzstrahlers geeichtes Dosimeter (PTW-SN4, Fa. PTW, Freiburg) überwacht.

Damit sich die Zellen bei der Bestrahlung in der S-Phase befanden, wurden sie 24 Stunden nach dem Ansetzen bei Raumtemperatur bestrahlt. Um gleiche Bedingungen für die Kontroll-Kulturflaschen (0 Gy) zu schaffen, wurden diese während der Bestrahlungszeit ebenfalls aus dem Brutschrank genommen.

### **3.6 Wachstumskurve**

Die Wachstumskurve wurde aus den Zellzahlen erstellt, die in drei unabhängigen Versuchen ermittelt wurden. Zuerst wurden die A549 Zellen synchronisiert. Das bedeutet, dass in zwei Kulturflaschen 10 ml Zellsuspension mit je  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium ausgesät und sofort in den Brutschrank gelegt wurden. Die Zellen ließ man nun für 120 h wachsen. In dieser Zeit bildete sich ein so dichter Zellrasen, dass die Zellen die Proliferation einstellten und zum großen Teil in der G<sub>0</sub>-Phase verharrten.

Nach 120 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dann zuerst mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und anschließend abtrypsiniert. Dazu wurden 3 ml Trypsin-EDTA (Trypsin-EDTA Lösung 100 ml, GIBCO) in die Kulturflasche zugegeben. Diese wurde anschließend wieder in den Brutschrank gestellt. Die Morphologie und die Adhäsivität wurden nach 3 bis 4 min. unter dem Mikroskop (Invertoskop Labovert Typ 520572, Leitz) kontrolliert. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurde das Trypsin-EDTA mit 5-10 ml DMEM-Medium inaktiviert. Anschließend wurde aus einem abgenommenen Aliquot die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellsuspension dann, durch Zugabe einer entsprechenden Menge Mediums, auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden nun auf 21 Kulturflaschen aufgeteilt. Dazu wurden in jede Kulturflasche 10 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium gegeben. Die fertigen Kulturflaschen wurden sofort wieder in den Brutschrank gelegt.

24 Stunden nach dem Aussäen wurde von einer Kulturflasche die Zellzahl direkt bestimmt; je drei der restlichen Flaschen wurden mit 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 8 Gy, gemäß der in Kapitel 3.5 beschriebenen Vorgehensweise, bestrahlt.

Die Zellzahlen wurden nun nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h p.r. ermittelt, wobei pro Untersuchungszeitpunkt je eine der mit 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy und 8 Gy bestrahlten Kulturflaschen ausgewertet wurde. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und später der abtrypsinierten Zellsuspension wieder zugegeben. Dadurch sollten auch die frei im Medium schwimmenden Zellen erfasst werden. Anschließend wurden die Zellen, wie oben beschrieben, mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen, abtrypsiniert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Danach wurde die Kulturflasche mit kaltem Medium ausgespült, um auch die restlichen Zellen aufzunehmen. Diese drei Zellsuspensionen wurden anschließend wieder zusammengeführt.

Für die Zellzählung wurde die Zellsuspension mit 1.200 U (Umdrehungen) für 5 min. bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Rotanta/RP Typ 4300) und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in 10 ml frischem DMEM-Medium aufgeschüttelt. Sobald die Zellen vereinzelt waren, erfolgte die Auszählung in der Neubauer Zählkammer.

Um das Zellwachstum graphisch darzustellen wurden die aus den drei Versuchen ermittelten Zellzahlen pro ml gegen die Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Für jede

Dosis und Zeiteinheit wurde eine Wachstumskurve erstellt. Zur Berechnung der Zellverdopplungszeiten zog man nur die Zeitspanne zwischen 24 h und 72 h p.r. heran, da sich hier die Zellen im exponentiellen Wachstum befanden. Dazu wurde zwischen den eben genannten Zeitpunkten eine Regressionsgerade erster Ordnung gelegt und diese zur Auswertung der Zellverdopplungszeiten herangezogen, indem die zur Verdopplung benötigte Zeit daran abgelesen wurde. Aus den für jeden Versuch errechneten Verdopplungszeiten wurde aus den drei Versuchen ein Mittelwert gebildet und der Standardfehler (SEM = standard error of mean) bestimmt. In dieser Arbeit wurden alle ermittelten Werte durchgehend mit SEM angegeben, solange nichts anderes angegeben wurde.

### 3.7 Vitalitätstest

Die A549-Zellen wurden zur Bestimmung der Vitalität synchronisiert und in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml ausgesät. Nach einer Ruhephase von 24 h wurden die Zellen, wie in Kap. 3.5 beschrieben, mit 0 Gy und 5 Gy bestrahlt.

Zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA abtrypsiniert und in ein Falcon-Röhrchen gegeben, das Trypsin-EDTA wurde durch Zugabe von 5 bis 10 ml DMEM-Medium inaktiviert. Es wurde nun die Vitalität überprüft und eine Zellzählung durchgeführt (siehe Kap. 3.6). Zur Überprüfung der Vitalität wurden 30  $\mu$ l der Zellsuspension zusammen mit dem gleichen Volumen DAPI (Gebrauchskonzentration: 1  $\mu$ g/ml) auf einen Objektträger gegeben und eingedeckelt. Der Anteil der blau fluoreszierenden, toten Zellen wurde mithilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (DMRB) bestimmt. Zur Auswertung wurden 100 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz der lebenden Zellen angegeben.

### 3.8 MAA-Assay

Der MAA-Assay wurde dazu verwendet, die maximale Frequenz mikrokernhaltiger (MN), apoptotischer und abnormaler Zellen (d.h. multinukleärer Zellen, Riesenzellen, Schattenzellen und Zellen mit pulverisiertem Zellkern) in einem Zytopräparat zu bestimmen.

Die A549-Zellen wurden auch in diesem Versuchsansatz wieder synchronisiert und in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml ausgesät.

Nach einer Ruhephase von 24 h wurden die Zellen, wie in Kap. 3.5 beschrieben, mit 0 Gy und 5 Gy bestrahlt.

Zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA abtrypsiniert, in ein Falcon-Röhrchen gegeben und das Trypsin-EDTA wurde durch Zugabe von 5 bis 10 ml DMEM-Medium inaktiviert.

Für den MAA-Assay wurde das Trypsin-Medium-Gemisch mit 1.000 U/min bei RT für 5 min. (Modell 2K15) abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 5 ml PBS aufgeschüttelt. Mithilfe des PBS wurde das restliche Medium ausgewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit den gleichen Einstellungen und ein erneutes Abdekantieren des Überstandes. Das Pellet wurde im restlichen PBS resuspendiert. Um der Erzeugung von Artefakten bei der Zytozentrifugation vorzubeugen, bzw. das Risiko zu minimieren, wurde eine Vorfixation mit 70 %igem Ethanol durchgeführt. Dafür wurden 5 ml Ethanol zu dem aufgeschüttelten Zellpellet gegeben, das man für 5 min. bei Raumtemperatur (RT) einwirken ließ.

Mithilfe der Zytozentrifuge (Shandon Cytospin 3) wurde nun aus 100 µl alkoholischer Zellsuspension ein Zytopräparat erstellt, indem für 5 min. bei 1.000 U und RT zentrifugiert wurde. Sobald die Zellen auf dem Objektträger getrocknet waren, wurden sie mit einer Ethidiumbromid-Lösung (Verdünnung 1:10.000) und anschließend noch mit einer DAPI-Lösung gefärbt. Sobald der Objektträger trocken war, folgte das Eindeckeln. Es wurde das Eindeckelmittel Vecta Shield auf den Objektträger gegeben und zum Schluss wurde ein Deckglas aufgelegt.

Nun wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (DMRB) auf folgende morphologische Veränderungen hin untersucht; diese wurden anschließend graphisch dargestellt.

### 1. Mikrokerne (MN)

MN lagen als kleine, runde, blaue Strukturen getrennt vom Zellkern innerhalb des vom Ethidiumbromid rot angefärbten Zytoplasmas. Sie beinhalteten kondensierte DNA, weswegen sie durch das DAPI blau angefärbt wurden. Man musste jedoch sicherstellen, dass es sich nicht um eine Ausstülpung von Kernmaterial ohne vollständige Separation vom Kern (Protrusion) handelte, was manchmal schwer zu beurteilen war. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden 1.000 Zellen ausgezählt.

### 2. Apoptose

Für die Apoptose sind die runden DNA-Kondensationen charakteristisch. Auch hier wurden pro Untersuchungszeitpunkt 1.000 Zellen ausgezählt.

### 3. Abnormale Zellen

Zu den abnormalen Zellen zählen die multinukleären Zellen, die Riesenzellen, die Schattenzellen und die Zellen mit pulverisiertem Zellkern (siehe Stand des Wissens Kap. 2.1.3). Es wurden pro Untersuchungszeitpunkt und Strahlendosis 1.000 Zellen beurteilt.

## 3.9 BrdU-DNA-Doppelmarkierung

Die Bestimmung der Zellzykluskinetik wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Mit diesem Verfahren konnte für eine große Zellzahl in kurzer Zeit die Position der Zellen im Zellzyklus bestimmt werden. Die verwendeten Parameter waren der DNA-Gehalt pro Zelle und der Einbau des Thymin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA während der DNA-Replikation. Beide Parameter wurden mithilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (PI) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gemessen.

Die Menge der DNA wurde mit Hilfe des Farbstoffes PI bestimmt. Die Menge des interkalierenden Farbstoffes PI war proportional der DNA-Menge. Bei Anregung des PI durch Licht geeigneter Wellenlänge war die Intensität der emittierten Fluoreszenz zu der PI-Menge und damit auch der DNA-Menge im Zellkern proportional. Mithilfe des erhaltenen Häufigkeits-Spektrums ließ sich eine genaue Aussage über die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen treffen.

Um die Zellen für die Zweiparameter-Messung am Durchflusszytometer vorzubereiten, mussten die Zellen mit BrdU markiert werden. Zu diesem Zweck wurde den Zellen über einen bestimmten Zeitraum (10 min.) BrdU im Kulturmedium angeboten. Die in der S-Phase befindlichen Zellen bauten dann statt Thymidin das damit konkurrierende BrdU in die DNA ein.

Anschließend wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne isoliert, indem das Zytoplasma durch Pepsininkubation verdaut wurde, und die DNA wurde durch Inkubation in HCl denaturiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. An das in die DNA eingebaute BrdU wurde ein monoklonaler Antikörper gebunden, dessen Nachweis wiederum durch einen zweiten, FITC-konjugierten Antikörper erfolgte. Als zweiter Parameter wurde dann eine Gegenfärbung der gesamten DNA des Zellkerns mit PI vorgenommen (siehe oben).

Die Fluoreszenzintensitäten wurden dann im Durchflusszytometer gemessen und beide Parameter in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Den so entstehenden Punktwolken (dot plots) konnten nun die Zellzyklusphasen zugeordnet werden.

### 3.9.1 Versuchsansatz

Für die Durchflusszytometrie wurden pro Dosis und Zeitwert  $1 \times 10^6$  Zellen der A549 synchronisiert angezüchtet. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Zur Synchronisation wurden in drei 75 cm<sup>2</sup> - Kulturflaschen 10 ml Zellsuspension, mit je  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium, ausgesät und sofort in den Brutschrank gelegt (120 h). Nach dieser Zeitspanne (Zellen in G<sub>0</sub>-Phase) wurden zur Überprüfung der Zellen auf ihre Position im Zellzyklus direkt in eine Kulturflasche der drei Kulturflaschen 100 µl BrdU-Stammlösung gegeben und für 10 min. inkubiert. Dann wurde das BrdU-enhaltende Medium entnommen und die Zellen wurden zweimal mit 10 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen. Abschließend wurden die Zellen abtrypsiniert und in ein Röhrchen überführt, die Trypsin-Reaktion wurde mit Medium gestoppt und die Zellsuspension bei 1.200 U/min bei RT 5 min. zentrifugiert (Rotanta/RP Typ 4300). Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet aufgeschüttelt. Anschließend wurden tropfenweise 3 ml eiskaltes 80 %iges Ethanol hinzugefügt und die

Zellsuspension für mindestens 1 h bei 4°C fixiert. Dann konnten die Zellen entweder gleich weiterverarbeitet werden oder wurden bei -20°C zwischengelagert.

Bei den anderen beiden der ursprünglich drei Kulturflaschen wurde nach 120 h (Zellen in G<sub>0</sub>-Phase) eine Zellzählung durchgeführt. Die Zellen daraus wurden in 24 frische Kulturflaschen mit je 1x10<sup>6</sup> Zellen in je 10 ml Medium umgesetzt. Diese Kulturflaschen wurden nach 24 h bestrahlt, da sich die Zellen dann in der S-Phase befanden; es wurden je 6 Flaschen mit 0 Gy, 2 Gy, 5 Gy bzw. 8 Gy bestrahlt.

Sofort anschließend wurde zu allen 24 Kulturflaschen je 100 µl BrdU-Stammlösung gegeben und für 10 min. inkubiert. Dann wurde das BrdU-enthaltende Medium entnommen und die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Von jeder Strahlendosis wurde je eine Flasche, wie oben beschrieben, abtrypsinisiert und in Alkohol fixiert. Die anderen 18 Kulturflaschen wurden mit 10 ml Medium aufgefüllt und im Brutschrank weiter kultiviert.

Nach 8 h, 12 h, 24 h, 32 h und 48 h wurden die Zellen abtrypsinisiert und in Alkohol fixiert. Die Zellen wurden so lange bei -20°C gelagert, bis alle Zeitwerte abgenommen worden waren. Dann wurden alle Zellen zusammen aufgearbeitet.

Zur Aufarbeitung wurden die Zellsuspensionen bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. (Rotanta/RP Typ 4300) zentrifugiert, der Alkohol wurde abdekantiert und das Pellet mit PBS auf ein Volumen von 4 ml in dem Zentrifugenröhrchen aufgefüllt. Anschließend wurde wieder bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. zentrifugiert (Rotanta/RP Typ 4300), der Überstand abdekantiert und das Pellet resuspendiert. Nun wurden 2 ml RNase-Lösung hinzugegeben und anschließend für 10 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte wieder eine Zentrifugation bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min.

Zur Auflösung der Zellmembran und Freilegung des Zellkerns wurden nun 2 ml kalte Pepsinlösung hinzupipettiert, 10 min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen zum Stoppen der Reaktion für 5 min. ins Eiswasserbad gestellt. Daraufhin wurden 3 ml eiskalte PBS-Lösung hinzupipettiert, bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet resuspendiert.

Zur Denaturierung der DNA wurden 2 ml 2 N HCl hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert. Um den pH-Wert wieder auszugleichen und die Salzsäure auszuwaschen, wurden 3 ml PBS hinzupipettiert, das Zentrifugenröhrchen wurde für eine gleichmäßige Suspension der Zellkerne

geschüttelt, bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. lang zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet resuspendiert. Dieser Vorgang wurde nochmals mit 4 ml PBS wiederholt.

Anschließend wurden 4 ml PBSA hinzugegeben, geschüttelt und bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. zentrifugiert; der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet resuspendiert. Das Albumin sollte unspezifische Antikörperbindungen verhindern, indem es sich auf die Bindestellen für die Antikörper legte, sich aber von den spezifischen Antikörpern verdrängen ließ.

Zur Markierung des BrdU wurden dann 200 µl anti-BrdU Antikörper-Lösung hinzupipettiert und bei 30 min. RT inkubiert. Die Antikörper banden an das anstelle von Thymidin in die DNA eingebaute BrdU. Dann wurde wieder bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet resuspendiert.

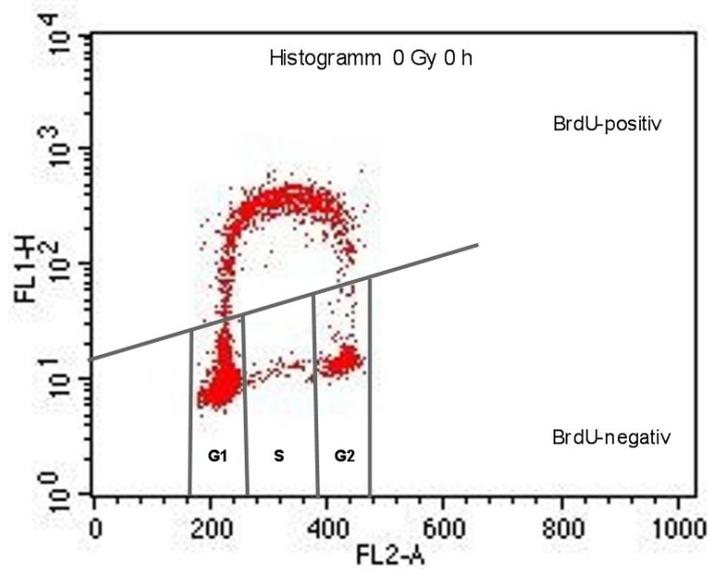
Darauf folgte die Zugabe des Kaninchen-Anti-Maus IgG Antikörpers, welcher FITC-konjugiert und 1:50 in PBSA verdünnt war. Dieser Sekundärantikörper konnte nun an den anti-BrdU-Antikörper anheften. Die Inkubation erfolgte für 30 min., um dem Antikörper genug Zeit zum Auffinden seiner Andockstellen zu geben, und wurde im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs (Fading) zu verhindern. Nach der Inkubation wurde die Lösung wieder bei 1.200 U/min, 4°C, 8 min. abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet aufgeschüttelt.

Es wurden 500 µl Färbelösung hinzugegeben und das Reaktionsröhrchen geschüttelt. Bei der Färbelösung handelte es sich um eine PI-Stammlösung, welche 1:1 mit PBS verdünnt wurde und 0,01% RNase enthielt. Die Färbelösung wurde, genau wie bei den Schritten davor, abzentrifugiert und abdekantiert und das Pellet nun in 250 µl derselben Färbelösung wieder aufgenommen. Bei Raumtemperatur wurde nun wieder für 30 min. im Dunkeln inkubiert.

### **3.9.2 Zweiparameter-Messung am Durchflusszytometer**

Die Proben wurden mit dem Durchflusszytometer (FACScalibur) gemessen. Die Daten wurden anschließend vom Computer verarbeitet und dann je nach gewählter Einstellung in Häufigkeitsverteilungen oder „dot plots“ gezeigt. Bei den vorliegenden Messungen wurden zwei Signale berücksichtigt, daher der Name „Zweiparameter-Messung“. Bei einem handelte es sich um das Signal für den Gesamt-DNA-Gehalt

(PI-Fluoreszenz), bei dem zweiten um das Signal für BrdU-positive DNA. Die Messwerte wurden in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Einzelne Punktwolken konnten nun den Zellzyklus-Phasen zugeordnet und somit eine Aussage getroffen werden, wie viele Zellen sich in den einzelnen Zellzyklus-Phasen befanden, bzw. welche Phasen schon passiert worden waren (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1** Histogramm von Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen bei 0 Gy und 0 h. Auf der oberen Hälfte der y-Achse ist die Zahl der BrdU positiven, auf der unteren Hälfte der y-Achse die Zahl der BrdU negativen Signale abzulesen. Auf der x-Achse ist der DNA-Gehalt pro Zelle und damit die Zellzyklusphase aufgetragen.

### 3.10 Genexpressionsarray

Das Screening der Genexpression der A549 Zellen wurde mit dem kommerziell erhältlichen BD Atlas™ Plastic Human 12K Microarray durchgeführt. Dieser Mikroarray erlaubt es 11.835 Gene gleichzeitig in einer Probe zu untersuchen.

#### 3.10.1 Versuchsplanung

Folgende Punkte mussten bei der Versuchsplanung bedacht werden:

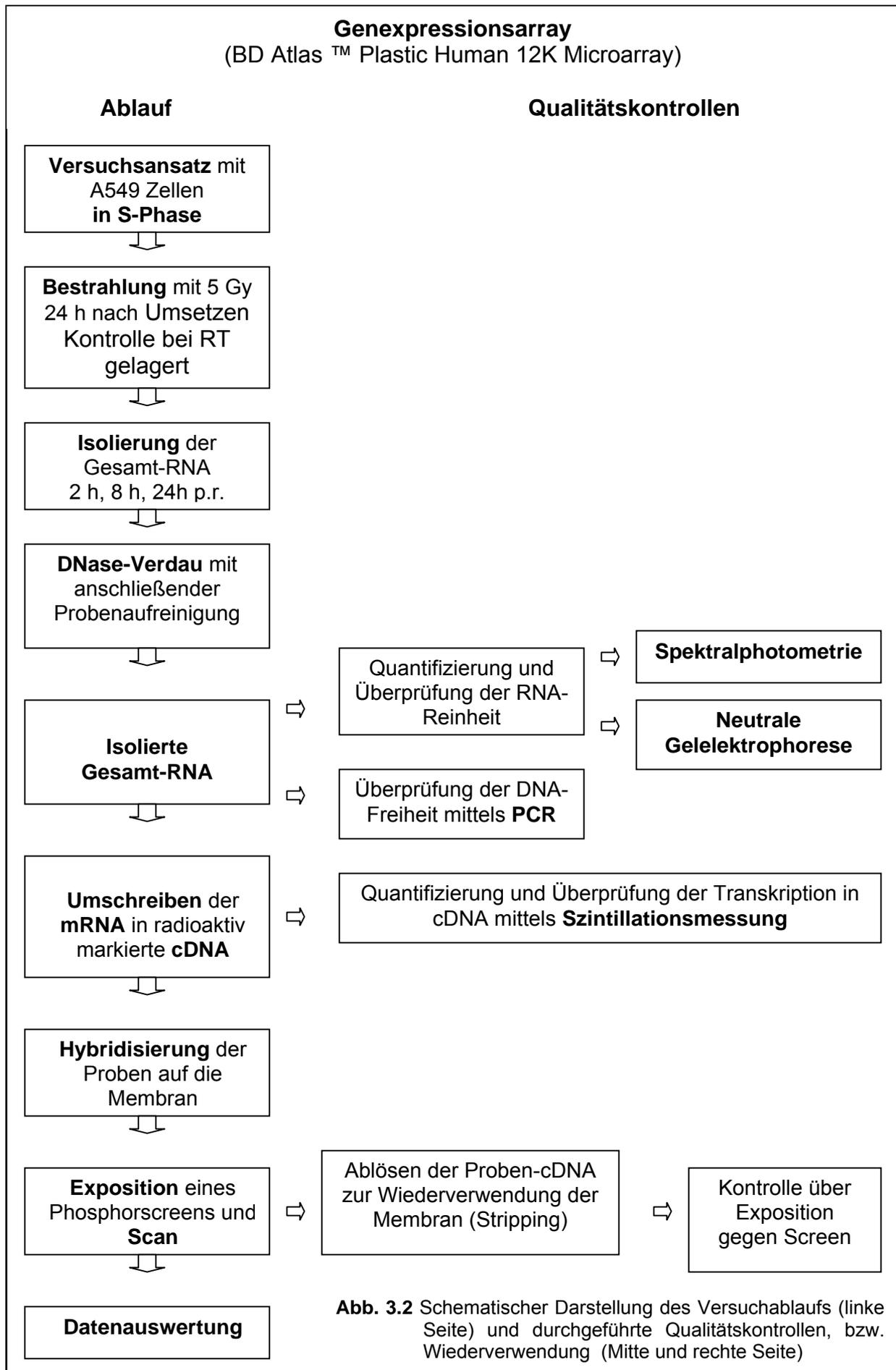
- Die Zellen sollten sich möglichst im gleichen Zyklusstadium befinden.
- Es wurde eine große Menge an Zellen gebraucht, um adäquate RNA-Mengen für die folgenden Untersuchungen zu isolieren.

Bei dem letzten Punkt musste Folgendes bedacht werden:

- Für das Umschreiben der mRNA in cDNA sollten 50 µg Gesamt-RNA eingesetzt werden.
- Die cDNA-Synthese musste gegebenenfalls wiederholt werden.
- Es sollte ausreichend Gesamt-RNA für eine spätere quantitative RT-PCR vorhanden sein.
- Es musste eine ausreichende Menge an isolierter RNA für die verschiedenen Kontrolluntersuchungen vorhanden sein (Gelelektrophorese, Integrität der RNA, PCR).
- Die Kapazität der Säulen (Qiagen) sollte mit  $7 \times 10^6$  Zellen pro Säule nicht überschritten werden.

Unter Berücksichtigung all dieser Punkte ergab sich, dass pro Untersuchungszeitpunkt zwischen  $6$  und  $40 \times 10^6$  Zellen aufgearbeitet werden mussten, d.h. pro Probe wurden jeweils eine bis sechs Säulen parallel verwendet. Das Untersuchungsspektrum war jedoch auf die beiden Dosen 0 Gy (Kontrolle) und 5 Gy beschränkt. Es wurde eine Strahlenexposition mit 5 Gy gewählt, da hierbei starke Zellzyklusveränderungen und Zelltod bei ausreichendem Überleben vorkamen.

Die Zellen befanden sich 24 h nach dem Umsetzen in der S-Phase. Deshalb wurden sie zu diesem Zeitpunkt bestrahlt und die Messungen im Abstand von 2 h p.r., 8 h p.r., 24 h p.r. durchgeführt.



### 3.10.2 Zellansatz

Für den Versuchsansatz mussten die A549 Zellen erst einmal synchronisiert werden. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen / 10 ml in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät und diese 120 h lang inkubiert. In dieser Zeit bildete sich ein so dichter Zellrasen, dass die Zellen die Proliferation einstellten. Nun wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA abtrypsinisiert, die Reaktion wurde nach 3 bis 4 min. mit 5-10 ml DMEM-Medium gestoppt und die Gesamtzellzahl anhand eines entnommenen Aliquots mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt. Nun wurden die Zellen wieder mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / 10 ml in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche umgesetzt und umgehend in den Brutschrank gestellt. Für jede Strahlendosis wurden pro Versuch 5 Kulturflaschen angelegt. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

Die Bestrahlung erfolgte gemäß Kapitel 3.5 für S-Phase nach 24 Stunden.

### 3.10.3 RNA-Isolation

RNA kann sehr schnell durch ubiquitär vorkommende RNasen abgebaut werden. Um solche Degradationen in den Proben durch Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, mussten deshalb vor dem Arbeiten mit RNA einige Vorbereitungen getroffen werden. So wurde immer mit Handschuhen gearbeitet. Weiterhin wurden die benötigten unsterilen Eppendorfgefäße bei 120°C mindestens 45 Minuten bei 3 bar autoklaviert und der Arbeitsplatz einschließlich der Ständer für die Eppendorfgefäße, Pipetten und Pinzette mit einem speziellen Spray (RNase Contamination Removal Fluid) behandelt. Außerdem wurden nur gestopfte Pipettenspitzen verwendet und alle Materialien und Chemikalien im Labor separat aufbewahrt.

Nach der Isolation wurde die RNA zur Qualitätskontrolle zum einen spektralphotometrisch über die Bestimmung der Optical Density (O.D.) bei 260 und 280 nm kontrolliert, zum anderen wurde die Qualität anhand der optischen Dichte der 28 S und der 18 S rRNA-Banden im Agarosegel im Vergleich zu einem RNA-Standard mit bekannter RNA-Menge überprüft. Dabei wurde darauf geachtet, dass die beiden Banden deutlich sichtbar waren und kein Schmier zu erkennen war.

Zur Sicherheit, dass die RNA nach dem DNA-Verdau auch wirklich DNA frei war, was eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung des Atlas Arrays ist, wurde noch

eine PCR, welche genomisches Aktin mit Hilfe eines spezifischen Primersets nachweist, durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anhand einer Gelelektrophorese kontrolliert.

Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde ein auf Silica-Gel-Membranen beruhender Isolationskit über Säulen verwendet, der kommerziell erhältlich ist (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit), wobei die Aufarbeitung in den folgenden Schritten erfolgte:

### 3.10.3.1 Isolation der Gesamt-RNA

Bevor jedoch mit dem RNA-Isolation mittels RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit begonnen werden konnte, mussten noch folgende Vorbereitungen getroffen werden:

Vorbereiten der Puffer des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit:

- Vor dem ersten Gebrauch mussten dem RPE-Puffer 220 ml 100 %iges, hochreines Ethanol zugefügt werden.
- Ebenso musste dem RLT-Puffer pro 1 ml 10 µl β-Mercaptoethanol zugegeben werden, wobei dieses Gemisch bei Raumtemperatur einen Monat haltbar war.

Vorbereitung des Arbeitsplatzes:

- Der gesamte Arbeitsplatz einschließlich der benötigten Geräte wurde mit „RNase Contaminations Removal Fluid“ behandelt.
- Ein Thermomixer (Thermostat Typ 5320), der für den DNase-Verdau benötigt wurde, wurde auf 30°C vorgeheizt.
- Es wurde ein Eiskübel mit zerstoßenem Eis bereitgestellt.

Vorbereitung der Zellen:

- Mit einer ausreichenden Menge Trypsin-EDTA wurden die adhärent wachsenden Zellen abgelöst und durch Zugabe von DMEM-Medium wurde in einem äquivalenten Volumen die Trypsinwirkung wieder aufgehoben.
- Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde anhand eines entnommenen Aliquots die Zellanzahl bestimmt. Daraufhin wurde, je nach Zellanzahl, das Volumen entnommen, das einer Menge von  $7 \times 10^6$  Zellen entsprach. Dieses Volumen wurde in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 1.500 U/min

über 5 min. bei 4°C herunter zentrifugiert (Labofuge 400R Heraeus Instruments). Der Überstand wurde dekantiert.

- Um das restlich Medium heraus zu waschen, wurden zu dem Pellet ca. 10 ml PBS-Puffer dazugegeben, das Pellet wurde resuspendiert, unter den gleichen Bedingungen nochmals herunter zentrifugiert und anschließend dekantiert.

### Aufarbeitung zur RNA-Isolation

#### 1. Lyse der Zellen

- Zu den vorbereiteten Zellen wurden 600 µl RLT-Puffer gegeben und die Zellen mehrmals mit der Pipette aufgezogen, so lange bis das Gemisch, das zunächst sehr dickflüssig wurde, wieder dünnflüssig war. Damit sollte erreicht werden, dass die DNA, die RNA und die Proteine abgesetzt, die DNA geschert und die Proteine homogenisiert wurden.
- Anschließend wurden 600 µl 70 %iges Ethanol dazugegeben und das Zelllysats wurde mehrmals mit der Pipette gemischt. Auf diese Art wurde die RNA-Isolation vorbereitet.

#### 2. Beladen der Säule

- Es wurden 700 µl des Zelllysats auf die Säule, die bereits in einem 2 ml Sammelgefäß stand, gegeben und bei RT wurde bei 10.000 U/min, 15 sec. zentrifugiert (Eppendorf Modell 5415C). Dieser Vorgang wurde mit dem verbliebenen Rest wiederholt.
- Das Eluat wurde in einem gesonderten β-Mercaptoethanol-Abfallbehälter gesammelt, da β-Mercaptoethanol toxisch ist.

#### 3. Waschen der Säule

- Zum Waschen wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese anschließend mit 10.000 U, bei Raumtemperatur 15 sec. zentrifugiert. Das Eluat wurde zusammen mit dem Sammelgefäß in dem β-Mercaptoethanol-Abfallbehälter entsorgt und die Säule in ein frisches 2 ml Sammelgefäß gestellt.

#### 4. Equilibrieren der Säule

- Es wurden 500 µl RPE-Puffer zum Equilibrieren auf die Säule gegeben und anschließend wurde wieder bei RT, 10.000 U/min, 15 sec. zentrifugiert. Das Eluat wurde in einem normalen Abfallbehälter entsorgt.
- Der Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt, wobei diesmal über 2 min. zentrifugiert wurde.
- Um die Membran zu trocknen, wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben und noch einmal wurde bei maximaler Geschwindigkeit der Zentrifuge und bei Raumtemperatur eine Minute lang zentrifugiert.

#### 5. Elution der RNA

- Nach dem Trocknen wurde die Säule in ein 1,5 ml Sammelgefäß gestellt und 30 µl RNase freies Wasser wurden auf die Membran gegeben. Wiederum erfolgte die Zentrifugation bei RT, 10.000 U/min, eine Minute. Dieser Vorgang wurde auch noch ein zweites Mal wiederholt. Die isolierte RNA befand sich nun im Eluat. Die Säule konnte entsorgt werden.
- Die befüllten Sammelgefäße wurden sofort nach Beendigung der RNA-Isolation auf Eis gestellt.

### 3.10.3.2 DNase-Verdau und Probenaufreinigung

#### 1. Vorbereitung (RNase-Free DNase Set)

- DNase I wurde in 550 µl RNase freiem Wasser gelöst, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Lösung keinen starken mechanischen Belastungen ausgesetzt wurde, da diese die DNasen sehr schnell zerstören können.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen der DNase, wurde sie zur Aufbewahrung zu je 36 µl aliquotiert und bei -20°C bis zu 9 Monaten gelagert.

#### 2. DNase-Verdau

- Nun wurden zu 36 µl der DNase I-Stammlösung 140 µl RDD-Puffer gegeben und diese 176 µl zu der isolierten RNA-Probe gegeben.

- Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermomixer bei 20-30°C für 15-30 Minuten, wobei diese Zeit nicht überschritten werden durfte.

### 3. Probenaufreinigung

- Zum Aufreinigen der RNA wurden 350 µl RLT-Puffer auf die Probe gegeben und mit der Pipette durchmischt. Dann erfolgte die Zugabe von 250 µl 100 %igem Ethanol.
- Die Probe wurde nun auf eine Säule gegeben, welche wiederum in einem 2 ml Sammelgefäß stand und anschließend bei Raumtemperatur, 10.000 U/min, 15 sec. lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde zusammen mit dem Sammelgefäß in den β-Mercaptoethanol-Abfallbehälter entsorgt und die Säule in ein frisches 2 ml Sammelgefäß gestellt.
- Nun wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und es erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei Raumtemperatur, 10.000 U und 15 sec.
- Dieser letzte Vorgang wurde noch einmal wiederholt, wobei diesmal, zur Trocknung der Membran, bei maximaler Geschwindigkeit und für 2 min. zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde mit dem Sammelgefäß verworfen. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Sammelgefäß überführt.
- Jetzt wurden wieder 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran gegeben und es wurde bei RT, 10.000 U/min für 1 min. zentrifugiert. Auch diese Elution der RNA wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Somit war die RNA in 60 µl RNase freies Wasser eluiert. Nachdem die Gesamt-RNA eines Versuches vollständig aufgereinigt war, wurden die zusammengehörigen Proben zusammen pipettiert.

## 3.10.4 Quantifizierung der RNA, Überprüfung der Reinheit und Integrität

### 3.10.4.1 Spektralphotometrie

Zur Mengenbestimmung und Überprüfung der Reinheit, d.h. zum Ausschluss von Proteinkontaminationen der RNA mittels Spektralphotometrie, wurde das Photometer NanoDrop (NanoDrop ND-1.000 Spectrophotometer) verwendet. Das Gerät bestimmte die optische Dichte der RNA bei 260 nm und bei 280 nm. Es berechnete

auch automatisch, zur Überprüfung auf Proteinverunreinigungen, den Quotienten aus den Absorbationswerten der Proben von 260 nm und 280 nm. Dieser Quotient ( $A(260): A(280)$ ) sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Lagen die Werte deutlich darunter, konnten diese Proben nicht für die Auswertung im Atlas Array verwendet werden, da sonst eine zu starke Hintergrundbildung verursacht wurde.

#### 3.10.4.2 Neutrale Gelelektrophorese zur Quantifizierung

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1 %iges Agarosegel benötigt. Als Kontrolle wurden 2 µg RNA-Standard und je 2 µg der spektralphotometrisch berechneten Proben mit jeweils 3 µl Ladepuffer versetzt und in die Gelslots pipettiert. An das Gel wurde anschließend eine Spannung von 100 V für 40 min. bei RT angelegt (Elektrophoresekammer GNA 100 mit Stromversorger 2301 Macrodrive 1, LKB Produkter AB). Nachdem die Auftrennung der Proben erfolgt war, wurden die 28 S (5 kb)- und die 18 S (1,9 kb)- Banden der mRNA, mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes (peQLab Biotechnologie GmbH) beurteilt. Typischerweise liegt das Verhältnis (18 S/28 S) dieser Banden zueinander bei ca. 1:2.

Außerdem wurden die Banden der RNA-Proben mit dem RNA-Standard mit bekannter Menge verglichen, um die spektralphotometrische Messung zu überprüfen.

#### 3.10.5 PCR zur Überprüfung der DNA-Freiheit

Die PCR wurde zum Ausschluss einer DNA-Kontamination in den RNA-Proben durchgeführt. Dazu wurde folgendes Primerset eingesetzt:

- $\beta$ -Aktin Primer forward: 5` -AGA-GAT-GGC-CAC-GGC-TGC-TT-3`
- $\beta$ -Aktin Primer reward: 5` -ATT-TGC-GGT-GGA-CGA-TGG-AG-3`

Als Proben dienten

- MCF-7-DNA als Positivkontrolle
- RNase free H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle
- Isolierte Gesamt-RNA der A549

Zum Ansatz wurde der HotStarTaq Master Mix Kit verwendet.

Für die PCR-Reaktion wurden folgende Lösungen in ein PCR-Gefäß zusammen pipettiert:

- 1 µl β-Aktin Primer forward: 3`
  - 1 µl β-Aktin Primer reward: 5`
  - 22 µl RNase free H<sub>2</sub>O
  - 25 µl Master Mix
  - 1 µl Probe (RNA, H<sub>2</sub>O, bzw. MCF-7-DNA)
- 50 µl Gesamtvolumen

Die PCR-Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

- |                |             |   |
|----------------|-------------|---|
| 1. Zyklus:     | 1. Schritt: | 94°C, 90 sec. (Denaturierung)               |
|                | 2. Schritt: | 66°C, 90 sec. (Anlagerung („Annealing“))    |
|                | 3. Schritt: | 72°C, 60 sec. (Verlängerung („Elongation“)) |
| 2.-29. Zyklus: | 1. Schritt: | 94°C, 60 sec. (Denaturierung)               |
|                | 2. Schritt: | 66°C, 60 sec. (Anlagerung („Annealing“))    |
|                | 3. Schritt: | 72°C, 60 sec. (Verlängerung („Elongation“)) |
| 30. Zyklus:    | 1. Schritt: | 4°C, bis Abschaltung durch Benutzer.        |

Das Ergebnis der PCR wurde in einem 1 %igen Agarose-Gel mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.10.4.2) sichtbar gemacht. Dazu wurden 2 µl DNA-Standard (Längenstandard 1 kb DNA), 7 µl der PCR-Reaktion und 5 µl Ladepuffer zusammen pipettiert und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend erfolgten die bildliche Darstellung der β-Aktin-Banden in der Kontrolle sowie das Fehlen dieser Banden in der Negativkontrolle und den aufgetragenen RNA-Proben mittels des Geldokumentationsgerätes.

### 3.10.6 Konvertierung der mRNA in radioaktiv markierte cDNA

Auch in diesem Verfahren wurden die bestrahlten Proben und die dazugehörigen Kontrollen stets parallel aufgearbeitet. Die gewonnene mRNA wurde nun mithilfe der Reversen Transkriptase, eines Primercocktails und freier Nukleotiden unter Hinzufügung von radioaktiv markiertem dATP in cDNA umgeschrieben. Auf diese Art und Weise wurden beispielsweise aus fünf Kopien einer mRNA-Sorte nach der Konvertierung fünf komplementäre cDNA-Fragmente. Zur Isolation der cDNA-Fragmente von den nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden wurde die radioaktiv markierte cDNA über Säulen aufgereinigt und das Ergebnis über Szintillationsmessung quantifiziert. Dabei sollten die Proben  $20 \times 10^6$  cpm nicht unterschreiten. Nach Hybridisierung, Exposition der Membran gegen einen Screen über Nacht, bzw. über sieben Tage, sollten sich die cDNA auf dem Screen nach Digitalisierung im „Phosphorimager“ als charakteristische Schwärzungen darstellen.

#### Vorbereitung vor Versuchsbeginn

- Es wurde der BD Atlas™ Plastic Human 12K Microarray verwendet.
- Da für die Hybridisierung 50 µg RNA benötigt wurden, wurde zuerst die benötigte Menge in µl aus den Ergebnissen der spektralphotometrischen Bestimmung berechnet.
- Wichtig bei diesem Verfahren war es, dass alle Lösungen vor dem direkten Verbrauch gut gemischt wurden.
- Vor dem ersten Gebrauch mussten zu dem NT3 Puffer noch 28 ml 95 %iges Ethanol zugegeben werden.
- Die „BD PlasticHyb“ Hybridisierungs-Lösung musste auf 60°C vorgewärmt werden.
- Folgende Lösungen mussten zum Waschen der Membranen am zweiten Tag kurz vor Gebrauch angesetzt werden:

#### 1. „High Salt Wash“ Lösung (HSW)

80 ml 20x SSC (= 2x SSC)

4 ml 20% SDS (=0,1 % SDS)

ad 716 ml aqua dest.

**2. „Low Salt Wash“ Lösung (LSW 1)**

- 1 ml 20 x SSC (=0,1x SSC)
- 1 ml 20 % SDS (=0,1% SDS)
- ad 198 ml aqua dest.

**3. „Low Salt Wash“ Lösung 2 (LSW 2)**

- 1 ml 20 x SSC
- ad 199 ml aqua dest.

**Versuch**

- Aktivierung der „Beads“

Um die mRNA aus der DNA-freien Gesamt-RNA zu isolieren, wurden „Streptavidin Magnetic Beads“ verwendet, die zunächst aktiviert werden mussten. Pro RNA-Probe wurden 15 µl „Beads“ abgenommen und in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden pro Probe 150 µl „1x Binding Puffer“ dazugegeben, mehrmals resuspendiert und unter Zuhilfenahme eines Magneten wurden die „Beads“ von der Lösung getrennt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die nun aktiven „Beads“ wurden in 15 µl „1x Binding Puffer“ pro Probe aufgenommen und auf Eis gestellt.

- Bindung biotinylierter Oligo(dt) an die mRNA-Spezies

Da die mRNA mit einem Poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz ausgestattet ist, macht man sich diesen zu Nutze, um die mRNA aus der Gesamt-RNA zu isolieren. Dazu wurden 50 µg total-RNA in ein 0,5 ml PCR-Gefäß überführt, das Volumen mit RNase freiem Wasser auf 45 µl ergänzt. Anschließend wurde 1 µl biotinylierter Oligo(dt)-Nukleotide dazugegeben, welche sich während der Inkubation mit dem Poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz verbanden. Die Inkubation wurde für 2 min. bei 70°C (Thermomixer comfort) und anschließend für 10 min. bei Raumtemperatur (Thermomixer comfort) durchgeführt.

- Abtrennung der mRNA

Nach der Inkubation wurden 45 µl „2x Binding Puffer“ dazugegeben oder bei größeren Proben-Volumina das gleich große Volumen. Die „Beads“ wurden mit der Pipette resuspendiert und davon je 15 µl zur Probe pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 25-30 min. auf einem Schüttler (Thermomixer comfort) mit

1.500 U bei Raumtemperatur inkubiert, wobei 30 min. nicht überschritten werden durften. Hierbei kam es zu einer Bindung zwischen der Streptavidin-Komponente der „Beads“ und den biotinylierten Oligo-(dt)-Nukleotiden, welche an dem Poly(A<sup>+</sup>)-Schwanz der mRNA hafteten. Im folgenden Schritt wurden die „Beads“ und somit die mRNA unter Zuhilfenahme eines Magneten von der Gesamt-RNA abgetrennt. Es folgten zwei Waschschrte, bei denen je 50 µl „1x Wash Puffer“ zu den „Beads“ gegeben wurden; diese wurden resuspendiert und mit einem Magneten getrennt. Nach dem zweiten Waschen wurden zu den „Beads“ 50 µl „1x Reaction Puffer“ gegeben, wieder wurde resuspendiert und die „Beads“ wurden, so trocken wie möglich, mit einem Magneten abgetrennt. Danach wurden sie in 2 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

- cDNA-Synthese

Es wurde der „Master Mix“ wie folgt vorbereitet und anschließend auf Eis gesetzt.

Pro RNA-Probe 4 µl „5x Reaction Puffer for Powerscript“

Pro RNA- Probe 2 µl „10x dNTP Mix“

Pro RNA-Probe 7 µl (Alpha <sup>33</sup>P) dATP

Pro RNA-Probe 1,5 µl DTT (zur Stabilisierung von „Powerscript“)

14,5 µl Gesamtvolumen pro Probe

Zu den „Beads“ der Proben wurden 3 µl Random-Primer „without Synthetic Control“ (S 2774) gegeben und die Proben so auf ein Gesamtvolumen von 5 µl gebracht.

Für eine separate Reaktion wurde in ein 0,5 ml-Reaktions-Gefäß 1 µl Random-Primer „with Synthetic Control“ (S 3269) pipettiert. Letzterer sollte zum Schluss die Grid-Punkte markieren. Es folgte die Inkubation bei 65°C (Thermomixer comfort) über 2 min. und anschließend für 2 min. (für die cDNA-Synthese) bei 42°C (Thermomixer comfort).

Zum „Master Mix“ wurden nun noch je Probe 2 µl „Powerscript Reverse Transkriptase“ gegeben. Die Reversen Transkriptase ist sehr empfindlich gegen mechanische Einflüsse und gegen Wärme. Deshalb wurde sie erst kurz vor Gebrauch aus dem Gefrierschrank entnommen, in einem Kühlblock aufbewahrt und nur ganz vorsichtig mit der Pipette kurz durchgemischt. Nach der Zugabe

wurde der „Master Mix“ so lange vorsichtig mit der Pipette gemischt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren.

Zu den je 5 µl „Beads“ der Proben und dem 1 µl Random-Primer „with Synthetic Control“ (für das Grid) wurden je 16,5 µl „Master Mix“ pipettiert, kurz durchgemischt und sofort bei 42°C zur cDNA-Synthese für 30 min. inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden je 2 µl „10x Termination Mix“ zu den Proben pipettiert.

- Aufreinigung über die Säulen

Um die cDNA von den Primern, den radioaktiv markierten Nukleotiden und der mRNA zu trennen, wurden die Proben auf die Reinigungssäulen pipettiert.

Die Proben wurden mit 180 µl NT2 Puffer auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, gemischt und auf die Säulen pipettiert, von denen jede in einem 2 ml Sammelgefäß stand.

Anschließend wurden sie bei 14.000 U/min 1 min. zentrifugiert (Model 2K15, Rotor 12145), der Durchfluss wurde in dem Sammelgefäß als radioaktiver Abfall entsorgt.

Die Säulen wurden in frische 2 ml Sammelgefäße gestellt, je 400 µl NT3 Puffer auf die Säulen gegeben, wieder bei 14.000 U/min für 1 min. zentrifugiert und der Durchfluss mit den Sammelgefäßen als radioaktiver Abfall entsorgt. Dieser Waschvorgang wurde noch dreimal wiederholt.

Nach dem insgesamt vierten Mal wurden die Säulen in saubere 2 ml Sammelgefäße gestellt, es wurden je 100 µl NE Puffer zur Elution dazupipettiert, 2 min. inkubiert und dann wurden bei 14.000 U/min 1 min. zentrifugiert.

Die Aufreinigung über die Säulen wurde nochmals wiederholt. Die Wiederholung erfolgte jedoch nur mit den Proben, also ohne den Ansatz „with Synthetic Control“. Jedoch wurden diesmal am Anfang zu den Eluatzen statt 180µl NT2 500 µl NT2 dazugegeben. Der restliche Ablauf erfolgte allerdings genau wie beim ersten Mal.

Nach jeder Aufreinigung wurde eine Szintillationsmessung durchgeführt.

- Szintillationsmessung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Umschreibung der mRNA in cDNA wurde eine Szintillationsmessung (LS 6500 Scintillation Counter) durchgeführt. Dazu wurde 1 µl des Eluates entnommen, mit 999 µl aqua dest. verdünnt und gemischt (so

entstand eine Verdünnung von 1:1.000). Aus dieser Vorverdünnung wurden wiederum 5 µl entnommen und mit 10 ml Rotiszint (Szintillationsflüssigkeit: Rotiszint eco plus) für die Szintillationsmessung vermischt, so dass eine Verdünnung der Eluatprobe von 1:20.000 entstand. (Ursprünglich wurden aus den 100 µl Eluat 5 µl entnommen und gemessen, was einer Verdünnung von 1:20 entsprach. Da die Konzentration zu hoch war, erfolgte eine Vorverdünnung mit 1 µl Eluat auf 999 µl aqua dest. was einer Vorverdünnung von 1:1.000 entsprach; daraus wurden dann die 5 µl entnommen.) Es erfolgte nun die Szintillationsmessung mit einem geeigneten Messprogramm für  $^{33}\text{P}$ . Ihr Ergebnis musste mit dem Faktor 20.000 multipliziert werden, um die exakten „Counts“ zu bestimmen.

### **3.10.7 Hybridisierung und Exposition eines Phosphorscreens**

Die cDNA-Proben wurden denaturiert, indem sie für zwei Minuten bei 95°C (Thermomixer comfort) inkubiert wurden. Anschließend wurden sie auf die immobilisierten cDNAs der Membranen des Mikroarrays über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen über mehrere Waschschriffe gewaschen und anschließend vorerst über Nacht und dann weitere sieben Tage auf einen Screen (Imaging Screen K) aufgelegt. Nach den ersten ca. 22 h konnte das erste Ergebnis abgelesen werden. Die Membranen wurden noch weitere sieben Tage aufgelegt, damit auch schwach exprimierte Gene sichtbar gemacht werden konnten, die bei kürzeren Expositionszeiten nicht oder nicht so deutlich zu sehen waren.

#### **3.10.7.1 Hybridisierung**

##### **I. Vorhybridisierung**

- Es wurden pro Probe je 15 ml vorgewärmte „BD PlasticHyb“ Hybridisierungslösung in eine „BD PlasticHyb“ Hybridisierungsbox gefüllt und ein Mikroarray mit der bedruckten Seite nach oben hineingelegt. Die verschlossene Box wurde für mindestens 30 Minuten bei 60°C im Hybridisierungsöfen (Heraehybrid 12) inkubiert, wobei man sie immer wieder manuell hin und her bewegte, so dass die Membran gleichmäßig benetzt wurde.

- Außerdem wurden je 25 ml der „PlasticHyb“ Hybridisierungs-Lösung in je ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und ebenfalls bei 60°C warm gehalten.

## II. Probenvorbereitung

- Die Proben und die Kontrolle wurden nun für 2 min. bei 95 - 100°C im Thermomixer denaturiert und anschließend für mindestens 2 min. auf Eis gestellt.
- Danach wurde wieder eine Szintillationsmessung durchgeführt. Für die Kontrolle wurde nun berechnet, auf wie viele µl sich 3 Mio Counts verteilen; das entsprechende Volumen der Kontrolle wurde den Proben zugefügt.
- Daraufhin wurde je eine Probe in die vorgewärmten 25 ml „PlasticHyb“ Hybridisierungs-Lösung gegeben, gut durchmischt und wieder in den Hybridisierungsöfen gestellt.

## III. Hybridisierung

- Nun wurde die Vorhybridisierungslösung von den Membranen entfernt und die Proben mit den 25 ml „PlasticHyb“ Hybridisierungs-Lösung auf die Membranen gegeben, wobei darauf zu achten war, dass die Lösungen nicht direkt auf die Membranen gegossen wurde.
- Die Boxen wurden sofort verschlossen, in Plastiktüten verpackt, mit Bleiringen beschwert und über Nacht bei 58°C - 60°C im Hybridisierungswasserbad (Köttermann) mit der Schüttelstärkeneinstellung 3 hybridisiert.

## 6. Waschen der Membranen

- Am nächsten Tag wurden pro Probe folgende Waschlösungen angesetzt: 800 ml „High Salt Wash“ Lösung (HSW), 50 ml „Low Salt Wash“ Lösung 1 (LSW1) und 50 ml „Low Salt Wash“ Lösung 2 (LSW2).
- SDS kann bei RT ausfallen. In diesem Fall wurden die entsprechenden Lösungen bis zum Lösen des Salzes in den Wärmeschrank gestellt.
- Zum Waschen der Membran wurden 50 ml HSW in eine Waschbox, der Rest der Lösung (ca. 750 ml) in ein Becherglas gegeben.
- Der Mikroarray wurde vorsichtig aus dem Hybridisierungsbad und der Box genommen, die Membran in das Becherglas mit der HSW gestellt und die radioaktive Hybridisierungslösung entsprechend entsorgt.

- Nun wurde die Membran langsam fünfmal eingetaucht und anschließend in die Waschbox mit der Hybridisierungslösung gelegt.
- Die Waschbox wurde verschlossen und fünfmal wie auf einer Wippe geschwenkt. Anschließend wurde die HSW abgegossen.
- Der gleiche Vorgang erfolgte mit 50 ml LSW 1.
- Daraufhin wurden 50 ml LSW 2 am Rand in die Box pipettiert und diese wie bei den vorhergehenden Malen fünfmal geschwenkt.
- Nach diesem Waschschrift wurde die Membran aus der Waschbox entnommen, in eine Schale mit aqua dest. gelegt und langsam wieder herausgezogen, so dass möglichst keine Tropfen auf der Membran zurückblieben.
- Der Mikroarray wurde nun 10 min. lang in aufrechter Position an der Luft getrocknet.

#### **3.10.7.2 Exposition auf einen Phosphorscreen**

- Nach dem Trocknen wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt und auf einen Phosphorscreen (Imaging Screen K) mit der gespotteten Seite nach oben exponiert. Dies diente zur Abbildung der radioaktiven Signale, welche von dem Phosphorscreen erfasst wurden.
- Die erste Messung erfolgte am Phosphor-Imager Molecular-Imager<sup>®</sup>FX mit einem geeigneten Programm (Quantity One) nach ca. 22 h. Danach wurde der Screen wieder gelöscht (Screen Eraser-K) und für weitere sieben Tage aufgelegt.
- Der Scan erfolgte mit einer Auflösung von 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.10.8 „Strippen“ der Membranen

Eine Membran kann laut Hersteller bis zu dreimal verwendet werden. Zuvor müssen jedoch die Signale der vorhergegangenen Hybridisierung heruntergewaschen werden.

#### I. Ansetzen der „Stripping“-Lösung

- Zuerst erfolgte das Ansetzen der „Stripping“-Lösung (vgl. Kap. 3.3)

#### II. „Strippen“ der Membranen

- Es wurden 40-50 ml der 80°C warmen „Stripping“-Lösung in eine BD Atlas Plastic Waschbox gegeben und dorthinein wurde die zu strippende Membran mit der geplotteten Seite nach unten gelegt.
- Die Box wurde sofort mit dem Deckel fest verschlossen, in eine Plastikhülle geschoben, mit Bleiringen beschwert und im Wasserbad (Köttermann) für 10 min. bei Stufe 6 und 80°C inkubiert.
- Nach der Inkubation wurde die Membran mit einer Pinzette der Box entnommen und sofort in eine Waschschiessel mit aqua dest. gelegt.
- Die Membran wurde ganz langsam dem Wasserbad entnommen, so dass sie dabei vorsichtig abgespült wurde, das Wasser gut ablaufen konnte und dabei möglichst keine Wassertropfen auf der Membran zurückblieben.
- Die Trocknung der Membran erfolgte 10 min. lang in aufrechter Position an der Luft. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde sie, mit der geplotteten Seite nach oben, in eine Filmkassette gegeben und für 7 Tage ein Screen (Imaging Screen K) aufgelegt.
- Nach diesen 7 d wurde der Film wieder mit einer Auflösung von 50 µm in dem „Phosphorimager“ Molecular-Imager®FX mit Hilfe der Phosphorimager-Software digital ausgewertet.
- Die „gestrippen“ Mikroarrays wurden immer bei RT und im Dunkeln aufbewahrt.

### 3.10.9 Auswertung

Die Membranen wurden, wie in Kapitel 3.11.7.2 beschrieben, mithilfe des Computerprogramms Quantity One (BioRad) eingescannt. Mit Hilfe dieses Programms wurden die radioaktiven Signale von der eingescannten Membran in digitale Informationen als 16 Bit kodierte Graustufenbild umgewandelt. Ferner wurde dieses Graustufenbild zur weiteren Verarbeitung als tiff-Datei gesichert.

Die Auswertung der Arrays erfolgte mit der Spezialsoftware Atlas Image 2.7 (Clontech). Dabei ging das Programm in folgender Reihenfolge vor:

1. Alignment
2. Erstellen der Summengrauwerte und Zuordnung der Gene
3. Normalisierung gemäß der Gesamtgenexpression
4. Bestimmung der exprimierten, bzw. differentiell exprimierten Gene.

#### 1. Alignment

Diese Software öffnete die tiff-Datei als ein Phosphor Imager File und legte anschließend eine virtuelle Lochschablone zum Auffinden der Gene über den Array. Das Grid und die Kontrollen dienten dabei als Orientierung. Nun konnte man diese virtuelle Lochmaske noch automatisch ausrichten, bzw. manuell nachkorrigieren, so dass sie möglichst exakt über den Genen zu liegen kam.

#### 2. Erstellen der Summengrauwerte und Zuordnung der Gene

Anschließend maß das Programm die Intensität der Grauwerte jedes einzelnen Pixels in der „region of interest“. Diese Grauwerte wurden aufaddiert in Summengrauwerte ( $\Sigma$ Grauwerte). Diese Summengrauwerte wurden in einem Datenfile abgespeichert. Das Programm war in der Lage, bis zu ca. 65.000 unterschiedliche Grauabstufungen zu erkennen (16 Bit-Kodierung). Jeder errechnete Summengrauwert stand für ein Gen. Ein Gen galt als exprimiert, wenn es sich deutlich vom Hintergrund, in diesem Fall musste der Summengrauwert zwei Mal über dem Hintergrund liegen, unterschied. Der Hintergrund wurde an Stellen, wo er durch große Flecken überstrahlt wurde, manuell angeglichen, um falsche Ergebnisse zu vermeiden. So entstanden für die gesamte Genexpression Tabellen, in denen für

jeden Untersuchungszeitpunkt spaltenweise die Summengrauwerte der 11.835 Gene dargestellt wurden. Diese Summengrauwerte der Kontrollen und Proben wurden miteinander verglichen. Zur Weiterverarbeitung wurden diese Daten in Excel (Microsoft) überführt. Um zwei Proben miteinander vergleichen zu können, musste eine Normalisierung vorgenommen werden.

### 3. Normalisierung gemäß der Gesamtgenexpression

Die Normalisierung erfolgte gegen die Gesamtgenexpression jeder Probe, also gegen die Summe der aufaddierten Grauwerte aller 11.835 Gene.

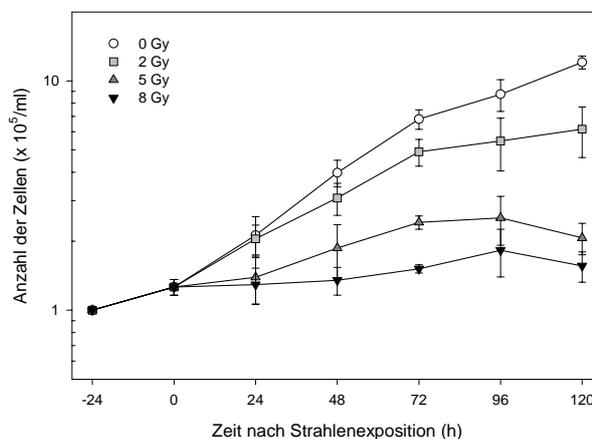
### 4. Bestimmung der exprimierten, bzw. differentiell exprimierten Gene

Die normalisierten Summengrauwerte der Kontrolle konnten nun mit den normalisierten Summengrauwerten der Proben über Quotientenbildung in Beziehung gesetzt werden. Die Genexpression der Proben wurde als ein Mehrfaches der Expression der Kontrolle ausgedrückt. Quotienten, die  $\geq 2$  waren, stellten eine Hochregulation, Quotienten, die  $\leq 0,5$  waren eine Herunterregulation der Gene gegenüber den Genen der Kontrolle dar. Jedes dieser gefundenen exprimierten Gene wurde anschließend nochmals manuell überprüft um sicher zu gehen, dass das Programm auch wirklich Gene gefunden hatte und nicht z.B. Gene als exprimiert gemessen hatte, die von benachbart liegenden Genen überstrahlt wurden. War die Richtigkeit sichergestellt, konnte nun diese Genexpressionsmatrix nach unterschiedlichen Kriterien, z.B. nach Höhe der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (differentielle Expression) oder nach Abhängigkeit der Genexpression von der Strahlendosis, analysiert werden. Ebenso wurden die Gene nach ihren biologischen Funktionen geordnet, zum einen nach dem Klassifizierungssystem nach Clontech und zum anderen nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software. Mithilfe des Panther<sup>R</sup>-Programms (Applied Biosystems) konnte man die Anzahl der zu erwartenden exprimierten Gene einer funktionellen Gengruppe bestimmen und diese mit den tatsächlich exprimierten Genen derselben funktionellen Gengruppe vergleichen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellwachstum und Vitalität

Aus den Ergebnissen der Zellauszählung zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten ergab sich das Zellwachstum gegen die Zeit (Abb. 4.1). Die Einzelmessungen sind den Tabellen 9.1-9.3 des Anhangs zu entnehmen. Für den Versuch wurde die Zellen 24 h vor Strahlenexposition ausgesät, wobei die Zellzahl auf  $10^5$  pro ml eingestellt wurde. Bis zum Zeitpunkt der Strahlenexposition stieg die Zellzahl geringfügig auf durchschnittlich  $1,3 \times 10^5$ /ml (Abb. 4.1). Über die folgenden 72 h nach Bestrahlung konnte ein exponentielles Wachstum in der Kontrolle sowie nach 2 Gy Bestrahlung gefunden werden. So stieg die Zellzahl der Kontrolle von  $2,1 \times 10^5$ /ml bei 24 h p.r. auf  $6,8 \times 10^5$ /ml 72 h nach Bestrahlung an. Während des gleichen Zeitraums stiegen die mit 2 Gy bestrahlten Zellen von  $2,1 \times 10^5$ /ml auf  $4,9 \times 10^5$ /ml an. Über den gleichen Zeitraum konnte in den mit 5 Gy und 8 Gy bestrahlten Zellen ein nur geringer Anstieg der Zellzahl von  $1,4 \times 10^5$ /ml (5 Gy) bzw.  $1,3 \times 10^5$ /ml (8 Gy) auf  $2,4 \times 10^5$ /ml (5 Gy) bzw.  $1,5 \times 10^5$ /ml (8 Gy) gefunden werden.

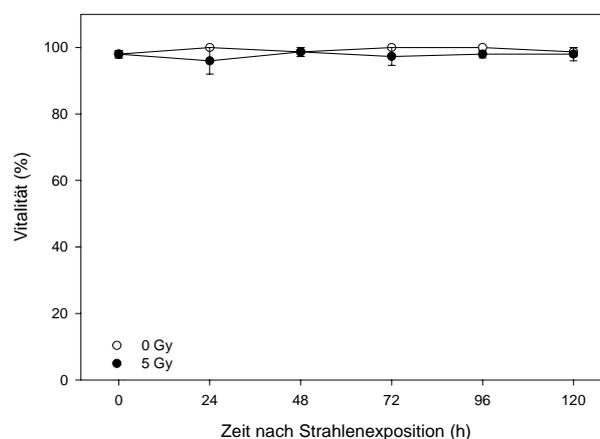


**Abb. 4.1** Bestimmung der Zellzahl der mit 0, 2, 5 und 8 Gy bestrahlten A549 Zellen bis zu einem Zeitpunkt von 120 h nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 h vor Strahlenexposition ausgesät. Mit 0 h ist der Zeitpunkt angegeben, zu dem die Strahlenexposition stattfand. Die Symbole stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Ausgehend vom Zellwachstum innerhalb der ersten 24 h bzw. 48 h wurde die Verdopplungszeit bestimmt. Mit steigender Strahlendosis konnte hierbei ein Anstieg der Zellverdopplungszeit gezeigt werden. Für die Kontrolle betrug die Zellverdopplungszeit 22,8 h +/- 0,4. Nach Strahlenexposition stieg die

Zellverdopplungszeit von 36,4 h  $\pm$  0,4 bei 2 Gy und auf 40,4 h  $\pm$  7,8 bei 5 Gy Bestrahlung. Die Zellverdopplungszeit wurde für die Strahlenexposition mit 8 Gy auf einen Wert von 154,9  $\pm$  45,1 berechnet.

Des Weiteren wurden die Adhäsivität und Vitalität der Zellen überprüft. Die Adhäsivität der strahlenexponierten Zellen war zu allen beurteilten Zeitpunkten vergleichbar zur Kontrolle. Die Vitalität (Abb. 4.2) der Kontrolle lag zu allen Zeitpunkten zwischen 98 %  $\pm$  1,2 und 100 %  $\pm$  0,0. Die Vitalität der mit 5 Gy strahlenexponierten Zellen lag zu allen Zeitpunkten nur geringfügig unterhalb, bzw. entsprach zu den anderen Untersuchungszeitpunkten denen der 0 Gy Kontrolle.

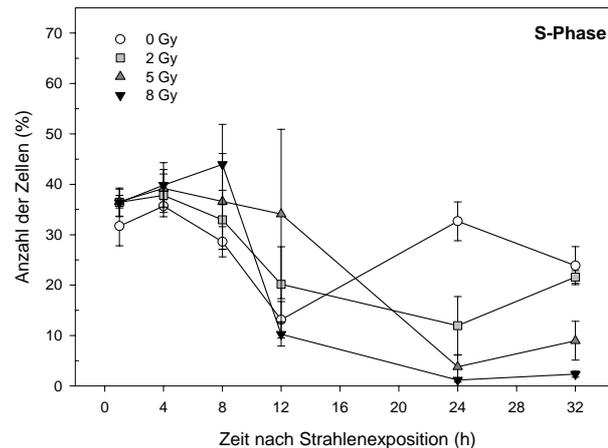


**Abb. 4.2** Beurteilung der Vitalität der Zellen. Es wurde die Vitalität der mit 0 Gy und 5 Gy bestrahlten A549 Zellen bis zum Zeitpunkt von 120 h nach Bestrahlung untersucht. Mit 0 h ist der Zeitpunkt angegeben, zu dem die Strahlenexposition stattfand. Die Symbole stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Zusammenfassend konnte über den gesamten gemessenen Zeitraum bei den bestrahlten Zellen eine der Kontrolle vergleichbare Adhäsivität und Vitalität festgestellt werden.

## 4.2 Proliferation

Mit Hilfe der BrdU/DNA Doppelmarkierungstechnik wurden die synchronisierten und in der S-Phase bestrahlten Zellen markiert und deren Transition durch die S-Phase bis 32 h nach Strahlenexposition mit 2 Gy, 5 Gy und 8 Gy relativ zur unbestrahlten Kontrolle weiterverfolgt (Abb. 4.3).



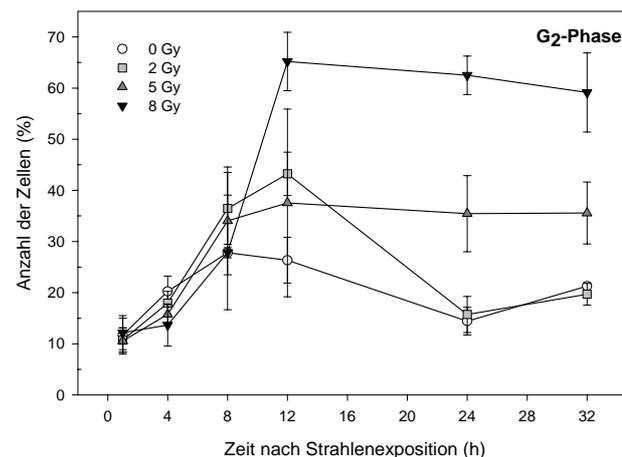
**Abb. 4.3** Darstellung des während der Strahlenexposition sich in S-Phase befindlichen Anteils der BrdU/DNA markierten Zellen und deren Transition durch die S-Phase. 0 h ist der Zeitpunkt der Strahlenexposition. Die Symbole stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Es sind nur die sich in S-Phase befindenden Zellen dargestellt.

Zum Bestrahlungszeitpunkt belief sich in der Kontrolle der Anteil der in S-Phase befindlichen Zellen auf 31,7 %  $\pm$  3,9. Ein vergleichbarer Anteil der in S-Phase befindlichen Zellen von 36,4-36,6 % konnte nach Strahlenexposition mit 2-8 Gy gemessen werden. Sowohl in der Kontrolle als auch in den bestrahlten Kulturen stieg der S-Phase-Anteil bis 4 h nach Bestrahlung auf Werte von 35,7 %  $\pm$  1,3 in der Kontrolle bzw. 37,8-39,8 % der mit 2-8 Gy bestrahlten Kulturen an. Ein weiterer Anstieg der S-Phase-Zellen konnte lediglich nach 8 h mit einer Bestrahlung von 8 Gy gezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Anteil 43,9 %  $\pm$  8,0. Zum gleichen Zeitpunkt nahm die Anzahl der sich in S-Phase befindlichen Zellen mit steigender Strahlendosis bis 12 h nach Bestrahlung invers ab. In den Kontrollkulturen wurden 13,1 %  $\pm$  3,6 S-Phase-Zellen gefunden. Zum gleichen Zeitpunkt betrug die Anzahl der S-Phase-Zellen nach 2 Gy 20,2 %  $\pm$  7,5 bzw. 34,1 %  $\pm$  16,8 nach 5 Gy. Im Gegensatz dazu wurden nach einer Strahlenexposition mit 8 Gy ebenfalls bei 12 h p.r. mit 10,3 %  $\pm$  2,4 Kontrollwerte erreicht. Über den folgenden Zeitraum von 24-32 h nach Bestrahlung konnte für die Kontrolle eine Auffüllung der nach Strahlenexposition folgenden S-Phase gefunden werden. So betrug die Anzahl der S-Phase-Zellen 24 h p.r. 32,7 %  $\pm$  3,9 und erreichte Werte wie zum Zeitpunkt 0 h nach Bestrahlung. Bis 32 h nach Bestrahlung konnte zudem eine Entleerung der nach Bestrahlung folgenden S-Phase gezeigt werden. Dabei reduzierte sich die Anzahl der S-Phase-Zellen der Kontrolle auf 23,9 %  $\pm$  3,8.

Über den gleichen Zeitraum von 24-32 h nach Strahlenexposition konnte eine von der Strahlendosis abhängige verzögerte Auffüllung der nach Bestrahlung folgenden

S-Phase gezeigt werden. So nahm zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy die Anzahl der S-Phase-Zellen relativ zu 12 h p.r. weiter ab (von 20,2 % +/- 7,5 auf 12 % +/- 5,8) und stieg 32 h p.r. auf 21,6 % +/- 1,3 an. Im Gegensatz hierzu konnte nach Bestrahlung mit 5 Gy und 8 Gy über den Zeitraum von 24-32 h kein ausgeprägter Anstieg der Anzahl der S-Phase-Zellen gezeigt werden. Stattdessen wurde relativ zu den Werten gemessen bei 12 h ein weiterer Abfall der Anzahl der S-Phase-Zellen 24 h nach Bestrahlung von 34,1 % +/- 16,8 auf 3,8 % +/- 2,3 (5 Gy) bzw. von 10,25 % +/- 2,4 auf 1,2 % +/- 0,4 (8 Gy) gefunden. Zum Zeitpunkt 32 h nach Strahlenexposition blieb nach 8 Gy Bestrahlung der Wert (2,3 % +/- 0,6) konstant und zeigte bei 5 Gy nur eine geringe ansteigende Tendenz (9 % +/- 3,8). Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass in Abhängigkeit der Höhe der Strahlenexposition eine zunehmende zeitliche Verzögerung in der Auffüllung der nach Bestrahlung folgenden S-Phase passierte.

Die in der S-Phase bestrahlten Zellen konnten nach Verlassen der S-Phase mit Hilfe der BrdU/DNA-Doppelmarkierung in der folgenden G<sub>2</sub>-Phase untersucht werden (Abb. 4.4). Bis zu 8 h nach Strahlenexposition nahm die Zahl der in der G<sub>2</sub>-Phase vorhandenen Zellen sowohl in der Kontrolle als auch in den strahlenexponierten Zellen stetig zu. So betrug die Zellanzahl für die Kontrolle wie für die bestrahlten Kulturen in der G<sub>2</sub>-Phase relativ konstant bei 1 h zwischen 10,6-12,2 %, während bei 8 h die Streuung zwischen 27,8 -36,5 % lag.

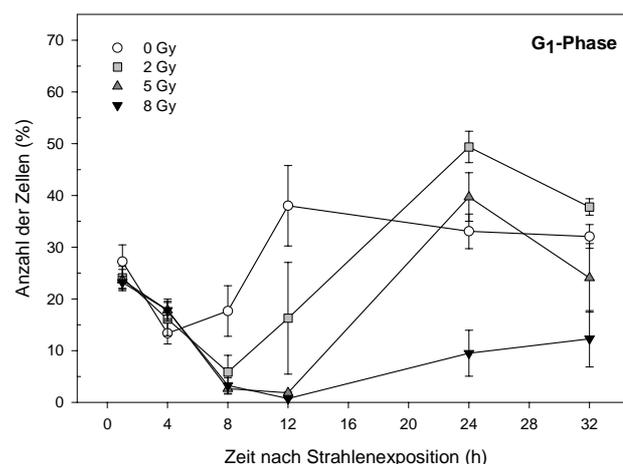


**Abb. 4.4** Darstellung des während der Strahlenexposition sich in S-Phase befindlichen Anteils der BrdU/DNA markierten Zellen und deren Transition durch die nach Bestrahlung folgende G<sub>2</sub>-Phase. Es sind nur die sich in der G<sub>2</sub>-Phase befindenden Zellen dargestellt. 0 h ist der Zeitpunkt der Strahlenexposition. Die Symbole stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Danach stieg die Zellanzahl dosisabhängig bis 8 h nach Strahlenexposition von 27,8 % +/- 1 in der Kontrolle auf jeweils 36,5 % +/- 7,0 bzw. 34,0 % +/- 10,5 und 27,9 % +/- 11,2 bei 2 Gy, 5 Gy und 8 Gy. Nur die strahlenexponierten Kulturen wiesen einen weiteren Anstieg in der Anzahl der G<sub>2</sub>-Phase-Zellen bis 12 h nach Bestrahlung auf, während die Anzahl der G<sub>2</sub>-Phase-Zellen der Kontrollen wieder leicht absank (von 27,8 % nach 8 h p.r. auf 26,3 % +/- 4,5 nach 12 h p.r.). Dabei konnte mit einer gewissen Dosisabhängigkeit nach 12 h p.r. ein Anstieg der Anzahl der G<sub>2</sub>-Phase-Zellen auf 43,2 % +/- 4,2 bei 2 Gy, 37,6 % +/- 18,4 bei 5 Gy und 65,2 % +/- 5,7 bei 8 Gy beobachtet werden. Mit Ausnahme nach Strahlenexposition mit 2 Gy veränderte sich die Anzahl der in der G<sub>2</sub>-Phase befindlichen Zellen bei den beiden höheren Strahlendosen bis zu 32 h nach Bestrahlung nicht. Nach 2 Gy Strahlenexposition wurden indes während des Zeitraums von 24-32 h nach Bestrahlung Kontrollwerte erreicht.

Zusammenfassend konnte für alle drei Strahlendosen ein G<sub>2</sub>-Block gezeigt werden. Dabei kam es nach Bestrahlung mit 2 Gy zu einer Auflösung des G<sub>2</sub>-Blocks 24 h nach Strahlenexposition, während bei höheren Strahlendosen von 5 Gy und 8 Gy jeweils von 12-32 h nach Strahlenexposition der G<sub>2</sub>-Block mit konstanten Anzahlen von Zellen erhalten blieb. Dabei belief sich die Anzahl der im G<sub>2</sub>-Block liegenden Zellen auf 35,5-35,6 % nach 5 Gy bzw. 59,1-65,2 % nach Bestrahlung mit 8 Gy.

Die in der S-Phase bestrahlten Zellen konnten nach Verlassen der G<sub>2</sub>-Phase mit Hilfe der BrdU/DNA-Doppelmarkierung in der folgenden G<sub>1</sub>-Phase untersucht werden (Abb. 4.5).



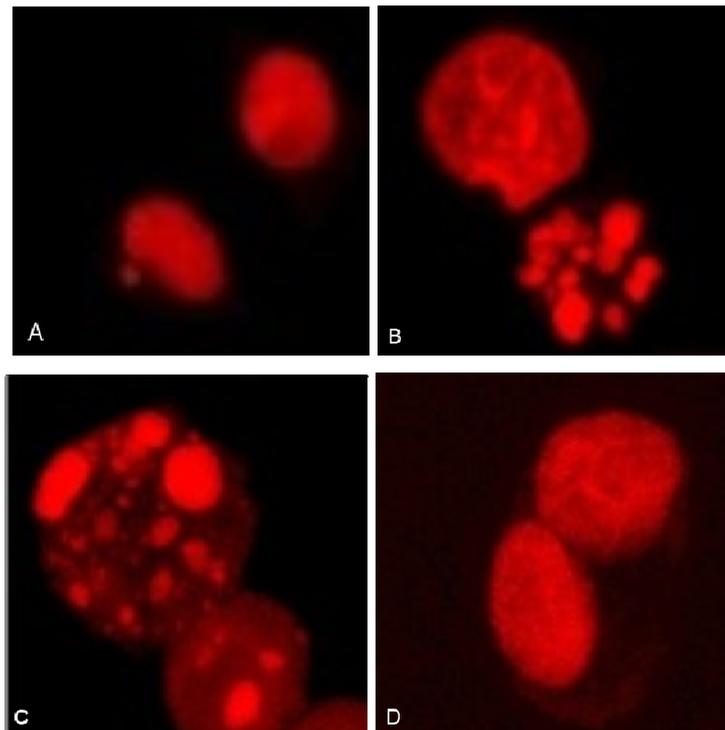
**Abb. 4.5** Darstellung des während der Strahlenexposition sich in S-Phase befindlichen Anteils der BrdU/DNA markierten Zellen und deren Transition durch die nach Bestrahlung folgende G<sub>1</sub>-Phase. Es sind nur die sich in der G<sub>1</sub>-Phase befindenden Zellen dargestellt. 0 h ist der Zeitpunkt der Strahlenexposition. Die Symbole stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Zum Zeitpunkt der Strahlenexposition befand sich eine vergleichbare Anzahl von bestrahlten Zellen (23,2-24,1 %) wie unbestrahlten Kontrollen (27,2 %  $\pm$  3,3) in der G<sub>1</sub>-Phase (Abb. 4.5). Die Anzahl der unbestrahlten G<sub>1</sub>-Phase Zellen nahm bis 8 h nach Bestrahlung ab (von 27,2 % bei 0 h p.r. auf 17,7 % bei 8 h p.r.). Danach war ein Anstieg der unbestrahlten Kontrollen auf 38,0 %  $\pm$  7,8 ab 12 h nach Bestrahlung zu verzeichnen. Diese Prozentzahl änderte sich während des weiteren Untersuchungszeitraums bis 32 h nach Bestrahlung nur unwesentlich. So betrug die Anzahl der unbestrahlten Kontrollen 33,1 %  $\pm$  3,4 nach 24 h und 32,1 %  $\pm$  2,3 bei 32 h nach Bestrahlung. Während der Anstieg der unbestrahlten G<sub>1</sub>-Phase Zellen bei 12 h nach Bestrahlung sein Maximum erreicht hatte, konnte dieses für die strahlenexponierten Zellen erst 24 h (2 Gy und 5 Gy) und 32 h (8 Gy) nach Bestrahlung gezeigt werden. Die korrespondierende Anzahl der in G<sub>1</sub>-Phase befindlichen Zellen betrug dabei 49,4 %  $\pm$  3,4 nach 2 Gy und 39,7 %  $\pm$  4,0, nach 5 Gy. Für die mit 8 Gy exponierten Zellen wurden als höchste Prozentzahl 12,3 %  $\pm$  5,5 G<sub>1</sub>-Phase Zellen gemessen.

Zusammenfassend konnte somit ein mit der Höhe der Strahlenexposition korrelierender verzögerter Eintritt der aus dem G<sub>2</sub>-Block kommenden Zellen in die G<sub>1</sub>-Phase gezeigt werden. Die Ausbildung eines strahleninduzierten G<sub>1</sub>-Blocks konnte nicht beurteilt werden, da sich die Mehrzahl der unbestrahlten Kontrollzellen auch 32 h nach Bestrahlung noch in der G<sub>1</sub>-Phase aufhielten.

### 4.3 Zelltod

Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellkerne mit Ethidiumbromid angefärbt. Abnormale Zellen waren bis zu 72 h nach Strahlenexposition vorwiegend durch vergrößerte und transparente Zellkerne charakterisiert. Zu späteren Zeitpunkten nahm der Anteil polymorphkerniger Zellen zu. Zu einem geringeren Anteil wurden zu allen Zeitpunkten auch binukleäre Zellen gefunden. In der Abbildung 4.6 wurden fluoreszenzmikroskopische Beispiele für eine mikrokernhaltige (Abb. 4.6 A), eine apoptotische (Abb. 4.6 B), eine Zelle mit vergrößertem Zellkern (Abb. 4.6 C) und eine binukleäre Zelle dargestellt (Abb. 4.6 D)



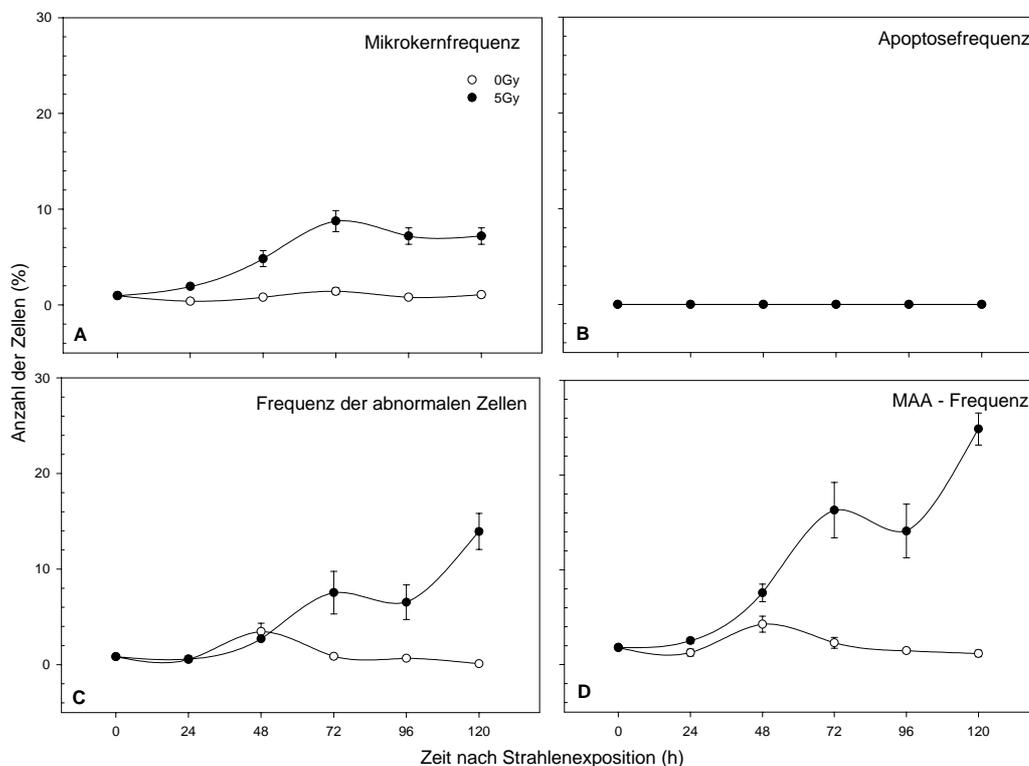
**Abb. 4.6** Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der mit Ethidiumbromid angefärbten Zellen. Das Zytoplasma ist leicht angefärbt, während die Zellkerne als deutlich sichtbare rote Strukturen imponieren. In den einzelnen Abbildungen sind dargestellt: **A:** ein mikrokernhaltiger Zellkern, wobei der Mikrokern links unterhalb des Zellkernes liegt. Der Zellkern rechts oben weist keinen Mikrokern auf. **B:** ein apoptotischer Zellkern unterhalb eines normalen Zellkerns. **C:** ein vergrößerter Zellkern, der zudem eine apoptotische Kondensation aufweist. **D:** ein binukleärer Zellkern, bei dem zwei Zellkerne in einer Zelle liegen.

Die Anzahl mikrokernhaltiger Zellen (Abb. 4.7 A), apoptotischer Zellen (Abb. 4.7 B) und abnormaler Zellen (Abb. 4.7 C) wurde bis 120 h nach Bestrahlung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Durch Bildung der Summe der zur gleichen Zeit gemessenen einzelnen Zelltodesformen konnte eine Bestimmung des von der Zelltodesform unabhängigen Maßes des Zelluntergangs (MAA) erreicht werden (Abb. 4.7 D).

Die in der S-Phase synchronisierten A549 Zellen zeigten zu allen Zeitpunkten nach Strahlenexposition weitgehend konstante Kontrollwerte. So betrug die Frequenz mikrokernhaltiger Zellen der Kontrolle zwischen 0,4-1,4 %. Zu keinem Zeitpunkt nach Bestrahlung konnte bei der Kontrolle eine Apoptose gefunden werden, während die Anzahl abnormaler Zellen in der Regel zwischen 0,1-0,9 % lag. Lediglich 48 h nach Bestrahlung wurde bei der Kontrolle ein leichter Anstieg der abnormalen Zellen auf 3,5 % +/- 0,9 gefunden.

Gegen die Zeit nach Strahlenexposition stieg die Anzahl mikrokernhaltiger und abnormaler Zellen bei den mit 5 Gy strahlenexponierten Zellen an, während die

Anzahl apoptotischer Zellen den Kontrollwerten entsprach. So konnte 72 h p.r. eine maximale Mikrokernfrequenz von 8,8 %  $\pm$  1,1 ermittelt werden. Ein parallel dazu gleichsinnig verlaufender Anstieg auf eine fast gleiche Anzahl abnormaler Zellen von 7,5 %  $\pm$  2,2 konnte ebenfalls 72 h p.r. gemessen werden. Während die Anzahl mikrokernhaltiger Zellen danach wieder abnahm, wurde 120 h nach Bestrahlung ein weiterer Anstieg der Anzahl abnormaler Zellen auf 13,9 %  $\pm$  1,9 gefunden. Nach Bildung der Summe der zur gleichen Zeit gemessenen einzelnen Zelltodesformen (MAA) konnte ein stetiger Anstieg der MAA-Frequenz mit einer Anzahl von 16,3 %  $\pm$  2,9 72 h nach Bestrahlung ermittelt werden. Dieser Prozentsatz änderte sich nur geringfügig 96 h p.r. (14,1 %  $\pm$  2,8), stieg jedoch auf 24,9 %  $\pm$  1,7 bei 120 h nach Strahlenexposition.



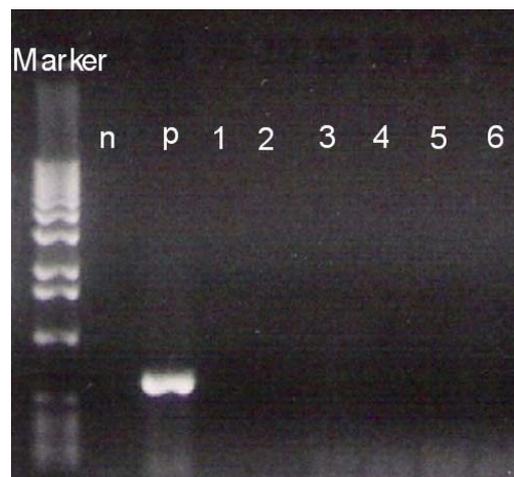
**Abb. 4.7** Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Anzahl mikrokernhaltiger Zellen (A), apoptotischer Zellen (B) und abnormaler Zellen (C) bis 120 h nach Bestrahlung. Durch Bildung der Summe der zur gleichen Zeit gemessenen einzelnen Zelltodesformen wurde eine Bestimmung des von der Zelltodesform unabhängigen Maßes des Zelluntergangs (MAA) erreicht (D). Die Symbole stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

Zusammenfassend war die Form des Zelltodes zu etwa gleichen Anteilen durch das Auftreten mikrokernhaltiger und abnormaler Zellen charakterisiert. Die über den gemeinsamen Zeitraum maximal gemessene MAA-Frequenz der mit 5 Gy strahlenexponierten Zellen, lag bei 24,9 %  $\pm$  1,7.

## 4.4 Genexpression

### 4.4.1 Isolation der Gesamt-RNA

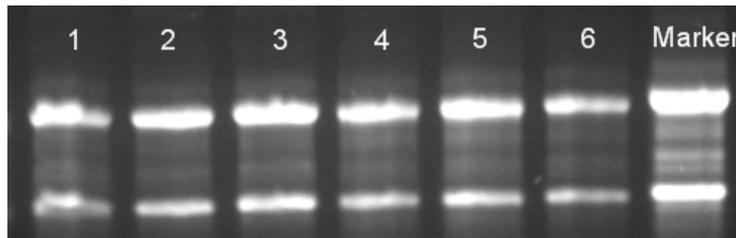
Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde routinemäßig jede Probe einem DNase-Verdau unterzogen und die Effizienz des Verdau mittels konventioneller PCR (mit Aktinprimern) untersucht. In der Abb. 4.8 ist das Ergebnis nach DNA-Verdau dargestellt: Während in der Kontrollprobe (genomische DNA aus HL-60 Zellen) eine Bande erkennbar ist (Nachweis des für Aktin kodierenden Gens), war diese Bande bei den zu unterschiedlichen Zeitpunkten isolierten Gesamt-RNA Proben aus A549 Zellen eines Versuchs nicht nachweisbar. Dies galt als Beleg für die weitgehende Freiheit der Proben von genomischer DNA. Nur solche RNA-Proben, die dieses Qualitätskriterium erfüllten, wurden weiterprozessiert. In ca. 10 % der Fälle musste die Gesamt-RNA Probe ein zweites Mal mit DNasen behandelt werden, bevor ein befriedigendes Ergebnis - wie in Abb. 4.8 dargestellt - erzielt werden konnte.



**Abb. 4.8** PCR zur Überprüfung der Effizienz des DNase-Verdau. Als Längenstandard (Marker) diente eine käuflich erwerbbar Standard-DNA. Als positive Kontrolle wurde die DNA von MCF-7 Zellen genutzt. Das Vorhandensein einer Bande in der Positivkontrolle (p) und die Abwesenheit einer Bande in der Negativkontrolle (n) dient der Überprüfung des korrekten Ablaufes der PCR. Daneben sind wie angegeben die 0 Gy- Kontroll-Proben und die mit 5 Gy bestrahlten Proben des gleichen Zeitpunktes nach Bestrahlung hintereinander angeordnet (1: 0 Gy 2 h, 2: 5 Gy 2 h, 3: 0 Gy 8 h, 4: 5 Gy 8 h, 5: 0 Gy 24 h, 6: 5 Gy 24 h) In den Proben der isolierten Gesamt-RNA aus den einzelnen Untersuchungszeitpunkten waren keine Banden nachzuweisen.

Die Menge der isolierten Gesamt-RNA nach DNase-Verdau betrug zwischen 180-290 µg pro Versuchszeitpunkt und wurde spektralphotometrisch bestimmt (siehe Anhang Tab.9.9). Die bei 260 nm (Nuklidbestimmung) und 280 nm (Nuklid- und Proteinbestimmung) gemessenen Absorptionen der RNA-Proben wiesen typischerweise Quotienten (260/280 nm) zwischen 1,8-2,1 auf und lagen im zu

erwartenden Normalbereich. Mit einem Mengenverhältnis der 28S/18S-Banden von ca. 2:1 und ohne Hinweise auf stattgehabte Degradation (zwei klare Banden ohne dazwischen oder darunter liegenden Degradationsprodukten), galten die Qualitätsmerkmale als erfüllt und die RNA-Proben wurden entweder bei -20°C eingefroren oder unmittelbar weiterprozessiert. Ein repräsentatives Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA eines Versuchs über den vollständigen Zeitraum ist in der Abb. 4.9 wiedergegeben.



**Abb.4.9** Gelelektrophorese aller zu verschiedenen Zeitpunkten nach Strahlenexposition isolierter Gesamt-RNA Proben eines Versuchs. Als Längenstandard (Marker) diente eine käuflich erwerbbar Gesamt-RNA-Probe. Neben dem Marker sind wie angegeben die 0 Gy-Kontroll-Proben und die mit 5 Gy bestrahlten Proben des gleichen Zeitpunktes nach Bestrahlung hintereinander angeordnet (1: 0 Gy 2 h, 2: 5 Gy 2 h, 3: 0 Gy 8 h, 4: 5 Gy 8 h, 5: 0 Gy 24 h, 6: 5 Gy 24 h). Es wurde der Gelbereich, der die 28S- und 18S- Banden zeigt, mittels Geldokumentationssystem digitalisiert. Es konnten in keiner Probe Degradationsprodukte unterhalb oder zwischen den Banden gefunden werden.

Um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen, wurden die spektralphotometrischen Messungen zur Mengenbestimmung der RNA der Proben vor ihrer Verwendung für den Atlas Array nochmals überprüft. In keinem Fall konnte eine erhebliche Abweichung von den zuvor gemessenen Werten gefunden werden. Nach diesen letzten Kontrollen wurden die Gesamt-RNA Proben für den Atlas Array eingesetzt.

#### 4.4.2 Konvertierung der mRNA in radioaktiv markierte cDNA

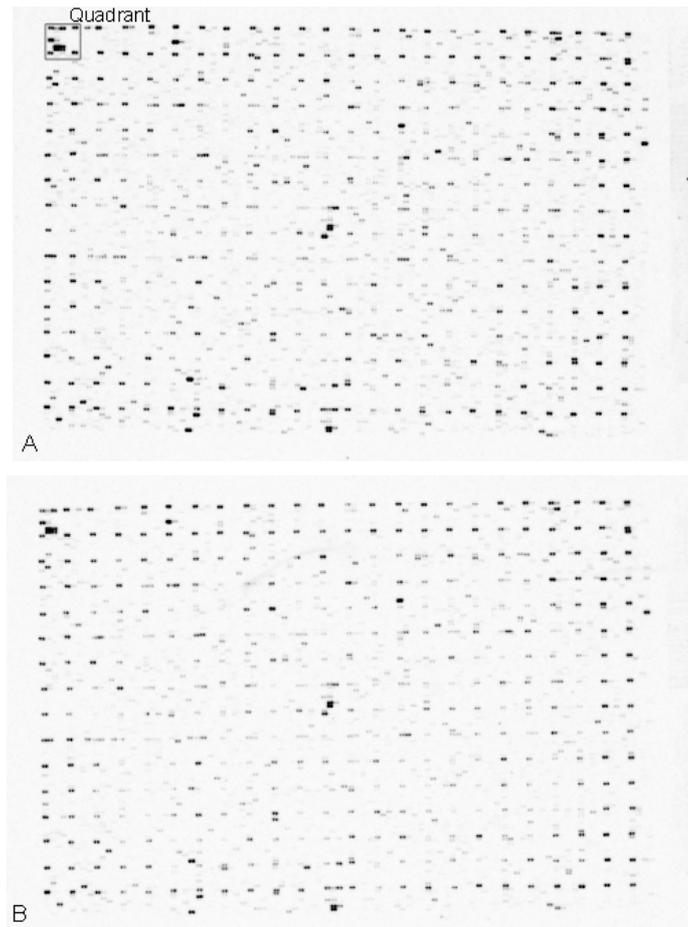
Mittels reverser Transkriptase und „Random“ Primern wurde die Gesamt-RNA in cDNA konvertiert und gleichzeitig radioaktiv markiert. Die radioaktiv markierte cDNA wurde von den nicht eingebauten radioaktiven Nukliden nach mehreren Waschschritten über eine Säule nach Elution getrennt. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt und nach jedem Elutionsschritt wurde eine Szintillationsmessung durchgeführt. Typischerweise konnten nach der 2. Elution zwischen  $35-99 \times 10^6$  cpm zur Hybridisierung auf den Array eingesetzt werden. Das Minimum an

einzusetzender radioaktiver cDNA von  $20 \times 10^6$  cpm (Angaben des Herstellers) wurde in allen Hybridisierungen überschritten. Die einzelnen eingesetzten Radioaktivitäten sind der Tab. 9.10 im Anhang zu entnehmen.

In einer separaten reversen Transkriptasereaktion wurde zudem eine mitgelieferte Kontrollprobe Gesamt-RNA in radioaktive cDNA konvertiert. Diese cDNA diente neben der Kontrolle der erfolgreichen RT-Reaktion auch als Markierung für die spätere Ausrichtung/Zuordnung der markierten Gene auf dem Array. Hierzu befand sich auf dem Array in gleichwertigen Abständen immobilisierte RNA-Spezies, an der nur die Kontrollproben-RNA hybridisierte. Dadurch entstand ein Raster (Grid) mit 384 Quadranten (Abb. 4.10), das als Orientierung und Zuordnung der 32 innerhalb des Grids liegenden Gene, an denen die Hybridisierung der Versuchsproben erfolgen konnte, diente. Alle 11.835 Gene waren auf dem Array zweifach an zwei nebeneinander liegenden Orten aufgebracht, so dass sie in der Autoradiographie als Doppelpunkte imponierten. Somit ergaben sich 64 Doppelpunkte pro Quadrant, wobei jeder Quadrant in jeder Ecke durch Grid-Doppelpunkte markiert war. Bei jeder Hybridisierung wurde eine Radioaktivität von ca.  $3 \times 10^6$  cpm der konvertierten cDNA der mitgelieferten Kontrollproben RNA eingesetzt. Die verwendete Radioaktivität von  $3 \times 10^6$  cpm führte erfahrungsgemäß zu einer deutlich sichtbaren Markierung des Rasters. Die einzelnen eingesetzten Radioaktivitäten sind gleichfalls der Tab. 9.10 im Anhang zu entnehmen.

#### 4.4.3 Hybridisierung und Autoradiographie

Nach dem Hybridisieren und Waschen der Membranen wurden diese gegen einen Phosphorscreen exponiert und so die Ergebnisse mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 4.10). Für jede Hybridisierung wurden zwei Autoradiographien erstellt. Die erste Messung erfolgte nach ca. einem Tag (19 h - 22 h), die zweite nach ca. 7 Tagen. Auf diese Weise konnten auch schwach exprimierte Gene detektiert werden. Erfahrungsgemäß wurde jedoch die Autoradiographie des länger exponierten Phosphorscreens zur Auswertung verwendet, weil in keinem Fall eine Sättigung der Grauwerte, jedoch gleichzeitig auch schwach exponierte Gene zur Darstellung gebracht werden konnten. Sämtliche zur Auswertung verwendeten Autoradiographien sind im Anhang unter Abb. 9.1-9.6 zusammengestellt.



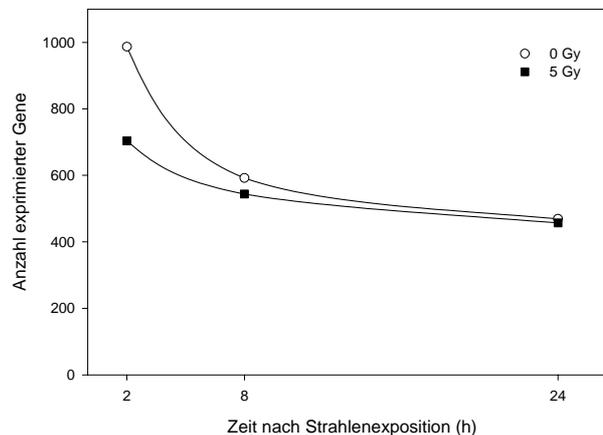
**Abb. 4.10** Autoradiographie der Hybridisierungsergebnisse einer cDNA-Probe ( **A**: 0 Gy, 8 h p.r., **B**: 5 Gy 8 h p.r.). Die Probe wurde auf eine Nylonmembran hybridisiert, die mit immobilisierter RNA-Spezies in gleichwertigen Abständen bestückt war, an denen nur die Kontrollproben RNA hybridisieren konnten. Dadurch entstand ein Raster (Grid) mit 384 Quadranten (Längsachse: 16 Quadranten, Querachse: 24 Quadranten), das als Orientierung und Zuordnung der 32 innerhalb des Quadranten liegenden Gene diente (zur Verdeutlichung wurde in der Abb. oben links eine Quadrant grau umrahmt). Alle Gene waren auf dem Array zweifach, nebeneinander aufgebracht, so dass sie in der Autoradiographie als Doppelpunkte imponierten (32 Gene x 2 Orte, macht 64 Spots pro Quadrant). Die unterschiedlichen Graustufen der punktförmigen Hybridisierungen korrelierten mit der Anzahl entsprechender mRNA-/cDNA-Spezies der Probe.

#### 4.4.4 Auswertung

##### 4.4.4.1 Exprimierte Gene

Als exprimierte Gene wurden alle Gene definiert, deren Summengrauwerte mindestens um das Zweifache über dem Hintergrundgrauwert lagen. Von allen 11.835 auf dem Array vorhandenen Genen konnten nur bis maximal 987 exprimierte Gene (12 %) bei 0 Gy und 2 h nach Strahlenexposition gefunden werden. Relativ zur Kontrolle konnten zum selben Zeitpunkt nach Strahlenexposition in den mit 5 Gy

bestrahlten Zellen 28,7 % weniger exprimierte Gene (704 Gene) nachgewiesen werden (Abb. 4.11). Schon 8 h bzw. 24 h nach Strahlenexposition glichen sich die Anzahl der exprimierten Gene jedoch soweit an, dass keine erheblichen Unterschiede zu verzeichnen waren. So waren bei der Kontrolle 24 h p.r. 469 Gene und bei den mit 5 Gy strahlenexponierten Zellen 457 Gene exprimiert.



**Abb. 4.11** Anzahl der exprimierten Gene der Kontrolle und der in S-Phase mit 5 Gy bestrahlten A549 Zellen 2 h, 8 h und 24h nach Strahlenexposition.

#### 4.4.4.2 Differentiell exprimierte Gene

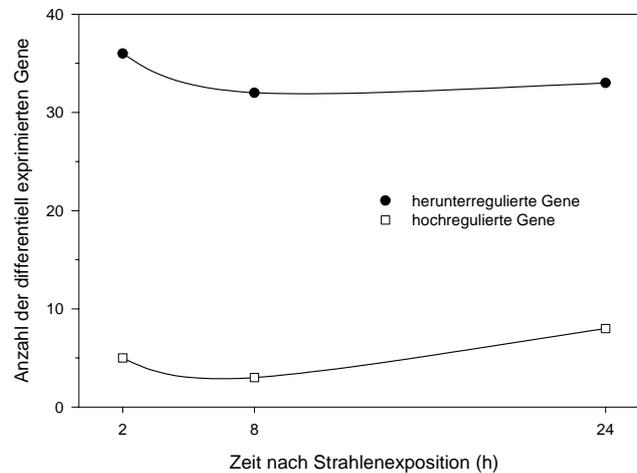
Als differentiell exprimierte Gene wurden alle Gene definiert, die relativ zur korrespondierenden Kontrolle einen Quotienten  $\geq 2$  bzw.  $\leq 0,5$  zeigten. Quotienten  $\geq 2$  wurden als hochreguliert, Quotienten  $\leq 0,5$  wurden als herunterreguliert bezeichnet.

##### 4.4.4.2.1 Anzahl der differentiell exprimierten Gene gegen die Zeit

Die Anzahl der herunterregulierten Gene zeigte mit 36 Genen 2 h nach Strahlenexposition und 33 bzw. 34 Genen 8 h und 24 h nach Bestrahlung nur geringe Schwankungen (Abb. 4.12).

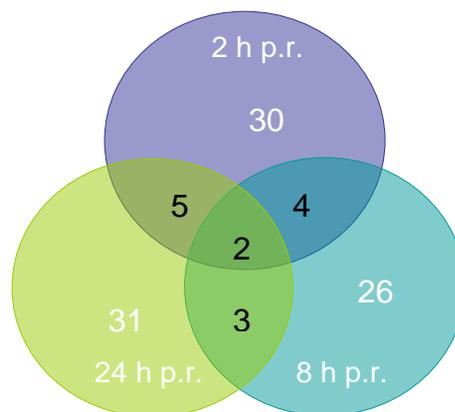
Der gleiche Trend zu gegen die Zeit nach Strahlenexposition konstanten Anzahlen differentiell exprimierter Gene konnte auch für die Anzahl der hochregulierten Gene gezeigt werden. Dabei lagen die Anzahl der differentiell hochregulierten Gene bei 5 Genen nach 2 h, 3 Genen nach 8 h und 8 Genen 24 h nach Bestrahlung gemessen (Abb. 4.12).

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Anzahl der herunterregulierten Gene immer die Anzahl der zeitlich korrespondierenden hochregulierten Gene um ein Vielfaches (mindestens um den Faktor 4,3 gemessen 24 h p.r. und höchstens um den Faktor 11 gemessen 8 h p.r.) übertraf.



**Abb. 4.12** Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene der in S-Phase mit 5 Gy bestrahlten Zellen.

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen differentiell exprimierten Gene gleichermaßen auch zu anderen Zeitpunkten gefunden wurden (Abb. 4.13). Die Anzahl der zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gleichermaßen differentiell exprimierten Gene betrug zwischen 3-5 Genen (Abb. 4.13). Relativ zur Gesamtzahl der zu diesen Zeitpunkten differentiell exprimierten Gene waren somit zwischen 11-16 % der Gene zu zwei verschiedenen Zeitpunkten gleichermaßen differentiell exprimiert.



**Abb. 4.13** Darstellung der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Gesamtzahl differentiell exprimierter Gene (Zahlen in nicht überschneidenden Kreisen), sowie der Anzahl der gleichermaßen auch zu anderen Zeitpunkten differentiell exprimierten Gene (Zahlen in überschneidenden Kreisen).

Die Anzahl der zu allen drei verschiedenen Zeitpunkten gleichermaßen differentiell exprimierten Gene betrug 2 Gene. Damit lag die Überschneidung der gleichermaßen differentiell exprimierten Gene bei 6,5-7,6 % relativ zur Gesamtzahl der zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen differentiell exprimierten Gene.

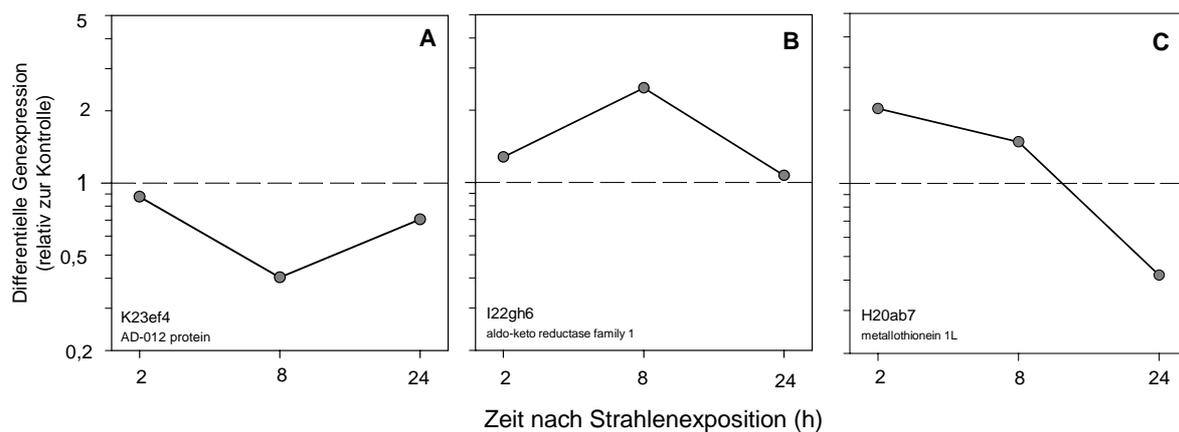
#### 4.4.4.2 Verhalten der differentiell exprimierten Gene gegen die Zeit

Es wurden 101 differentiell exprimierte Gene ermittelt. Jedes einzelne Gen ist im Anhang als Abb. 9.7–9.23 gegen die Zeit nach Strahlenexposition graphisch dargestellt.

Unter Berücksichtigung der Art der Genregulation (hoch- oder herunterreguliert) ergab sich eine Einteilung in

- Gene, die während der Zeit nach Strahlenexposition Kontrollwerte oder eine Herunterregulation der differentiellen Genexpression zeigten. Als Beispiel ist in Abb. 4.14 A die differentielle Genexpression des „*AD-012 protein*“ dargestellt. Zum Zeitpunkt 8 h p.r. wurde das Gen herunterreguliert (Ratio betrug 0,4), während es zu den anderen beiden Zeitpunkten nach Strahlenexposition Werte im Normalbereich annahm. Die Mehrzahl (86,1 %) der differentiell exprimierten Gene (87 Gene) fiel in diese Kategorie. Sie sind dem Anhang der Tabelle 9.12 zu entnehmen.
- Gene, die während der Zeit nach Strahlenexposition Kontrollwerte oder eine Hochregulation der differentiellen Genexpression zeigten. Als Beispiel ist in Abb. 4.14 B die differentielle Genexpression des „*aldo-keto reductase family 1*“ dargestellt. Dabei konnte erst ein Anstieg und dann ein Zurückkehren zu Normalwerten der differentiellen Genexpression gegen die Zeit gezeigt werden. Dabei stieg die differentielle Genexpression vom Kontrollwert 1,3 bei 2 h p.r., auf eine Hochregulation von 2,5 bei 8 h p.r. an und fiel schließlich wieder auf einen Kontrollwert (1,1) der differentiellen Genexpression 24 h nach Strahlenexposition ab (Abb. 4.14 B). Insgesamt 11 Gene (10,9 %) konnten in dieser Kategorie zusammengefasst werden. Sie sind dem Anhang der Tabelle 9.12 zu entnehmen.
- Gene, die während der Zeit nach Strahlenexposition Kontrollwerte und *sowohl* eine Hochregulation *als auch* eine Herunterregulation der differentiellen Genexpression zeigten. Als Beispiel ist in Abb. 4.14 C die differentielle

Genexpression des Gens „*metallothionein 1L*“ dargestellt. Es konnte ein kontinuierlicher Abfall der differentiellen Genexpression ausgehend von einer Hochregulation (Ratio 2,2) 2 h p.r. über Kontrollwerte (Ratio 1,6 8 h p.r.) auf eine Herunterregulation des Gens auf einen Wert von 0,4 bei 24 h nach Strahlenexposition gefunden werden (Abb. 4.14 C). Drei Gene (3 %) konnten in diese Kategorie eingeordnet werden. Sie sind dem Anhang der Tabelle 9.12 zu entnehmen.

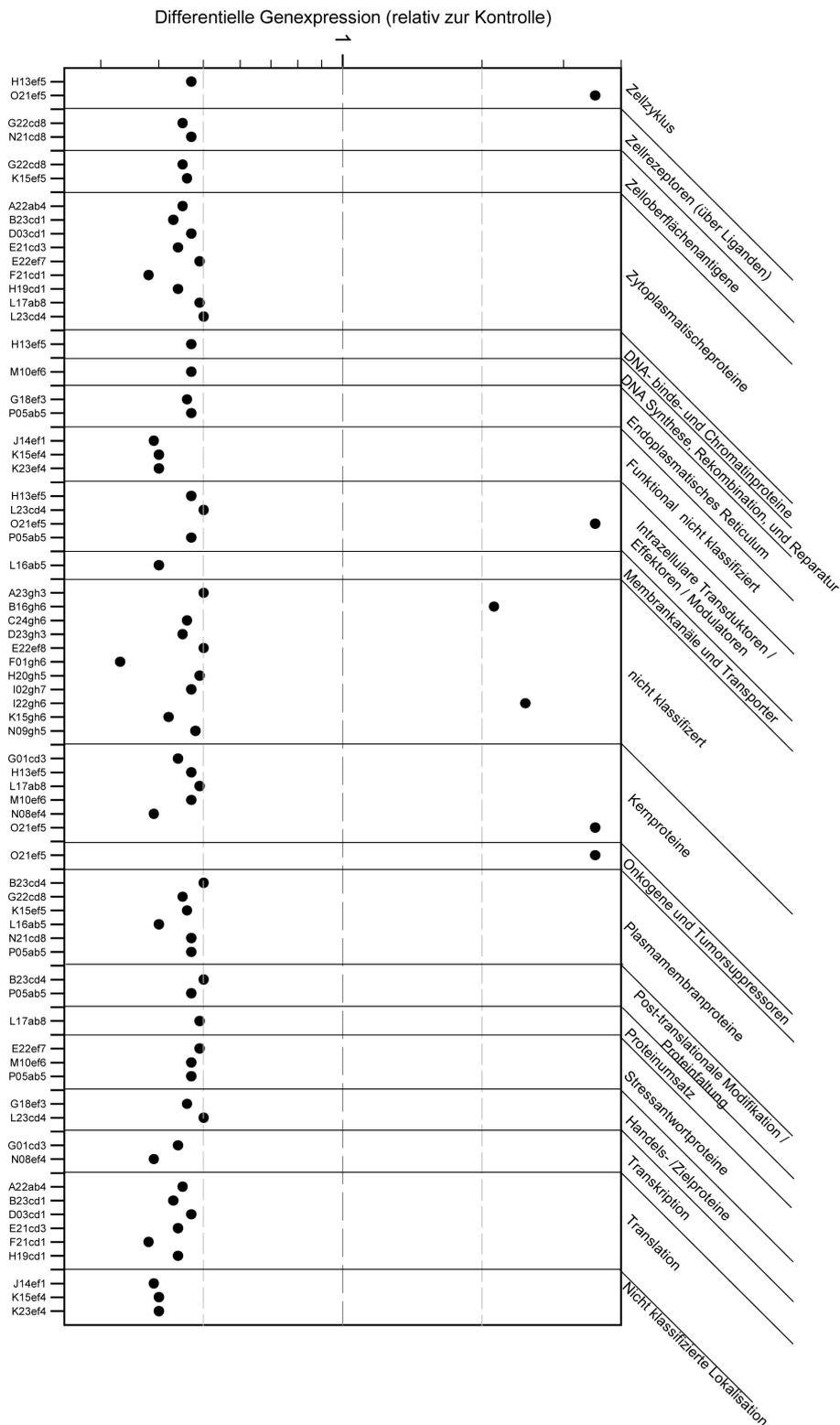


**Abb. 4.14** Unter Berücksichtigung der Hoch- und Herunterregulation ergab sich eine Einteilung in Gene, deren differentielle Genexpression Kontrollwerte und herunterreguliert (A) oder Kontrollwerte und hochreguliert (B) oder sowohl herunter- als auch hochreguliert (C) waren.

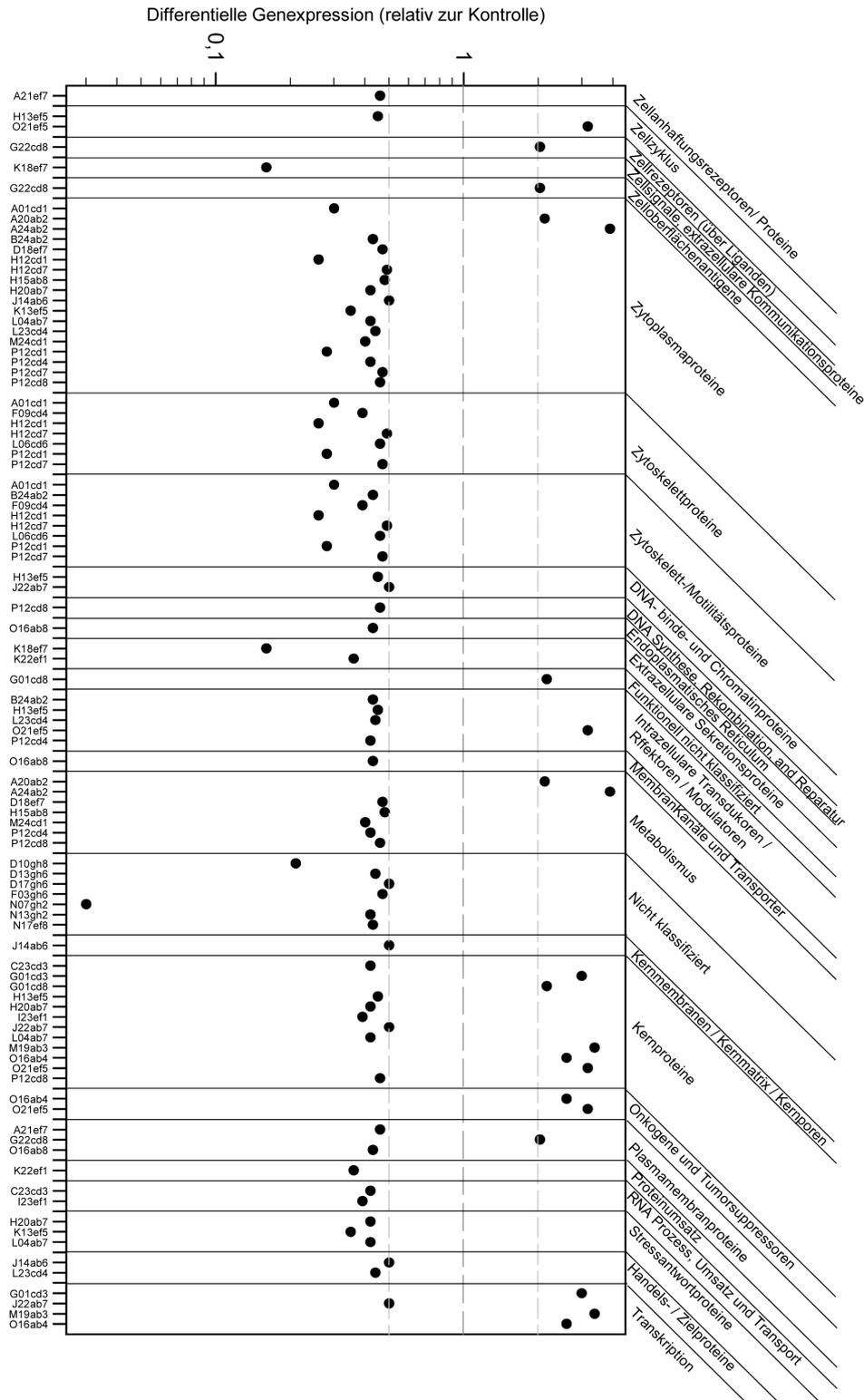
#### 4.4.4.2.3 Geneinteilung nach biologischer Funktion gemäß dem Herstellers (Clontech)

In Abb. 4.15 sind die 2 h nach Strahlenexposition gefundenen differentiel exprimierten Gene (dargestellt in Form der Koordinatenbezeichnungen des Arrays auf der unteren X-Achse) gemäß der biologischen Funktion (schräge Beschriftung in der oberen X-Achse), wie sie durch den Hersteller des Arrays (Clontech) vorgenommen wurde, wiedergegeben. Von insgesamt 87 Genen (Mehrfachnennungen mit eingeschlossen) stellten sich 87,4 % herunterreguliert und 12,6 % (11) Gene als hochreguliert dar. Vier der 11 hochregulierten Gene zeigten eine differentielle Genexpression im Bereich von 5, während die restlichen hochregulierten Gene um den Faktor 2-3 relativ zur Kontrolle differentiel überexprimiert waren. Die Mehrzahl der herunterregulierten Gene (97,4%) wies eine differentielle Genexpression relativ zur Kontrolle von 0,3-0,5 auf. Lediglich 2 Gene wiesen eine differentielle Genexpression  $\leq 0,08$  auf.





**Abb. 4.16** Aufteilung der 8 h nach Strahlenexposition gefundenen differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gengruppen, wie sie durch den Hersteller des Arrays (Clontech) vorgenommen wurde. Die Gennamen sind durch die entsprechenden Koordinatenbezeichnungen des Arrays auf der unteren X-Achse des Graphen (nach Ansicht links) wiedergegeben. Verschiedene Gene wurden unterschiedlichen biologischen Funktionsbereichen (schräge Beschriftung in der oberen X-Achse des Graphen, nach Ansicht rechts) zugeordnet. Infolge dessen kommen Mehrfachnennungen einzelner Gene vor.



**Abb. 4.17** Aufteilung der 24 h nach Strahlenexposition gefundenen differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gengruppen, wie sie durch den Hersteller des Arrays (Clontech) vorgenommen wurde. Die Gennamen sind durch die entsprechenden Koordinatenbezeichnungen des Arrays auf der unteren X-Achse des Graphen (nach Ansicht links) wiedergegeben. Verschiedene Gene wurden unterschiedlichen biologischen Funktionsbereichen (schräge Beschriftung in der oberen X-Achse des Graphen, nach Ansicht rechts) zugeordnet. Infolge dessen kommen Mehrfachnennungen einzelner Gene vor.

Das hier dargestellte Verhalten der differentiellen Genexpression stellte sich in gleicher Weise auch zu den Zeiten 8 h und 24 h nach Strahlenexposition dar: Von insgesamt 70 Genen (Mehrfachnennungen wieder eingeschlossen) stellten sich 8 h nach Strahlenexposition 91,4 % herunterreguliert und 6 Gene (8,6 %) hochreguliert dar (Abb. 4.16). Vier der hochregulierten Genen zeigten eine differentielle Genexpression um den Faktor 3-4 relativ zur Kontrolle, die anderen beiden Gene, welche beide in die Gruppe der „nicht klassifizierten“ Gene fielen, waren um den Faktor 2-3 relativ zur Kontrolle differentiell überexprimiert. Alle herunterregulierten Gene zeigten wiederum eine differentielle Genexpression relativ zur Kontrolle von 0,3-0,5.

In Abb. 4.17 sind die 24 h nach Strahlenexposition gefundenen differentielle exprimierten Gene gemäß ihrer biologischen Funktion dargestellt. Der Prozentsatz der herunterregulierten Gene, von insgesamt 96 Genen (Mehrfachnennungen), betrug 79,2 % und der Prozentsatz der hochregulierten Gene 20,8 % (20 Gene). Alle hochregulierten Gene zeigten eine differentielle Genexpression im Bereich 2-4 relativ zur Kontrolle. Die Mehrzahl der herunterregulierten Gene (86,8 %) wies wiederum eine differentielle Genexpression relativ zur Kontrolle von 0,3-0,5 auf. 10 Gene wiesen eine differentielle Genexpression  $< 0,3$  auf wobei 9 dieser 10 Gene zwischen 0,1-0,3 lagen und lediglich ein Gen eine differentielle Genexpression von  $\leq 0,03$  zeigte.

Als nächstes wurde untersucht, ob die den Gengruppen zugeordneten differentielle exprimierten Gene des Mikroarrays über- oder unterrepräsentiert waren. Aufgrund der Gesamtanzahl der nach Strahlenexposition gefundenen 101 differentielle exprimierten Gene wurde proportional auf die zu *erwartende* Anzahl der differentielle exprimierten Gene dieser funktionellen Gengruppe geschlossen. Durch den Vergleich mit der *tatsächlich gefundenen* Anzahl der differentielle exprimierten Gene nach Strahlenexposition konnte die Über- oder Unterrepräsentation der Genanzahl in dieser funktionellen Gengruppe *relativ zu der erwarteten* Anzahl der Gene dieser funktionellen Gengruppe angegeben werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind den Tabellen 4.1-4.3 zu entnehmen. Unter der Prämisse, dass ein Unterschied zwischen der erwarteten und gefundenen Anzahl der Gene von  $>2/<0,5$  auf vergleichbare Werte hinweist, entsprach zu unterschiedlichen Zeiten p.r. in den

Bezeichnung der funktionellen Gengruppe	Genanzahl/fkt. Gengruppe		
	bezogen auf 11.835 Gene	bezogen auf 101 Gene	
	Genanzahl	erwartete Genzahl	gefundene Genzahl
Apoptose assoziierte Proteine	207	1,5	2
Zellzyklus	258	1,9	1
Zellrezeptoren (über Aktivitäten)	442	3,2	1
Zellrezeptoren (über Liganden)	675	5,0	3
Zellsignale, extrazelluläre Kommunikationsproteine	421	3,1	1
Zelloberflächenantigene	226	1,7	1
Zytoplasmatische Proteine	2323	17,1	14
Zytoskelettproteine	314	2,3	2
Zytoskelett- und Motilitätsproteine	327	2,4	2
Endoplasmatisches Reticulum	200	1,5	1
Extrazelluläre Sekretionsproteine	784	5,7	1
Funktionell nicht klassifiziert	923	6,8	3
Intrazelluläre Transduktoren/ Effektoren /Modulatoren	1272	9,3	5
Membrankanäle und Transporter	465	3,4	5
Metabolismus	1084	8,0	4
Mikrosomale Proteine	44	0,3	1
Mitochondriale Protein	304	2,3	6
Nicht klassifiziert	3508	25,8	8
Kernproteine	1913	14,1	4
Onkogene und Tumorsuppressoren	234	1,7	2
Plasmamembran Proteine	1951	14,3	5
Post-Translationale Modifikation/ Proteinfaltung	334	2,4	1
Proteinumsatz	433	3,2	2
RNA Prozess, Umsatz und Transport	277	2,0	2
Stressantwort Proteine	300	2,2	4
Handels-/ Zielproteine	534	3,9	1
Translation	213	1,6	2
Nicht klassifizierte Lokalisation	776	5,7	3

**Tab. 4.1** Gegenüberstellung der zum Zeitpunkt **2 h p.r.**, für die einzelnen funktionellen Gengruppen erwarteten Genanzahl zu den tatsächlich gefundenen differentiell exprimierten Genen. Von links nach rechts ist dargestellt: die Bezeichnung der funktionellen Gengruppe (Spalte 1) und die in dieser Gruppe auf dem Mikroarray abgebildete Genanzahl dieser funktionellen Gengruppe bezogen auf die gesamte Genanzahl von 11.835 Genen (Spalte 2). Ausgehend von 101 gefundenen differentiell exprimierten Genen wurde linear auf die erwartete Genanzahl der entsprechenden Gruppe geschlossen (Spalte 3). Die gefundene Anzahl differentiell exprimierter Gene ist in Spalte 4 wiedergegeben. Eine Überrepräsentation der Anzahl gefundener relativ zur Anzahl erwarteter Gene ist in dunkelgrau unterlegt. Eine Unterrepräsentation ist in hellgrau unterlegt.

meisten Fällen (50 % - 81,0 %) die gefundene Genanzahl einer funktionellen Gengruppe der erwarteten Anzahl der differentiell exprimierten Gene. Eine Unterrepräsentation, d.h. es wurden weniger differentiell exprimierte Gene als

erwartet in einer funktionellen Gengruppe gefunden, konnte in 14,3 - 42,3 % der untersuchten funktionellen Gengruppen gezeigt werden (Details, siehe Tab. 4.1-4.3).

Bezeichnung der funktionellen Gengruppe	Genanzahl/fkt. Gengruppe		
	bezogen auf 11.835 Gene	bezogen auf 101 Gene	
	Genanzahl	erwartete Genzahl	gefundene Genzahl
Zellzyklus	258	1,5	2
Zellrezeptoren (über Liganden)	675	4,0	2
Zelloberflächenantigene	226	1,3	2
Zytoplasmaproteine	2323	13,7	9
DNA-binde- und Chromatin proteine	179	1,1	1
DNA Synthese, Rekombination und Reparatur	192	1,1	1
Endoplasmatisches Reticulum	200	1,2	2
Funktionell nicht klassifiziert	923	5,8	3
Intrazelluläre Transduktoren/ Effektoren /Modulatoren	1272	7,5	4
Membrankanäle und Transporter	465	2,7	1
Nicht klassifiziert	3508	20,7	11
Kernproteine	1913	11,3	6
Onkogene und Tumorsuppressoren	234	1,4	1
Plasmamembranproteine	1951	11,6	6
Post-Translationale Modifikation/ Proteinfaltung	334	2	2
Proteinumsatz	433	2,6	1
Stressantwort Proteine	300	1,8	3
Handels-/ Zielproteine	534	3,2	2
Transkription	1052	6,2	2
Translation	213	1,3	6
Nicht klassifizierte Lokalisation	776	4,6	3

**Tab. 4.2** Gegenüberstellung der zum Zeitpunkt **8 h p.r.**, für die einzelnen funktionellen Gengruppen erwarteten Genanzahl zu den tatsächlich gefundenen differentiell exprimierten Genen. Von links nach rechts ist dargestellt: die Bezeichnung der funktionellen Gengruppe (Spalte 1) und die in dieser Gruppe auf dem Mikroarray abgebildete Genanzahl dieser funktionellen Gengruppe bezogen auf die gesamte Genanzahl von 11.835 Genen (Spalte 2). Ausgehend von 101 gefundenen differentiell exprimierten Genen wurde linear auf die erwartete Genanzahl der entsprechenden Gruppe geschlossen (Spalte 3). Die gefundene Anzahl differentiell exprimierter Gene ist in Spalte 4 wiedergegeben. Eine Überrepräsentation der Anzahl gefundener relativ zur Anzahl erwarteter Gene ist in dunkelgrau unterlegt. Eine Unterrepräsentation ist in hellgrau unterlegt.

Lediglich in vier Fällen wurde nach Strahlenexposition eine Überrepräsentation gefunden: Statt erwarteter 2,3 Gene wurde in der Gengruppe der mitochondrialen Proteine nach 2 h p.r. 6 Gene gefunden (Tab. 4.1). Zum Zeitpunkt 8 h p.r. wurden in der Gengruppe der Translation kodierenden Gene statt 1,3 erwarteter Gene, 6 Gene gefunden (Tab. 4.2). Statt der 2,6 bzw. 2,7 erwarteten Gene in den funktionellen

Gengruppen „Zytoskelettproteine“ und „Zytoskelett-/Motilitätsproteine“ wurden 24 h nach Strahlenexposition 7 bzw. 8 Gene gefunden (Tab. 4.3).

Bezeichnung der funktionellen Gengruppe	Genanzahl/fkt. Gengruppe		
	bezogen auf 11.835 Gene	bezogen auf 101 Gene	
	Genanzahl	erwartete Genzahl	gefundene Genzahl
Zellhaftungsrezeptoren/ Proteine	387	3,2	1
Zellzyklus	258	2,1	2
Zellrezeptoren (über Liganden)	675	5,5	1
Zellsignale, extrazelluläre Kommunikationsproteine	421	3,5	1
Zelloberflächenantigene	226	1,8	1
Zytoplasmaproteine	2323	18,8	18
Zytoskelettproteine	314	2,6	7
Zytoskelett/Motilitätsproteine	327	2,7	8
DNA-binde- und Chromatinproteine	179	1,4	2
DNA Synthese, Rekombination und Reparatur	192	1,5	1
Endoplasmatisches Reticulum	200	1,6	1
Extrazelluläre Sekretionsproteine	784	6,3	2
Funktionell nicht klassifiziert	923	7,5	1
Intrazelluläre Transduktoren/ Effektoren /Modulatoren	1272	10,3	5
Membrankanäle und Transporter	465	3,7	1
Metabolismus	1084	8,8	7
Nicht klassifiziert	3508	28,4	7
Kernmembranen/ Kernmatrix/ Kernporen	55	0,5	1
Kernproteine	1913	15,6	12
Onkogene und Tumorsuppressoren	234	1,9	2
Plasmamembran Proteine	1951	15,8	3
Proteinumsatz	433	3,6	1
RNA Prozess, Umsatz, und Transport	277	2,2	2
Stressantwort Proteine	300	2,4	3
Handels-/ Zielproteine	534	4,3	2
Transkription	1052	8,5	4

**Tab. 4.3** Gegenüberstellung der zum Zeitpunkt **24 h p.r.**, für die einzelnen funktionellen Gengruppen erwarteten Genanzahl zu den tatsächlich gefundenen differentiell exprimierten Genen. Von links nach rechts ist dargestellt: die Bezeichnung der funktionellen Gengruppe (Spalte 1) und die in dieser Gruppe auf dem Mikroarray abgebildete Genanzahl dieser funktionellen Gengruppe bezogen auf die gesamte Genanzahl von 11.835 Genen (Spalte 2). Ausgehend von 101 gefundenen differentiell exprimierten Genen wurde linear auf die erwartete Genanzahl der entsprechenden Gruppe geschlossen (Spalte 3). Die gefundene Anzahl differentiell exprimierter Gene ist in Spalte 4 wiedergegeben. Eine Überrepräsentation der Anzahl gefundener relativ zur Anzahl erwarteter Gene ist in dunkelgrau unterlegt. Eine Unterrepräsentation ist in hellgrau unterlegt.

Bei genauerer Betrachtung dieser funktionellen Gengruppe mit überrepräsentierter Anzahl differentiell exprimierter Gene fiel auf, dass die Mehrzahl der Gene für Tubulin und Aktin (insgesamt 6) kodierten (Tab. 4.4). Zudem konnte eine verstärkt nach 24 h einsetzende Herunterregulation der Gene gezeigt werden (Tab. 4.4). Im Detail zeigten 2 der neun Gene, die für das Zytoskelett kodierten, zum Zeitpunkt 2 h p.r. eine Herunterregulation (Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 und K-ALPHA-1). Ein Gen (tubulin, beta, 5) wies nur bei 8 h p.r. eine herunterregulierte differentielle Genexpression relativ zur Kontrolle auf. Sechs Gene jedoch (tubulin, beta, 2; tubulin, alpha 3; K-ALPHA-A; actin, beta; Rho GTPase activating protein 6; WAS protein family, member 3) zeigten eine Herunterregulation bei 24 h p.r.. Das Gen K-ALPHA-1 gehörte zu den „housekeeping genes“ und war somit mehrfach auf dem Array vorhanden. An einer Position auf dem Array wurde es nur zum Zeitpunkt 24 h p.r. exprimiert, an einer anderen Position erfolgte zusätzlich 2 h nach Strahlenexposition eine Herunterregulation relativ zur Kontrolle.

Array-koordinaten	Genname	Regulation zur Zeit p.r. (h)		
		2	8	24
A01cd1 P12cd1	K-ALPHA-1 (tubulin, alpha, ubiquitous)	R (1x 0,5)		R (2x 0,3)
F01gh6	TUBB4 (TUBB5; beta-5 ; tubulin, beta, 5)		R (0,3)	
F03gh6	TUBB2 (tubulin, beta, 2)			R (0,5)
F09cd4	TUBA3 (B-ALPHA-1; FLJ25113; tubulin, alpha 3)			R (0,4)
H12cd1,	K-ALPHA-A (tubulin, alpha, ubiquitous)			R (0,3)
H12cd7, P12cd7	ACTB (actin, beta)			R (2x 0,5)
B14ab2	ARGBP2 (KIAA0777; Arg/Abl-interacting protein ArgBP2)	R (0,5)		
B24ab2	ARHGAP6 (RHOGAP6; rhoGAPX-1; Rho GTPase activating protein 6)			R (0,4)
L06cd6	WASF3 (SCAR3; WAVE3; KIAA0900; WAS protein family, member 3)			R (0,5)

**Tab. 4.4** Differentiell exprimierte Gene die Zytoskelettproteine kodieren. In der Tabelle wird der Zeitpunkt der Genexpression nach Strahlenexposition einschließlich der Art der differentiellen Genexpression (R steht für Herunterregulation, H für Hochregulation) angegeben. Klein, grau und in Klammern wurde die Höhe der differentiellen Genexpression relativ zur Kontrolle angegeben. Zwei Gene, K-ALPHA-1 und ACTB, befanden sich mehrfach an unterschiedlichen Lokalisationen auf dem Array und wurden an zwei Positionen differentiell exprimiert, weshalb in Klammern 2 x der Wert der differentiellen Genexpression angegeben wurde. K-ALPHA-1 wurde auf den Positionen A01cd1 und P12cd1 differentiell exprimiert, jedoch nur auf der Position P12cd1 auch zum Zeitpunkt 2 h nach Strahlenexposition.

Auf dem Array wurden die ribosomalen Proteine keiner eigenen funktionellen Gengruppe zugeordnet. Es fiel jedoch auf, dass 8 Gene, die verschiedene

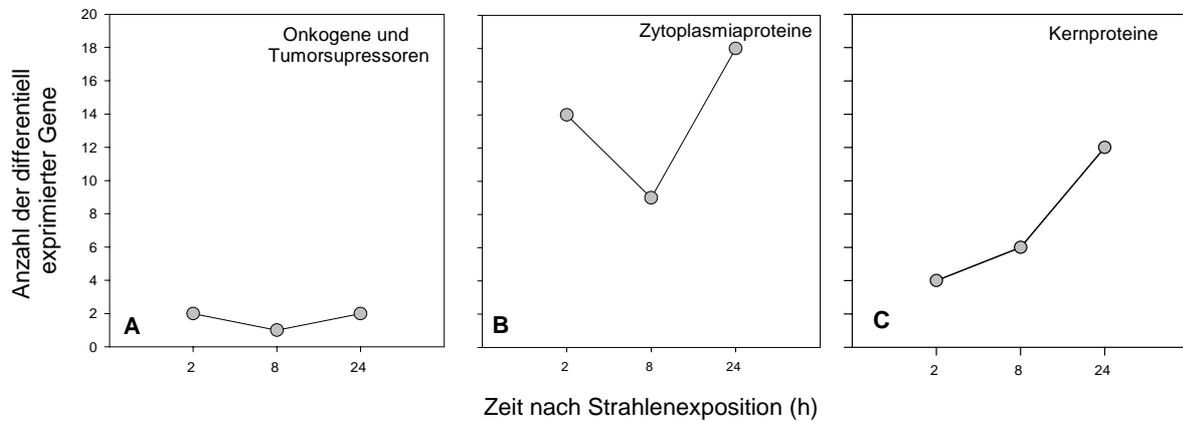
ribosomale Proteine kodieren, differentiell exprimiert waren (Tab. 4.5). Clontech ordnete diese Gene den Gengruppen für Zytoplasma- und Kernproteinen zu. Gene, die für ribosomale Proteine kodierten, waren im Prinzip durch eine verstärkt 8 h nach Strahlenexposition auftretende Herunterregulation charakterisiert (Tab. 4.5). Im Detail konnte nur für ein Gen (ribosomal protein S27) eine Hochregulation 24 h nach Strahlenexposition gezeigt werden. Bei 8 h p.r. zeigte das Gen zudem eine herunterregulierte differentielle Genexpression relativ zur Kontrolle. Zwei der 8 Gene zeigten zum Zeitpunkt 2 h p.r. eine Herunterregulation (ribosomal protein L34, ribosomal protein L10a), fünf Gene (ribosomal protein L4; ribosomal protein L7; ribosomal protein L5, ribosomal protein, large, P0; ribosomal protein S13) zeigten nur bei 8 h p.r. eine herunterregulierte differentielle Genexpression relativ zur Kontrolle.

Array-koordinaten	Genname	Regulation zur Zeit p.r. (h)		
		2	8	24
B23cd1	RPL4 (HRPL4; ribosomal protein L4)		R (0,4)	
D03cd1	RPL7 (humL7-1; ribosomal protein L7)		R (0,5)	
E21cd3	RPL5 (MSTP030; ribosomal protein L5)		R (0,4)	
F11cd1	RPL34 (ribosomal protein L34)	R (0,5)		
F21cd1	RPLP0 (LIOE; MGC88175; P0; PRCPO; RPP0; ribosomal protein, large, P0)		R (0,4)	
G01cd3	RPS27 (MPS-1; MPS1; ribosomal protein S27 (metallopanstimulin 1))		R (0,4)	H (3,0)
G22cd1	RPL10A (csa-19; NEDD6; ribosomal protein L10a)	R (0,5)		
H19cd1	RPS13 (ribosomal protein S13)		R (0,4)	

**Tab. 4.5** Differentiell exprimierte Gene, die ribosomale Proteine kodieren. In der Tabelle wird der Zeitpunkt der Genexpression nach Strahlenexposition einschließlich der Art der differentiellen Genexpression (R steht für Herunterregulation, H für Hochregulation) angegeben. Klein, grau und in Klammern wurde die Höhe der differentiellen Genexpression relativ zur Kontrolle angegeben.

Schließlich wurde die Anzahl differentiell exprimierter Gene in Abhängigkeit von der funktionellen Gengruppe gegen die Zeit untersucht. Aufgrund der hohen Anzahl zur Verfügung stehender Gengruppen und der insgesamt 101 differentiell exprimierten Gene entfielen auf die meisten Gengruppen nur 2-4 Gene. Als Beispiel ist in Abb. 4.18 A die Anzahl der für Onkogene und Tumorsuppressorgene kodierenden Gene wiedergegeben. Zu keinem Zeitpunkt nach Strahlenexposition wurden mehr als zwei Gene gefunden. Von einer weiteren Untersuchung dieser geringen Genanzahl gegen die Zeit wurde Abstand genommen. Jedoch sind sämtliche diesen Kriterien genügenden Gengruppen im Anhang unter Abb. 9.24 – 9.28 zusammengeführt.

Für die Gengruppen der Zytoplasmaproteine und Kernproteine kodierenden Gene wurden jeweils höhere Anzahlen differentiell exprimierter Gene gefunden (Abb. 4.18 B-C).



**Abb. 4.18** Repräsentatives Ergebnis einer geringen Anzahl differentiell exprimierter Gene einer Gengruppe gemessen gegen die Zeit nach Strahlenexposition (A). Anzahl der für Zytoplasmapiroteine (B) bzw. Kernproteine (C) kodierenden Gene gegen die Zeit nach Strahlenexposition.

So konnten mindestens 9 und maximal 18 differentiell exprimierte Gene, die für Zytoplasmapiroteine kodieren, gefunden werden (Abb. 4.18 B). Hingegen konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Anzahl der für Kernproteine kodierenden Gene von 4 (2 h p.r.) auf 6 (8 h p.r.) und schließlich 12 Gene (24 h p.r.) gezeigt werden (Abb. 4.18 C).

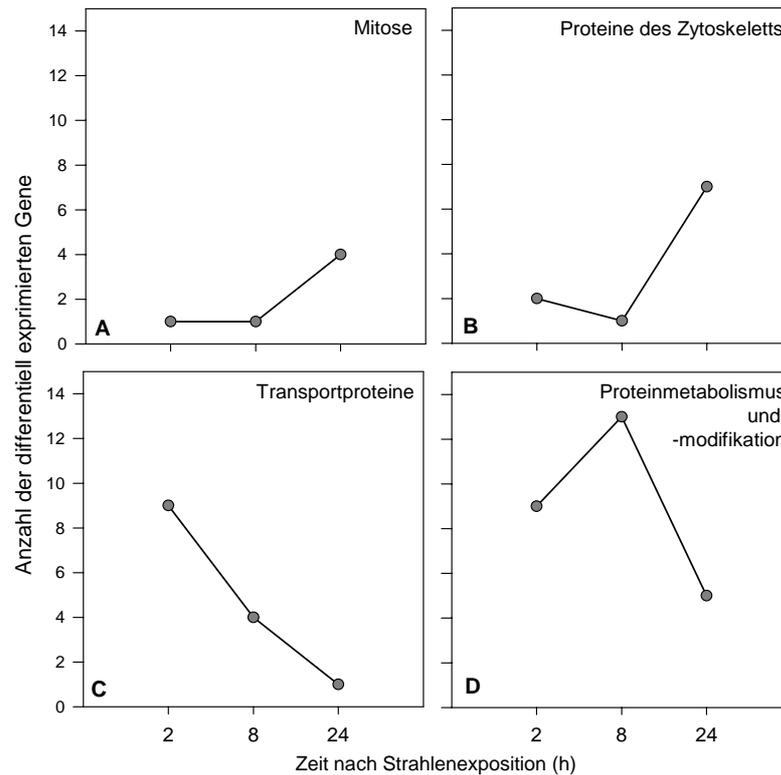
#### 4.4.4.2.4 Geneinteilung nach biologischer Funktion gemäß der Software Panther<sup>R</sup> (Applied Biosystems)

Mit Hilfe einer von Applied Biosystems zur Verfügung gestellten Software (Panther<sup>R</sup>) wurde eine weitere Einteilung der differentiell exprimierten Gene nach funktionellen Gengruppen durchgeführt. Die Gengruppeneinteilung nach Panther<sup>R</sup> unterscheidet sich von der durch Clontech gemachten Einteilung. Darüber hinaus bot die Software eine Aussage darüber, ob die den bestimmten Gengruppen zugeordneten Gene statistisch signifikant über- oder unterrepräsentiert waren. Hierzu wurde wie weiter oben bereits dargestellt die gefundene Genanzahl mit der erwarteten Genanzahl einer funktionellen Gengruppe verglichen und eine Signifikanz berechnet.

Mit Hilfe dieser Software wurden die nach Strahlenexposition der A549 Zellen gefundenen differentiell exprimierten Gene unter dem Aspekt strahleninduzierter

Signaltransduktionswege, molekularer Funktionen und biologischer Prozesse, wie sie durch Panther definiert wurden, untersucht. Nur jene Gengruppen, in denen eine statistisch signifikante Über- oder Unterrepräsentation strahleninduzierter differentiell exprimierter Gene vorlag, wurden berücksichtigt. Aufgrund der geringen Anzahl differentiell exprimierter Gene und der großen Anzahl zur Verfügung stehender Gengruppen (insgesamt 30) befanden sich für die meisten Gengruppen nur 2-4 Gene in einer Gengruppe (siehe Abb. 4.19 A). Von einer weiteren Untersuchung dieser durch ihre geringe Genanzahl charakterisierten, funktionellen Gengruppen gegen die Zeit wurde trotz der statistischen Signifikanz Abstand genommen. Jedoch sind sämtliche diesen Kriterien genügenden Gengruppen im Anhang unter Abb. 9.29 – 9.36 zusammengeführt.

Für drei weitere Prozesse (Proteine des Zytoskeletts, Transportproteine und Proteinmetabolismus/-modifikation) konnte eine höhere Anzahl differentiell exprimierter Gene gefunden werden. Die Anzahl der nach Strahlenexposition differentiell exprimierten Gene und deren Änderung gegen die Zeit, sind in Abb. 4.19 B-D wiedergegeben. Für jeden der drei biologischen Prozesse war die Anzahl der differentiell exprimierten Gene gegen die Zeit unterschiedlich. So konnte für Gene, die Proteine des Zytoskeletts kodieren, erst 24 h nach Strahlenexposition ein Anstieg auf 8 Gene gefunden werden. Die zuvor gefundene Anzahl differentiell exprimierter Gene betrug 1-2 Gene, gemessen 2 h und 8 h nach Bestrahlung (Abb. 4.19 B). Im Gegensatz dazu nahm die Anzahl Transportprotein kodierender Gene gegen die Zeit von 9 Genen 2 h nach Bestrahlung auf 1 Gen gemessen 24 h nach Strahlenexposition kontinuierlich ab (Abb. 4.19 C). Gene, die für Proteinmetabolismus und -modifikation kodierten, zeigten hingegen einen Anstieg der Anzahl von 9 auf 13 Gene innerhalb der ersten 8 h p.r., während ihre Anzahl auf 1 Gen gemessen 24 h nach Bestrahlung absank (Abb. 4.19 D).



**Abb. 4.19** Graph A: Typischer Weise fielen nur wenige Gene in eine Gruppe. Die Graphen B-D: In diese drei Gruppen fielen genügend differentiell exprimierte Gene, so dass sich dort eine Tendenz erkennen ließ, aus der sich evtl. eine Aussage über den Verlauf von Veränderungen in Prozessen ableiten ließe.

Zusammenfassend konnten gemäß der Einteilung nach Clontech sowie unter Verwendung des Klassifikationswerkzeugs Panther<sup>R</sup> im Besonderen Proteine des Zytoskeletts sowie zusätzlich ribosomale Proteine kodierende Gene als signifikant überrepräsentiert gefunden werden.

#### 4.4.4.2.5 Zellproliferation und Zelltod kodierende Gene

Auf dem Array befanden sich 207 Gene, die für Zelltod (Apoptose) kodierten, von denen 3 Gene exprimiert waren (Tab. 4.6). Für den Zellzyklus kodierten 258 Gene, wovon 2 Gene exprimiert waren (Tab. 4.7). Die für die G<sub>2</sub>-Transition verantwortlichen Gene wie Cyclin B und cdc2 waren ebenfalls auf dem Array enthalten, jedoch zu keinem Zeitpunkt p.r. differentiell exprimiert.

Die drei Zelltod assoziierten Gene waren alle in den ersten 8 h herunterreguliert. „Caplain“ und „TNF receptor-associated factor 1“ waren ausschließlich bei 2 h nach Strahlenexposition zwischen 0,3 und 0,5 relativ zur Kontrolle exprimiert, „Caspase

recruitment domain protein 14“ zeigte eine differentielle Genexpression im Bereich von 5 relativ zur Kontrolle, jedoch ausschließlich bei 8 h nach Strahlenexposition.

Array-Koordinaten	Genname	Zeit nach Strahlenexposition (h)		
		2	8	24
C22ef6	Calpain (CAPNS1; CALPAIN4; CANP; CANPS; CDPS; HGNC1481; 30k)	R (0,5)		
K15gh6	Caspase recruitment domain protein 14 (CARD14;BIMP2; CARMA2; HGNC:16446)		R (0,4)	
L11cd2	TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1; EBI6; MGC10353)	R (0,5)		

**Tab. 4.6** Angaben zu den differentiell exprimierten Genen, welche Zelltod assoziiert waren. In der Tabelle wird der Zeitpunkt der Genexpression nach Strahlenexposition einschließlich der Art der differentiellen Genexpression (R steht für Herunterregulation,) angegeben. Klein, grau und in Klammern wurde die Höhe der differentiellen Genexpression relativ zur Kontrolle angegeben.

Hochregulation kam bei den für die Zellproliferation assoziierten Genen (Tab. 4.7) vor. Dies betraf das Gen „cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)“, wobei dieses durchgehend in einem Bereich von 3-5 eine hochregulierte Genexpression zeigte. „Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) fiel besonders auf, da es als einziges der hier interessanten Gene durchgehend exprimiert und noch dazu relativ zur Kontrolle hochreguliert war.

Das Gen „prothymosin, alpha“ war zu zwei Zeitpunkten (8 h und 24 h nach Strahlenexposition) relativ zur Kontrolle unterexprimiert.

Array-Koordinaten	Genname	Zeit nach Strahlenexposition (h)		
		2	8	24
O21ef5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	H (5,0)	H (3,5)	H (3,2)
H13ef5	PTMA (TMSA; prothymosin, alpha (gene sequence 28))		R (0,5)	R (0,5)

**Tab. 4.7** Angaben zu den differentiell exprimierten Genen, welche mit der Zellproliferation assoziiert waren. In der Tabelle wird der Zeitpunkt der Genexpression nach Strahlenexposition einschließlich der Art der differentiellen Genexpression (R steht für Herunterregulation, H für Hochregulation) angegeben. Klein, grau und in Klammern wurde die Höhe der differentiellen Genexpression relativ zur Kontrolle angegeben.

## 5 Diskussion

### 5.1 In vitro Versuche

Mit steigender Strahlendosis konnte ein Abfall in der Anzahl der A549 Zellen nach Strahlenexposition und ein damit korrespondierender Anstieg der Zellverdopplungszeit gezeigt werden (Abb. 4.1). Die kalkulierten Zellverdopplungszeiten der A549 von ca. 23 h entsprachen zuvor bekannten Erfahrungswerten. Die bei 5 Gy und 8 Gy kalkulierten Zellverdopplungszeiten von 40 h und 155 h wiesen auf einen massiven Rückgang der Fähigkeit zur Zellverdopplung hin, wobei der für 8 Gy berechnete Wert eher im Sinne einer Einstellung jeder Zellverdopplung nach Strahlenexposition zu interpretieren wäre. Gleichzeitig lag in den durchgeführten Experimenten die Vitalität der bestrahlten und unbestrahlten Zellen zu jedem Zeitpunkt bei Werten  $\geq 96\%$  (Abb. 4.2). Damit bewegten sich die Parameter im Bereich der erwarteten Norm, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die in vitro Versuche regelrecht durchgeführt wurden.

### 5.2 Zeitlicher Zusammenhang zwischen Proliferation, Zelltod und Genexpression

Nach Strahlenexposition der A549 Zellen konnte eine zeitliche Verzögerung der Auffüllung der dem Bestrahlungszeitpunkt folgenden S-Phase gezeigt werden (Abb. 4.3). Diese Verzögerung war auch auf einen strahleninduzierten G<sub>2</sub>-Block zurückzuführen (Abb. 4.3). Diese Messungen stehen im Einklang mit Untersuchungen an A549 Zellen durch andere Arbeitsgruppen. So konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit 20 Gy 50-60 % der A549 Zellen bis 144 h p.r. im G<sub>2</sub>-Block verweilen (Stuschke et al. 2002). Ob strahleninduzierte Veränderungen in der G<sub>1</sub>-Phase ebenfalls zur Verzögerung der Befüllung der dem Bestrahlungszeitpunkt folgenden S-Phase beitragen, konnte nicht beantwortet werden, weil sich die Mehrzahl der unbestrahlten Kontrollzellen während des Untersuchungszeitraums noch in der G<sub>1</sub>-Phase befanden. Es ist jedoch bekannt, dass viele Tumorzellen oder Zelllinien die Möglichkeit, am G<sub>1</sub>/S-Checkpoint

innezuhalten, verloren haben (Gilbertz et al. 1998, Maity et al. 1994, Syljuasen et al. 2001, Wilson 2004), wogegen der G<sub>2</sub>-Block normalerweise bei allen Zellen ausgeprägt war (Gilbertz et al. 1998). Vor allem Wildtyp-p53 Zellen, die nach dem G<sub>1</sub>-Checkpoint bestrahlt worden waren, wiesen einen G<sub>2</sub>-Block auf, verweilen aber nicht unbedingt in der G<sub>1</sub>-Phase (Pellegata et al. 1996).

Während sich bis 32 h nach Bestrahlung mit 5 Gy zwischen 11-38 % der Zellen im G<sub>2</sub>-Block befanden, konnte schon ab 24 h nach Bestrahlung ein Anstieg sowohl mikrokernhaltiger als auch abnormaler Zellen gezeigt werden (Abb. 4.6). Ab 72 h nach Strahlenexposition wurden die maximalen Werte von jeweils ca. 10 % mikrokernhaltiger und abnormaler Zellen gemessen. Diese Ergebnisse entsprechen unveröffentlichten Untersuchungen an den gleichen Zellen, die nicht synchronisiert bestrahlt worden waren. Auch der Umstand, dass verschiedene Formen des Zelltodes – in diesem Fall – gleichzeitig nebeneinander auftreten, ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden (Abend et al. 2003, 2000, Belka et al. 2003).

Es ist hinreichend bekannt, dass durch Strahlenexposition die Genexpression verändert werden kann (Jasty et al. 1998, Amundson et al. 1999, 2000, 2003, Rhee et al. 1999, Suzuki et al. 2001, Syljuasen et al. 2001). So ist eine große Anzahl an die Proliferation kontrollierenden Gene (Kudoh et al. 2000, Li et al. 2001, Wharton 2001, Syljuasen et al. 2001) und der die Apoptose kontrollierenden Gene aus der Literatur bekannt (Amundson et al. 1999, Ashe et al. 2003, Kudoh et al. 2000, Lawen 2003, Li et al. 2001, Lotem 1995, Sak et al. 2003). Es wird ferner postuliert, dass auch andere Formen des Zelltodes als Apoptose auf Genexpressionsebene reguliert werden (Abend 2003, Li et al. 2001). Zudem sind nicht alle an der Proliferationskontrolle beteiligten Gene bekannt. Mit Bezug auf den gewählten, hier dargestellten experimentellen Ansatz wurde deshalb zu Zeitpunkten, die der Ausbildung des G<sub>2</sub>-Blocks (12 h p.r.) und dem Anstieg mikrokernhaltiger und abnormaler Zellen (ab 48 h p.r.) zeitlich vorgeschaltet waren, mit Hilfe von Mikroarrays ein Screening nach differentiell exprimierten Genen vorgenommen. So fielen die 2 h p.r. durchgeführten Mikroarrays zeitlich mit dem Eintritt der A549 Zellen in die G<sub>2</sub>-Phase zusammen. Die 8 h p.r. durchgeführten Mikroarrays sind von besonderem Interesse, weil eine von der Strahlendosis abhängige Ausprägung des G<sub>2</sub>-Blocks ab 12 h p.r. zu verzeichnen war (Abb. 4.4). Die 24 h p.r. durchgeführten Mikroarrays korrelierten zeitlich mit einem Verlassen der G<sub>2</sub>-Phase durch die unbestrahlten Zellen (Kontrolle), während sich die mit 5 Gy exponierten Zellen

weiterhin zu ca. 35 % im G<sub>2</sub>-Block befanden. Gleichzeitig war dieser Zeitpunkt den später auftretenden strahleninduzierten mikrokernhaltigen und abnormalen Zellen zeitlich vorgeschaltet.

### 5.3 Genexpressionsuntersuchungen

Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Endpunkten, die in ihrer Untersuchung breiter angelegt waren, wurden die Genexpressionsuntersuchungen nur zu ausgewählten Zeiten und nur mit einer Strahlendosis durchgeführt. Die zuvor vorgestellten Endpunkte und deren Kinetik dienten dabei als Orientierungshilfen, weil die gleiche Breite der Untersuchungen mit der sehr kosten- und zeitintensiven Technik der Mikroarrays nicht geleistet werden konnte. Die für die Mikroarrays gewählten Zeitpunkte und die Strahlendosis von 5 Gy ergaben sich aus diesen oben dargestellten Ergebnissen.

Die Gesamtzahl exprimierter Gene lag während des gesamten Untersuchungszeitraums bei ca. 12 % aller Gene des Mikroarrays (Abb. 4.11). Aufgrund von Erfahrungen der Arbeitsgruppe bei der Verwendung von Makroarrays (mit einer Detektion von 1.200 Genen) wurden vergleichbare Prozentzahlen exprimierter Gene von ca. 10 % unter Verwendung unterschiedlicher in vitro Modelle nach Strahlenexposition gefunden (unveröffentlichte Daten und Staßen et al. 2003). Im Gegensatz zu den im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Arbeiten wurden die mit Makroarrays vollzogenen in vitro Experimente an nicht-synchronisierten Zellen untersucht. Demnach steht die Anzahl exprimierter Gene vermutlich nicht in Beziehung zur Bestrahlung in einer bestimmten Zellzyklusphase. Bei Verwendung eines das gesamte Genom abdeckenden neuartigen Mikroarrays wurden bislang unabhängig vom bestrahlten Modell zwischen 30-50 % aller Gene exprimiert. Diese Werte entsprechen den am Institut gemachten Erfahrungen und stehen im Einklang mit mündlichen Aussagen einer auf Genexpressionsanalysen spezialisierten Firma (IMGM, München). Diese offensichtlich von der Plattform abhängigen Unterschiede könnten auf dem anderen Detektionsprinzip (Chemolumineszenz statt Autoradiographie) und weiteren innovativen Techniken des Arrays beruhen, die eine höhere Sensitivität gewährleisten.

Bei Betrachtung der differentiell exprimierten Gene dominierte die Anzahl der herunterregulierten Gene die Anzahl der hochregulierten Gene ca. um den Faktor 4 (Abb. 4.12). Zudem verhielt sich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene in beiden Kategorien konstant gegen die Zeit (Abb. 4.12). Auch die Überschneidung der Gene, die zu verschiedenen Zeitpunkten gleichermaßen differentiell exprimiert waren, erschienen mit 11-16 % im Vergleich zu anderen Modellen (30 %, Manuskript in Bearbeitung) gering (Abb. 4.13). Die differentiell exprimierten Gene waren zudem in 86 % (87 von 101 Gene) zu jedem gemessenen Zeitpunkt nach Strahlenexposition herunterreguliert oder im Kontrollniveau (Abb. 4.14 B). Lediglich ein geringer Anteil von 3 % der Gene (3 von 101 Genen) war durch eine Hoch- und Herunterregulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung charakterisiert (Abb. 4.14 C). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit 97 % (z.B. 2 h p.r.) die Mehrzahl der herunterregulierten Gene relativ zur Kontrolle vergleichbare differentielle Genexpressionen zwischen 0,3-0,5 aufwies (Abb. 4.15). Diese äußerst homogene Charakteristik ist unerwartet und kontrastiert zu vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen (Manuskripte in Bearbeitung, sowie Staßen et al. 2003), aber auch zu *in vivo* Untersuchungen an Hodentumorbiopsien (Port et al. 2005a). Es bleibt zunächst offen, ob es sich hier um eine für die verwendete Zelllinie spezifische Eigenschaft handelt. Alternativ könnte es sich um einen durch die in S-Phase synchronisierten und bestrahlten Zellen hervorgerufenen Effekt handeln. In Zusatzexperimenten wurde deshalb aus den gleichen nicht synchronisierten A549 Zellen zu 0 h und 24 h nach Strahlenexposition mit 0 Gy und 5 Gy RNA isoliert und auf die Mikroarrays hybridisiert. Die Auswertung dieser Experimente konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden. Erste vorläufige Analysen durch die Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass es sich um einen zellzyklusabhängigen Effekt handelt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Suche nach differentiell exprimierten Genen, die strahleninduzierten Änderungen der Proliferation und des Zelltods zeitlich vorgeschaltet sind und somit unter Umständen auch kausal assoziiert sind. Der Anteil bekannter die Proliferation (CDKN1A (p21) und Prothymosin) bzw. Apoptose (Calpain, Caspase recruitment domain protein 14 und TNF receptor-associated factor 1) regulierender Gene war jedoch gering. CDKN1A wurde schon bei geringen Dosen von 2 cGy als induziert beschrieben (Amundson 1999a). In der vorliegenden Arbeit ist CDKN1A durchgehend hochreguliert. Zu Prothymosin, Calpain, Caspase

recruitment domain protein 14 und TNF liegen in der Literatur keine geeigneten Daten vor. In dieser Arbeit waren die ebengenannten Gene herunterreguliert. Yang et al. konnten 1999 eine Überexpression von CD24 in den Zelllinien MCF-7 und T47D ermitteln (Yang et al. 1999). Dieses Gen zeigte auch in der vorliegenden Arbeit neben einer Herunter- auch eine Hochregulation.

Der geringe Anteil bekannter, an der Proliferation beteiligter Gene erscheint ungewöhnlich. Für den Übergang in die G<sub>2</sub>-Phase kodierten der Proteinkomplex bestehend aus der Kinase cdc2 und dem Cyclin B (Dash et al. 2005, Cerciello et al. 2005). Aus der Literatur ist die Genexpression von CDKN1A und Cyclin B1 als hochreguliert (Li et al. 2001) bekannt. Cyclin B1 wurde jedoch nicht als differentiell exprimiert gefunden. Cdc2 wurde nach Bestrahlung als herunterreguliert gefunden (Amundson et al. 1999). Die Unterdrückung von Cyclin B1 ist nach Bestrahlung in der G<sub>2</sub>-Phase bekannt (Chaudhry et al. 2003) Eine Erklärung hierfür könnte die Anzahl der Zeitpunkte, zu denen die strahleninduzierte Genexpression gemessen wurde, sein. Bekanntermaßen ist der die Transition zwischen den Zellzyklusphasen regulierende Anstieg der Menge der Cyclinproteine zeitlich eng begrenzt (Iliakis et al. 2003, Nias 1998, Goldberg 2001). Dies könnte auch auf der Genexpressionsebene einen kurzfristigen Anstieg der strahleninduzierten Genexpression bedeuten. Aufgrund der limitierten Anzahl der Messpunkte nach Strahlenexposition könnte dieser undetektiert geblieben sein.

Bei Durchsicht der differentiell exprimierten Gene und unter Verwendung unterschiedlicher Geneinteilungen verschiedener Hersteller viel die Häufung von Genen, die für Zytoskelettproteine kodieren, auf (Tab 4.4). Überraschenderweise kodierten 70 % der Gene dieser funktionellen Gengruppe (insgesamt 10 Gene) ausschließlich für Tubulinproteine (60 %) und Aktin (10 %). Änderungen des Aktins nach Strahleninduktion sind in der Literatur beschrieben (Chaudhry et al. 2003). Änderungen des Zytoskeletts sind bekanntermaßen mit biologischen Prozessen wie Proliferation (Goto et al. 2004) und Zelltod (Goto et al. 2004, Kumar et al.1995) assoziiert.

Darüber hinaus konnten 8 Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, identifiziert werden (Tab. 4.5). Eine Hochregulation von Genen für ribosomale Proteine wurden bereits in synchronisierten HeLa Zellen gefunden, die in G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase mit 2 Gy bestrahlt wurde (Chaudhry et al. 2003). Es wird vermutet, das eine Reihe ribosomaler Proteine Nebenfunktionen unabhängig von ihrer Rolle in der Proteinbiosynthese hat.

Hierzu zählt unter anderem, dass das humane ribosomale Protein L7 einen G<sub>1</sub>-Phase-Block induziert und auch bei der Einleitung der Apoptose mitwirken kann (Chaudhry et al. 2003). Auch für die Expression des humanen ribosomalen Proteins L13a konnte eine Induktion von Apoptose gezeigt werden (Chaudhry et al. 2003). Beide Gene wurden in der vorliegenden Arbeit als herunterreguliert gefunden. Dies steht im Einklang mit dem Fehlen morphologisch nachweisbarer Apoptosen (Abb. 4.7). In wieweit die strahleninduzierten Änderungen der mRNA Menge für ribosomale Proteine zu Effekten auf der Translationsebene führen, muss noch untersucht werden. Dass es sich dabei um einen komplexen Zusammenhang handelt, wurde kürzlich mit Hilfe von RTQ-PCR zur RNA-Mengenbestimmung und 2D-Gelelektrophorese mit Maldi-TOF-Massenspektrometrie zur Proteinmengenbestimmung nach Strahlenexposition an Mäusefibroblasten (L929) gezeigt (Szkanderova et al. 2003). Bei vorangegangenen in vitro Untersuchungen am Institut konnten 52 Gene identifiziert werden, die in vier verschiedenen in vitro Modellen sowohl bei der Apoptose als auch bei der Mikrokernbildung differentiell exprimiert waren (Manuskript in Bearbeitung). Lediglich drei Gene (Prothymosin, HMGN und heat shock protein 70) konnten übereinstimmend auch in A549 Zellen nach Strahlenexposition differentiell exprimiert gefunden werden. Diese geringe Überschneidung könnte zum einen darin begründet sein, dass A549 Zellen unter Bestrahlung nur zur Hälfte Mikrokern bildeten, während andererseits abnormale Zellen und hier vor allem vergrößerte Zellen bzw. Zellkerne nach Strahlenexposition imponierten (Abb. 4.6). Wie im Abfall der Genexpression der Tubulin, Aktin und ribosomale Proteine kodierenden Gene gezeigt, könnte das Auftreten der abnormalen Zellen zu einer entsprechend anderen strahleninduzierten Antwort auf der Genexpressionsebene geführt haben. Zum anderen muß die geringe Anzahl der Zeitpunkte ebenso wie der verwendete humane Array berücksichtigt werden; denn der humane Array deckt andere Gene ab als die zuvor an Mäusefibroblasten verwendeten Makroarrays, die zudem nur 1.200 Gene der Maus wiedergeben.

In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten (Staßen et al. 2003) wurde auch im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Herunterregulation der für Tubulin, Aktin und ribosomale Proteine kodierenden Gene und der Mehrzahl der anderen differentiell exprimierten Gene gefunden. Dieser strahleninduzierte Effekt wurde durch Staßen und Mitarbeiter im Sinne eines durch die Zelle bewirkten *aktiven* Abschaltens unterschiedlichster Zellfunktionen interpretiert. Dies wird zum Teil durch

*Herunterregulation* entsprechender Gene bewirkt (s.o.). Gleichzeitig konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass durch gezielte *Hochregulation* des p21 die Proliferation der bestrahlten A549 Zellen inhibiert wurde. Damit bestätigt auch das im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte Modell die Hypothese des durch die Zelle bewirkten „active silencing“ (Staßen et al. 2003). Hieraus leitet sich vermutlich auch eine aktive Beteiligung der Zelle an der Zelltodesform ab, wie bereits an anderer Stelle postuliert (Abend et al. 1999, 2000, 2003, Belka et al. 2003).

Aussagen bezüglich der Genexpression mit Hilfe von Mikro- oder Makroarrays sind aufgrund des wenig sensitiven Verfahrens nur semiquantitativ. Sie müssen durch sensitivere Verfahren wie die RTQ-PCR validiert und ergänzt werden. RTQ-PCR gilt als „gold standard“ zur Messung der Genexpression. Deshalb ist geplant, die isolierten RNA-Proben zusätzlich mit RTQ-PCR zu untersuchen. Hierzu werden ein kürzlich entwickeltes neues RTQ-PCR Verfahren („Micro Fluidic Card“, kurz MF-Card) und ein neu entwickelter Array (CLARCC-Array) eingesetzt werden. Mit Hilfe der MF-Card können bis zu 384 RTQ-PCR Reaktionen gleichzeitig auf einer Mikrotiterplatte ablaufen. Unter Verwendung dieser Technologie wurden am Institut 380 Gene zusammengestellt, die für den Zellzyklus, verschiedene Formen des Zelltodes und die Reparatur kodieren und gleichzeitig gemessen werden können (CLARCC-Array). Diese Untersuchungen werden dazu beitragen, die Bedeutung bekannter, für Zellproliferation und verschiedene Zelltodesformen kodierender Gene zu ermitteln.

Zusammenfassend bieten die bisherigen in dieser Doktorarbeit wiedergegebenen vorläufigen Ergebnisse entscheidende Hinweise darauf, dass neben den bekannten mit Zellproliferation und Zelltod kodierenden Gene in einem erheblichen Maße andere funktionelle Gengruppen wie z.B. für Zytoskelett- und ribosomale Proteine kodierende Genen beteiligt sein könnten. Die insgesamt vorherrschende Herunterregulation und gezielte Hochregulation inhibitorischer Gene kann auch im Sinne eines „active silencing“ der Zelle als Vorbereitung auf den Zelltod interpretiert werden. Des Weiteren überrascht das homogene Verhalten der differentiell exprimierten Gene. Diese oben beschriebenen Ergebnisse dienen als Ausgangsbasis für Anschlußexperimente.

## 6 Zusammenfassung

Untersuchungen strahleninduzierter Änderungen der Proliferation und des Zelltodes stellen Schwerpunkte der radiobiologischen Forschung dar. Aus strahlentherapeutischer Sicht interessieren hier im Besonderen die in Tumoren nach Strahlenexposition zu findenden Genexpressionsänderungen, die assoziiert mit strahleninduzierten Änderungen der Proliferation und des Zelltods auftreten. Detaillierte Kenntnisse der diesen biologischen Prozessen zugrundeliegenden Änderungen auf Genexpressionsebene könnten dazu beitragen, die Effizienz der Strahlentherapie humaner und tierischer Tumore zu verbessern.

So ist eine große Anzahl an für Proliferation und Apoptose kodierenden Genen bekannt. Es sind bisher jedoch nicht alle an der Proliferationskontrolle beteiligten Gene gefunden worden. Ebenso wird postuliert, dass auch andere Formen des Zelltodes als Apoptose auf Genexpressionsebene reguliert werden. Deshalb wurde mithilfe eines Mikroarrays mit 11.835 Genen ein Screening nach differentiell exprimierten Genen an strahlenexponierten A549 Zellen (humanen Lungenkarzinomzellen) vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen synchronisiert, in der S-Phase mit 5 Gy bestrahlt und an den Zeitpunkten, die der Ausbildung des G<sub>2</sub>-Blocks und dem Anstieg mikrokernhaltiger und abnormaler Zellen zeitlich vorausgingen, das Screening durchgeführt. Die geeigneten Zeitpunkte wurden zuvor anhand durchflusszytometrischer Zellzyklusuntersuchungen und der Messung des Zelltodes (MAA-Assay) bestimmt.

Die hybridisierten Mikroarrays wurden nach dem Digitalisieren unter Zuhilfenahme einer geeigneten Software interaktiv ausgewertet. Es konnten maximal 987 exprimierte Gene gefunden werden, was 12 % aller Gene des Mikroarrays entsprach. Setzte man die Genexpression der mit 5 Gy bestrahlten Zellen ins Verhältnis zu der Kontrolle, konnten 101 Gene als differentiell exprimiert ermittelt werden. Die Anzahl der herunterregulierten differentiell exprimierten Gene übertraf die Anzahl der hochregulierten differentiell exprimierten Gene zu jedem gemessenen Zeitpunkt immer ca. um den Faktor 4. Des Weiteren wurden die differentiellen Genexpressionen relativ zur Kontrolle der unterschiedlichen Zeitpunkte miteinander verglichen, wobei eine auffällig homogene Herunterregulation der Gene festzustellen war. Nach Einteilung der differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen konnten viele Gene, die für den Aufbau des Zytoskeletts kodierten, ermittelt werden.

Hierbei standen im Vordergrund vor allem Gene für Tubulinproteine und Aktin. Des Weiteren konnten 8 Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, identifiziert werden. Der Anteil bekannter, die Proliferation („cyclin-dependent kinase inhibitor 1A“ (p21, Cip1), „prothymosin, alpha“) bzw. die Apoptose („Caplain“ und „TNF receptor-associated factor 1“, „Caspase recruitment domain protein 14“) regulierender Gene war gering. In Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten Untersuchungen in anderen in vitro Modellen konnte eine aktive Herunterregulation bestimmter biologischer Funktionen (z.B. Zytoskelett, Proteinbiosynthese) bei gleichzeitiger Inhibition anderer Funktionen (Proliferation) gezeigt werden („active silencing“).

Da die Aussagen des Mikroarrays nur semiquantitativ sind, müssen die Ergebnisse noch durch ein quantitatives Verfahren (RTQ-PCR) validiert und ergänzt werden.

Die vorläufigen Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass neben den bekannten Zellproliferation und Zelltod kodierenden Genen in einem erheblichen Maße auch andere funktionelle Gengruppen wie z.B. Zytoskelett- und ribosomale Proteine kodierende Gene beteiligt sind und die Zelle im Sinne eines „active silencings“ durch Abschalten verschiedener Zellfunktionen ihren eigenen Untergang vorbereitet.

## 7 Summary

### **Radiation induced changes of cell proliferation, cell death and gene expression in A549 cells**

A main area of radiobiology research focuses on radiation induced changes of proliferation and cell death which appear differently regulated in tumor cells. A detailed knowledge of these biological processes on the gene expression level could improve radiotherapy of human as well as veterinarian tumors in future.

Many genes are known which are coding for biological processes like proliferation and apoptosis. But not all genes controlling proliferation are known yet. It is postulated that other forms of cell death than apoptosis exist, which are also under control of the cell and are initiated by changes in gene expression. Therefore, a screening for differentially expressed genes was made with the help of microarray (BD Atlas™ Plastic Human 12K Microarray of BD Biosciences Clontech) containing 11.835 genes and using radiation exposed A549 (humane lung carcinoma cells). For this, the cells were synchronized, irradiated with 5 Gy during S-phase and a screening was made at special times before the development of arrest in G<sub>2</sub> and increase of abnormal cells and micronucleated cells. The appropriate time of measurements for gene expression experiments was determined after examination of cell cycle changes using flow cytometry and measurements of cell death at different time points after irradiation employing the so called MAA-assay.

Microarrays were interactively analyzed after digitalisation of the hybridized membranes with the aid of suitable software. A maximum percentage of 12 % of all genes of the microarray appeared expressed at 2 h after irradiation. When comparing the gene expression of controls with cells exposed to 5 Gy, 101 genes could be found as differential expressed. The number of downregulated genes consistently exceeded the number of upregulated genes at least by a factor of 4. An overrepresentation of those genes coding for the cytoskeleton, especially genes coding for tubulin, could be found. Furthermore, 8 genes coding for ribosomal proteins were downregulated. Surprisingly, the number of known genes coding for proliferation (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1), prothymosin, alpha), or apoptosis (Caplain and TNF receptor-associated factor 1, Caspase recruitment domain protein 14) was small. In agreement with previously made examinations in

other in vitro models, an active downregulation of specific biology functions (e.g. cytoskeleton, protein synthesis) was shown simultaneously to an inhibition of other functions like proliferation. This behaviour was called “active silencing”.

As the results of the microarray are only semi quantitative, the results have to be validated with another quantitative approach, namely RTQ-PCR.

The temporary results of this work point out that beside the known genes coding for cell proliferation and cell death other functional gene groups, such as genes coding for cytoskeleton and ribosomal proteins, could be associated to proliferation and cell death. Again, the shutting down of cell functions by upregulation of inhibitory and downregulation of activating genes (active silencing) could be interpreted as a coordinated way to prepare to die by the cell.

## 8 Literaturverzeichnis

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

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

**Abend, M.:** Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 79 (2003): 1 - 15

**Almassy, Z.; Krepinsky, A. B. and Köteles, G.J.:** The Present State and Perspectives of Micronucleus Assay in Radiation Protection. A Review. *Appl Radiat Isot* 38 (1987): 241 - 249

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

**Amundson, S. A.; Do, K.T.; Fornace, A. J. Jr.:** Induction of Stress Genes by Low Doses of Gamma Rays. *Radiat Res* 152 (1999a): 225-231

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

**Amundson S. A.; Lee R. A.; KochPaiz C. A.; Bittner M. L.; Meltzer, P.; Trent, J. M.; Fornace, A. J.:** Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Molecular Cancer Research* 1 (2003): 445 - 452

**Ashe, P. C.; Berry, D. B.:** Apoptotic signalling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27 (2003): 199 – 214

**Banasiak, J. J.; Xia, Y.; Haddad, G. G.:** Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology* 62 (2000): 215 – 249

**BD Biosciences:** Kap. 1 Einführung in die Durchflusszytometrie. *FacSCalibur™ Trainingshandbuch Durchflusszytometrie BD Biosciences* (1999): 5 - 11

**Belka, C.; Abend, M.; Budach, W.; van Beunigen, D.:** Kap. Mechanismen und Formen des Zelltodes. *Radioonkologie, Bd 1 Grundlagen*. Hrsg: Bamberg, M., Molls, M. und Sack, H.; Zuckschwerdt Verlag München (2003): 208 – 219

**Brathen, M.; Bandrud, H.; Berg, K.; Moan, J.:** Induction of multinucleated cells caused by UV exposure in different stages of the cell cycle. *Photochem Photobiol* 71 (2000): 620 – 626

**Cerciello, F.; Hofstetter, B.; Fatah, S. A.; Zaghloul, M.; Odermatt, B.; Bodis, S.; Varga, Z.; Pruschy, M.; Ciernik, I. F.:** G<sub>2</sub>/M cell cycle checkpoint is functional in cervical cancer patients after initiation of external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 62 (2005): 1390 – 1398

**Chaudhry, M. A.; Chodosh, L. A.; McKenna, W. G.; Muschel, R. J.:** Gene expression profile of human cells irradiated in G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phase of cell cycle. *Cancer Letters* 195 (2003): 221 – 233

**Cimini, D.; Antoccia, A.; Tanzarella C.; Degrassi, F.:** Topoisomerase II inhibition in mitosis produces numerical and structural chromosomal aberrations in human fibroblasts. *Cytogenet Cell Genet.* 76 (1997): 61 - 67

**Dash, B. C.; El-Deiry, W. S.:** Phosphorylation of p21 in G<sub>2</sub>/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Mol Cell Biol.* 25 (2005): 3364 -3387

**Eder, H.; Kiefer J.; Luggen-Hölscher, J.; Rase, S.:** Kapitel 5, Zelluläre Strahlenwirkung. *Grundzüge der Strahlenkunde für Naturwissenschaftler und Veterinärmediziner*, Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg (1986): 64 - 90

**Endresen, P. C.; Prytz, P. S.; Aarbakke, J.:** A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA. *Cytometry* 20 (2005): 162 - 171

**Fritz-Niggli, H.:** Kap. 4. Zelluläre Strahlenbiologie (Experimentelle Grundlagen für die Strahlentherapie des Krebses). *Strahlengefährdung/ Strahlenschutz, Ein Leitfaden für die Praxis, 2. Auflage, Verlag Hans Huber Bern Stuttgart Toronto (1988): 83 - 97*

**Gilbertz, K.-P.; Van Beuningen, D.; Rhein, A. P.:** Early changes in cell cycle kinetics after ionizing irradiation below 1 Gy. *Int J Radiat Biol* 73 (1998): 187 - 195

**Goldberg, A. L.; Elledge, S. J.; Harper J. W.:** Reißwolf für Proteine. *Spektrum der Wissenschaft, Mai (2001): 54 - 59*

**Goto, H.; Yano, S.; Matsumori, Y.; Ogawa, H.; Blakey, D. C.; Sone, S.:** Sensitization of tumor-associated endothelial cell apoptosis by the novel vascular-targeting agent ZD6126 in combination with cisplatin. *Clin Cancer Res* 10 (2004): 7671 – 7676

**Hall, E.J.:** Kap. Cell-Survival Curves, Reproductive Integrity. *Radiobiology for the Radiobiologist, Third Edition, J.B. Lippincott Company Philadelphia, USA (1988): 18 - 38*

**Heddle, J. A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, Ph. and MacGregor, J.T.:** Micronuclei as an Index of cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 18 (1991): 277 - 291

**Hug, O.; Trott K. R.:** Kap. 2 Biologischen Grundlagen der Strahlenwirkung. *Radiologie Kompendium für den 1. Klinischen Studienabschnitt. J. Lissner und O. Hüge. 1. Auflage, 2. Nachdruck; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1975): 32 - 62*

**Iliakis, G.; Tamulevicius, P.:** Kap. DNA-Reparatur und Checkpoint-Aktivierung. *Radioonkologie, Bd 1 Grundlagen. Hrsg: Bamberg, M., Molls, M. und Sack, H.; Zuckschwerdt Verlag München (2003): 191 - 207*

**Jasty R.; Lu, J.; Irwin, T.; Suchard, S.; Clarke, M. F.; Castle V. P.:** Role of p53 in the regulation of irradiation-induced apoptosis in neuroblastoma. *Mol Genet Metab* 65 (1998): 155 - 164

**Kudoh, K.; Ramanna, M.; Ravatn, R.; Elkahloun, A. G.; Bittenr, M.L.; Meltzer, P. S.; Trent, J. M., Dalton, W. S.; Chin, K. V.:** Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res* 60 (2000): 4161 - 4166

**Kumar, K.; Wu, X. L.:** Expression of beta-actin and alpha-tubulin mRNA in gerbil brain following transient ischemia and reperfusion up to 1 month. *Brain Res Mol Brain Res* 30 (1995): 149-157

**Lang, F.; Gulbins, E.; Szabo, I.; Lepple-Wienhues, A.; Huber, S. M.; Duranton, C.; Lang, K. S.; Lang, P. A.; Wieder, T.:**Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *Journal of Molecular Recognition* 17 (2003): 473 - 480

**Lawen, A.:** Apoptosis – an introduction: *BioEssays* 25 (2003): 888 - 896

**Li, Z.; Liqun, X.; Lee, L. M.; Khaletskiy, A; Wang, J.; Wong, J. Y. C.; Li, J.-J.:** Effector Genes Altered in MCF-7 Human Breast Cancer Cells after Exposure to Fractionated Ionizing Radiation. *Radiat Res* 155 (2001): 543 - 553

**Lockhart, D. J.; Winzeler, E. A.:** Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405 (2000): 827 - 836

**Lotem, J.; Sachs, L.:** Interferon-gamma inhibits apoptosis induced by wild-type p53, cytotoxic anti-cancer agents and viability factor deprivation in myeloid cells. *Leukemia* 9 (1995): 685 - 692

**Maity, A.; McKenna, W. G.; Muschel, R. J.:**The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol* 31 (1994): 1 - 13

**Martin, L.J.:** Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 7 (2001): 455 – 478

**Meek, D. W.:** The role of p53 in the response to spindle damage. *Pathol Bio* 48 (2000): 246 - 254

**Meintières, S.; Nessler, F.; Pallardy, M.; Marzin, D.:** Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41 (2003): 260 - 269

**Misteli, T.:** Protein Dynamics: Implications for Nuclear Architecture and Gene Expression. *Science* 291 (2001): 843 - 847

**Nias, A. H. W.:** *An introduction to Radiobiology, Second Edition. Hrsg: John Wiley & Sons Ltd, West Sussex England (1998)*

**Nüsse, M.; Kramer, J.:** Flow Cytometric Analysis of Micronuclei Found in Cells After Irradiation. *Cytometry* 5 (1984): 20 -25

**Pellegata, N. S.; Antoniono, R. J.; Redpath, J. L.; Stanbridge, E. J.:** DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996): 15209 - 15214

**Pollack, J. R.; Perou, C.M.; Alizadeh, A. A.; Eisen, M. B.; Pergamenschikov A.; Williams, C.F.; Jeffrey, S. S.; Botstein, D.; Brown, P. O.:** Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature genetics* 23 (1999): 41 - 46

**Port, M.; Abend, M.:** Detection of Radiation-Induced Genes Applicable for Biological Dosimetry and Estimation of Radiosensitivity Using Four *In Vitro* Models. *NATO RTG-099 (2005)*

**Port, M.; Schmelz, H.U.; Stockinger, M.; Sparwasser, C.; Albers, P.; Pottek, T.; Abend, M.:** Gene Expression Profiling in Seminoma and Nonseminoma. *Journal of Clinical Oncology* 23 (2005a): 58 - 69

**Rhee, C. H.; Hess, K.; Jabbur, J.; Ruiz, M.; Yang, Y.; Chen, S.; Chenchik, A.; Fuller G. N.; Zhang, W.:** cDNA expression array reveals heterogeneous gene expression profiles in three glioblastoma cell lines. *Oncogene* 18 (1999): 2711 - 2717

**Sak, A.; Wurm, R.; Elo, B.; Grehl, S.; Pottgen, C.; Stuben, G.; Sinn, B.; Wolf, G.; Budach, V.; Stuschke, M.:** Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer cell lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21 (WAF1/Cip1). *Cancer Gene Ther* 10 (2003): 926 - 934

**Serebrianyi, A. M.; Aleshchenko, A. V.; Gotlib V. Ia.; Kudriashova, O. V.; Semenova, L. P.; Pelevina. I. I.:** On the new mechanism of adaptive response. *Radiats Biol Radioecol* 44 (2004): 653 - 656

**Sanchez-Carbayo, M.; Socci, N. D.; Charytonowicz, E.; Lu, M.; Prystowsky, M. ; Childs, G.; Cordon-Cardo, C.:** Molecular Profiling of Bladder Cancer Using cDNA Microarrays: Defining Histogenesis and Biological Phenotypes. *Cancer Research* 62 (2002): 6972 - 6980

**Shankar, S.; Singh, T. R.; Srivastava, R. K.:** Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms. *The Prostate* 61 (2004): 35 - 49

**Sheikh, M. S.; Fornace, A. J. Jr.:** role of p53 family members in apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* 182 (2000): 171 - 181

**Staßen, T.:** Strahleninduzierte Genexpression bei MCF-7-Zellen. *Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München und Institut für Radiobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München* (2001).

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

**Stuschke, M. ; Sak, A. ; Wurm, R. ; Sinn, B.; Wolf, G.; Stuben, G.; Budach, V.:** Radiation-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cell lines is secondary to cell-cycle progression beyond the G<sub>2</sub>-phase checkpoint. *Int J Radiat Biol* 78 (2002): 807 – 819

**Sun, Y.:** Identification and characterization of genes responsive to apoptosis: application of DNA chip technology and mRNA differential display. *Histol Histopathol* 15 (2000): 1271-1284

**Suzuki, K.; Mori, I.; Nakayama, Y.; Miyakoda, M.; Kodama, S.; Watanabe, M.:** Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shorting. *Radiat Res* 155 (2001): 248 - 253

**Syljuasen R. G.; Krolewski, B.; Little, J. B.:** Molecular events in radiation transformation. *Radiat Res* 155 (2001): 215 - 221

**Szkanderová, S.; Hernychová, L.; Kasalová, I.; Váverová, J.; Stulík, J.; Abend, M.; van Beuningen, D.:** Proteomic Analysis of Radiation-Induced Alterations in L929 Cells. *Folia Biologica* 49 (2003): 15 - 25

**Trott, K. R.; Lengfelder, E.:** Biologische Grundlagen der Strahlenwirkung und des Strahlenschutzes. *Kapitel 3; Radiologie I 3., neu bearbeitete Auflage, Herg.: J. Lissner und O. Hug; Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1986): 64 – 83*

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

**Wang, J. F.; Jerrells, T. R.; Spitzer, J. J.:** Decreased production of reactive oxygen intermediates is an early event during in vitro apoptosis of rat thymocytes. *Free Radic Biol Med* 20 (1996): 533 - 542

**Weiland, U.:** Untersuchung der Apoptose in kranialen und kardiovaskulären Erkrankungen: Bedeutung von Stickstoffmonoxid. *Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen (1999).*

**Wharton, W.:** Permanent growth arrest in irradiated human fibroblasts. *Radiat Res* 155 (2001): 554 – 563

**Wilson, G. D.:** Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer and Metastasis Reviews* 23 (2004): 209 – 225

**Wilson, C. A; Browning, J. L.:** Death of HT29 adenocarcinoma cells induced by TNF family receptor activation ist caspase-independent and displays features of both apoptosis and necrosis. *Cell Death Differentiation* 9 (2002): 1321 - 1333

**Yang, G. P.; Ross, D. T.; Kuang, W. W.; Brown, P. O.; Weigel, R. J.:** Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 27 (1999): 1517 - 1523

**Young, R. A.:** Biomedical Discovery with DNA Arrays. *Cell (Cell Press)* 102 (2000): 9 - 15

## 9. Anhang

### 9.1 Zellwachstum und Vitalität

	0h	24h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>0 Gy</b>	1,45	2,425	4,925	6,6	11,125	13,475
<b>2 Gy</b>		2,3	3,6	5,075	7,375	9,225
<b>5 Gy</b>		1,6	2,65	2,4	3,625	2,675
<b>8 Gy</b>		1,55	1,55	1,6	2,65	1,975

**Tab. 9.1** Versuch 1: Die Zellzahlen sind in  $\times 10^5/\text{ml}$  angegeben. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt -24 h bei  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte zum Zeitpunkt 0 h.

	0h	24h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>0 Gy</b>	1,225	2,675	3,9	8,05	8,75	11,875
<b>2 Gy</b>		2,4	3,55	5,95	6,325	4,725
<b>5 Gy</b>		1,825	2	2,7	2,425	1,95
<b>8 Gy</b>		1,5	1,525	1,55	1,625	1,55

**Tab. 9.2** Versuch 2: Die Zellzahlen sind in  $\times 10^5/\text{ml}$  angegeben. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt -24 h bei  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte zum Zeitpunkt 0 h.

	0h	24h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>0 Gy</b>	1,11	1,275	3,105	5,79	6,345	10,815
<b>2 Gy</b>		1,44	2,1	3,69	2,7	4,53
<b>5 Gy</b>		0,75	0,945	2,145	1,53	1,575
<b>8 Gy</b>		0,825	0,975	1,395	1,2	1,156

**Tab. 9.3** Versuch 3: Die Zellzahlen sind in  $\times 10^5/\text{ml}$  angegeben. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt -24 h bei  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte zum Zeitpunkt 0 h.

	0 Gy	2 Gy	5 Gy	8 Gy
<b>Versuch 1</b>	23,25	37,00	33,50	200,00
<b>Versuch 2</b>	23,00	36,25	56,00	200,00
<b>Versuch 3</b>	22,00	35,50	31,75	64,75

**Tab. 9.4** Mittelwerte der Zellproliferationszeiten (h) der einzelnen Strahlendosen je Versuchsansatz

	0 Gy	2 Gy	5 Gy	8 Gy
<b>SEM</b>	0,3819	0,4330	7,8080	48,0833

**Tab. 9.5** SEM (Standard Error of mean) der Mittelwerten aus Tab.9.4

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>0 Gy</b>						
<b>Vitalität</b>	98	100	98,7	100	100	98,7
<b>SEM</b>	1,2	0	1,3	0	0	1,3

**Tab. 9.6** Mittelwerte der Vitalitätsmessung aus drei Versuche bei 0 Gy, angegeben mit SEM.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<b>5 Gy</b>						
<b>Vitalität</b>	98	96	98,7	97,3	98	98
<b>SEM</b>	1,2	4	1,3	2,7	1,2	2

**Tab. 9.7** Mittelwerte der Vitalitätsmessung aus drei Versuche bei 5Gy, angegeben mit SEM.

## 9.2 Proliferation

Zeit	G <sub>1</sub> Vers.1 0 Gy	G <sub>1</sub> Vers.2 0 Gy	G <sub>1</sub> Vers.3 0 Gy	S Vers.1 0 Gy	S Vers.2 0 Gy	S Vers.3 0 Gy	G <sub>2</sub> Vers.1 0 Gy	G <sub>2</sub> Vers.2 0 Gy	G <sub>2</sub> Vers.3 0 Gy
1h	21,2	28	32,4	39,4	26,6	29,1	14,6	15,4	5,1
4 h	10,1	12,8	17,2	36,4	33,2	37,4	25,9	19,2	15,6
8 h	23,7	21,3	8	25,4	25,8	34,6	29,2	25,9	28,3
12 h	50,9	39,1	24	6,8	19,3	13,3	19,3	25,1	34,6
24 h	31,5	28,2	39,5	34,8	25,2	38	15,6	18,4	9,3
32 h	34,8	33,9	27,5	20,3	19,9	31,4	21,4	20	22,4

Zeit	G <sub>1</sub> Vers.1 2 Gy	G <sub>1</sub> Vers.2 2 Gy	G <sub>1</sub> Vers.3 2 Gy	S Vers.1 2 Gy	S Vers.2 2 Gy	S Vers.3 2 Gy	G <sub>2</sub> Vers.1 2 Gy	G <sub>2</sub> Vers.2 2 Gy	G <sub>2</sub> Vers.3 2 Gy
1h	21,1	22,7	28,4	41,1	31,3	36,9	13	13,3	5,9
4 h	10	20,9	17,4	43,1	29,4	40,9	22	17,8	14,1
8 h	12,1	1,2	4,3	25,4	29	44,5	44,7	42,2	22,5
12 h	37,4	9,5	1,9	8,8	17,5	34,2	35,9	50,6	43,2
24 h	45,9	55,4	46,8	23,4	7,5	5	10,4	14,4	22,4
32 h	37,3	40,7	35,3	19,8	21	24	22,6	20,9	15,6

Zeit	G <sub>1</sub> Vers.1 5 Gy	G <sub>1</sub> Vers.2 5 Gy	G <sub>1</sub> Vers.3 5 Gy	S Vers.1 5 Gy	S Vers.2 5 Gy	S Vers.3 5 Gy	G <sub>2</sub> Vers.1 5 Gy	G <sub>2</sub> Vers.2 5 Gy	G <sub>2</sub> Vers.3 5 Gy
1h	-	21,6	25,7	-	35,3	37,8	-	13,1	8
4 h	13,6	20,2	19,7	44,5	32	41,1	17,3	18	12
8 h	1,4	1,8	4,8	26,4	27,8	55,6	47,1	41,8	13,2
12 h	-	2	1,7	-	17,3	50,9	-	42,9	19,2
24 h	44,4	35	-	6,1	1,5	-	28	33	-
32 h	33,3	27,7	11,2	15,7	8,8	2,4	26,6	55,9	47,1

Zeit	G <sub>1</sub> Vers.1 8 Gy	G <sub>1</sub> Vers.2 8 Gy	G <sub>1</sub> Vers.3 8 Gy	S Vers.1 8 Gy	S Vers.2 8 Gy	S Vers.3 8 Gy	G <sub>2</sub> Vers.1 8 Gy	G <sub>2</sub> Vers.2 8 Gy	G <sub>2</sub> Vers.3 8 Gy
1h	23,5	21,1	25	34,7	32,8	41,6	15,4	15,6	5,5
4 h	14,4	20,1	18,9	44,2	30,9	44,4	14,9	20,1	6
8 h	1,6	1,9	6,3	31,1	42,2	58,5	47,5	27,4	8,7
12 h	0,8	0,7	-	7,9	12,6	-	70,9	59,5	-
24 h	16,7	10,4	1,4	1,8	0,4	1,3	55,6	63,4	68,5
32 h	22,3	11,1	3,5	3,5	2,1	1,4	46,1	58,4	72,9

**Tab. 9.8** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zur Analyse der Zellzyklusphasen. Die Werte geben die Prozentzahlen der Zellen in der entsprechenden Zellzyklusphase in den einzelnen Versuchen zu den Zeitpunkten (h) nach Bestrahlung und nach Strahlendosis sortiert an.

### 9.3 Genexpressionsarray

#### 9.4.1 Isolation der Gesamt-RNA

Dosis/Zeitwert	260 nm	280 nm	<u>260 nm</u> 280 nm	ng / $\mu$ l	1 $\mu$ g / x $\mu$ l	Gesamt- volumen	Gesamt $\mu$ g
0 Gy 0h							
0 Gy 2h	26,410	12,548	2,10	1056,4	0,947	175	184,87
5 Gy 2h	36,463	17,432	2,09	1458,5	0,69	178	259,6
0 Gy 8h	29,705	14,095	2,11	1188,2	0,8416	238	282,79
5 Gy 8h	34,306	16,387	2,09	1372,2	0,7287	167	229,16
0 Gy 24h	30,452	17,052	1,79	1218,1	0,8209	238	289,9
5 Gy 24h	20,945	11,649	1,80	837,8	1,1936	238	199,396

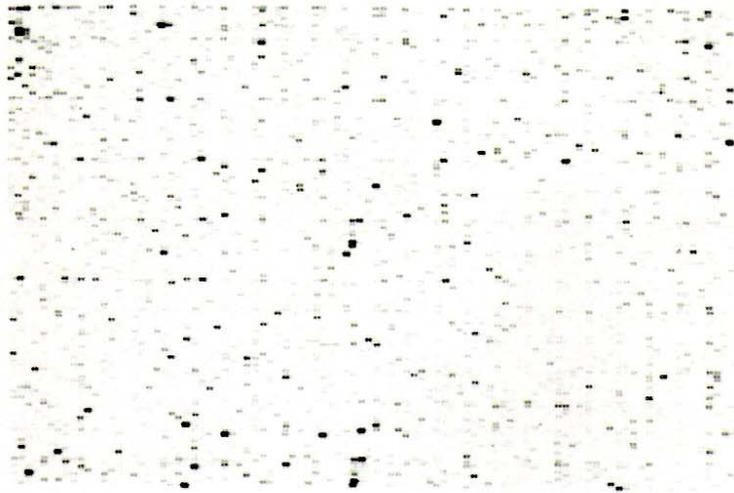
Tab. 9.9 Ergebnisse der Spektralphotometrie der Isolierten Gesamt-RNA von den 0 Gy und 5 Gy Proben.

#### 9.4.2 Konvertierung der mRNA in radioaktiv markierte cDNA

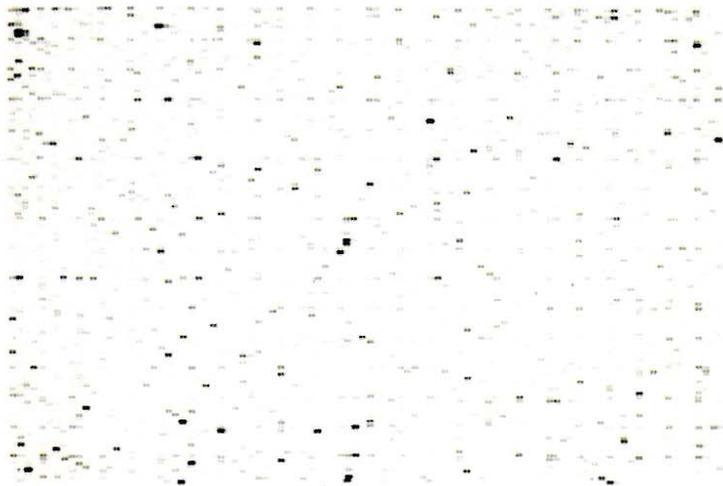
Dosis/Zeitwert	1.Elution Mio cpm	2.Elution Mio cpm	Elution nach Kochen Mio cpm	Zugegebene $\mu$ l Kontrolle pro Probe
0 Gy 2h	220,72	77,60		
5 Gy 2h	166,40	45,92		
Kontrolle 2h	9,44	8,88		17,1 $\mu$ l / 1,5 Mio cpm
0 Gy 8h	161,60	71,84		
5 Gy 8h	234,00	34,56		
Kontrolle 8h	19,92	7,44		40,3 $\mu$ l / 3,0 Mio cpm
0 Gy 24h	184,80	51,68	63,52	
5 Gy 24h	119,12	98,72	48,40	
Kontrolle 24h	7,68	-	9,28	32,3 $\mu$ l / 3,0 Mio cpm

Tab. 9.10 Werte der Szintillationsmessung zur Kontrolle der Konvertierung der radioaktiv markierten cDNA zu den einzelnen Zeitpunkten nach Elution.

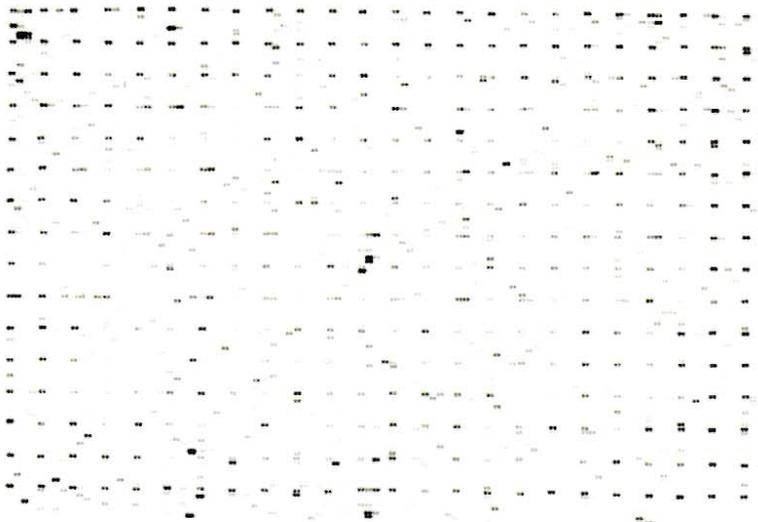
### 9.4.1 Hybridisierung und Exposition gegen einen Screen



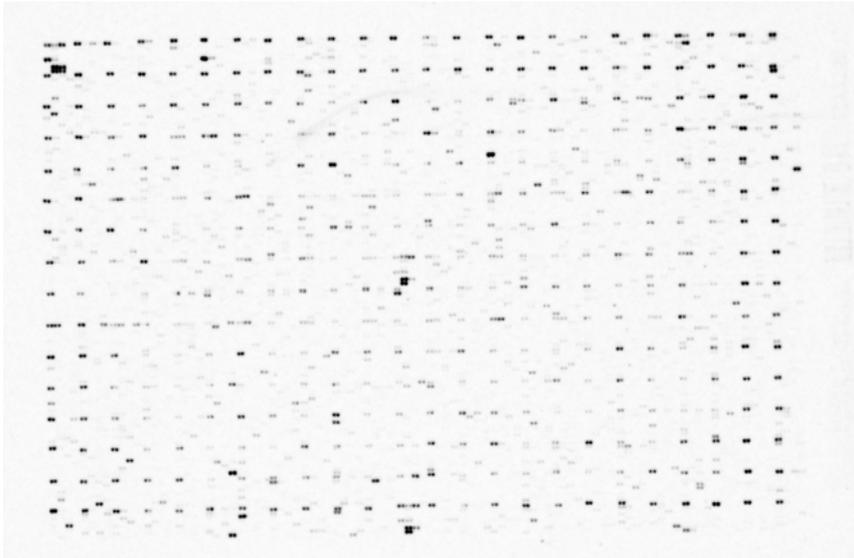
**Abb. 9.1** Autoradiographie der cDNA der A549 0 Gy, 2 h p.r., nach 7-tägiger Exposition des Arrays gegen einen Screen



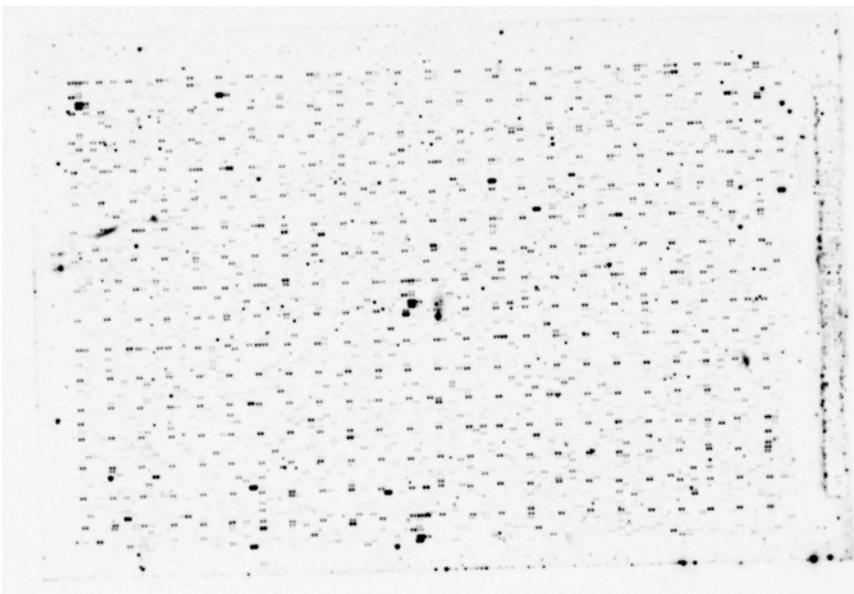
**Abb. 9.2** Autoradiographie der cDNA der A549 5 Gy, 2 h p.r., nach 7-tägiger Exposition des Arrays gegen einen Screen



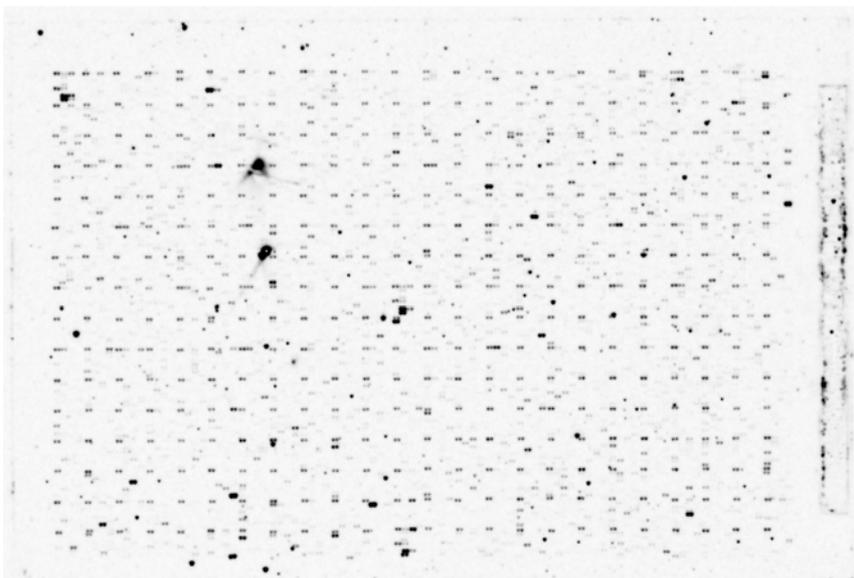
**Abb. 9.3** Autoradiographie der cDNA der A549 0 Gy, 8 h p.r., nach 6-tägiger Exposition des Arrays gegen einen Screen



**Abb. 9.4** Autoradiographie der cDNA der A549 5 Gy, 8 h p.r. nach 6-tägiger Exposition des Arrays gegen einen Screen



**Abb. 9.5** Autoradiographie der cDNA der A549 0 Gy, 24 h p.r. nach 7-tägiger Exposition des Arrays gegen einen Screen

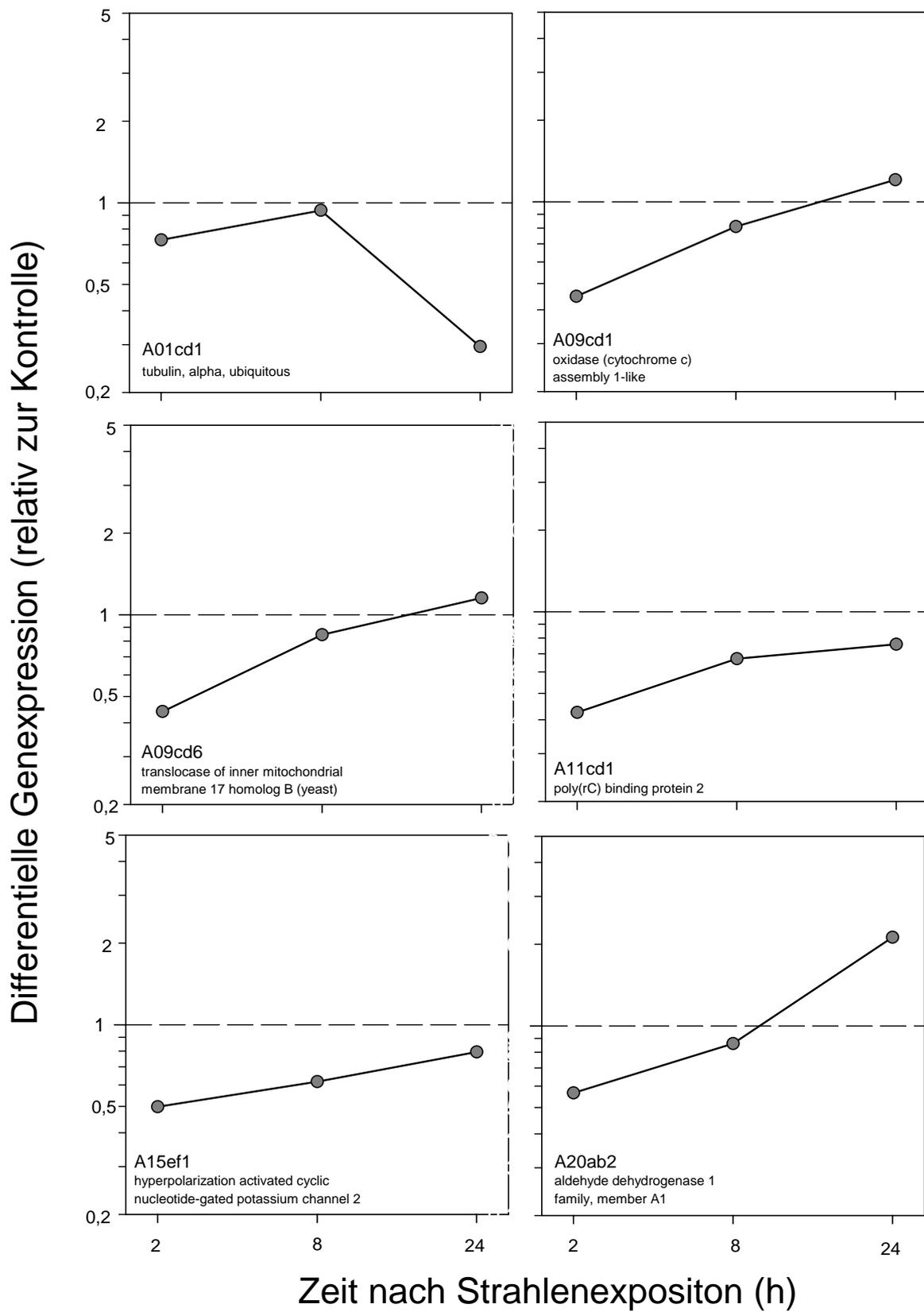


**Abb. 9.6** Autoradiographie der cDNA der A549 5 Gy, 24 h p.r. nach 7-tägiger Exposition des Arrays gegen einen Screen

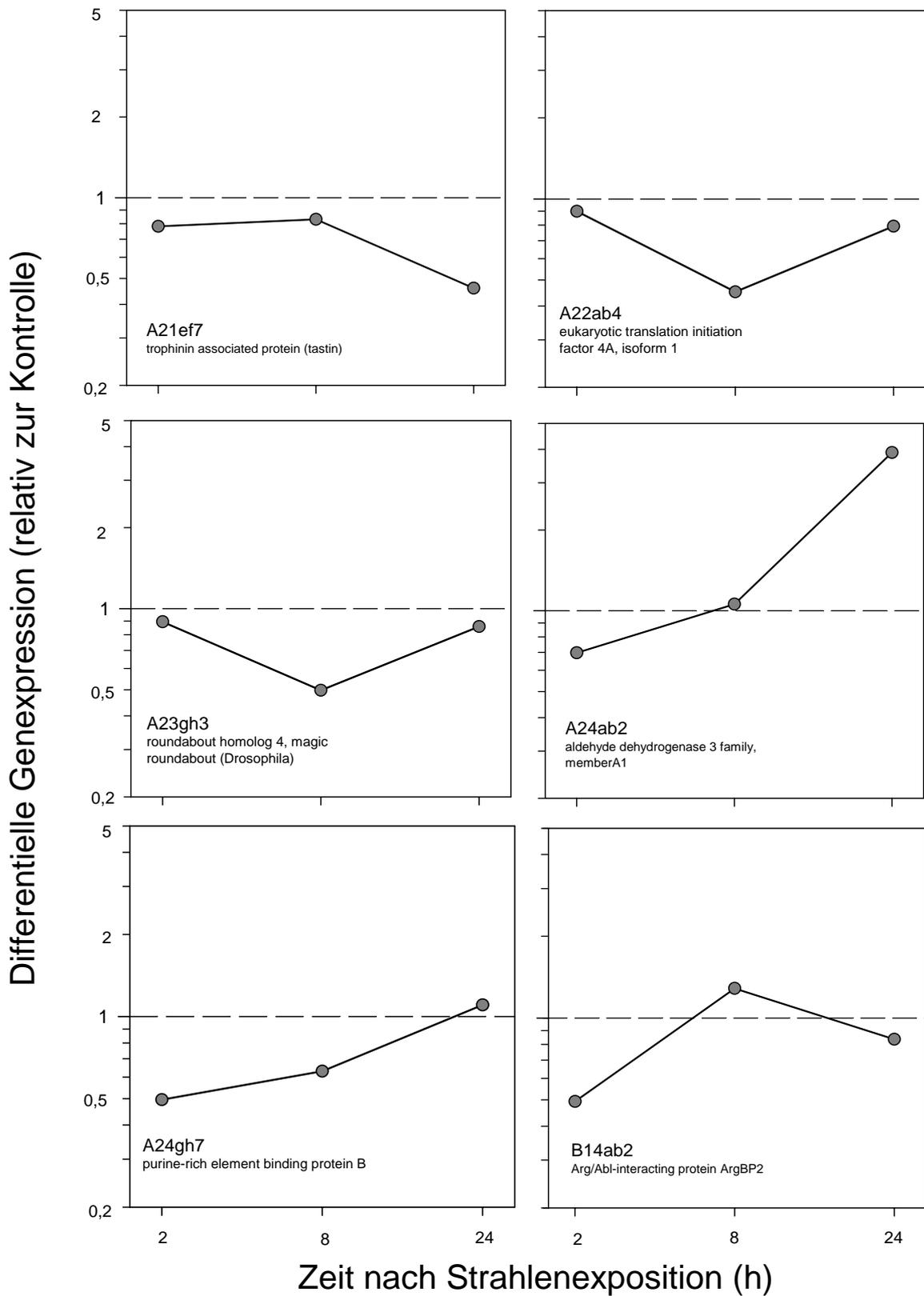
#### 9.4.4 Auswertung

Zeit	2 h	2 h / 8 h	8 h	8 h / 24 h	24 h	2 h / 24 h	2 h / 8 h / 24 h
<b>Gene</b>	A09cd1	C24gh6	A22ab4	G01cd3	A01cd1	H20ab7	G22cd8
	A09cd6	D23gh3	A23gh3	H13ef5	A20ab2	I23ef1	O21ef5
	A11cd1	E22ef7	B16gh6	L23cd4	A21ef7	K23ef5	
	A15ef1	K15ef4	B23cd1		A24ab2	P12cd1	
	A24gh7		B23cd4		B24ab2	P12cd4	
	B14ab2		D03cd1		C23cd3		
	C18cd3		E21cd3		D10gh8		
	C22ef5		E22ef8		D13gh6		
	C22ef6		F01gn6		D17gh6		
	C22ef7		F21cd1		D18ef7		
	E17ab7		G18ef3		F03gh6		
	E18gh2		H19cd1		F09cd4		
	F04ab6		H20gh5		G01cd8		
	F11cd1		I02gh7		H12cd1		
	G22cd1		I22gh6		H12cd7		
	H06ef2		J14ef1		H15ab8		
	I13cd4		K15ef5		J14ab6		
	K03ef8		K15gh6		J22ab7		
	K12cd5		K23ef4		K18ef7		
	K13ef6		L16ab5		K22ef1		
	L11cd2		L17ab8		L04ab7		
	M01ab7		M10ef6		L06cd6		
	M22ef2		N08ef4		M19ab3		
	M24ab5		N09gh5		M24cd1		
	O02gh2		N21cd8		N07gh2		
	O13gh1		P05ab5		N13gh2		
	O14ab2				N17ef8		
	P08ab2				O16ab4		
	P08gh5				O16ab8		
	P14ab2				P12cd7		
					P12cd8		

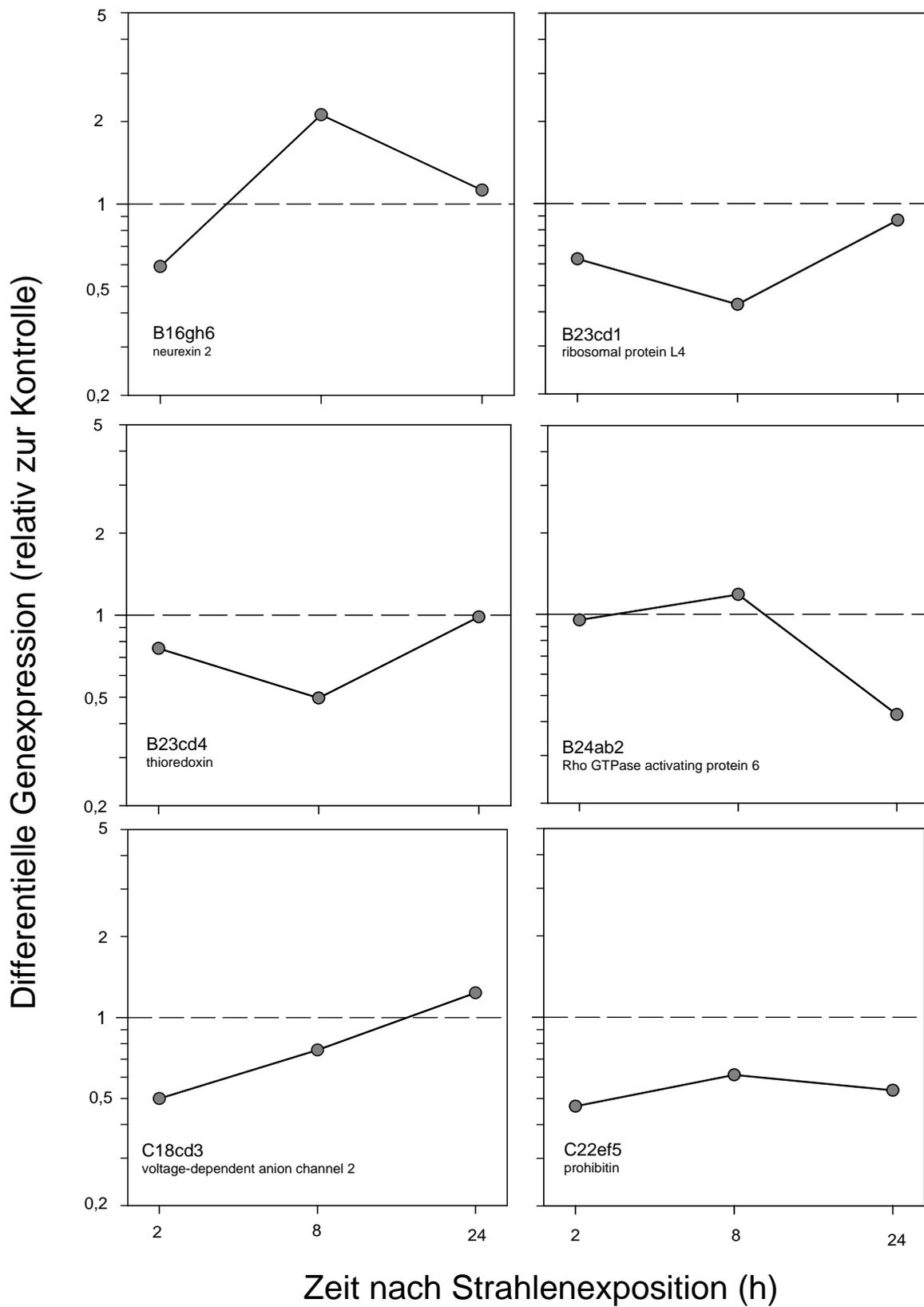
**Tab. 9.11** Auflistung der Gene, zu welchem Zeitpunkt sie differentiell exprimiert waren, einschließlich der Angaben zur Überschneidungen mit anderen Zeitpunkten.



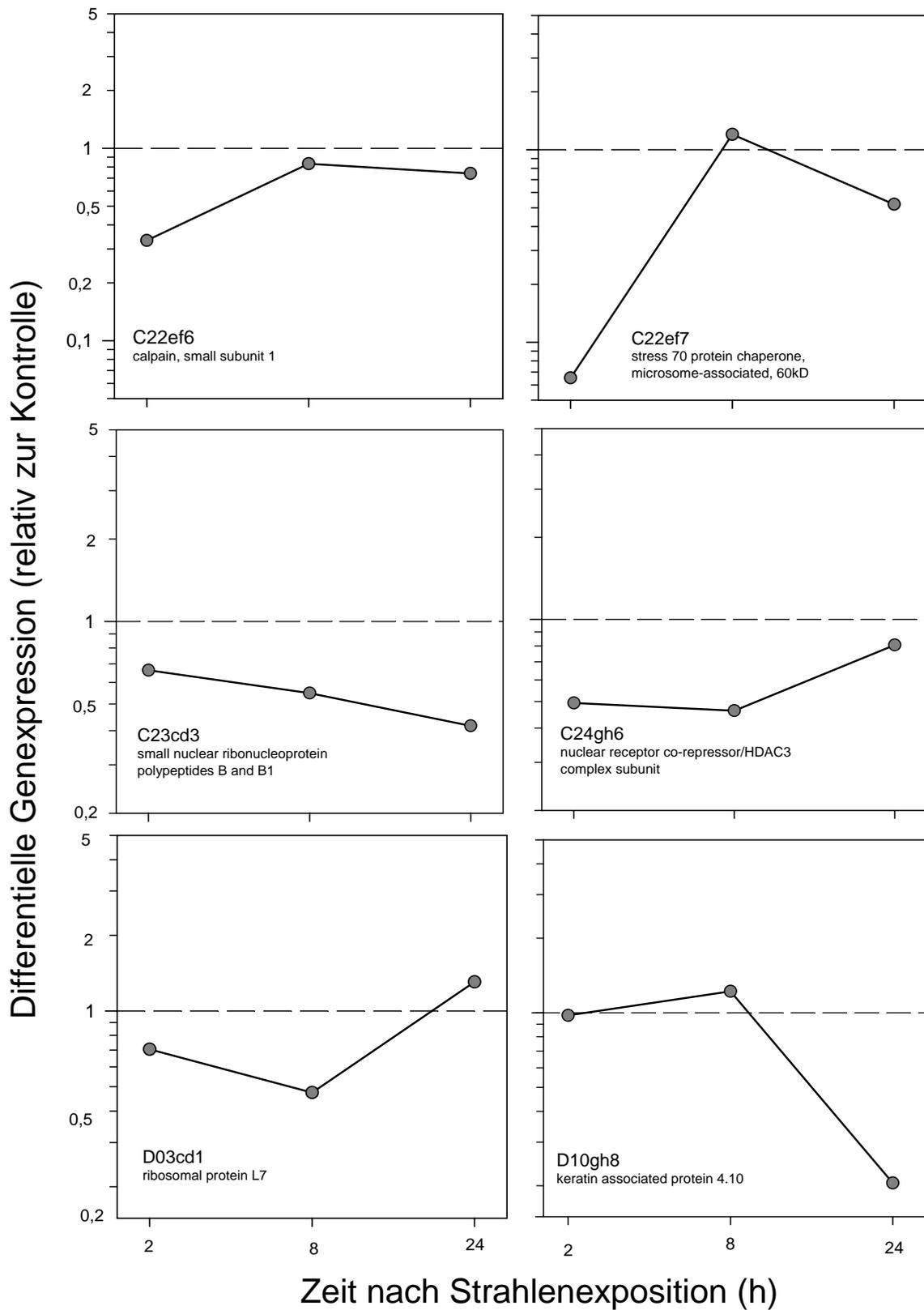
**Abb. 9.7** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene A01cd1 bis A20ab2. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



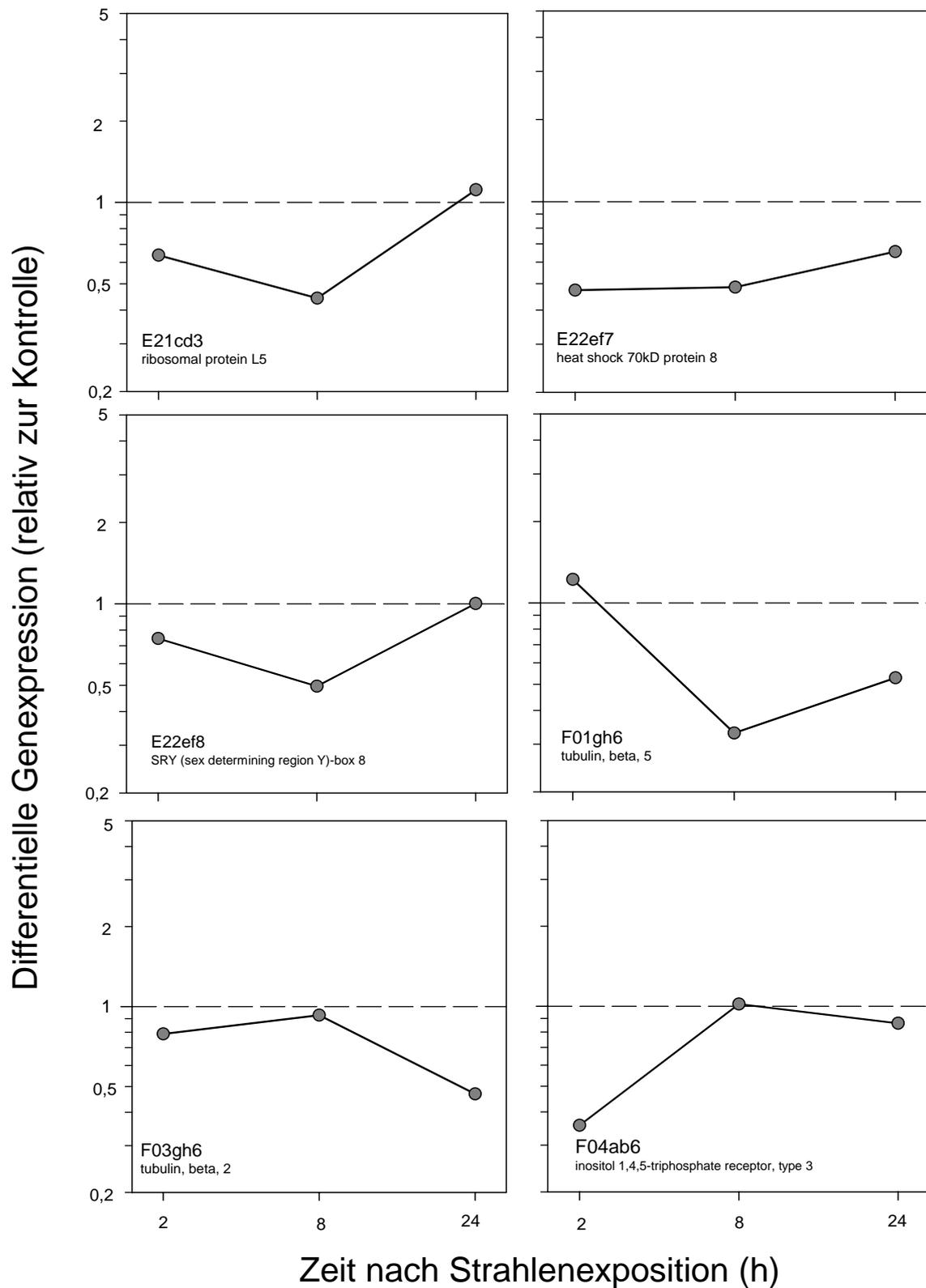
**Abb. 9.8** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene A21ef7 bis B14ab2. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



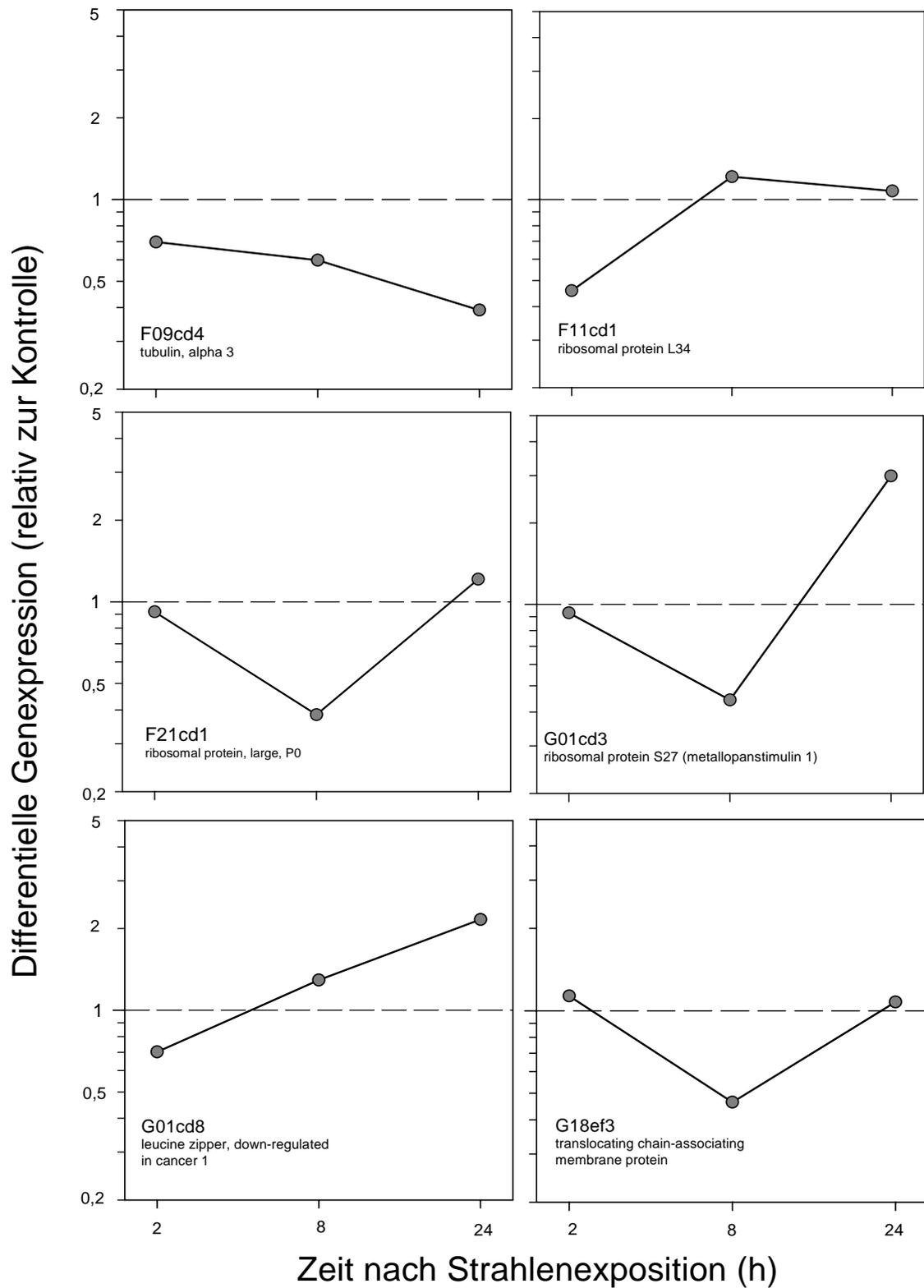
**Abb. 9.9** Differentielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene B16gh6 bis C22ef5. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



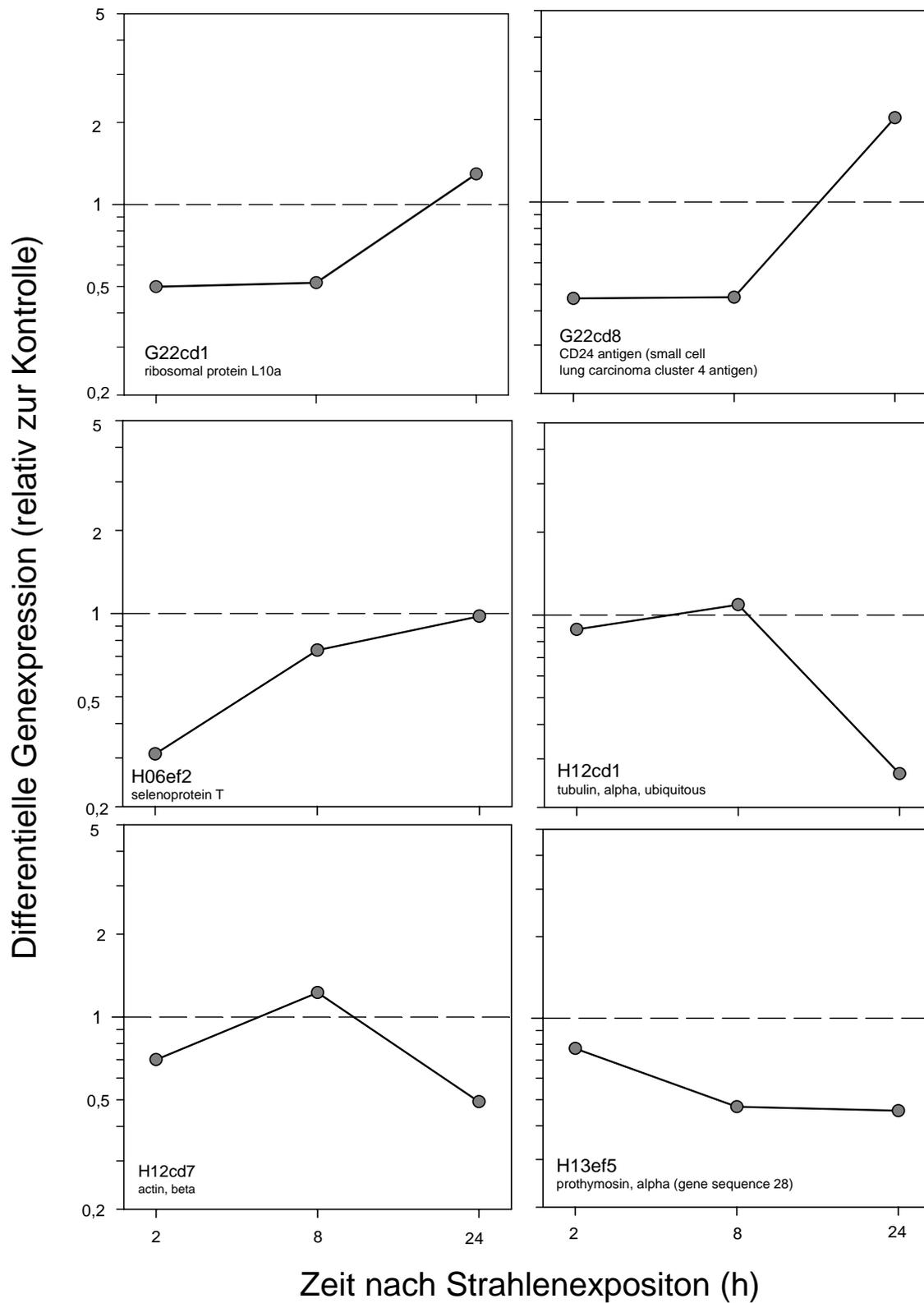
**Abb. 9.10** Differentielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene C22ef6 bis D10gh8. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



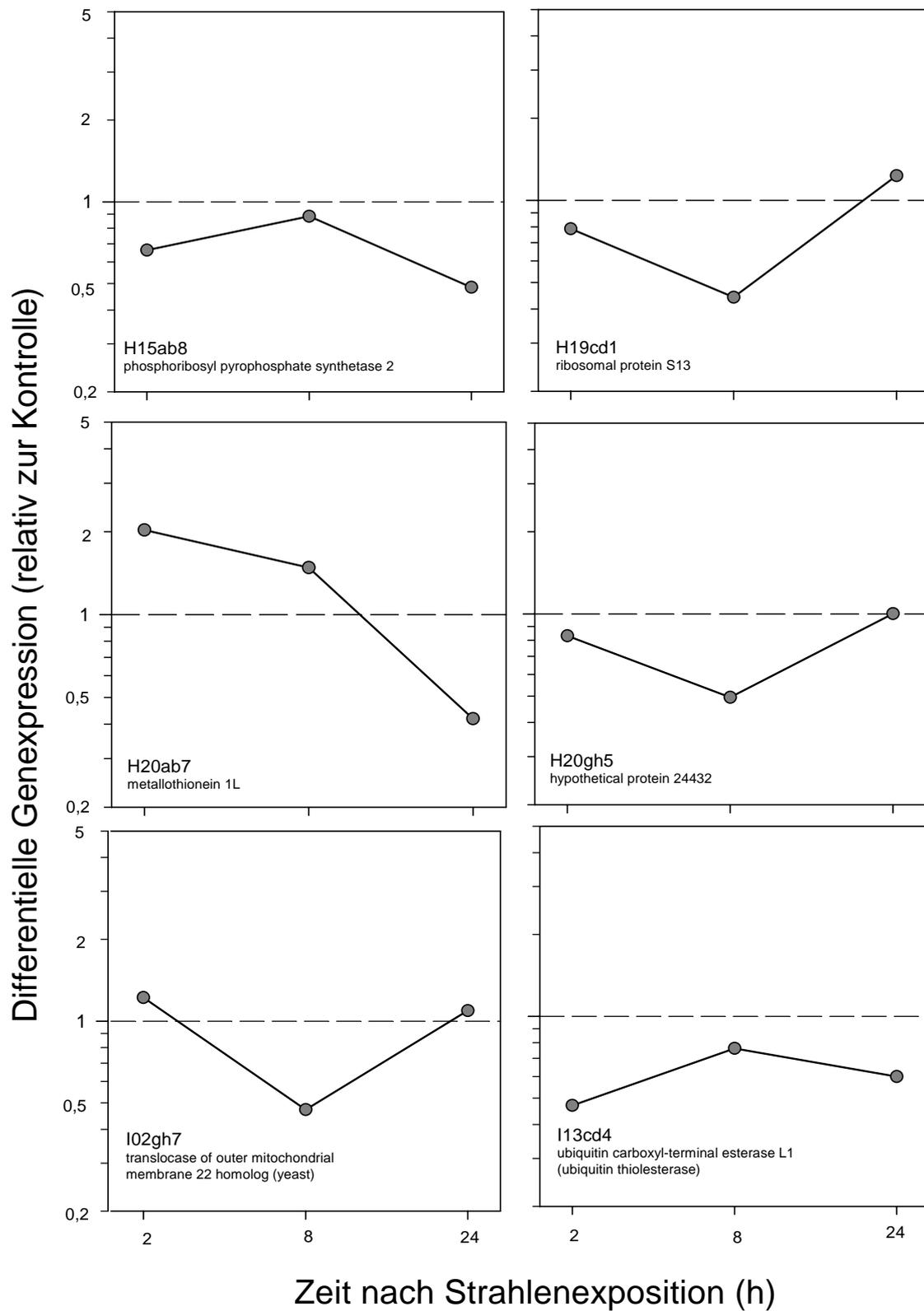
**Abb. 9.12** Differentielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene E21cd3 bis F04ab6. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



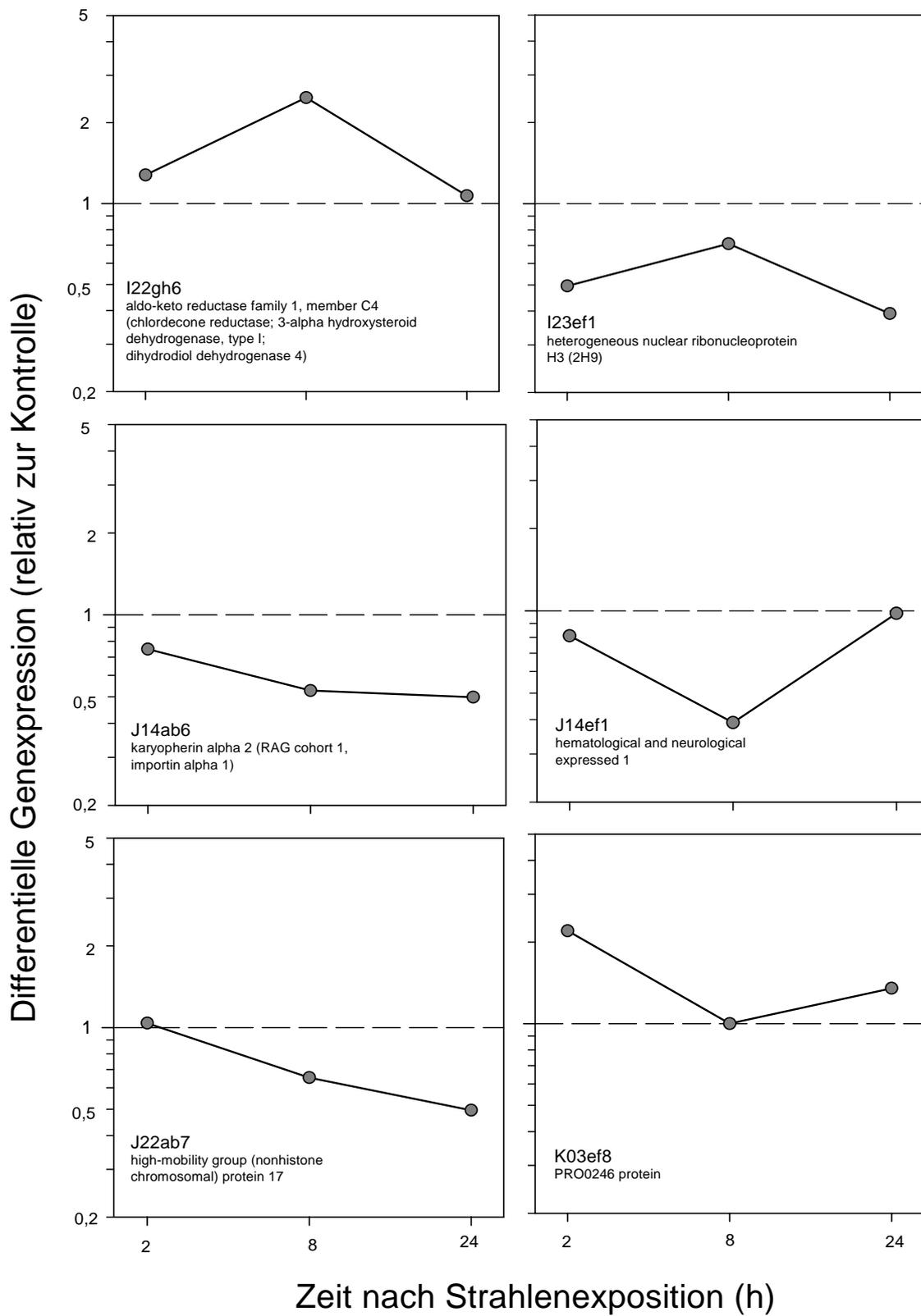
**Abb. 9.13** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene F09cd4 bis G18ef3. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



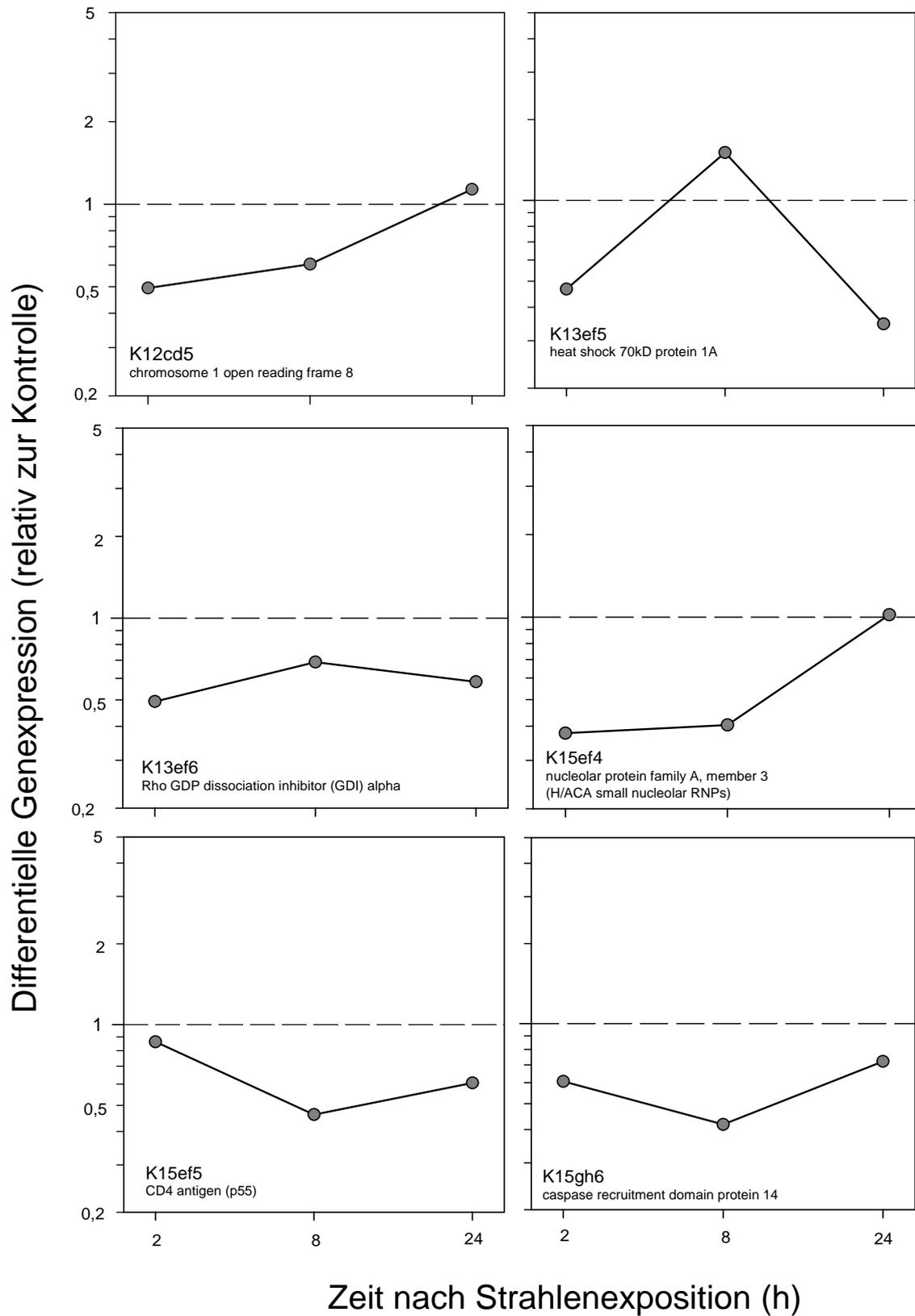
**Abb. 9.14** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene G22cd1 bis H13ef5. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



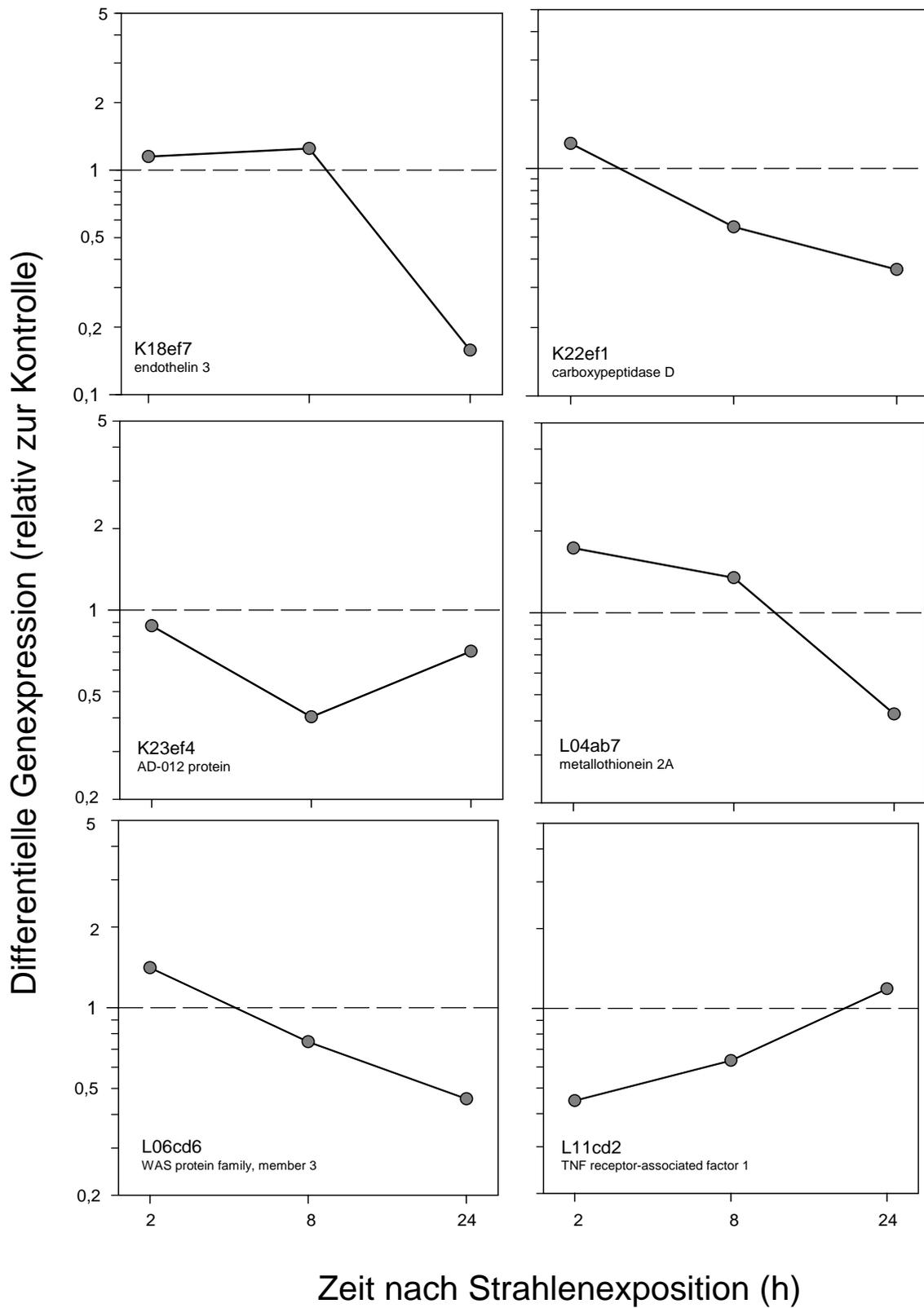
**Abb. 9.15** Differentielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene H15ab8 bis I13cd4. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



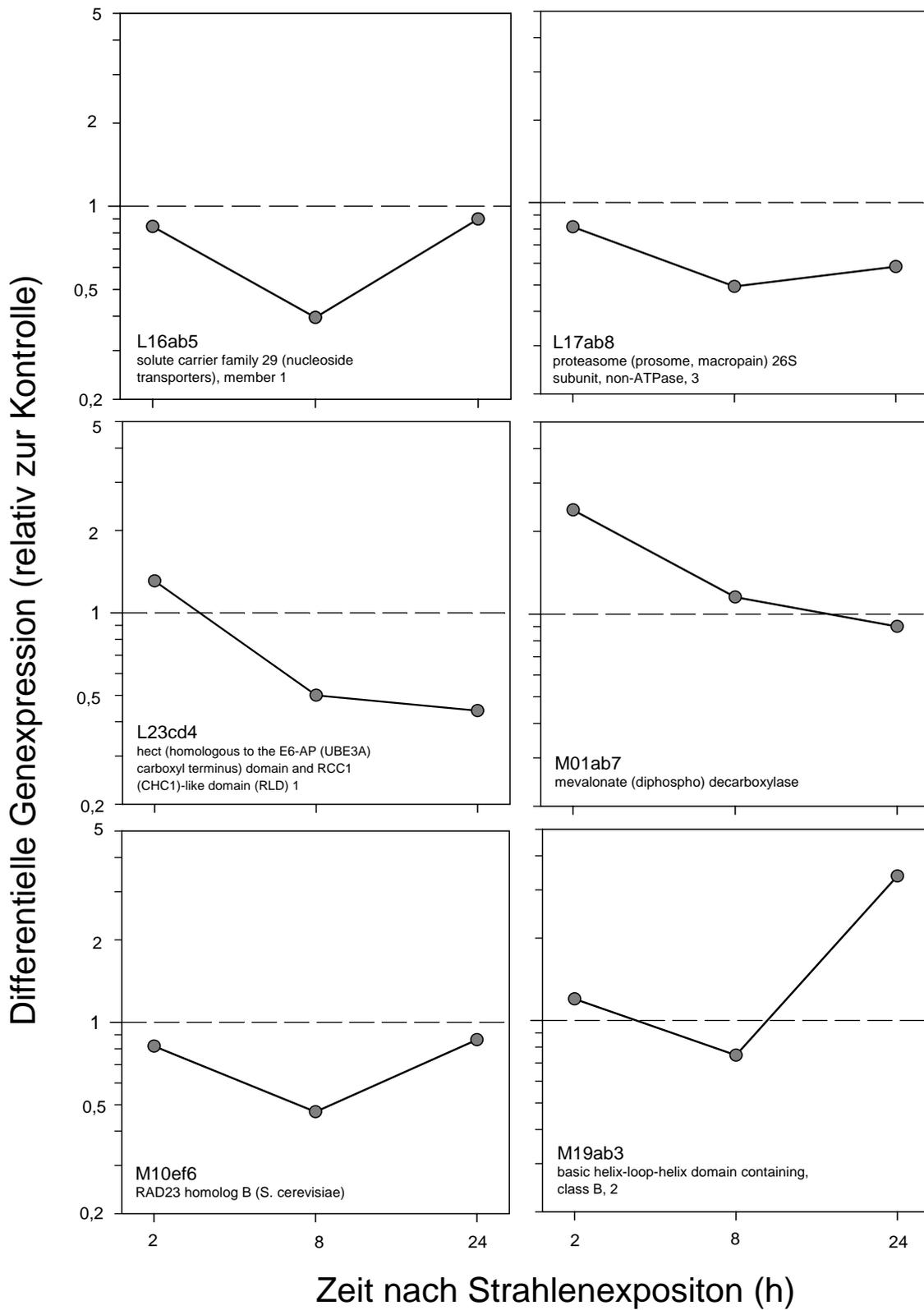
**Abb. 9.16** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene I22gh6 bis K03ef8. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



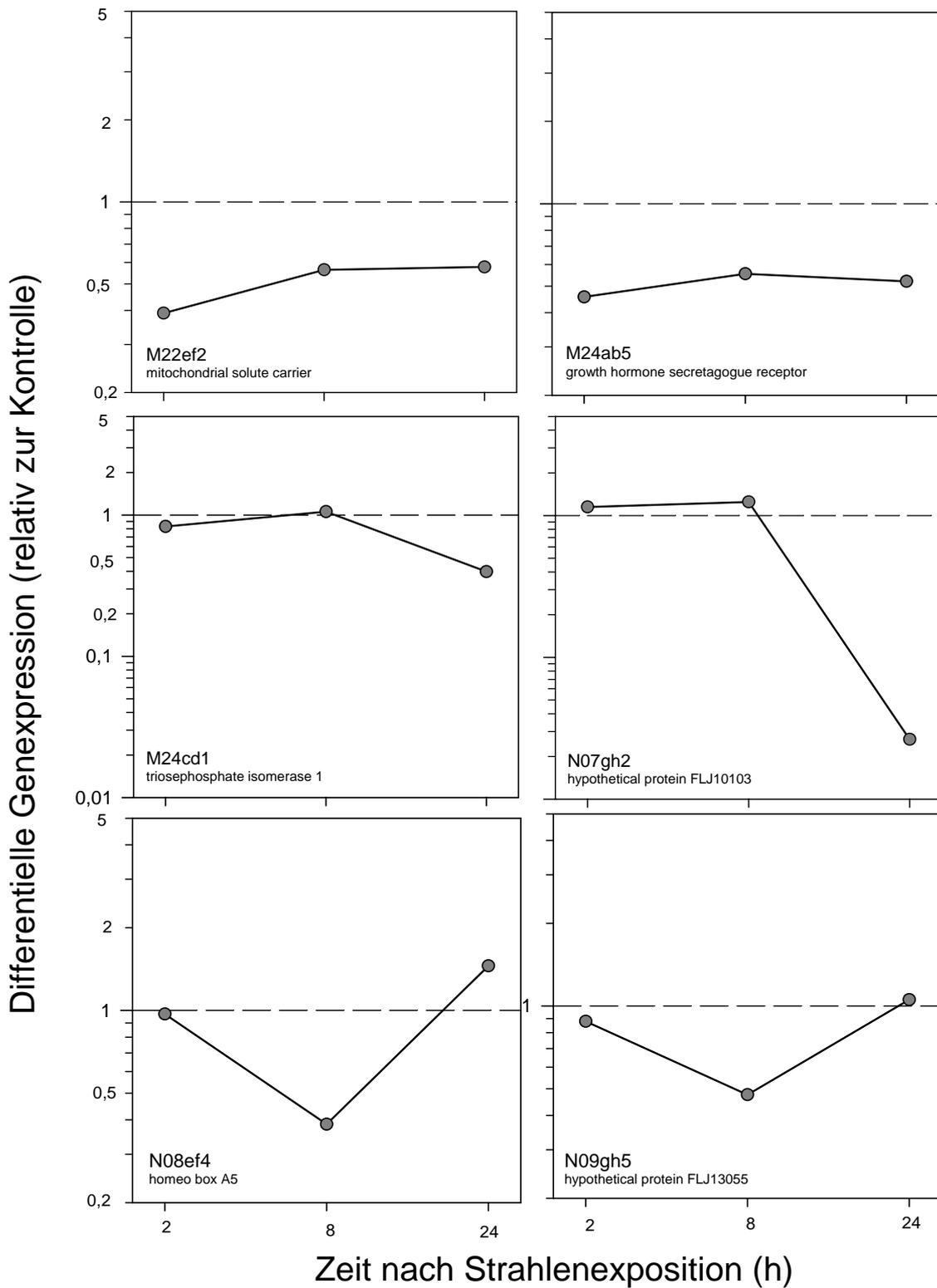
**Abb. 9.17** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene K12cd5 bis K15GH6. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



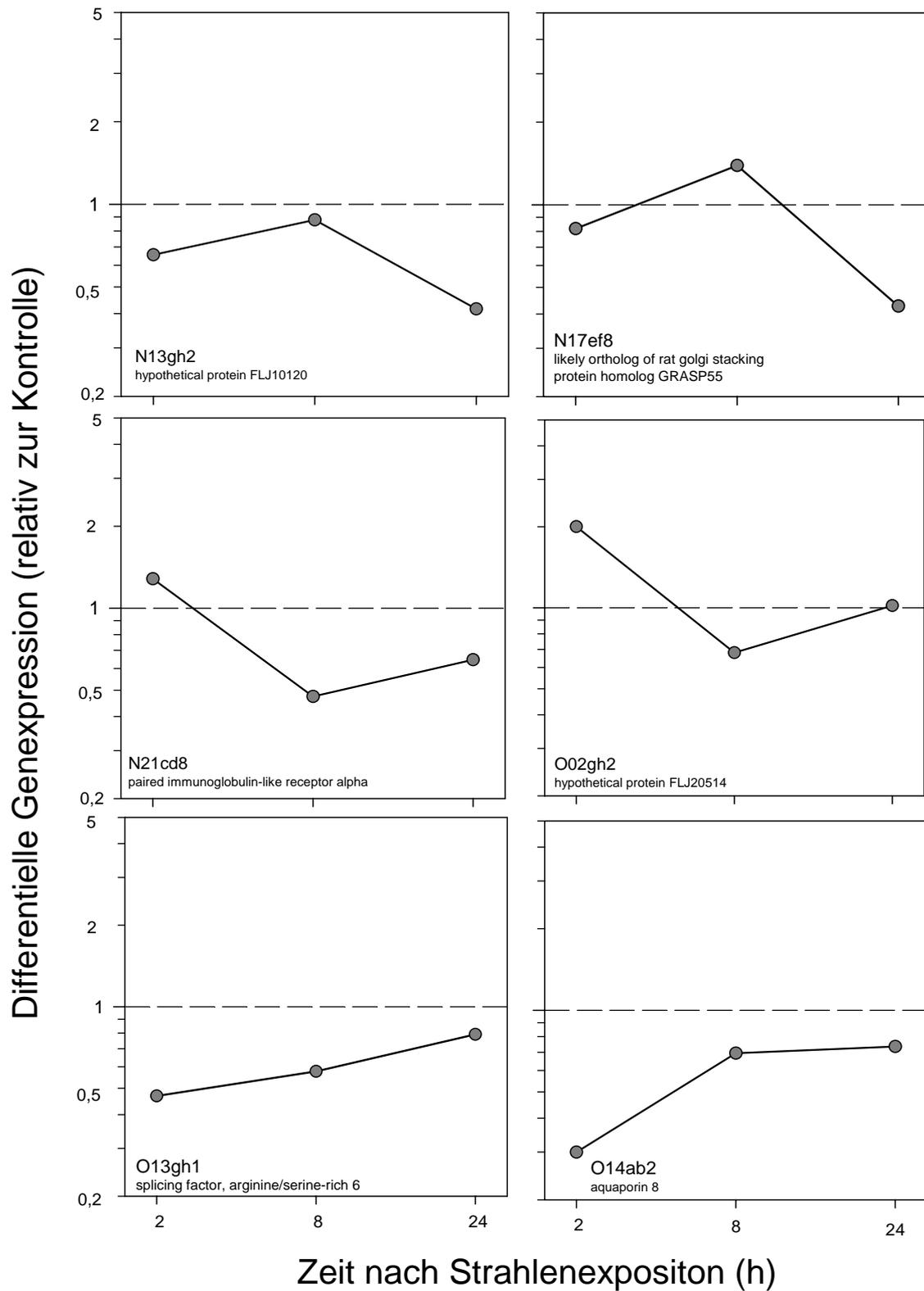
**Abb. 9.18** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene K18ef7 bis L11cd2. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



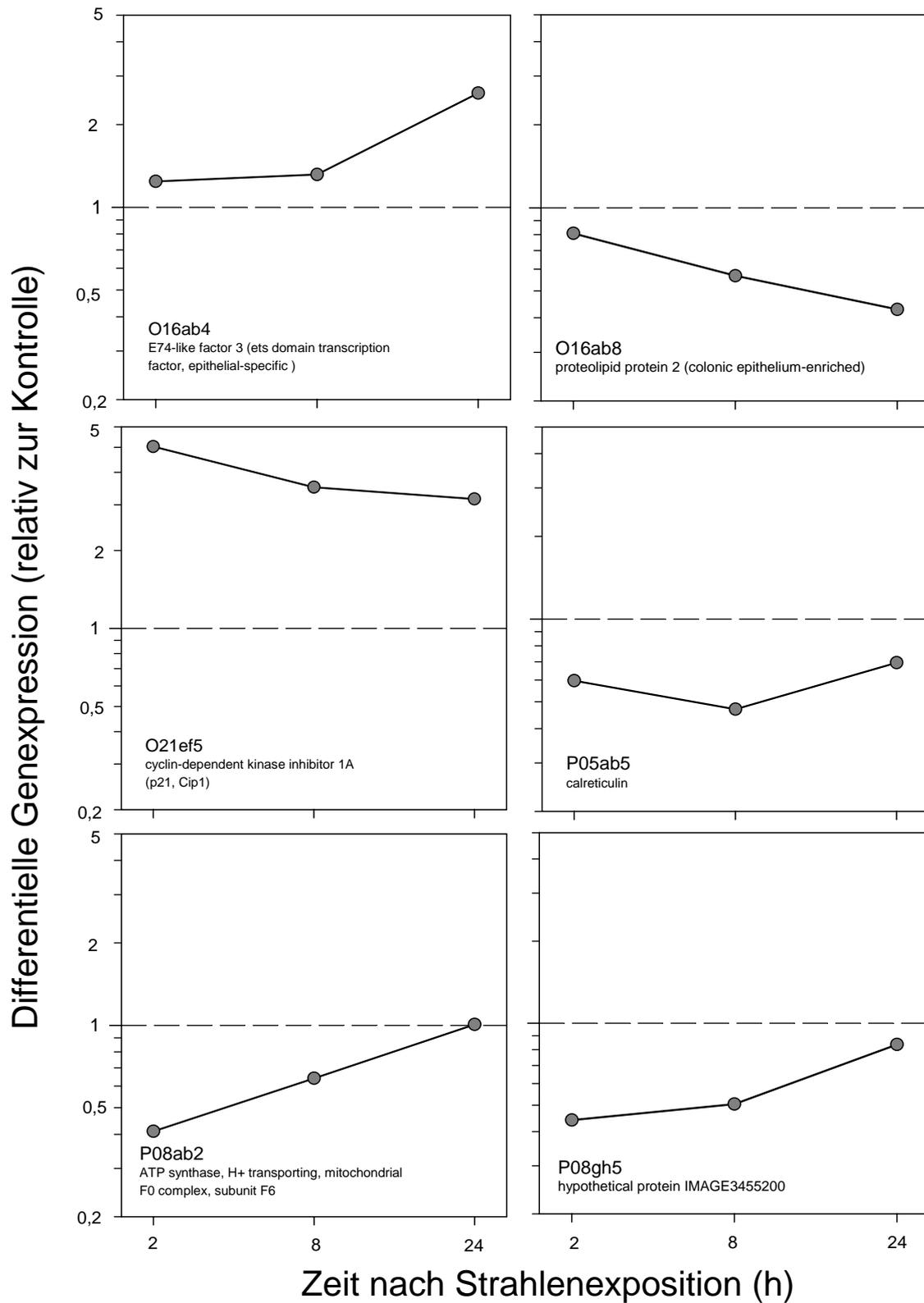
**Abb. 9.19** Differentielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene L16ab5 bis M19ab3. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



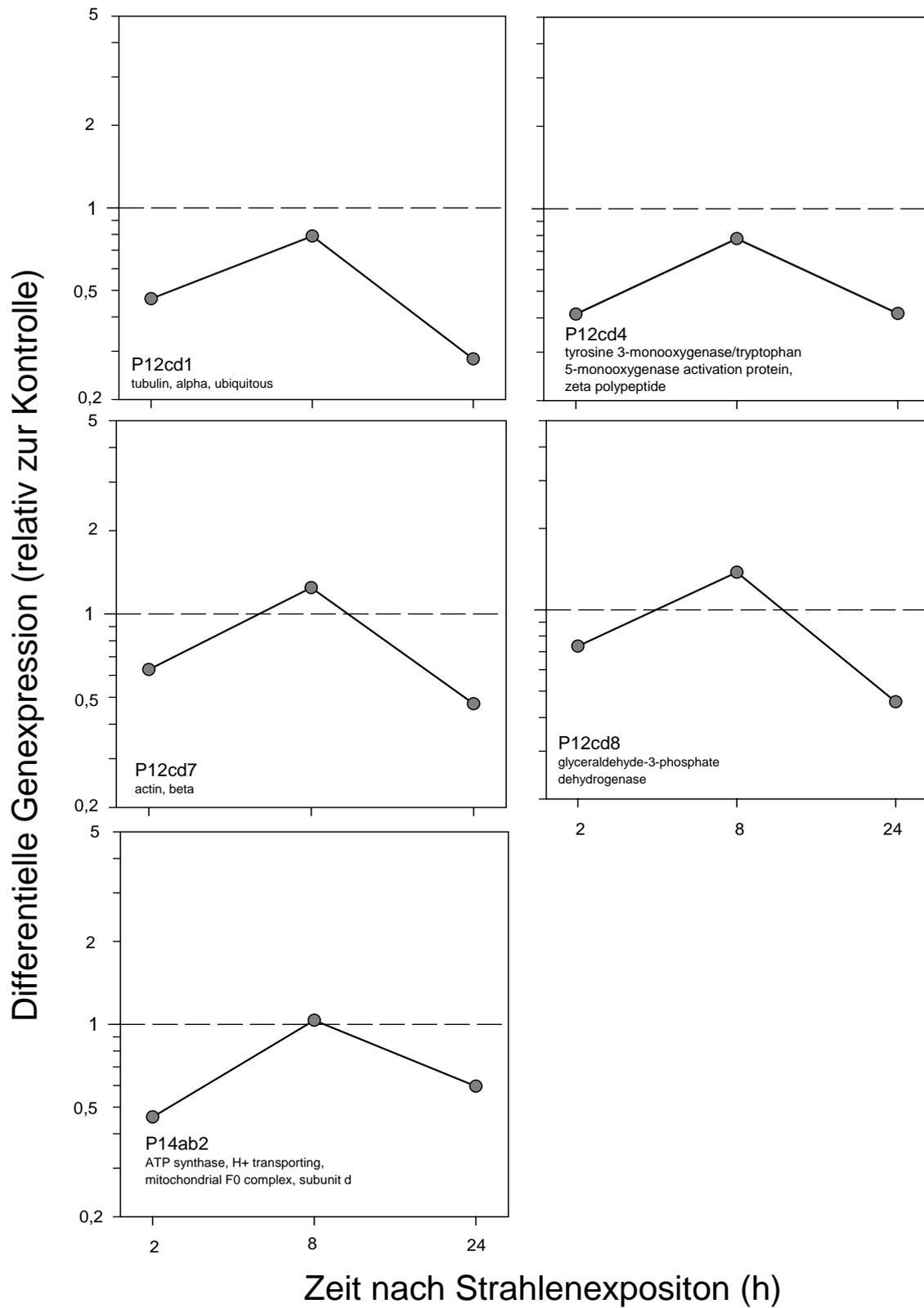
**Abb. 9.20** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene M22ef2 bis N09gh5. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



**Abb. 9.21** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene N13gh2 bis O14ab2. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



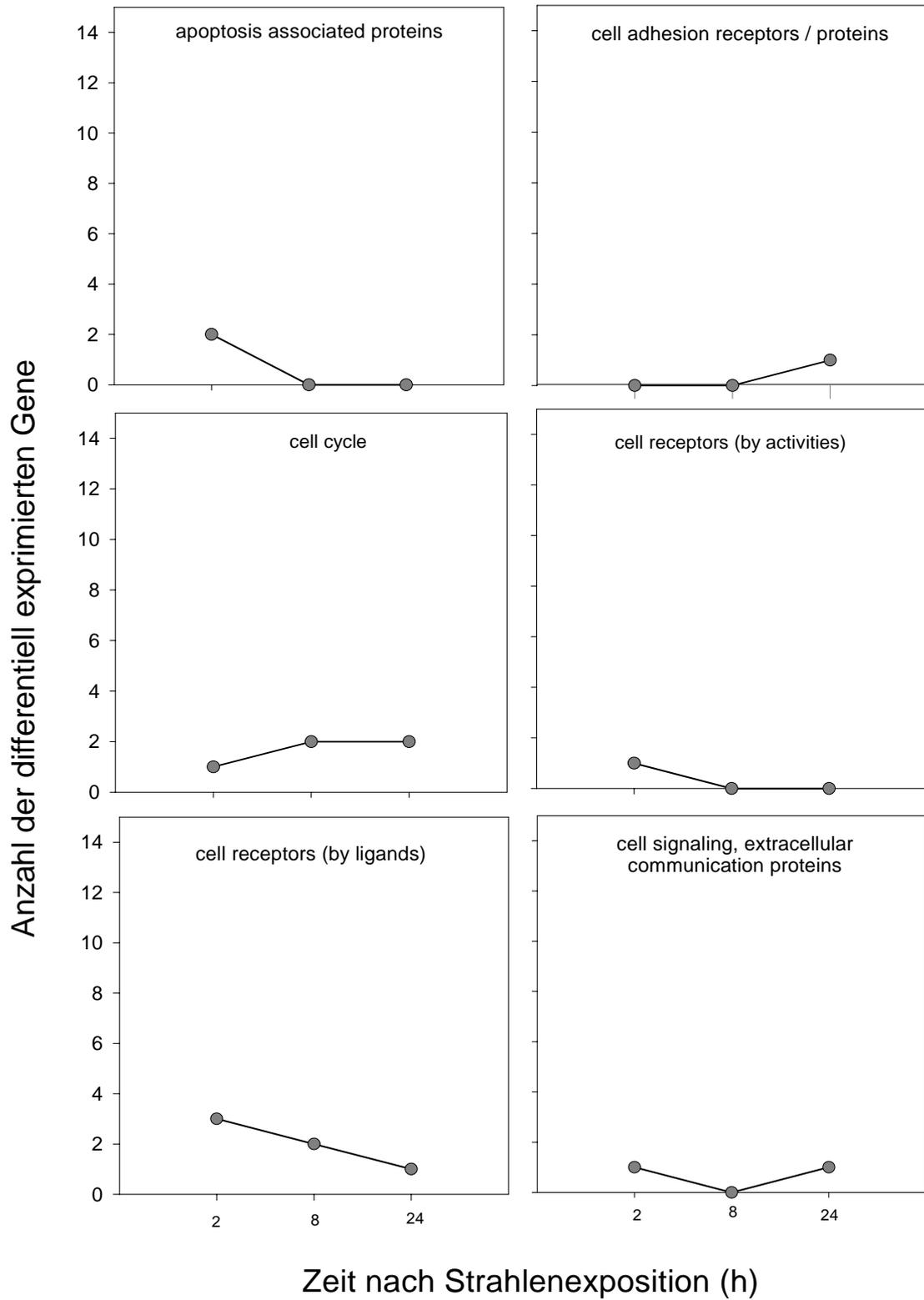
**Abb. 9.22** Differenzielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene O16ab4 bis P08gh5. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.



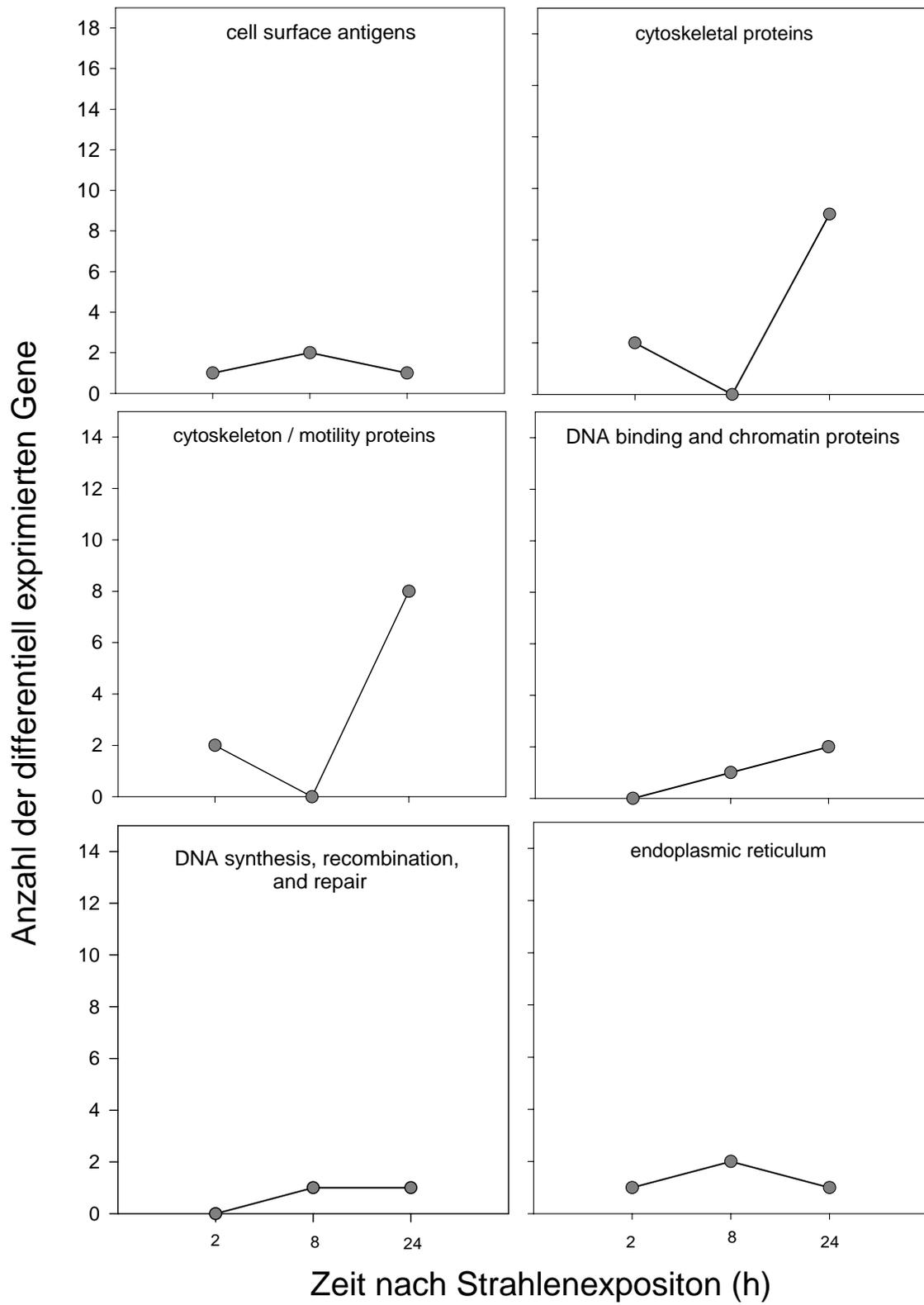
**Abb. 9.23** Differentielle Genexpression relativ zu Kontrolle der Gene P12cd1 bis P14ab2. Bei Werten  $\leq 0,5$  sind die Gene herunterreguliert, bei Werte  $\geq 2$  sind sie hochreguliert.

Einteilungskriterium	Zugeordnete Gene
<p><b>Gene, die Kontrollwerte und nur Herunterregulationen aufwiesen</b></p>	<p>A01cd1, A09cd1, A09cd6, A11cd1,  A15ef1, A21ef7, A22ab4, A23gh3,  A24gh7, B14ab2, B23cd1, B23cd4,  B24ab2, C18cd3, C22ef5, C22ef6,  C22ef7, C23cd3, C24gh6, D03cd1,  D10gh8, D13gh6, D17gh6, D18ef7,  D23g3, E17ab7, E18gh2, E21cd3,  E22ef7, E22ef8, F01gh6, F03gh6,  F04ab6, F09cd4, F11cd1, F21cd1,  G18ef3, G22cd1, H06ef2, H12cd1,  H12cd7, H19cd1, H13ef5, H15ab8,  H20gh5, I02gh7, I13cd4, I23ef1,  J14ab6, J14ef1, J22ab7, K12cd5,  K13ef5, K13ef6, K15ef4, K15ef5,  K15gh6, K18ef7, K22ef1, K23ef4,  L04ab7, L06cd6, L11cd2, L16ab5,  L17ab8, L23cd4, M10ef6, M22ef2,  M24ab5, M24cd1, N07gh2, N08ef4,  N09gh5, N13gh2, N17ef8, N21cd8,  O13gh1, O14ab2, O16ab8, P05ab5,  P08ab2, P08gh5, P12cd1, P12cd4,  P12cd7, P12cd8, P14ab2</p>
<p><b>Gene, die Kontrollwerte und nur Hochregulationen aufwiesen</b></p>	<p>A20ab2, A24ab2, B16gh6, G01cd8,  I22gh6, K03ef8, M01ab7, M19ab3,  O02gh2, O16ab4, O21ef5</p>
<p><b>Gene, die Herunter- und Hochregulationen aufwiesen</b></p>	<p>G01cd3, G22cd8, H20ab7</p>

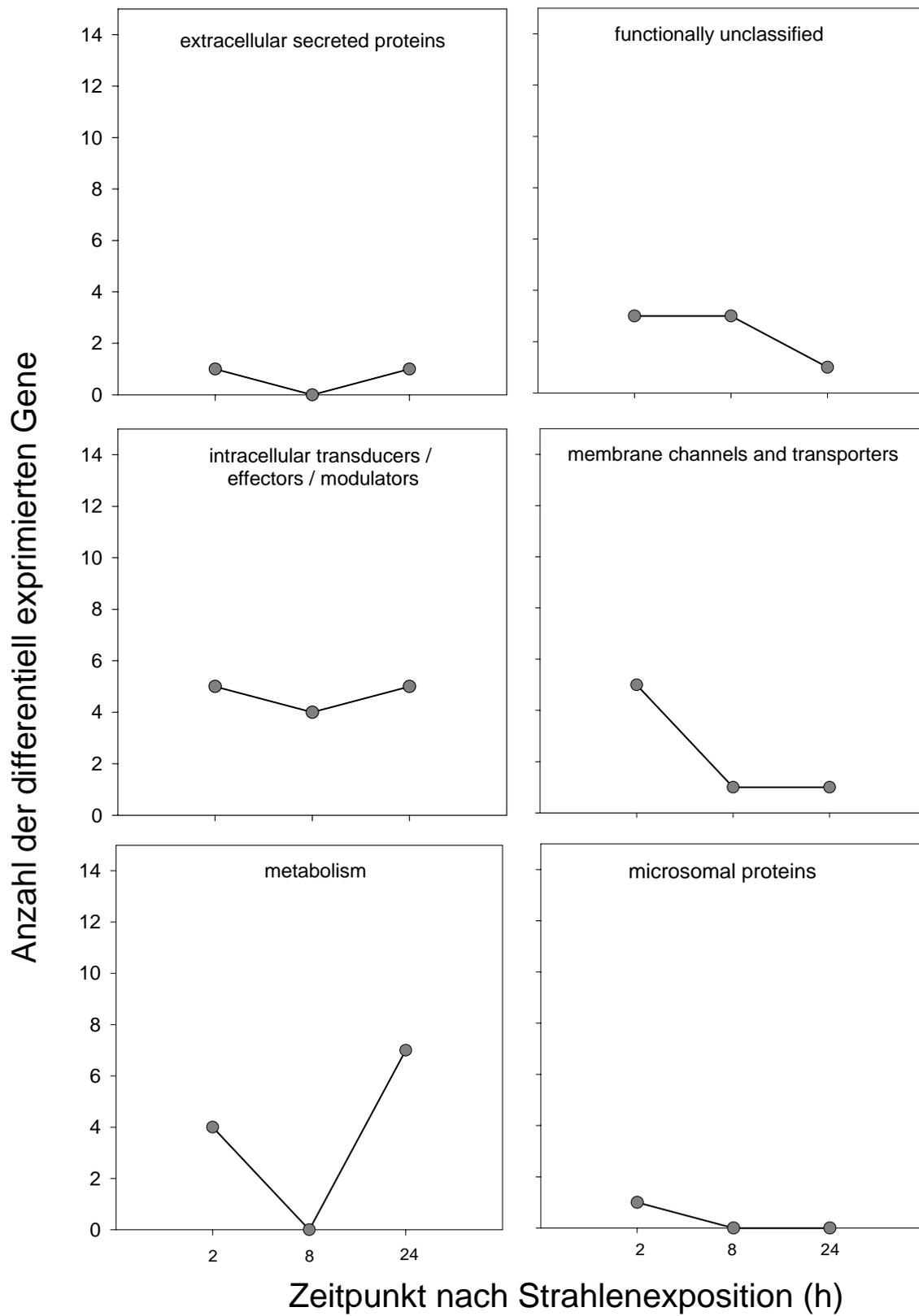
**Tab. 9.12** Zuordnung der Arraylokalisationen der einzelnen Gene, in die jeweils in die Gruppen: Gene mit Kontrollwerten und Herunterregulationen, Gene mit Kontrollwerten und Hochregulationen und Gene mit Hoch- und Herunterregulationen.



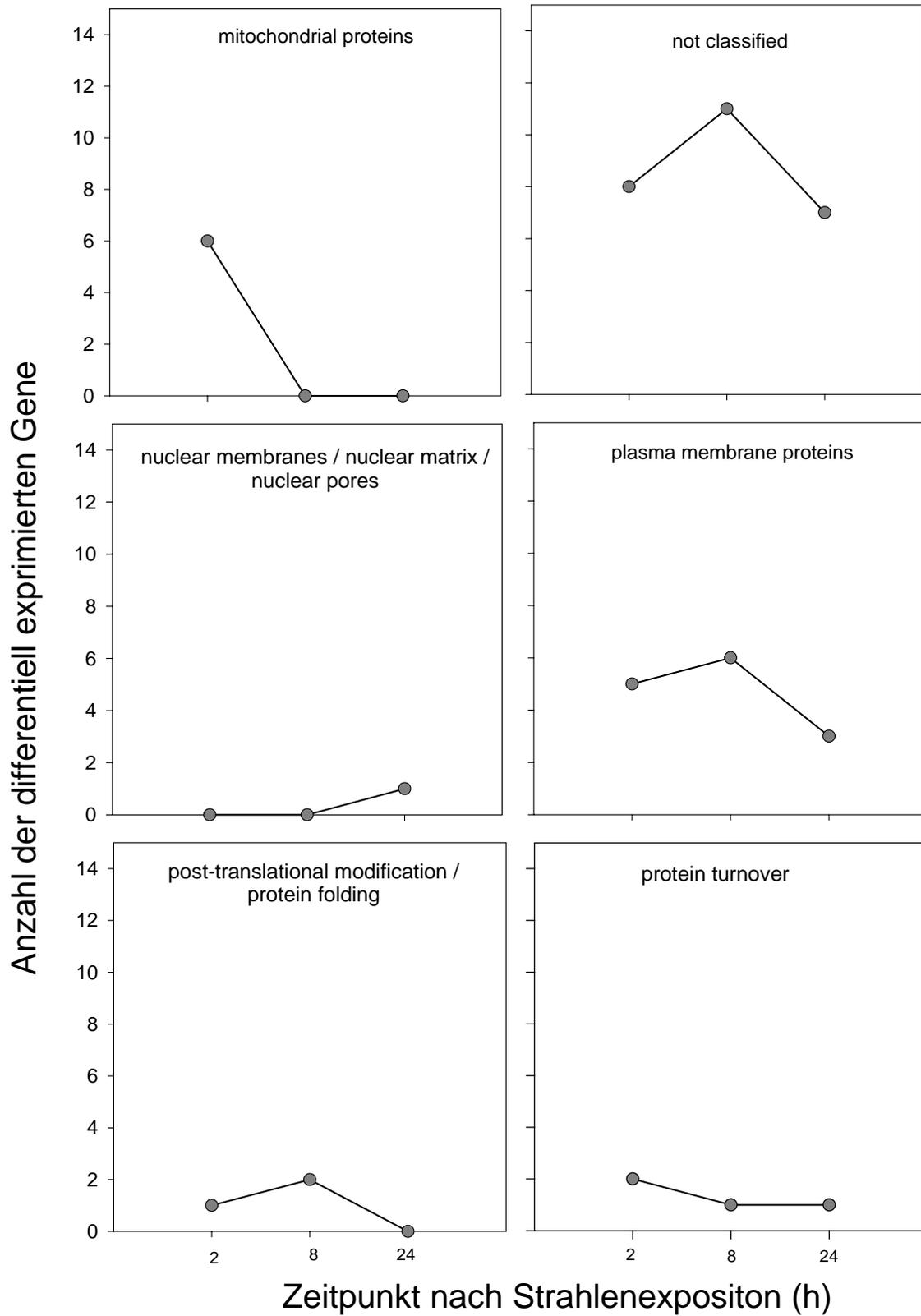
**Abb. 9.24** Einteilung der Gene in die einzelnen Funktionsgruppen, nach dem Klassifizierungssystem von Clontech.



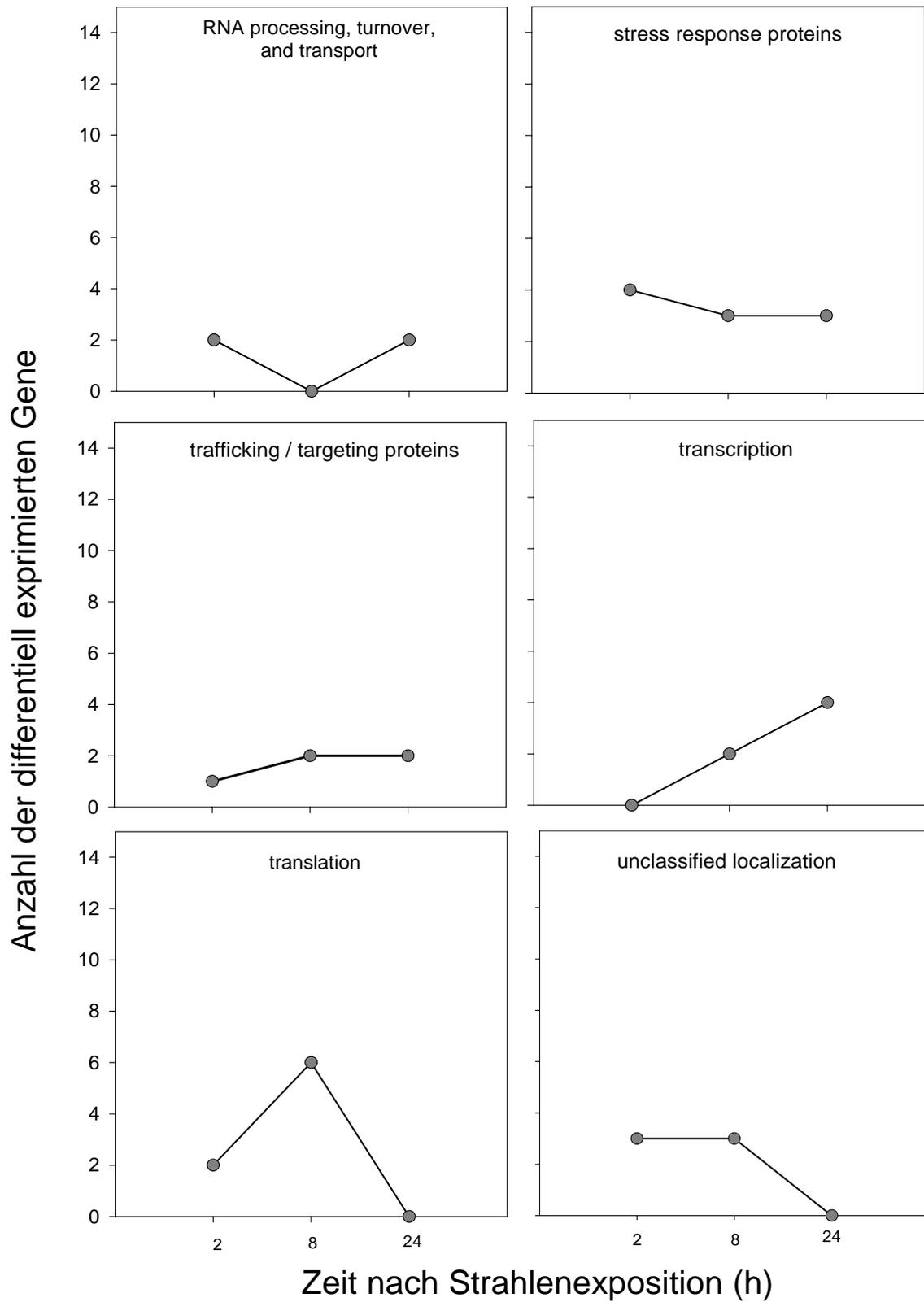
**Abb. 9.25** Einteilung der Gene in die einzelnen Funktionsgruppen, nach dem Klassifizierungssystem von Clontech.



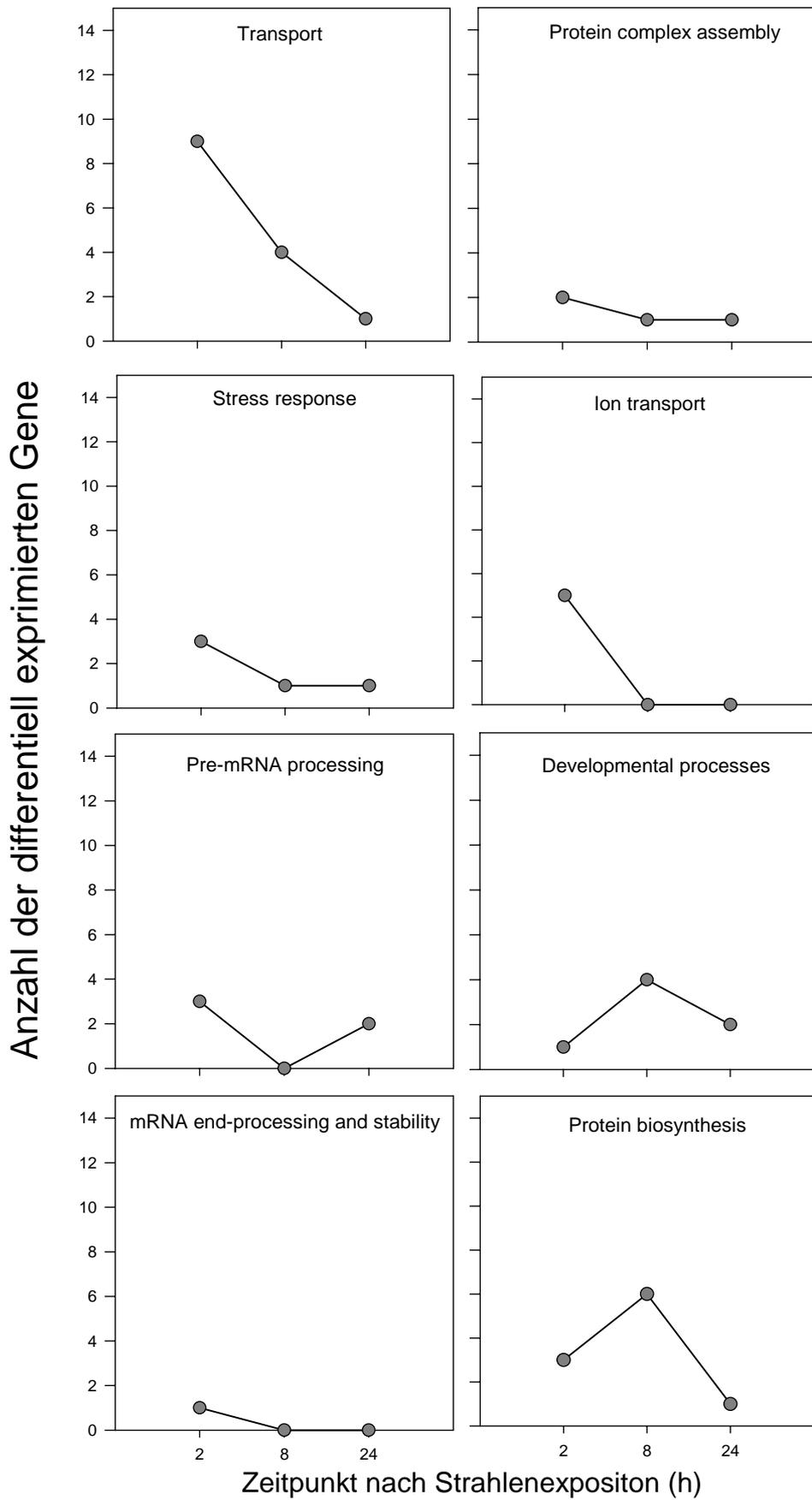
**Abb. 9.26** Einteilung der Gene in die einzelnen Funktionsgruppen, nach dem Klassifizierungssystem von Clontech.



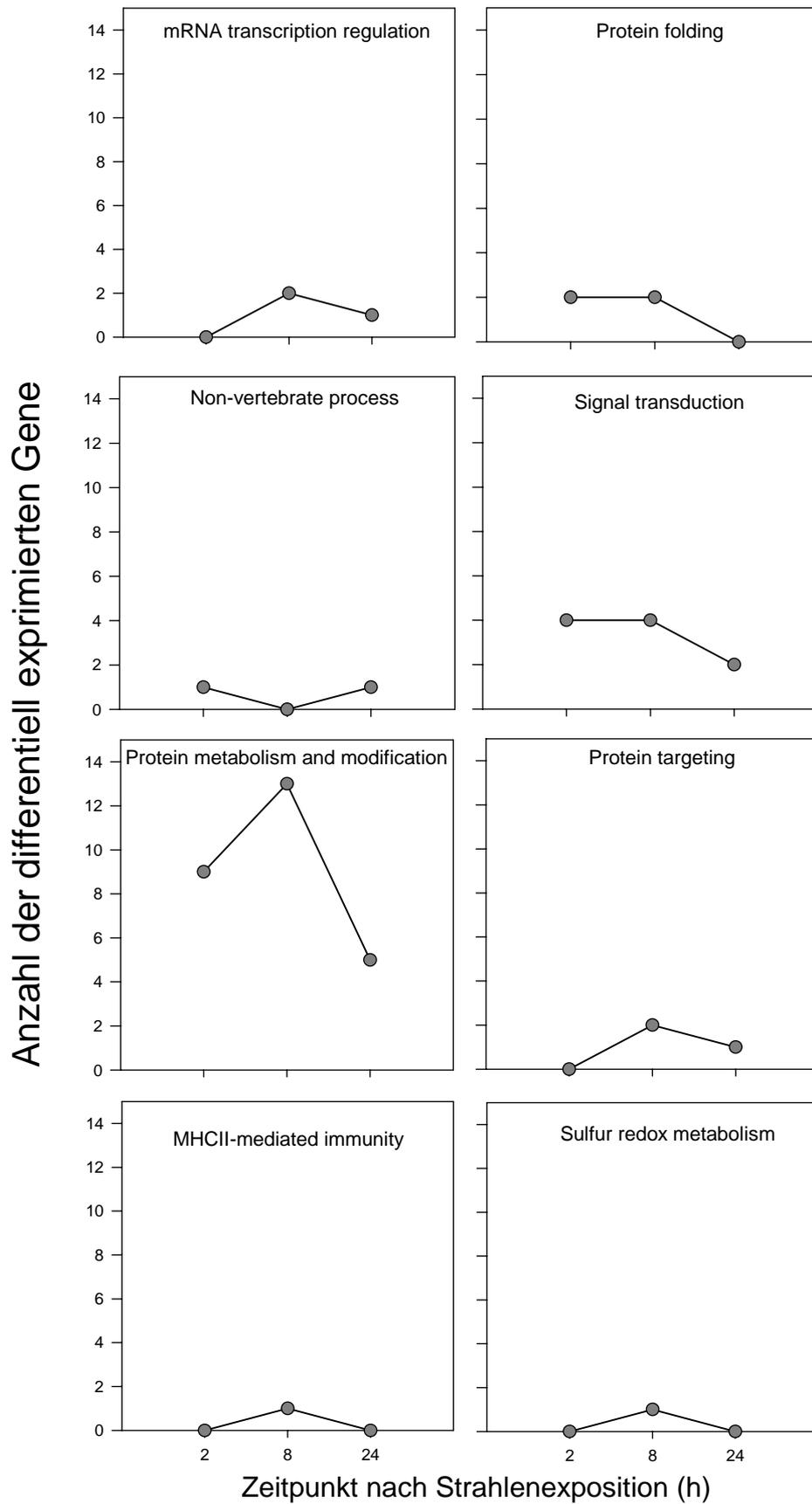
**Abb. 9.27** Einteilung der Gene in die einzelnen Funktionsgruppen, nach dem Klassifizierungssystem von Clontech.



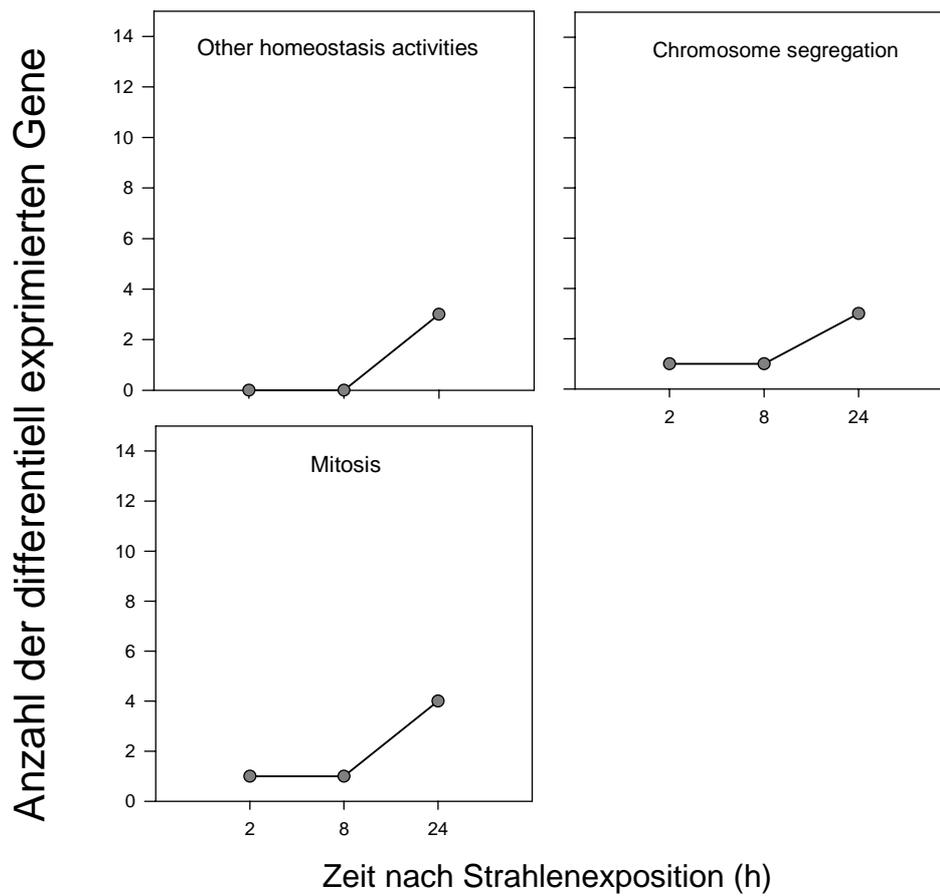
**Abb. 9.28** Einteilung der Gene in die einzelnen Funktionsgruppen, nach dem Klassifizierungssystem von Clontech.



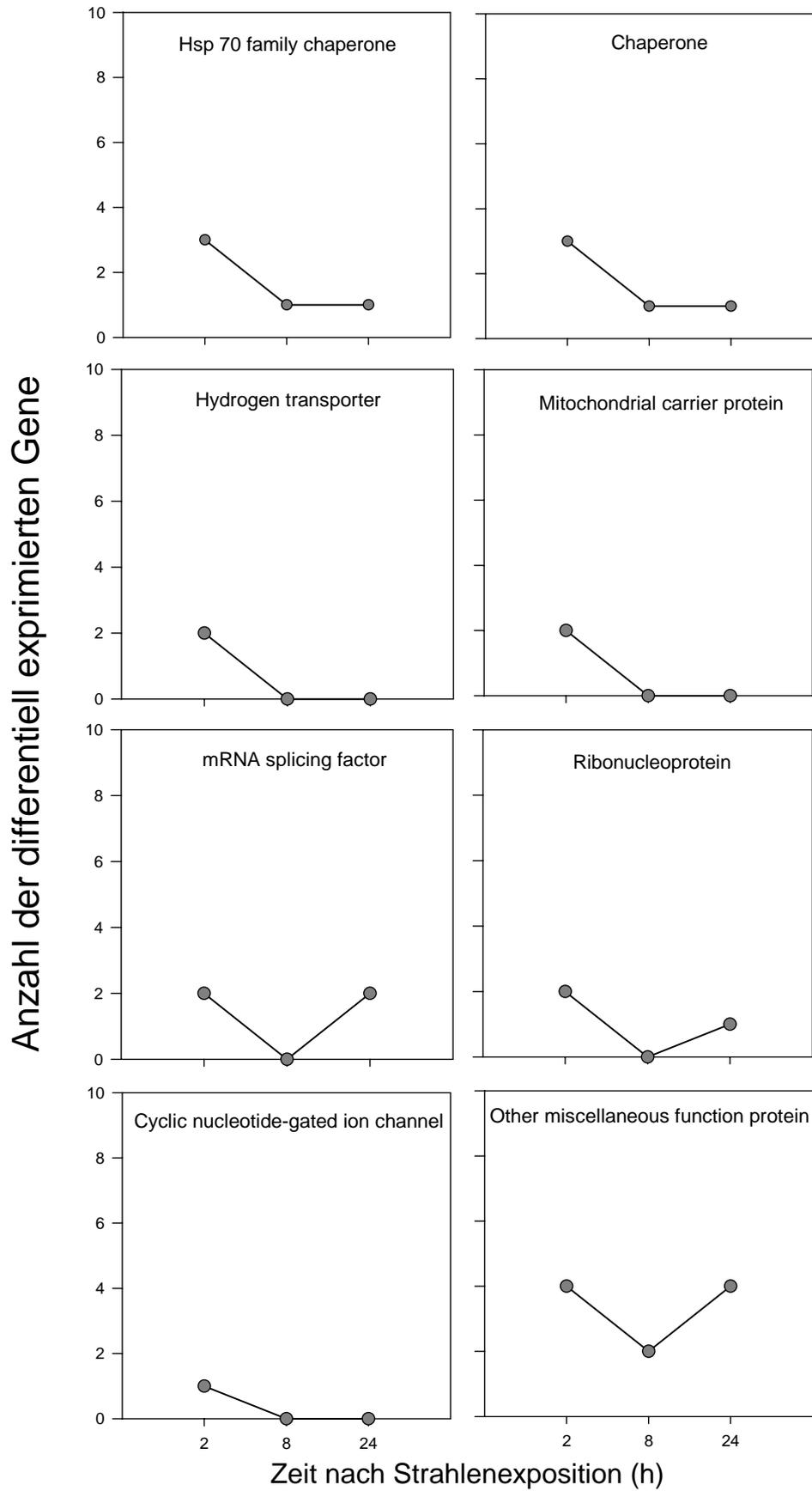
**Abb. 9.29** Einteilung der Gene in unterschiedliche biologische Prozesse nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



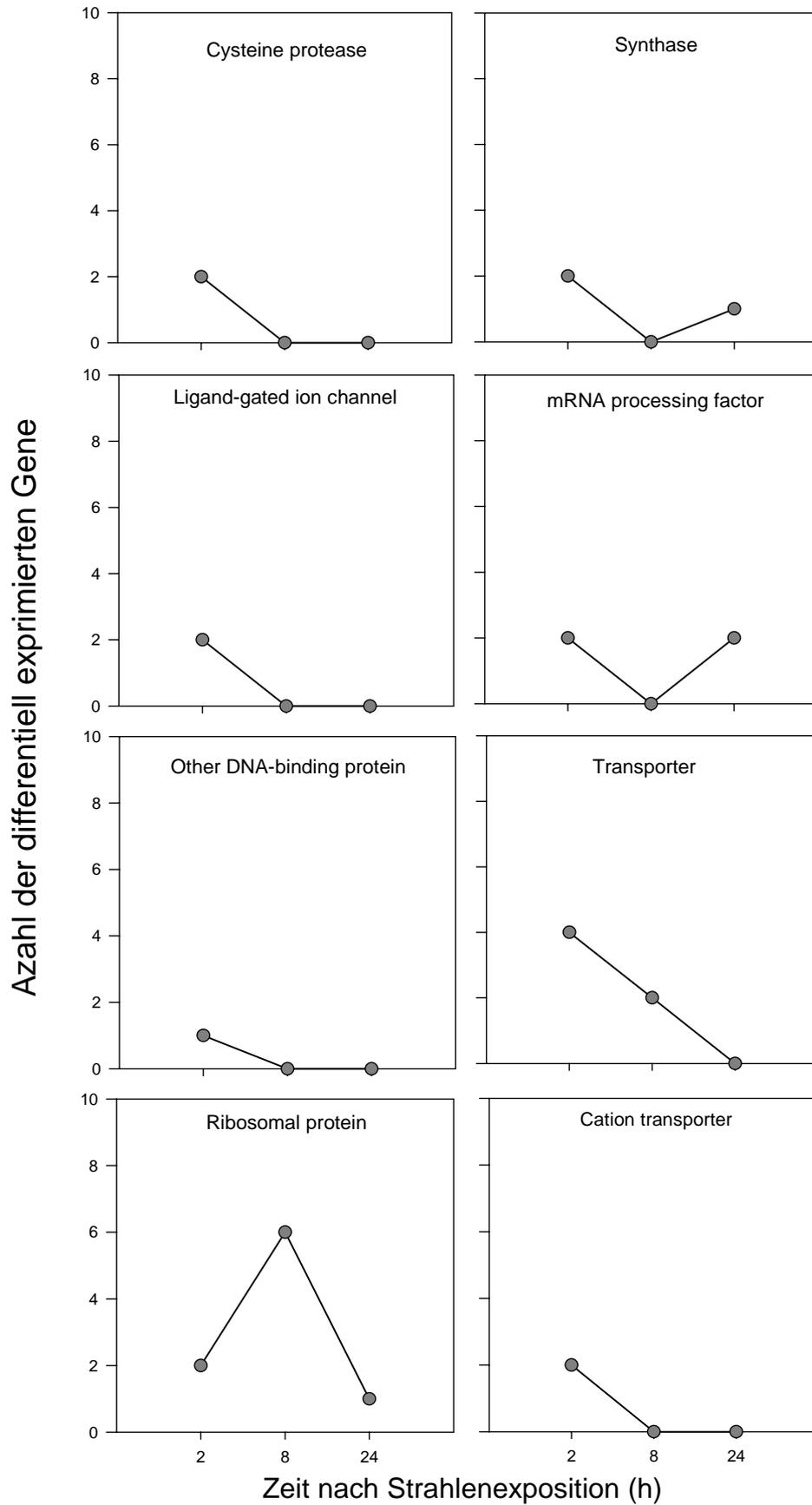
**Abb. 9.30** Einteilung der Gene in unterschiedliche biologische Prozesse nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



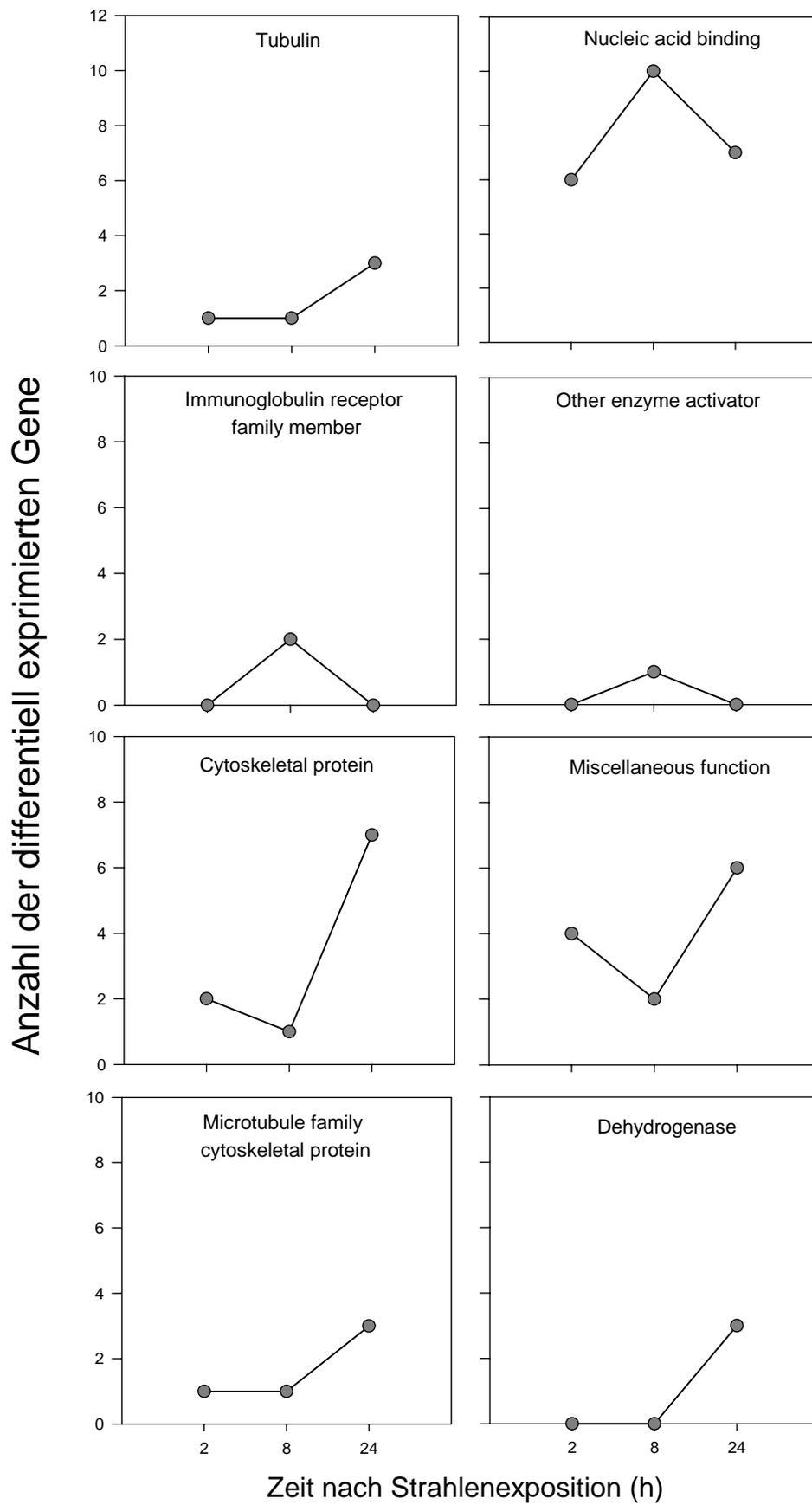
**Abb. 9.31** Einteilung der Gene in unterschiedliche biologische Prozesse nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



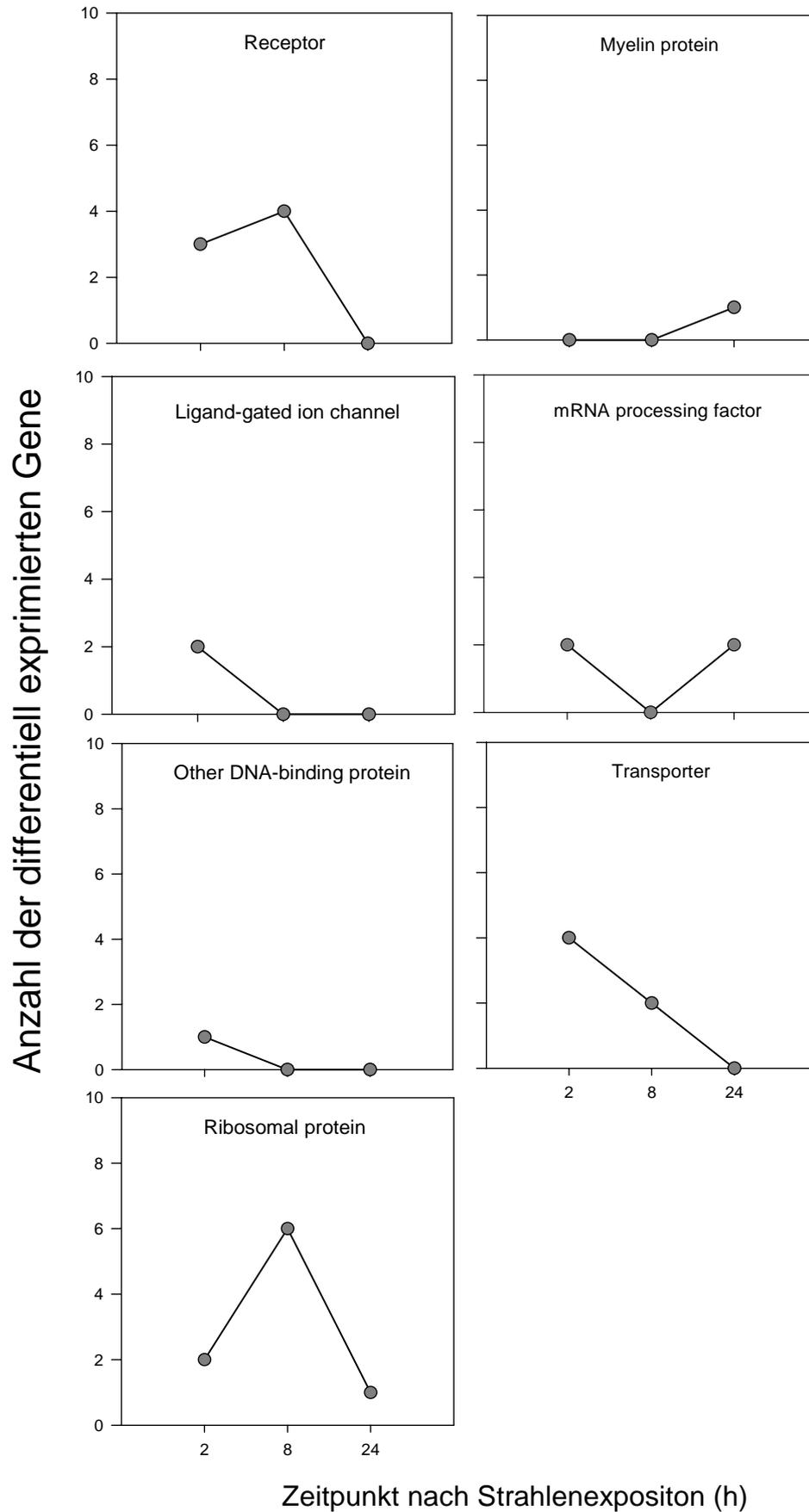
**Abb. 9.32** Einteilung der Gene in unterschiedliche molekulare Funktionen nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



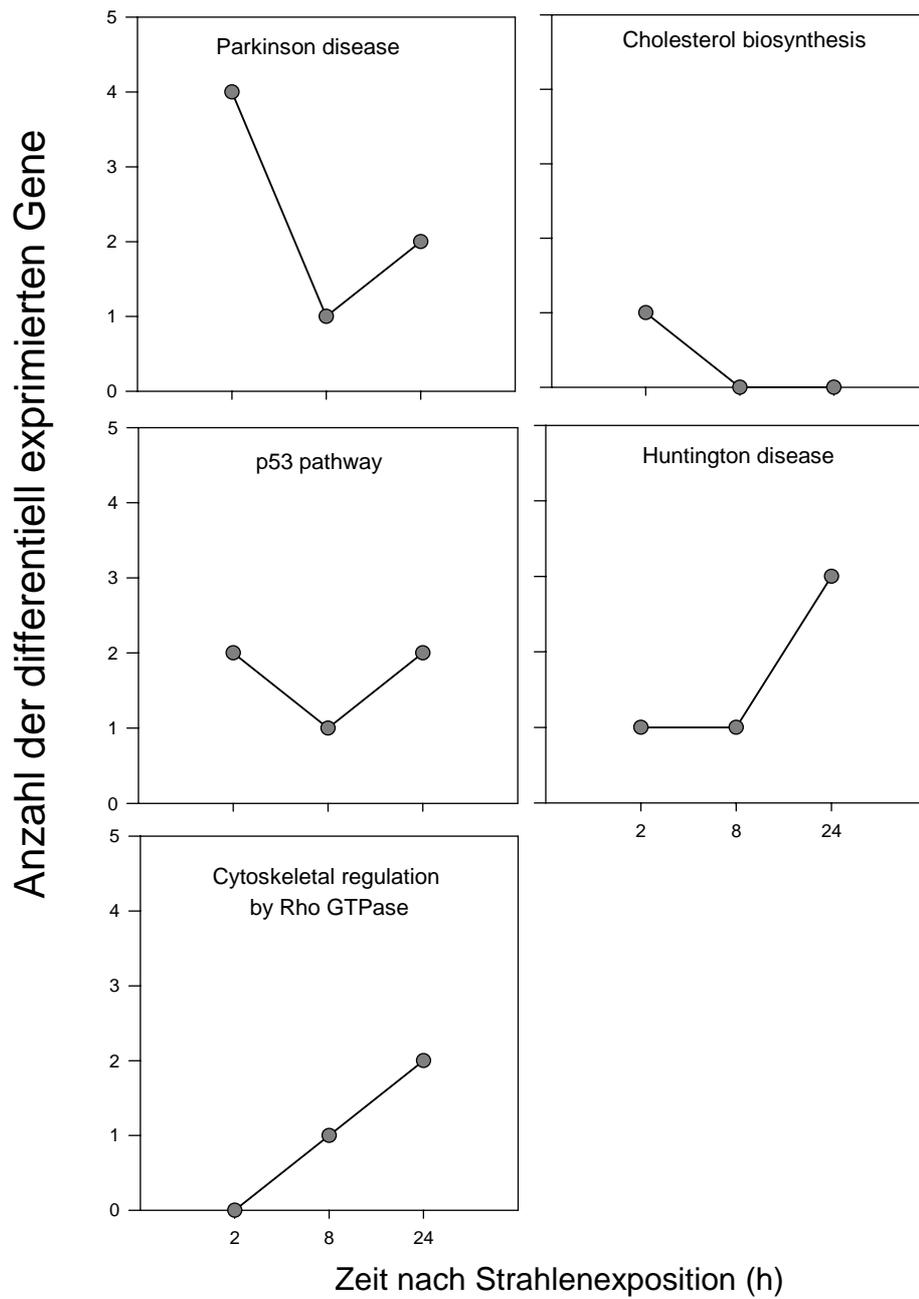
**Abb. 9.33** Einteilung der Gene in unterschiedliche molekulare Funktionen nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



**Abb. 9.34** Einteilung der Gene in unterschiedliche molekulare Funktionen nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



**Abb.9.35** Einteilung der Gene in unterschiedliche molekulare Funktionen nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.



**Abb. 9.36** Einteilung der Gene in unterschiedliche Signalwege nach dem Klassifizierungssystem der Panther<sup>R</sup>-Software.

**A: Apoptose assoziierte Gene:**

A02ef6, A03ab6, A04ef6, A05cd5, A06ef6, A08ef6, A09ab7, A10ef6, A12ef6, A14ef6, A15cd1, A16ef6, A18ef5, A18ef6, A20ef6, A22ef6, A23cd4, A24ef6, B01ef6, B03ef6, B05cd3, B05ef6, B06cd2, B07cd6, B08ef1, B11cd2, B13ab2, B20cd8, C01cd1, C01cd4, C02cd2, C02ef3, C02ef6, C03cd7, C04ef6, C05cd4, C05cd6, C06ef5, C06ef6, C06ef7, C07cd4, C08ef6, C09cd4, C10ef6, C12ef6, C14ef6, C16ef6, C17cd4, C18ef6, C18ef7, C19cd4, C20ef6, C21cd4, C22ab3, C22ef6, C24ef6, D02cd7, D04cd7, D05ef3, D09ab5, D18cd3, D18cd7, E02ef5, E02ef6, E04ef6, E06ef6, E08ef6, E09ab4, E10cd6, E10ef6, E12ab7, E12ef6, E14ef6, E14ef7, E16cd1, E16ef6, E16ef7, E18ef5, E18ef6, E18ef7, E19ab5, E20ab5, E20ef6, E22ef5, E22ef6, E24ef6, E24ef7, F01ab7, F02ab4, F02ef3, F03ab7, F03ef2, F08cd4, F14ab5, F22cd4, F23cd3, F23ef5, F24cd4, G02ef6, G02ef7, G03cd4, G04ab8, G04ef6, G05cd5, G06ef6, G08ef6, G10ef6, G12ef6, G14ef3, G14ef6, G16ef6, G18ef6, G19ab5, G20ef3, G20ef6, G22ef6, G24ef6, H06ef5, H10ab3, H11ab4, H11cd5, H16cd6, H20cd4, H24ef2, I02cd2, I02cd8, I02ef6, I06ef4, I09cd4, I15ef5, I17ab3, I17ef3, I19ab3, J02cd3, J04cd3, J05ef7, J07cd8, J11cd5, J16ef2, J21cd3, K06cd7, K07cd4, K09ef3, K18ab2, K19ab4, K20ef3, K21ef3, K21ef4, K22cd5, K22cd8, K23cd7, K24ef1, L07ef3, L09ab3, L10ef3, L11ab5, L11cd2, L13ab5, L20ab3, L20ef4, L22ab3, L24ab3, L24ef5, M02ef3, M06cd7, M07cd5, M09ef5, M11ab5, M11cd6, M16ef5, N04ab3, N06cd8, N20cd3, N20ef1, N21cd2, N21ef3, N23ab2, O01ab3, O01ef3, O02ef3, O05ef5, O07ef6, O09ef6, O11ef6, O13ef6, O15ef6, O17ef6, O19ef6, O21ef6, O23ef6, O24ef1, O24ef6, P01ab2, P04ef5, P05ab7, P05ef3, P06ef5, P07cd4, P07cd8, P11ab2, P14ab3, P15cd2, P16ab3, P16ef3, P18ab3, P19ef3, P22cd3

**B: Zellzyklus assoziierte Gene:**

A04ef5, A05ab4, A07ab4, A11cd7, A17cd7, A17ef6, A22ab5, A22ab7, A23ab4, B01ef5, B02ab8, B02ef1, B03ef5, B04ef2, B05ef5, B07ef5, B09ab8, B09ef5, B11ef5, B12ef6, B13ef5, B14ef1, B14ef6, B15ef5, B17ef5, B19ef5, B20ab5, B21ef5, B22cd3, B23ef5, B24cd3, C01ab4, C03ab4, C03ef1, C04ef5, C07cd7, C08ef5, C10cd4, C11ab6, C11ab7, C20ab7, C23ab4, C23cd5, C24ab7, D01ef5, D03ef5, D03ef7, D05ef5, D06cd4, D06ef7, D07ef5, D08ab8, D09ef5, D10cd7, D11ef5, D13ef5, D14ab4, D15ab8, D15ef4, D15ef5, D16ef4, D17cd3, D17cd6, D17ef5, D19cd6, D19ef5, D21ef5, D23cd8, D23ef5, E01ef6, E02ef3, E06ab3, E07ef1, E09cd4, E10cd2, E10ef3, E10ef5, E13ab6, E18cd3, E19cd5, E21cd5, E22cd1, E24ef4, E24ef6, F01cd6, F01ef5, F02ef2, F03ab2, F03ab5, F03ef5, F04ef2, F05ef5, F07ef5, F09ab5, F09ef3, F09ef5, F11ef5, F13ef5, F15ef5, F16ab4, F16ef4, F17ef5, F18ef6, F19ef5, F20ef6, F21ef5, F22ef6, F23ef5, F24cd6, F24ef6, G02cd6, G07ef3, G11ab5, G11ef4, G15ab5, G15ef3, G20ef6, G24cd4, G24ef6, H01ef4, H01ef5, H02ab4, H02cd4, H02ef6, H03ef5, H04cd2, H04ef6, H05ef5, H06cd2, H06ef6, H07ef3, H07ef5, H08ef6, H09ef5, H10cd4, H10ef6, H11ef5, H13cd3, H13ef5, H14ef4, H14ef5, H15cd3, H15ef5, H17cd3, H17cd8, H17ef5, H18ef5, H19cd3, H19cd8, H19ef5, H20cd8, H21ef5, H22cd3, H23ef5, I01ab7, I02ef2, I02ef3, I06ef6, I07cd2, I07cd5, I08cd5, I08ef3, I09ab7, I09cd5, I13cd7, I15ef1, I22cd7, I22ef6, I23ef5, J01ef5, J04ef5, J06ef5, J07cd4, J08ab2, J08ef5, J09cd3, J10ef5, J12ef5, J13cd6, J14ef5, J14ef6, J15ef7, J16ef5, J18ef5, J20ef5, J24ef6, K02ef6, K02ef7, K04ef6, K07ef5, K08ef6, K10ab5, K11cd1, K12ab5, K14cd6, K15cd2, K18ab7, K20cd6, L12cd5, L12ef6, L13ab4, L16ef6, L20ab5, L20ef3, L23cd2, M01ef6, M06ef5, M07cd3, M11ab8, M16ef5, M19ef6, M20ef5, M21ef5, M21ef6, M22ef5, M24ef5, N02ab8, N02cd7, N03ef1, N05ef3, N07cd4, N09cd4, N12cd5, N13ab8, N14ef5, N16ef5, N18ab3, N18ef3, N20ab8, N21cd6, O01ef1, O01ef6, O02ef5, O03cd1, O04cd7, O04ef5, O05ef5, O06ef5, O08ef5, O09cd4, O10ef5, O12ef5, O13ef1, O14ef5, O15cd6, O18ab7, O20ef5, O21ef5, O22ab4, O22ef5, O23ab5, O23ef2, O24ef5, P02ef5, P07cd8, P07ef6, P09cd5, P20ef2

**Tab. 9.13** Auflistung aller Genlokalisationen auf dem Array die für Apoptose assoziierte Gene (A), bzw. die für Zellzyklus assoziierte Gene (B) kodieren.

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung einiger Personen nicht entstanden, denen mein aufrichtiger Dank gilt:

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. W. Schmahl für seine liebenswürdige und hilfreiche Betreuung bedanken. Durch seine Unterstützung konnte ich diese Arbeit überhaupt erst anfertigen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. V. Meineke für die freundliche Aufnahme im Institut, sowie für die großzügige Bereitstellung der benötigten Materialien.

Ganz besonderes möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn PD Dr. M. Abend für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Er nahm sich stets für mich Zeit und hatte immer wertvolle Ratschläge und Anregungen für mich.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. K.-P. Gilbertz, er hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und dafür gute Ratschläge.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. M. Port für seine Einweisung in die EDV-Auswertung und seine Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau C. Baaske für die freundliche Einweisung und Zusammenarbeit im Labor bedanken. Ebenso gilt mein Dank Herrn R. Obermair für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie Frau Chen und Herrn A. Kaiser für ihre freundliche Unterstützung. Darüber hinaus war Frau M. Katipoglu mit ihrer liebenswerten und offenen Art jederzeit für mich da – vielen Dank!

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Institutsmitgliedern bedanken, die mit ihrer Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Ein großer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Evelyn und Karl-Heinz Greubel, die meine Ausbildung nicht nur durch ihre finanzielle Unterstützung ermöglicht haben, sondern immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte. Ein eben solcher Dank gilt auch meiner Schwester Ingrid Greubel, die ebenfalls immer für mich da war und gute Anregungen hatte.

Ich danke meinen Nachbarn, Ursula und Günter Mühlbauer, für die moralische Unterstützung. Vor allem Ursula Mühlbauer, Evelyn und Ingrid Greubel möchte ich fürs Korrekturlesen herzlich danken. Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die mir in dieser Zeit große Toleranz entgegengebracht haben, obwohl ich viel zu wenig Zeit für sie hatte.