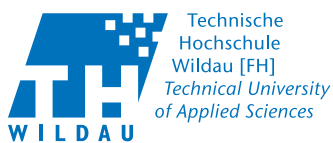


Transkriptomweite Untersuchungen von Prostata-Krebszelllinien im Kontext medizinischer Strahlentherapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Bioinformatik/Systembiologie"

angefertigt an der Technischen Hochschule Wildau,
Arbeitsgruppe "Diagnostic Bioinformatics" (Prof. Dr. Beyerlein)



eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam



von
Paul Hammer, M.Sc.
geboren am 16.04.1982 in Berlin

Potsdam, den 26.06.2012

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6319/>
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-63190
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63190>

ZUSAMMENFASSUNG

Die Strahlentherapie ist neben der Chemotherapie und einer operativen Entfernung die stärkste Waffe für die Bekämpfung bösartiger Tumore in der Krebsmedizin. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt, wobei Prostatakrebs heutzutage die häufigste, männliche Krebserkrankung darstellt. Trotz technologischer Fortschritte der radiologischen Verfahren kann es noch viele Jahre nach einer Radiotherapie zu einem Rezidiv kommen, was zum Teil auf die hohe Resistenzfähigkeit einzelner, entarteter Zellen des lokal vorkommenden Tumors zurückgeführt werden kann. Obwohl die moderne Strahlenbiologie viele Aspekte der Resistenzmechanismen näher beleuchtet hat, bleiben Fragestellungen, speziell für prognostische Bestimmungen des Erfolges einer Strahlentherapie und dem zeitlichen Ansprechen eines Tumors auf ionisierende Strahlung, größtenteils unbeantwortet, da systemweite Untersuchungen nur begrenzt vorliegen.

Als Zellmodelle wurden vier Prostata-Krebszelllinien (PC3, DuCaP, DU-145, RWPE-1) mit unterschiedlichen Strahlungsempfindlichkeiten kultiviert und auf ihre Überlebensfähigkeit nach Einwirken ionisierender Strahlung durch einen Trypanblau- und MTT-Vitalitätstest geprüft, wobei die PC3 Zelllinie, als Strahlungsresistente, und die DuCaP Zelllinien, als Strahlungssensitive, die größten Differenzen der Überlebensfraktionen aufwiesen. Die proliferative Kapazität der vier Zelllinien wurde mit einem Koloniebildungstest bestimmt, wobei auch hier die PC3 Zelllinie mit der größten und die DuCaP Zelllinie mit der geringsten Kapazität auffällig waren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die beiden Zelllinien ausgewählt, um anhand ihrer transkriptomweiten Genexpressionen, welche mit einer ligationsbasierten Hochdurchsatz-Sequenzierung (RNA-Seq) erfasst wurden, eine Identifizierung potentieller Marker für die Prognose der Effizienz einer Strahlentherapie zu ermöglichen. Weiterhin wurde mit der PC3 Zelllinie ein Zeitreihenexperiment durchgeführt, wobei zu 8 verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy die mRNA mittels der RNA-Seq Methode genomweit quantifiziert wurde, um das dynamisch zeitversetzte Genexpressionsverhalten auf Resistenzmechanismen untersuchen zu können. Insgesamt konnten somit rund 5,45 Milliarden Sequenzen der Länge 50 nt und 35 nt (Paired-End) erzeugt werden. Von den prozessierten Sequenzen konnten 40,33 % als *Unique Matching Read* (UMR), 24,23 % als *Non Matching Read* und 35,11 % als *Multi Matching Read* gegen das menschliche Genom klassifiziert werden.

Zur Identifizierung potentieller Marker für die Vorhersage der Effizienz einer Radiotherapie konnten durch das Setzen eines *Fold Change* Grenzwertes (99 % Konfidenzintervall) in Verbindung mit einem *P*-Wert $< 0,01$ aus 10.966 aktiven Genen 730 signifikant differentiell exprimierte Gene bestimmt werden, von denen 305 stärker in der PC3 und 425 stärker in der DuCaP Zelllinie exprimiert werden. Innerhalb dieser 730 Gene sind viele stressassoziierte Gene wiederzufinden, wie bspw. die beiden Transmembranproteingene *CA9* und *CA12* oder das Signaltransduktionsgen *GDF15*. Durch Berechnung eines eigens entwickelten Netzwerk-Scores konnten aus den GO- und KEGG-Datenbanken interessante Netzwerke abgeleitet werden, wobei insbesondere die GO-Kategorien *Aldehyd-Dehydrogenase [NAD(P)+] Aktivität* (GO:0004030) und *Wundheilung und Ausbreitung epidermaler Zellen* (GO:0050919) sowie der KEGG-Stoffwechselweg der *O-Glykan Biosynthese* (hsa00512) als relevante Netzwerke auffällig wurden. Durch eine weitere Interaktionsanalyse konnten zwei vielversprechende Netzwerke mit den Transkriptionsfaktoren JUN und FOS als zentrale Elemente identifiziert werden. Eine starke Expression des JUN Netzwerkes würde dabei für

eine erhöhte Resistenz stehen, wohingegen eine erhöhte Expression des FOS Netzwerkes einer Strahlensensitivität gleich kommt.

Zum besseren Verständnis des dynamisch zeitversetzten Ansprechens der strahlungsresistenten PC3 Zelllinie auf ionisierende Strahlung, konnten anhand der 10.840 exprimierten Gene und ihrer Expressionsprofile über 8 Zeitpunkte interessante Einblicke erzielt werden. Während es innerhalb von 30 min (00:00 - 00:30) nach der Bestrahlung zu einer schnellen Runterregulierung der globalen Genexpression kommt, folgen in den drei darauffolgenden Zeitabschnitten (00:30 - 01:03; 01:03 - 02:12; 02:12 - 04:38) systemweite Expressionserhöhungen, die eine Aktivierung schützender Netzwerke, wie die Hochregulierung der DNA-Reparatursysteme oder die Arretierung des Zellzyklus, auslösen. In den abschließenden, längeren drei Zeitbereichen (04:38 - 09:43; 09:43 - 20:25; 20:25 - 42:35) liegt wiederum eine Ausgewogenheit zwischen Induzierung und Supprimierung vor, wobei die absoluten Genexpressionsveränderungen ansteigen. Beim Vergleich der Genexpressionen kurz vor der Bestrahlung mit dem letzten Zeitpunkt (00:00 - 42:53) liegen mit 2.670 die meisten verändert exprimierten Gene vor, was einer massiven, systemweiten Genexpressionsänderung entspricht. Funktional scheint es, dass zum Ende der Zeitreihe die Reparaturvorgänge abgeschlossen sind und die überlebenden Zellen in den normalen Zellzyklusprozess übergehen. Signalwege wie die *ATM-Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose*, des *NRF2-Signalwegs nach oxidativer Stresseinwirkung* und die DNA-Reparaturmechanismen der *homologen Rekombination*, des *nicht-homologen End Joinings*, der *MisMatch-*, der *Basen-Exzision-* und der *Strang-Exzision-Reparatur* spielen dabei eine tragende Rolle. Durch Analyse der GO- und KEGG-Datenbanken konnten die Signaltransduktionswege MAPK, ErbB, p53 und Jak-STAT als Auslöser der Induzierung vieler schützender Gene und Netzwerke ermittelt werden. Äußerst interessant sind weiterhin die hohen Aktivitäten RNA-gesteuerter Ereignisse, insbesondere von *small nucleolar RNAs* und Pseudouridin-Prozessen. Demnach scheinen diese RNA-modifizierenden Netzwerke einen bisher unbekanntem funktionalen und schützenden Einfluss auf das Zellüberleben nach ionisierender Bestrahlung zu haben und sollten für zukünftige Bestrebungen einer verbesserten Strahlentherapie berücksichtigt werden. All diese schützenden Netzwerke mit ihren zeitspezifischen Interaktionen sind essentiell für das Zellüberleben nach Einwirkung von oxidativem Stress und zeigen ein komplexes aber im Einklang befindliches Zusammenspiel vieler Einzelkomponenten zu einem systemweit ablaufenden Programm.

ABSTRACT

The use of radiotherapy in addition to chemotherapy and surgical removal is the most powerful instrument in the fight against malignant tumors in cancer medicine. After cardiovascular diseases, cancer is the second leading cause of death in the western world, in which prostate cancer is the most frequent male cancer. Despite continuous technological improvements in radiological instruments and prognosis, it may occur a recurrence up to many years after radiotherapy due to a high resistance capability of individual malignant cells of the locally occurring tumor. Although modern radiation biology has studied many aspects of the resistance mechanisms, questions are largely unanswered especially in regards to prognostic terms of the success of a radiotherapy and the time response of tumor cells to ionizing radiation.

As cellular models four prostate cancer cell lines with different radiation sensitivities (PC3, DuCaP, DU-145, RWPE-1) were cultured and tested for their ability to survive after exposure to ionizing radiation by a trypan blue and MTT viability assay. The PC3 cell line (radiation-resistant) and the DuCaP cell line (radiation-sensitive) showed the maximal differences in survival fractions. The proliferative capacity of the four cell lines after exposure was determined using a colony formation assay, in which the PC3 cell line showed the maximal and the DuCaP cell line the lowest capacity. Based on these results the two cell lines were selected to allow identification of potential prognostic marker for predicting the effectiveness of radiation therapy via their transcriptome-wide gene expression, which was detected by ligation-based high-throughput sequencing (RNA-Seq). Furthermore, a time series experiment with the radiation-resistant PC3 cell line was performed. At 8 different time points, during the period from 00:00 - 42:53 (hh:mm) after exposure with 1 Gy, the mRNA was quantified by RNA-Seq to investigate the dynamic behavior of time-delayed gene expression and to discover resistance mechanisms.

Overall around 5.45 billion reads of the length of 50 nt and 35 nt were generated by paired-end sequencing of all four cell lines followed by an alignment against the human genome. Of the processed sequences 40.33 % were classified as uniquely matching read (UMR), 24.23 % as non-matching read and 35.11 % as multi-matching read. To identify potential prognostic markers for predicting the effectiveness of a radiotherapy, statistical tests were performed to find significantly differentially expressed genes between the resistant PC3 and the sensitive DuCaP cell lines.

Of 10,966 expressed genes 730 were significant differentially expressed, determined by setting a *fold change* threshold (99 % confidence interval) in conjunction with a *P*-value < 0.01. Of those 305 were more strongly expressed in PC3 cell line and 425 were more strongly expressed in the DuCaP cell line. Within these 730 genes many known stress-associated genes could be found, such as the two trans-membrane protein genes *CA9* and *CA12* or the signal transduction gene *GDF15*, which are associated with increased radiation resistance. By calculating a proprietary network score interesting networks were derived by the GO and KEGG databases. In particular the GO categories *aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity* (GO:0004030) and *wound healing and epidermal cells spread* (GO: 0050919) as well as the KEGG pathway of *O-glycan biosynthesis* (hsa00512) seems to be remarkably relevant. An interaction analysis revealed two promising networks with the transcription factors JUN and FOS as central elements. High expression of the JUN network

would be stand as indicator for radiation resistance whereas a high expression of the FOS network is equated with radiation sensitivity.

Interesting insights could be achieved by analyzing the 10,840 expressed genes of the PC3 cell line and its expression profile over the 8 time points. Shortly after irradiation (00:00 - 00:30) a transcriptome-wide down-regulation occurred, within the next three, short time periods (00:30 - 01:03; 01:03 - 02:12; 02:12 - 04:38) a predominant increase of gene expression and the activation of protective networks followed, such as the up-regulation of DNA repair systems or the arresting of cell cycle. In the ensuing three time periods (4:38 - 09:43; 09:43 - 20:25; 20:25 - 42:35) a balance between gene induction and suppression was present and the absolute gene expression change was increased. When comparing the gene expression prior to irradiation with the last time point (00:00 - 42:53) 2,670 genes were differentially expressed, suggesting a massive and system-wide change of gene expression. It appears that at the end of the time series the repair operations are completed and surviving cells undergo the normal cell cycle process. Signaling pathways such as the *ATM-regulated cell cycle and apoptosis*, the *Nrf2 pathway after oxidative stress exposure*, the DNA repair mechanisms of *homologous recombination*, the *non-homologous end joining*, the *mismatch repair*, *base-excision repair* and *strand-excision repair* play a major role. The network score analysis of the GO and KEGG databases could identify the signaling pathways of MAPK, ErbB, p53 and Jak-STAT as major regulators of the induction of many protective genes and networks. Very interesting are the high activity of RNA-driven events, especially activities of *small nucleolar RNAs* and pseudouridine processes. This suggests that these RNA-modifying networks could have a hitherto unknown functional and protective effect on cell survival after exposure to ionizing radiation and should be considered for future efforts in improving radiation therapy. All these protective networks and their time-specific interactions are essential for the survival of cells after exposure to oxidative stress and show a complex but consistent interaction of many individual components to a system-wide running program.

I	EINLEITUNG	1
1	Medizinische Bestrahlung in der Krebsbehandlung	1
1.1	Wirkungsmechanismen der Strahlentherapie	1
1.2	Strahlungsinduzierte DNA-Schädigungen und deren Reparatur	3
1.2.1	<i>Die MisMatch Repair Fehlerkorrektur</i>	5
1.2.2	<i>Der Basen-Exzisions-Repair (BER) DNA-Reparaturmechanismus</i>	6
1.2.3	<i>Der Strang-Exzisions-Repair (NER) DNA-Reparaturmechanismus</i>	9
1.2.4	<i>Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen</i>	10
1.3	Molekularbiologische Effekte der Bestrahlung	13
1.3.1	<i>Zellzyklus-Checkpoints und -Arretierung</i>	13
1.3.2	<i>Der apoptotische Zelltod</i>	15
1.3.3	<i>Der NRF2 Signalweg als Antwort auf oxidativen Stress</i>	16
1.4	Strategien strahlungsresistenter Krebszellen	18
2	Das Zeitalter der Hochdurchsatz-Sequenzierung	20
3	Zielsetzung der Arbeit	22
II	MATERIAL UND METHODEN	24
1	Material	24
1.1	Chemikalien	24
1.2	Lösungen, Puffer und Medien	24
1.3	Kommerzielle Reagenzien, Nachweis- und Reaktionssysteme	24
1.4	Verwendete Geräte und Systeme	25
1.5	Verwendete Zelllinien	26
1.6	Auflistung der Proben für die Hochdurchsatz-Sequenzierung	26
2	Methoden	28
2.1	Zellbiologische Methoden	28
2.1.1	<i>Allgemeine Kultivierungsbedingungen eukaryotischer Zellen</i>	28
2.1.2	<i>Kultivierung von Zelllinien</i>	28
2.1.2.1	<i>Kultivierung der Zelllinie DU-145</i>	28
2.1.2.2	<i>Kultivierung der Zelllinie DuCaP</i>	29
2.1.2.3	<i>Kultivierung der Zelllinie PC3</i>	29
2.1.2.4	<i>Kultivierung der Zelllinie RWPE-1</i>	29
2.1.3	<i>Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen</i>	30

2.1.4	<i>Der MTT-Test</i>	30
2.1.5	<i>Der Trypanblau-Test</i>	31
2.1.6	<i>Der Koloniebildungstest</i>	31
2.1.7	<i>Erfassung der zellulären Antwort von PC3 Zellen nach Bestrahlung</i>	32
2.1.8	<i>Kultivierung der Zelllinien für die Hochdurchsatz-Sequenzierung</i>	33
2.2	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1	<i>Gesamt-RNA-Isolierung</i>	34
2.2.2	<i>Anreicherung von mRNA aus Gesamt-RNA</i>	34
2.2.3	<i>Bestimmung der Konzentration aufgereinigter RNA</i>	35
2.2.4	<i>RNA Qualitätskontrolle</i>	36
2.2.5	<i>Ermittlung der Genexpression mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung</i>	37
III	DATEN UND ALGORITHMEN	39
1	Statistische Berechnungen der zellbiologischen Tests	39
1.1	Statistik für den MTT- und Trypanblau-Test	39
1.2	Der Koloniebildungstest	39
2	Die Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten	40
2.1	Die erzeugte Sequenzdatenmenge und deren Qualität	40
2.2	Alignment und Statistiken	44
2.3	Bestimmung der Genexpression	46
2.4	Reproduzierbarkeit der biologischen und technischen Replikate	46
3	Genexpressions- und Netzwerkanalysen	50
3.1	Schwellwert für die Genexpression	50
3.2	Ermittlung signifikant differentiell exprimierter Gene	52
3.3	Identifizierung von involvierten Gennetzwerken	54
3.4	Normierung zur Heatmap-Darstellung der Zeitpunktvergleiche	57
IV	ERGEBNISSE	58
1	Bestrahlungssensitivitäten der Prostata-Krebszelllinien	58
1.1	Energiedosis-abhängiger Zelltod nach Bestrahlung	58
1.2	PC3 und DU-145 Zelllinien mit größter proliferativer Kapazität	60
1.3	PC3 und DuCaP als geeignete Zellmodelle	62
2	Markersuche zur Vorhersage der Bestrahlungseffizienz	63

2.1	Massiver Genexpressionsunterschied zwischen PC3 und DuCaP Zellen	63
2.2	Hohe Aktivitäten krebsrelevanter Netzwerke	67
2.3	Aktive zellspezifische Netzwerke	69
3	Transkriptomweite Erfassung der Genexpression	72
3.1	Zeitabhängige Regulation der globalen Genexpression	72
3.2	Netzwerkspezifische Genexpression	76
3.3	Zyklische Expression strahlenbiologisch relevanter Netzwerke	78
3.4	Aktiver NRF2 Signalweg wirkt oxidativen Stress entgegen	81
3.5	Schnelle Reparatur von DNA-Schäden	83
3.6	Aktives ATM reguliert Zellzyklus und DNA-Reparatur	88
3.7	Zellüberleben und Zelltod im Gleichgewicht	89
V	DISKUSSION	92
1	Zellmodelle für strahlenbiologische Experimente	92
1.1	Größte Strahlenempfindlichkeitsdifferenz zwischen PC3 und DuCaP	92
1.2	Keine Resistenzveränderung nach Bestrahlung	94
2	Vorhersage des Ansprechens einer Radiotherapie	96
2.1	RNA-Seq, eine vertrauensvolle Methode	96
2.2	Aktivitätsprofilung DuCaP versus PC3	97
2.3	Potentielle Genmarker	98
2.4	Differentielle Expression verwandter Markergene	101
2.5	Funktionale Netzwerkeanalyse zur Therapieprognose	102
2.6	Das zellspezifische Glykosylierungsmuster als prognostischer Marker	105
2.7	Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos	106
3	Zeitliche Dynamik zellulärer Prozesse nach Bestrahlung	107
3.1	Das experimentelle Design	107
3.2	Die Normalisierung der Genexpressionsveränderungen	109
3.3	Parallele Hochdurchsatz-Sequenzierung Millionen individueller Zellen	110
3.4	Dynamische und systemweite Genexpressionsveränderungen	111
3.5	Schnelle Expressionserhöhung von Transkriptionsfaktoren	112
3.6	Expressionssteigerungen stressresistenz-assoziiierter Gene	114
3.7	Oszillierende Aktivitätsänderungen von Netzwerken	117
3.8	Zellzyklus, RNA Prozesse und Signaltransduktionswege	118
3.9	Zeitlich abgestimmtes Zusammenspiel schützender Signalwege	120

3.10	Potentielle therapeutische Ansätze zur Sensibilisierung	121
4	Ausblick	122
VI	LITERATUR	124
VII	ANHANG	135
A	Kontaktdaten	135
B	Publikationen	136
C	Selbständigkeitserklärung	138
D	Lebenslauf	139
E	Danksagung	140
F	Abkürzungen	141

I EINLEITUNG

1 Die medizinische Bestrahlung in der Krebsbehandlung

1.1 Wirkungsmechanismen der Strahlentherapie

Strahlentherapie, auch als Radiotherapie bezeichnet, ist im medizinischen Sinn die Anwendung ionisierender, hochenergetischer Strahlung auf den Menschen, um Krankheiten zu heilen bzw. deren Fortschreiten zu hemmen. Als Strahlungsarten kommen vorwiegend Gamma-, Röntgen- und Elektronenstrahlung zum Einsatz. In den letzten Jahren wurden neue hochspezifische Strahlungsarten entwickelt unter denen die Neutronen-, Protonen- und schwere Ionenbestrahlungen gezählt werden. Das Gebiet der Strahlentherapie umfasst weiterhin die medikamentösen und physikalischen Methoden zur Strahlungssensibilisierung und Verstärkung der Strahlenwirkung. Im Gegensatz zur Chemotherapie ist die Radiotherapie eine lokale Therapieform zur Behandlung von Tumoren. Etwa jeder zweite Krebspatient erhält, häufig auch in Kombination mit weiteren Therapieverfahren, wie eine chirurgische Entfernung des Tumors oder einer Chemotherapie, eine oder mehrere Strahlungseinheiten (Deutsche Krebshilfe 2010). Auch wenn die Heilungschancen eines organbegrenzten Prostatakarzinoms nach primärer Strahlentherapie gut sind, kommt es dennoch bei 1 bis 5 von 10 Männern, die in heilender Absicht bestrahlt wurden, innerhalb von 10 Jahren zu einem Wiederauftreten der Erkrankung (Krebsinformationsdienst 2011).

Die Wirkung der Strahlentherapie beruht auf der Bildung von Radikalen, die durch nachfolgende chemische Reaktionen große Schäden in der Zelle auslösen können (Kassis 2008). Die Wege vom physikalischen Primärereignis zum biologischen Effekt unterscheidet man dabei zwischen direkten und indirekten Mechanismen oder bezüglich des zeitlichen Ablaufes zwischen Akut- und Spätschäden. Energieabsorption und Bioeffekt erfolgen bei direkter Strahlenwirkung im selben Biomolekül, bei indirekter Strahlenwirkung durch Diffundieren von Radikalen in unterschiedliche Zellkompartimente. Die indirekte Strahlung interagiert zunächst mit Wasser und anderen Biomolekülen, wobei freie Radikale entstehen, die weit genug diffundieren, um das kritische Ziel erreichen und durch Wechselwirkung schädigen zu können. Bei der Strahlenreaktion mit Wasser entstehen die drei äußerst aktiven Primärradikale OH^\bullet , H^\bullet und die sogenannten hydratisierten Elektronen. Diese erzeugen an der DNA Radikalstellen, welche zur Schädigung des zellulären Apparats führen. Es wird angenommen, dass aufgrund des hohen Wasseranteils (ca. 80 %) in einer Zelle zwei Drittel der durch Photonen erzeugten indirekten Schäden auf das Konto von Wasserradikalen gehen (Sauer 2010). Die multiplen und komplexen, miteinander interagierenden Ereignisse laufen auf drei Ebenen ab. Die radiochemischen Vorgänge bilden

innerhalb 1 μs Primär- und Bioradikale, die nachfolgenden biochemischen Reaktionen verändern innerhalb von Sekunden bis Minuten andere Biomoleküle wie DNA und Membranen, und die daraus resultierenden biologischen Folgen sind mit einer Zeitspanne von Stunden bis Jahrhunderten stochastische und deterministische Effekte (Sauer 2010). Die Abbildung I.1 fasst die Wechselwirkungen ionisierender Strahlung mit biologischen Strukturen zusammen.

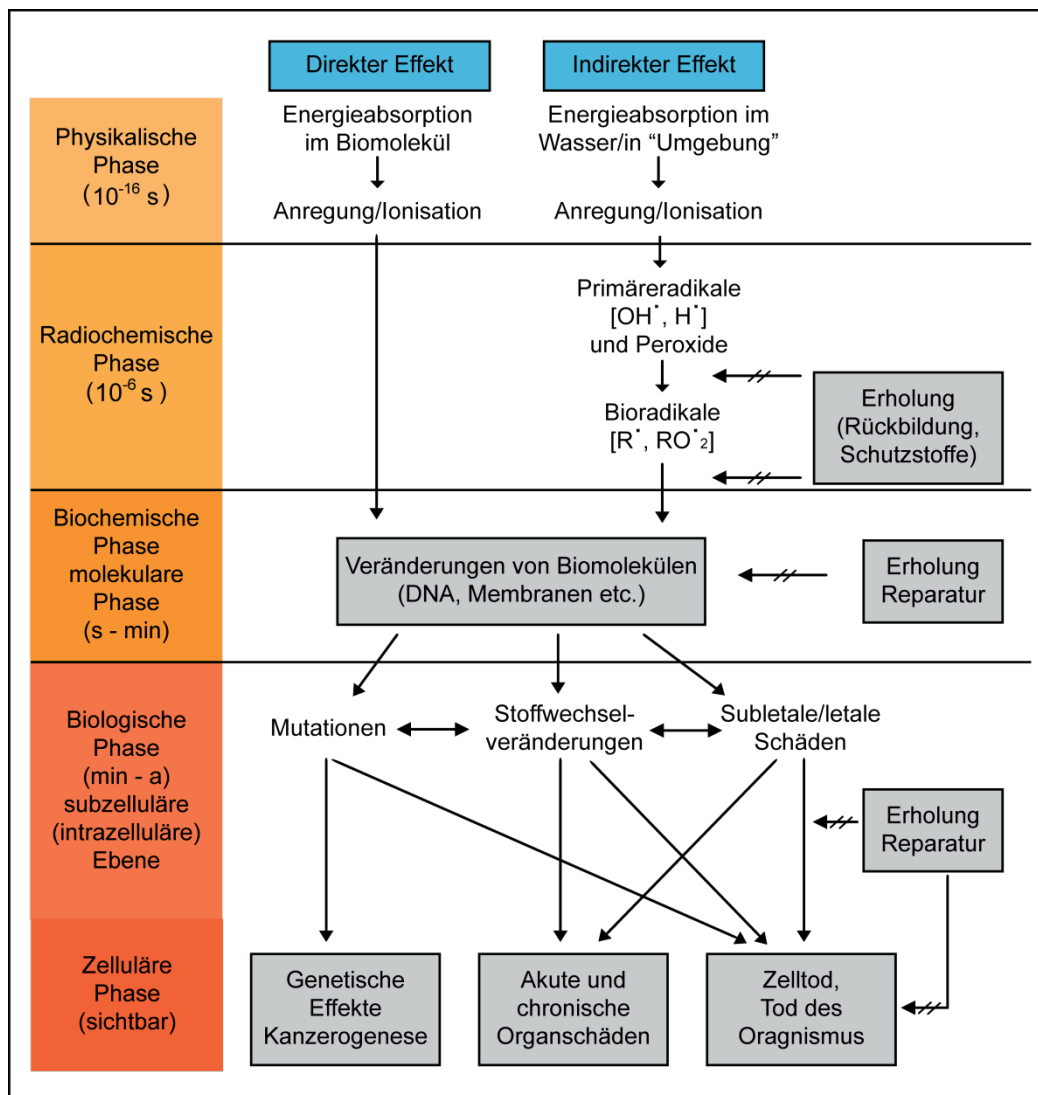


Abb. I.1 – Wechselwirkungen ionisierender Strahlung mit biologischen Strukturen. Der Weg vom physikalischen Primäreignis der Energieabsorption zum biologischen Effekt kann unmittelbar und kurz sein, verläuft meist aber länger über verschiedene Zwischenreaktionen. Während in der physikalischen Phase beim direkten Effekt Biomoleküle unmittelbar ionisiert werden, kommt es beim indirekten Effekt in der radiochemischen Phase zur Primär- und Bioradikalbildung. Durch Interaktionen dieser Radikale in der biochemischen Phase mit anderen zellulären Bestandteilen kann es zu Veränderungen von weiteren Biomolekülen kommen, die wiederum in der biologischen Phase Mutationen, Stoffwechselveränderungen oder letale Schäden nach sich ziehen können. In der zellulären Phase kann es dann je nach Schädigung zu Kanzerogenese, akuten und chronischen Organschäden oder zum Tod der Zelle oder des gesamten Organismus kommen. Zu beachten ist die Fähigkeit von Zellen auf allen Ebenen Erholungs- und Reparaturmechanismen anwenden zu können. Modifiziert nach Sauer (Sauer 2010).

1.2 Strahlungsinduzierte DNA-Schädigungen und deren Reparatur

Die Behandlung mit ionisierender, hochenergetischer Strahlung induziert durch direkte Interaktionen und indirekte Strahlenwirkungen Schäden in diversen zellulären Kompartiments, woraus komplexe biologische Effekte resultieren. Schädigungen der DNA, insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche, werden als der Hauptgrund für das zelluläre Ansprechen nach ionisierender Bestrahlung angesehen. Neben Doppelstrangbrüchen treten an der DNA Basenmodifikationen, Basenverluste, Veränderungen der Zuckermoleküle, Einzelstrangbrüche, DNA-Vernetzungen, DNA-Protein-Vernetzungen (*Crosslinks*) und *Bulky Lesions* (*locally multiply damaged sites*, Mehrfachereignisse) auf. Falschreparaturen von Einzelstrangbrüchen und Basenschäden führen zu Genmutationen, fehlende oder Falschreparatur von Doppelstrangbrüchen, *Bulky Lesions* und *Crosslinks* führen zu Chromosomenmutationen und -aberrationen (Hoeijmakers 2001; Kassis 2008). Abbildung I.2 stellt die verschiedenen Schädigungen nach ionisierender Bestrahlung an der DNA dar.

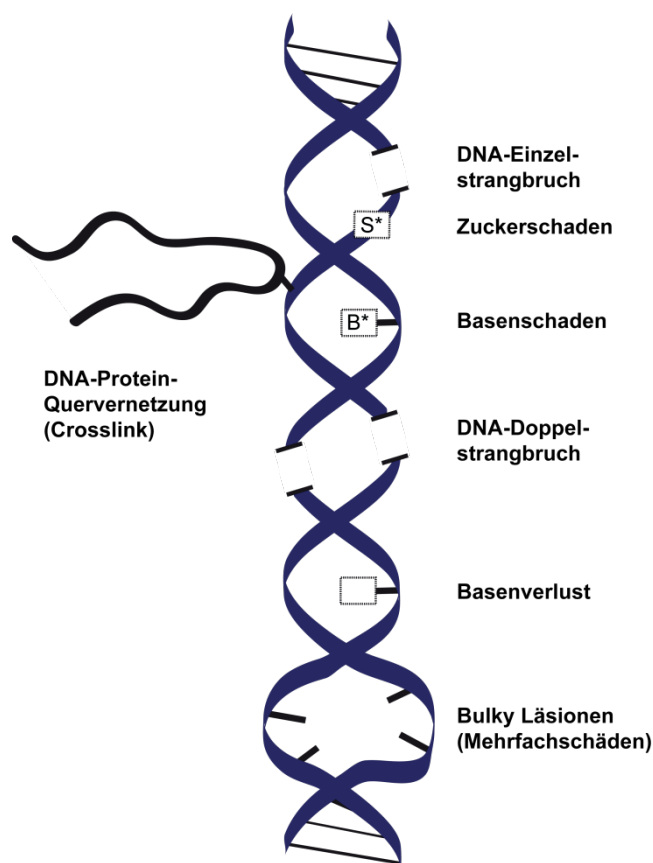


Abb. I.2 – DNA-Schädigungen durch ionisierende Strahlung. Bei der Bestrahlung von Zellen mit hochenergetischer Strahlung kommt es durch Radikalbildung an der DNA zu Basenmodifikationen, Basenverluste, Veränderungen der Zuckermoleküle, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüchen, DNA-Vernetzungen, DNA-Protein-Vernetzungen (*Crosslinks*) und *Bulky Lesions*. Modifiziert nach Hoeijmakers (Hoeijmakers 2001).

Um DNA-Schädigungen zu beseitigen, gibt es in der Zelle ein komplexes Kontroll-, Regulations- und Reparatursystem. Zuerst kommt es zur Detektion der DNA-Schäden gefolgt von teils einfachen, teils sehr komplexen Reparaturvorgängen, welche ein Zusammenspiel mehrerer Enzyme und Proteine beinhaltet. Weiterhin unterscheidet man

zwischen einer schnellen Reparatur, die 10 - 20 min andauert, und einer langsamen Reparatur, die erst nach 6 - 8 h abgeschlossen ist (Sauer 2010).

Dabei sind Zellen in der Lage Basenschäden und Einzelstrangbrüche schnell zu erkennen, diese enzymatisch herauszuschneiden und durch den Einsatz von Polymerasen und Ligasen die entstandenen Bereiche anhand des komplementären DNA-Stranges wieder zu vervollständigen. Bekannte zelluläre Reparaturmechanismen sind bei DNA-Einzelstrangbrüchen die einfache enzymatische Verknüpfung, bei Einzel-Basenschäden der *Basen-Exzisions-Repair* (BER) und bei Mehrfach-Basenschäden der *Strang-Exzisions-Repair* (NER). Fehlerhafte Reparaturen können durch den Mechanismus des *Mismatch-Repairs* (MMR) nachträglich korrigiert werden. Dementsprechend haben diese Schädigungen nur einen geringen Effekt auf die Entstehung von Mutationen und auf die Zellviabilität (Dahm-Daphi *et al.*, 1998). Eine größere Rolle spielt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, da diese Art von DNA-Schäden für die Zelle sehr toxisch ist und schon ein einziger, nicht reparierter DNA-Doppelstrangbruch den Zelltod induzieren kann (Bennett *et al.*, 1996; Christmann *et al.*, 2003). Somit ist die Erkennung und das Beheben dieser Läsionen eine bedeutende zelluläre Funktion. Durch das Auftreten solcher DNA-Schädigungen kommt es zu einer schnellen Rekrutierung der DNA-Reparaturmaschinerie sowie zur Aktivierung multipler Signalereignissen. Bei eukaryotischen Zellen werden die DNA-Doppelstrangbrüchen durch *nicht-homologes End Joining* (NHEJ), *homologe Rekombination* (HR) und *Single Strand Annealing* beseitigt (Christmann *et al.*, 2003; Friesen *et al.*, 2010; Sauer 2010). Unter diesen komplexen Reparaturverfahren ist das NHEJ das wichtigste Verfahren zur Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Nach Entfernung des geschädigten DNA-Abschnitts werden die DNA-Enden enzymatisch wieder miteinander verknüpft. Da das NHEJ ohne komplementäre DNA-Matrize abläuft wird nicht immer die richtige DNA-Sequenz konstruiert, so dass die Reparatur oftmals fehlerhaft ist. Tabelle I.1 zeigt die verschiedenen Reparaturmechanismen von DNA-Schäden.

Tab. I.1 – Reparaturmechanismen bei DNA-Schädigungen (Sauer 2010).

DNA-Schädigung	Reparaturverfahren
Einzelstrangbrüche	Einfache enzymatische Verknüpfung
Einzel-Basenschäden	<i>Basen-Exzisions-Repair</i> (BER)
Mehrfach-Basenschäden	<i>Strang-Exzisions-Repair</i> (NER)
Reparaturfehler	<i>Mismatch-Repair</i> (MMR)
Doppelstrangbrüche	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Nicht-homologes End Joining</i> (NHEJ) - <i>Homologe Rekombination</i> (HR) - <i>Single Strand Annealing</i>

Weiterhin verursachen DNA-Strangbrüche auch Effekte auf die Chromatin- und Zellkernstruktur. Indem einer der beiden Stränge aufgebrochen wird kann die sehr verpackte, superhelikale DNA in entspannte DNA übergehen, was eine Verringerung der DNA-Komprimierung und somit eine lokale Ausdehnung des Zellkerns verursachen kann. Außerdem können Signale durch DNA-Schädigungen zur Arretierung des Zellzyklus, zur Verstärkung der DNA-Reparaturkapazitäten oder bei nicht reparablen Schäden in die Aktivierung apoptischer Signalwegen führen (Amundson *et al.*, 2003). Schädigungen anderer Zellkompartiments wie bspw. der Zellmembran, der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums oder auch anderer Bestandteile des Chromatins als der DNA können ebenfalls Stresssignalwege initialisieren.

1.2.1 Die MisMatch Repair Fehlerkorrektur

Der MMR-Reparaturmechanismus entfernt fehlerhafte Basenpaarungen sowie Nukleotid-Insertionen und -Deletionen, welche durch die DNA-Polymerase beim DNA-Replikationsverfahren hervorgerufen werden können. Insbesondere durch Abweichungen bei der Replikation von kurzen repetitiven Sequenzen oder während Rekombinationsvorgängen entstehen solche Fehler (Aquilina & Bignami 2001). Defekte in diesem MMR-Mechanismus erhöhen drastisch die Mutationsraten und treiben somit den Prozess der Onkogenese voran. Der MMR-Mechanismus ist hauptsächlich durch vier Schritte gekennzeichnet: 1) Die Erkennung der Fehlerstelle an der DNA, 2) die Rekrutierung von zusätzlichen MMR-Faktoren, 3) Suche nach Signalen, die den neuen, falsch synthetisierten DNA-Strang identifizieren, und 4) die Re-Synthese des herausgeschnittenen DNA-Stranges (Hoeijmakers 2001). Die Abbildung I.3 zeigt ein vereinfachtes Model des MMR-Mechanismus.

Bei Säugetieren geschieht die Identifikation und Reparatur durch die Proteinheterodimere MutS α (hMSH2/6 Dimer), welches auf Basenpaarungsfehler und Einzelbasenloops fokussiert ist, und MutS β (hMSH2/3 Dimer), was für die Erkennung von Insertions- oder Deletionsloops verantwortlich ist. Heterodimere Komplexe der hMutL verwandten Proteine hMLH1/hPMS2 (MutL α) und hMLH1/hPMS1 (MutL β) interagieren mit den MSH Komplexen und weiteren Replikationsfaktoren. Die Strangunterscheidung wird dabei höchstwahrscheinlich durch Kontakt mit der benachbarten Replikationsmaschinerie bewerkstelligt. Ein Zusammenspiel aus mehreren Proteinen ist für das Herausschneiden des fehlerhaften neu synthetisierten DNA-Strangs und der nachfolgenden Re-Synthese verantwortlich, wie bspw. DNA Pol α , Pol δ/ϵ , RPA (*replication factor A*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), RFC (*replication factor C*), Exonuclease 1 und die Endonuklease FEN1 (*Flap structure-specific endonuclease 1*) (Hoeijmakers 2001).

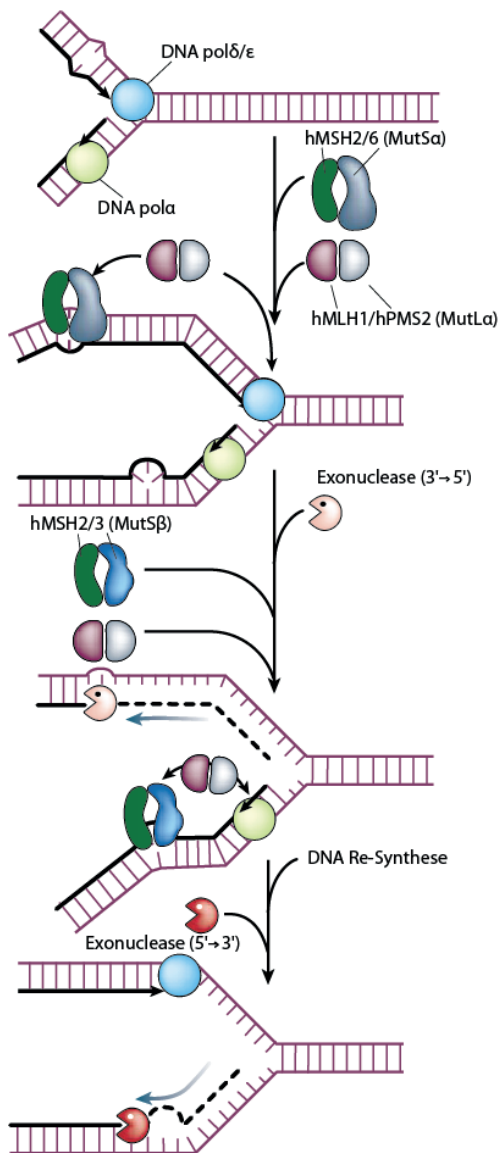


Abb. I.3 – Der Mechanismus der MMR-Fehlerkorrektur. Der MMR-Mechanismus beseitigt fehlerhafte Basenpaarungen sowie Nukleotid-Insertionen und –Deletionen. Die bei der Replikation eingebauten Fehler werden durch die Heterodimere MutS α (Basenpaarungsfehler) und MutS β (Insertions- und Deletionsfehler) erkannt. Durch das Zusammenspiel des Heterodimer MutL α mit weiteren MMR-Proteinen wird die Identifikation des richtigen DNA-Strangs gewährleistet und es kommt zur Aktivierung von Helikasen und Exonukleasen für den Abbau des fehlerbehafteten DNA-Stranges. Zum Schluss kommt es zur Rekrutierung der Replikationsmaschinerie und eine Re-Synthese des DNA-Strangs wird durchgeführt. Modifiziert nach Hoeijmakers (Hoeijmakers 2001).

1.2.2 Der Basen-Exzisions-Repair (BER) DNA-Reparaturmechanismus

Während bei der enzymatische Verknüpfung, auch als *Rejoining* bekannt, Einzelstrangbrüche durch einzelne Ligasen behoben werden, wird beim Verfahren des BER hauptsächlich die Reparatur kleinerer, endogen entstandener DNA-Schäden wie Depurinierung, Deaminierung oder Oxidierung von Basen über das Herausschneiden einer einzelnen Base eingeleitet (Lindahl & Wood 1999; Nilsen & Krokan 2001).

Der BER DNA-Reparaturmechanismus kann in zwei unterschiedlichen Ausführungen, der *Short-Patch* oder *Long-Patch* Pfad, ablaufen und wird durch Basenschädigungen oder Einzelstrangbrüche aktiviert. Bei Basenschädigungen erkennen zunächst DNA-Glycosylasen die Fehlerstellen und entfernen diese aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat. Die entstandene abasische Stelle wird anschließend durch die Endonuklease APE1 herausgeschnitten. Bei DNA-Einzelstrangbrüchen hingegen findet das Binden und Aktivieren des Komplexes PARP-

XRCC1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1, X-ray Repair Cross Complementing Group 1*) an der Bruchstelle statt. Anschließend schützt PNK (*Polynucleotide kinase*) in Wechselwirkung mit XRCC1 durch Anlagerung die DNA-Enden an dieser Bruchstelle. Nachfolgend sind nun der *Short-Patch* oder der *Long-Patch* Pfad möglich. Beim *Short-Patch* Pfad wird das fehlende Nukleotid durch die DNA-Polymerase β (Pol β) eingesetzt und die Lücke in der DNA wird durch die DNA-Ligase III geschlossen, die mit Pol β über XRCC1 wechselwirkt. Im Gegensatz zum *Short-Patch* Pfad kommt der *Long-Patch* Pfad seltener vor. Er ist durch das Herausschneiden von 2-10 nt im Bereich der Läsion charakterisiert und wird vorwiegend nach Induktion von Einzelstrangbrüchen in der DNA induziert (Krokan *et al.*, 2000). Nach Erkennen des Einzelstrangbruches durch den XRCC1/PARP-Komplex fügen Pol δ/ϵ und assoziierte Replikationsfaktoren zwei bis sechs Nukleotide nachfolgend zur abasischen Stelle ein und die Flap-Endonuklease FEN-1 trennt das kurze überhängende Oligonukleotid ab. Die bestehende Lücke wird abschließend von der DNA-Ligase I geschlossen. Die Funktion der Replikationsenzyme ist von den Aktivierungsenzymen PCNA, RPA und RFC abhängig. Störungen in diesem ubiquitär vorkommenden Reparaturweg sind aufgrund der essentiellen Bedeutung für die Zellfunktion grundsätzlich letal (Arenz 2007; Hoeijmakers 2001). Der BER DNA-Reparaturmechanismus als *Short-Patch* und als *Long-Patch* Pfad sind in Abbildung I.4 mit ihren enzymatischen Schritten dargestellt.

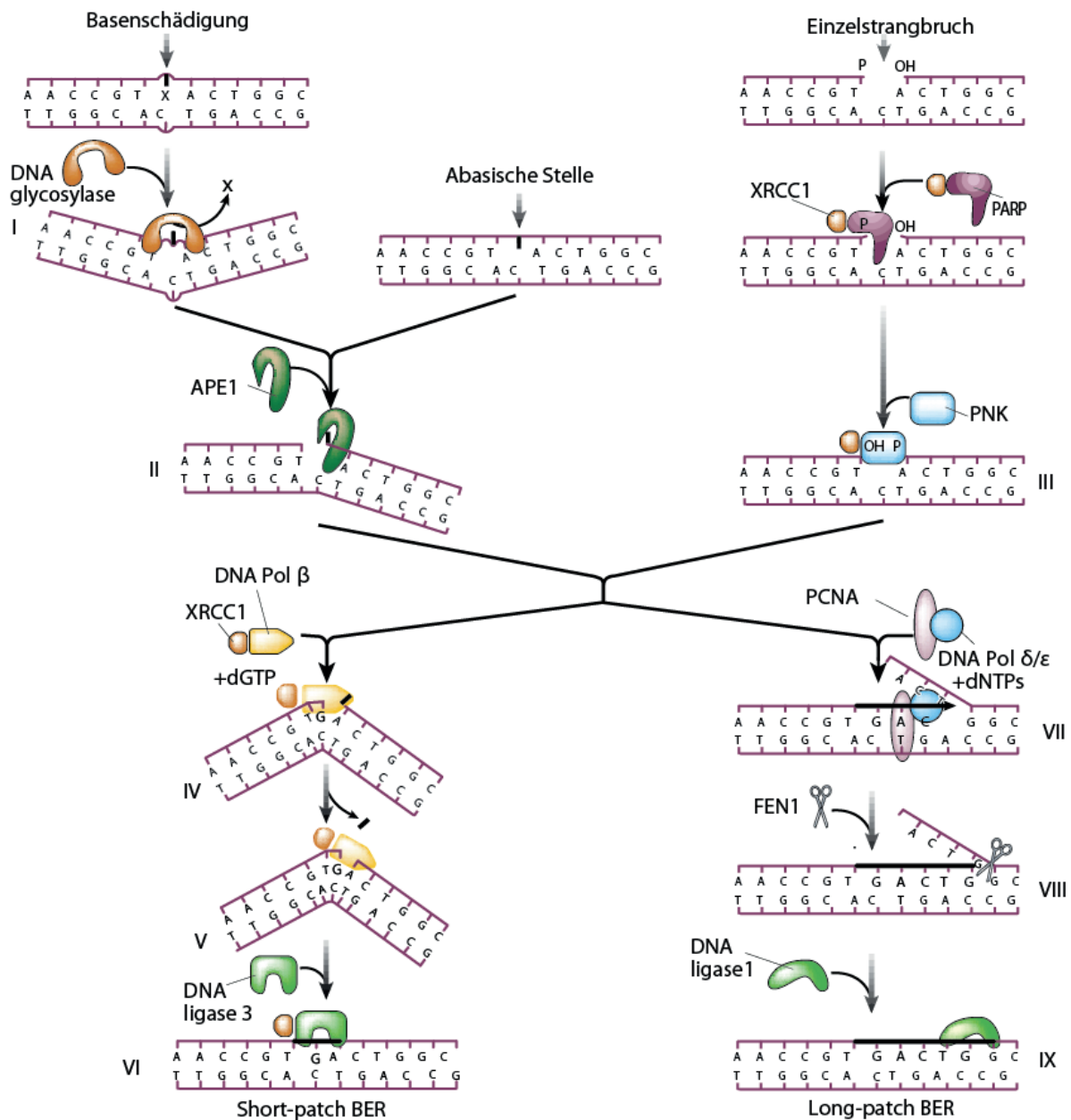


Abb. I.4 – Der BER DNA-Reparaturmechanismus. Dargestellt sind sowohl der häufiger vorkommende *Short-Patch* Pfad (links) als auch der seltenere *Long-Patch* Pfad (rechts). Allgemein wird der BER-Mechanismus durch Basenschäden oder Einzelstrangbrüche aktiviert. Bei Basenschäden ist die einleitende Reaktion die Entfernung der entsprechenden Base durch DNA-Glycosylasen (I) gefolgt vom endonukleolytischen Einschneiden der abasischen Stelle durch APE1 (II). Beim DNA-Einzelstrangbruch hingegen findet das Binden und Aktivieren des Komplexes PARP-XRCC1 an der Bruchstelle statt. Anschließend schützt PNK durch Anlagerung die DNA-Enden an der Bruchstelle (III). Nachfolgend sind nun der *Short-Patch* oder der *Long-Patch* Pfad möglich. *Short-Patch* BER: Die DNA-Polymerase Pol β baut in Wechselwirkung mit XRCC1 das komplementäre Nucleotid ein (IV,V). Im letzten Schritt verschließt die DNA-Ligase 3 in Wechselwirkung mit XRCC1 die DNA-Enden (VI). *Long-Patch* BER: Pol δ/ϵ und assoziierte Replikationsfaktoren bauen mehrere Nucleotide ein (VII) und FEN1 entfernt den dabei entstehenden, überlappenden DNA-Einzelstrang (VIII). Zum Schluss werden die DNA-Enden durch die DNA-Ligase 1 verschlossen (IX). Modifiziert nach Hoeijmakers (Hoeijmakers 2001).

1.2.3 Der Strang-Exzisions-Repair (NER) DNA-Reparaturmechanismus

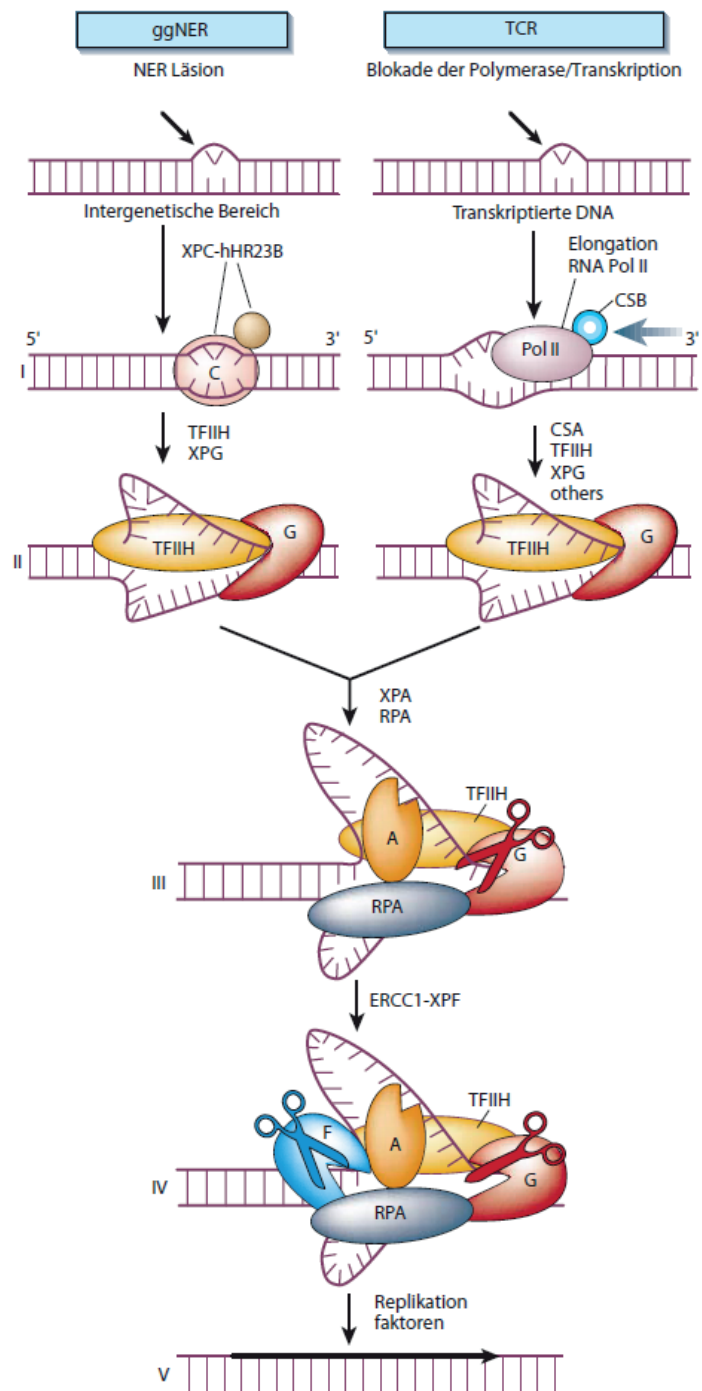
Der *Strang-Exzisions-Repair* DNA-Reparaturmechanismus, oder auch *Nukleotid-Exzisions-Repair* (NER), ist ebenfalls wie der BER in zwei Pfade unterteilt. Die Unterscheidung der beiden Reparaturpfade liegt hierbei in der Spezifizierung des zuständigen genomischen Bereiches (Hoeijmakers 2001). Die globale Genomreparatur (*global genome NER*, ggNER) dient der Behebung von Schäden in nicht transkribierten Bereichen und der transkriptionsgekoppelte NER (*transcription coupled repair*, TCR) ist für die Korrektur von DNA-Schäden in transkribierenden Regionen verantwortlich (Costa *et al.*, 2003; L. H. Mullenders & Berneburg 2001; Tornaletti & Hanawalt 1999; van Hoffen *et al.*, 2003). In einem komplexen und hochorganisierten Multienzymprozess werden DNA-Schädigungen wie UV-induzierte Photoprodukte, chemikalisch hervorgerufene Basenaddukte oder Inter- und Intrastrangverbindungen behoben (G. Wang *et al.*, 2004). Bei Ausfall des BER ist es möglich, dass der NER die Entfernung kleinere Basenschäden, die beispielsweise durch Alkylierung und Oxidation entstehen, übernimmt (Sancar *et al.*, 2004).

Zunächst sucht der ggNER-spezifische XPC-hHR23B Proteinkomplex (*xeroderma pigmentosum, complementation group C, human Rad23 homolog*) auf der Basis fehlerhafter Basenpaare die DNA nach Läsionen ab (Sugasawa *et al.*, 2001). Im TCR wird hingegen die Fähigkeit angewendet, dass die RNA Polymerase durch DNA-Läsionen bei der Transkription blockiert wird, wodurch sie für die Reparatur zunächst entfernt werden muss, um sterischen Platz für die eigentlichen Reparaturenzyme zu schaffen. Bedeutend bei der Versetzung der RNA Polymerase sind die beiden TCR spezifischen Faktoren CSA und CSB (Hoeijmakers 2001). Die nachfolgenden Schritte beider NER Pfade sind identisch.

Nach Rekrutierung von TFIIH (*Transcription factor II H*) zur Läsion entwinden die beiden Helicasenuntereinheiten XPB und XPD partiell die DNA an der Schadensstelle. Anschließend werden zur Läsion XPG und XPA/RPA einberufen, die die Öffnung bis zu einer Blase von ca. 25 Basen erweitern. Nach erfolgter Schadensüberprüfung gewährleisten XPA und RPA die richtige Positionierung der beiden Endonukleasen XPG und ERCC1/XPF. Dabei schneidet XPG in 3'- und ERCC1/XPF in 5'-Position zum Schaden. Nach Freigabe eines Oligonukleotides aus 25 bis 32 Nukleotiden wird die Lücke durch die Replikationsmaschinerie gefüllt und durch die DNA-Ligase I geschlossen. Insgesamt sind mehr als 25 Proteine am NER DNA-Reparaturmechanismus beteiligt (Arenz 2007; Hoeijmakers 2001). Nach einem vollständigen Reparaturereignis, welches mehrere Minuten Zeit benötigt, dissoziiert die komplette Proteinmaschinerie wieder (Houtsmuller *et al.*, 1999). Defekte im NER Reparatursystem führen zu den seltenen rezessiven Erbkrankheiten *Xeroderma Pigmentosum*, *Cockayne-Syndrom* und die *Trichothiodystrophie*, welche eine hochgradige Sensitivität gegenüber Sonnen- bzw. UV-Strahlung gemeinsam haben (de Boer

& Hoeijmakers 2000). Abbildung I.5 stellt die einzelnen Schritte des NER DNA-Reparaturmechanismus graphisch dar.

Abb. I.5 – Der NER DNA-Reparaturmechanismus. Spezifisch für den genomischen Bereich kommt der ggNER bei nicht transkriptierenden Regionen durch Erkennung von Basenschäden mittels des XPC-hHR23B Komplexes zur Anwendung, indessen der TCR Pfad bei Blockade der RNA Polymerase II (Pol II) während der Transkription fungiert (I). Zur Versetzung der RNA Pol II werden CSA und CSB benötigt, um sterischen Platz für die nachfolgenden Enzyme zu schaffen. Anschließend verlaufen die weiteren enzymatischen Schritte identisch. Die zwei Helikasen XPB und XPD, zwei Untereinheiten von TFIIH, entwinden ca. 30 Basenpaare an der DNA-Läsion (II). Nach Überprüfung des DNA-Schadens durch XPA, was nach Abnormalitäten im DNA-Rückgrat Ausschau hält (Sugasawa *et al.*, 2001), stabilisiert RPA die DNA-Öffnung durch das Binden am unbeschädigten Strang (III). Nach erfolgter Schadensüberprüfung gewährleisten XPA und RPA die richtige Positionierung der beiden Endonucleasen XPG und ERCC1/XPF. Dabei schneidet XPG in 3'- und ERCC1/XPF in 5'-Position am geschädigten Strang, wodurch ein Oligonukleotid mit dem Schaden mit einer Länge von 24-32 Basen generiert wird (IV). Im letzten Schritt komplementiert die reguläre Replikationsmaschinerie die Reparatur durch Auffüllen der Lücke (V). Modifiziert nach Hoeijmakers (Hoeijmakers 2001).



1.2.4 Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche entstehen durch ionisierende Strahlung, freien Radikalen, Chemikalien oder während der Replikation von DNA-Abschnitten mit Einzelstrangbruch. Dabei kann ein einziger Doppelstrangbruch für das Absterben einer Zelle verantwortlich sein, wodurch eine enorme Bedeutung dieser DNA-Schäden und deren Reparatur hervorgeht. Nach der Erkennung des DNA-Doppelstrangbruches tritt eine komplexe Reaktionskaskade

ein, die ein Anhalten der Zellzyklusmaschinerie verursacht und die Rekrutierung von Reparaturfaktoren einleitet (Khanna & Jackson 2001; Zhou & Elledge 2000).

Einer der ersten Initiatoren ist die Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), welche auch beim Louis-Bar-Syndrom (*Ataxia Telangiectasia*) eine entscheidende Rolle spielt (Rotman & Shiloh 1998). Als Initialereignis kommt es zur schnellen Phosphorylierung, 1 min - 3 min nach DNA-Schädigung, der DNA-Domäne vom Histon H2AX in einer Entfernung von mehr als einem Mega-Dalton vom Doppelstrangbruch, vermittelt durch die Proteinkinasen ATM, ATR (*ataxia telangiectasia related*) und DNA-PKcs (Paull *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass dadurch ein Chromatin-Zustand hervorgerufen wird, der für die komplexen Reparaturreaktionen und der Rekrutierung von Reparaturproteinen benötigt wird. Die *homologe Rekombination* (HR) und das *nicht-homologe End Joining* (NHEJ) sind die beiden Hauptreparaturwege bei einem DNA-Doppelstrangbruch. Die HR ist in der späten S- und G2-Phase der vorherrschende Reparaturweg, wobei ein intaktes, homologes DNA-Molekül als Vorlage verwendet wird. Die vergleichsweise einfache koordinierte Verknüpfung gebrochener Enden, das NHEJ, benutzt keine oder nur extrem kurze homologe Regionen als Vorlage für die Reparatur und wird vor allem in der G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus aktiviert (Arenz 2007). Die Abbildung I.6 stellt beide Reparaturmechanismen schematisch dar.

Der erste Schritt bei der HR besteht in der 5'-3' endonukleolytischen Prozessierung der DNA-Enden am DNA-Doppelstrangbruch durch den Rad50/Mre11/NBS1 Komplex unter Bildung einzelsträngiger Überhänge am 3'-Ende (Petrini 2000). Nach Bindung der ssDNA-Enden durch das einzelstrangbindende Protein RPA wird Rad51 zur Bildung eines Nukleoproteinfilaments mit Hilfe von Rad52 und weiteren Paralogen (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3) auf die ssDNA geladen. BRCA2 (*breast cancer 2, early onset*) spielt insofern eine wichtige Rolle da es wahrscheinlich die Bildung des Rad51-ssDNA-Filaments stimuliert. Rad51 besitzt die Fähigkeit des Austausches eines DNA-Einzelstrang mit der gleichen Sequenz eines Doppelstrang-DNA-Moleküls. Wahrscheinlich sichert dabei die korrekte Positionierung des Geschwister-Chromatids durch Cohesin die richtige Identifikation der homologen Sequenz. Rad54 stimuliert die Suche nach der homologen Duplex-DNA und initiiert eine Strangaustausch-Reaktion, was zur Bildung eines Verbindungsmoleküls zwischen der beschädigten und der unbeschädigten DNA führt. Letztendlich führt ein bisher noch nicht genau verstandener Prozess zur Beseitigung der sogenannten *Holiday Junction* durch Enzyme der Gruppe der Resolvasen (Haber 2000; Khanna & Jackson 2001; van Gent *et al.*, 2001). Die *Holiday Junction* löst sich dabei durch endonukleolytisches Aufbrechen und Wiederverbinden in einer Reaktion, die vermutlich vom Mus81-Protein abhängig ist und letztlich zu zwei intakten DNA-Molekülen führt (Schärer 2003). Der Mechanismus der HR ist somit das simultane Agieren einer großen Anzahl

gleicher Moleküle, welche nach einer Bestrahlung konzentriert in Bereich des Zellkerns aufzufinden sind.

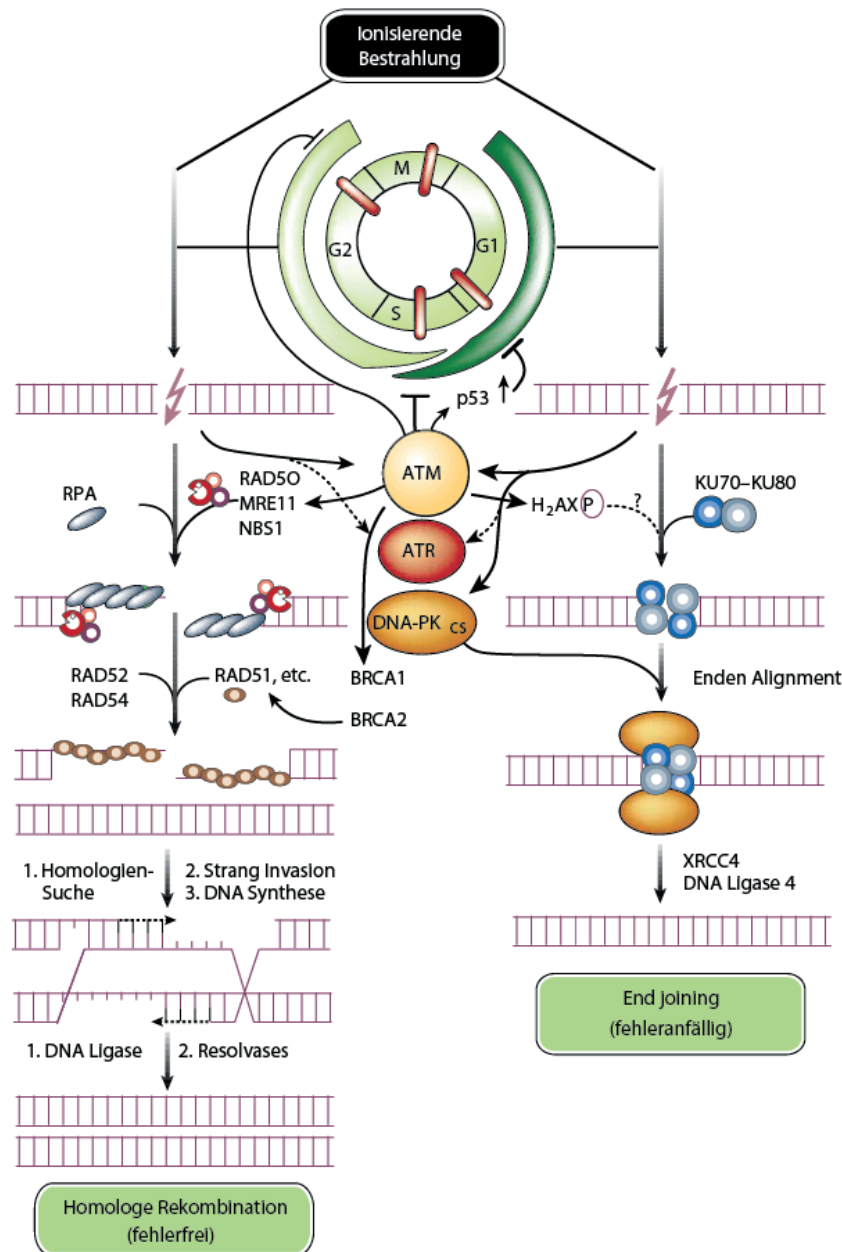


Abb. I.6 – Die Reparaturmechanismen der homologen Rekombination und des NHEJ bei DNA-Doppelstrangbrüchen. Abhängig vom Zellzyklusstadium fungieren die homologe Rekombination in der späten S- und G2-Phase und das NHEJ in der G1- oder frühen S-Phase als bedeutendste Reparaturmechanismen bei DNA-Doppelstrangbrüchen. Die homologe Rekombination bedient sich einer intakten, homologen DNA-Matrize während das NHEJ durch eine einfache koordinierte Verknüpfung von gebrochenen DNA-Enden gekennzeichnet ist. Als Initialereignis kommt es zur Phosphorylierung der DNA-Domäne vom Histon H2AX vermittelt durch ATM, ATR und DNA-PKcs. Homologe Rekombination (**links**): 5'-3' endonukleolytische Prozessierung der DNA-Enden am DNA-Doppelstrangbruch durch den Rad50/Mre1/NBS1 Komplex, Bildung einzelsträngiger Überhänge am 3'-Ende, RPA-Bindung an den ssDNA-Enden, Bildung eines Nukleoproteinfilaments durch Rad51 und weiteren Paralogen (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRC3) an der ssDNA, Suche nach homologer Duplex-DNA und Initiierung einer Strangaustausch-Reaktion, DNA-Ligation und Beseitigung der *Holiday Junction* durch Resolvasen. NHEJ (**rechts**): Bindung und Enden Alignment durch den KU70/80 Komplex und der DNA-PKcs an den DNA-Enden, Ligation durch XECC4-Ligase 4. Modifiziert nach Hoeijmakers (Hoeijmakers 2001).

Als eine Alternative zur HR verbindet das NHEJ die Enden eines Doppelstrangbruches ohne weitere DNA-Matrizenvorlage. Dabei interagieren der DNA-Enden-bindende Komplex KU70/80 und die DNA-PKcs gefolgt von einer XRCC4-Ligase 4 vermittelten Ligation mit der DNA-Doppelstrangbruchstelle (Khanna & Jackson 2001; van Gent *et al.*, 2001). Hierbei spielt die Funktion von KU70/80 beim Schutz und dem Zusammenbringen der DNA-Enden sowie als Signalgeber für die DNA-PKcs eine wichtige Rolle. Das NHEJ wird weiterhin vorangetrieben indem die DNA-Enden durch Nukleosome und anderen Komponenten noch zusätzlich zusammengehalten werden. Beim NHEJ kann es zum Gewinn und Verlust von einigen Nukleotiden kommen, wenn Mikrohomologien für das Anlagern der Komponenten verwendet werden (Hoeijmakers 2001).

1.3 Molekularbiologische Effekte der Bestrahlung

Während der letzten 20 Jahren wurde das Feld der zellulären und molekularbiologischen Strahlungsbiologie wesentlich entwickelt und heutzutage ist man in der Lage das Ansprechen von heterogenen Tumoren und organisierten Normalgeweben auf hochenergetische, ionisierende Bestrahlung weitestgehend zu beschreiben. Das verbesserte Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge führt zu einem allgemeineren, systembiologischen Ansatz, der eine stetige Verbesserung und Optimierung der Strahlentherapie vorantreibt. Einer der weitreichendsten Ereignisse einer Stressantwort nach hochenergetischer Bestrahlung ist die Genexpressionsänderung von Transkriptionsfaktoren. Die Expressions- und Aktivitätsänderungen führen zu einer drastischen und systemweiten Verschiebung des Transkriptionsprofils einer Zelle (Christmann *et al.*, 2003). Wichtige Stressantworten der Zelle sind insbesondere die Zellzyklus-Arretierung, die Aktivierung von DNA-Reparatursignalwegen, die Genexpression von anti-oxidativen Proteinen und die Einleitung der Apoptose.

1.3.1 Zellzyklus-Checkpoints und -Arretierung

Es ist bekannt, dass proliferierende Zellen im Allgemeinen deutlich anfälliger durch Toxine (Zytostatika) und hochenergetischer Strahlung verursachte mutagene Effekte sind. Dies ist durch die anspruchsvollen Aufgaben der DNA-Replikation und der chromosomalen Segregation begründet, welche durch DNA-Schädigungen schnell entgleisen können (Mats Ljungman 2010). Die Zellzyklus-Arretierung gibt der Zelle Zeit die Reparaturmaschinerie zu rekrutieren und vor der DNA-Synthese oder der chromosomalen Segregation die DNA-Schäden zu beseitigen. Eukaryotische Zellen verfügen über mindestens drei Zellzyklus-Checkpoints (G1/S-, S- und G2/M-Kontrollpunkt), die nach DNA-Schädigungen durch die Inaktivierung von Cyclicin-abhängigen Kinasen (CDK) die Zellzyklus-Arretierung einleiten und somit den Übergang in die nächste Zellzyklusphase verhindern (Arenz 2007).

Damit Zellen mit DNA-Schädigungen nicht in die S-Phase oder Mitose eintreten, phosphorylieren ATM und ATR spezifische Substrate, wie bspw. p53, CHEK1 und CHEK2, was die Arretierung des Zellzyklus bewirkt (Reinhardt & Yaffe 2009). Dadurch wird die endogene p53 Proteinkonzentration durch Inhibierung seines proteolytischen Abbaus stabilisiert (Caspari 2000). Der Transkriptionsfaktor p53 wiederum induziert die Expression des CDK2-Inhibitors p21 (CDKN1A), der die Aktivierung des CyclinE-CDK2-Komplexes hemmt und somit den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert. Durch ionisierende Strahlung wird p53 primär durch ATM modifiziert, nach UV oder durch Hydroxyharnstoff wird vor allem ATR zur p53-Phosphorylierung verwendet (Arenz 2007; Nelson & Kastan 1994).

In der S-Phase ist die DNA besonders mutationsanfällig, wodurch eine besondere Bedeutung für die Regulierung des S-Phase-Checkpoints vorherrscht. Bei einer DNA-Schädigung während der Replikation erfolgt zunächst die Aktivierung der Checkpoint-Kinase CHEK2 durch ATM oder ATR. CHEK2 phosphoryliert CDC25A, das daraufhin proteosomal degradiert wird. Die Aktivierung des CyclinE(A)-CDK2-Komplexes, welches die S-Phase reguliert, wird dadurch verhindert. Auch die Reparaturproteine NBS1 und BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) sind in der Kontrolle des S-Checkpoints involviert (Arenz 2007; Petrini 2000; Y. Xu *et al.*, 2010).

Werden DNA-Schädigungen in der Postsynthesephase (G2-Phase) identifiziert, die in der späten S-Phase oder während der G2-Phase induziert wurden, erfolgt zunächst eine Verzögerung der Aktivierung des Cyclin B-Cdk2-Komplexes. Anhängig vom schädigenden Medium liegt entweder ein p53-abhängiger, bspw. durch ionisierende Strahlung (Guilouf *et al.*, 1995), oder ein p53-unabhängiger G2-Phasen-Arrest, wie durch UV-C Bestrahlung induziert (Al-Mohanna *et al.*, 2001), vor. Durchlaufen Zellen trotz vorheriger DNA-Schädigung den Zellzyklus bis zur G2-Phase wird die ATR-Kinase aktiviert und eine Phosphorylierung von CHEK1 findet statt (Abraham 2001). Hingegen kommt es bei DNA-Schädigungen innerhalb der G2-Phase zur Aktivierung der ATM-Kinase mit anschließender Phosphorylierung von CHEK2. CHEK1 und CHEK2 vermitteln die Bindung so genannter 14-3-3-Kinasen an CDC25C und verhindern dadurch den CyclinB-CDC2-vermittelten Eintritt der Zelle in die Mitose (Abraham 2001; Arenz 2007). Weiterhin existiert ein alternativer ATM/ATR-unabhängiger Signaltransduktionsweg zur Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase. Dabei spielt wiederum die Aktivierung bestimmter Gene durch p53 und/oder BRCA1, darunter *p21 (CDKN1A)*, *GADD45 α* und *14-3-3 σ* , eine Rolle. Die Aktivierung der DNA-Reparaturmaschinerie beim G2/M-Arrest erfolgt wiederum durch verschiedene Induktoren wie BRCA1, ATM oder den NBS/MRE11/RAD50-Komplex, die selbst alle in der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur involviert sind (Arenz 2007).

1.3.2 *Der apoptotische Zelltod*

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist der letzte Ausweg einer Zelle wenn die DNA-Schäden irreparabel sind oder die DNA-Reparatur zu langsam und unvollständig vonstatten geht. Während die Apoptose durch bestimmte Agenzien wie UV-Licht, Cisplatin oder lichtaktivierenden Psoralen induziert wird, kommt es zunächst zu einer systemweiten Blockade der Transkription (Derheimer *et al.*, 2009; M Ljungman & Zhang 1996; M Ljungman *et al.*, 1999). Es scheint, dass Zellen vorzugsweise die Apoptose durchlaufen, die auf den Sprung in der S-Phase des Zellzyklus sind (Derheimer *et al.*, 2009; McKay *et al.*, 2001; McKay *et al.*, 2002). Der Prozess des kontrollierten Selbstmordes der Zelle wird dabei durch ein Zusammenspiel von Caspasen der Familie der Cysteinproteasen koordiniert (MacFarlane & A. C. Williams 2004). Eukaryontische Zellen scheinen eine interne, apoptotische Uhr zu besitzen, welche bei Ablauf der Zeit in der Lage ist diese Caspasen zu aktivieren, was zur Induktion des Apoptose-Vorganges führt. Die Zellen sind bewiesenermaßen fähig diese interne Uhr zurückzusetzen, wenn der DNA-Reparaturvorgang ausreichend war und essentielle Prozesse wie die Transkription und Replikation wieder aufgenommen wurden (Ljungman 2010).

Der apoptotische Zelltod ist generell durch eine Initiations- und Effektorphase gekennzeichnet, wobei die Initiationsphase in mindestens zwei Vorgänge, dem extrinsischen und intrinsischen Weg (Typ I und Typ II), unterschieden werden kann. Typ I wird durch Wechselwirkung und Aktivierung der TNF- (*Tumour necrosis factor*) Rezeptorfamilie, auch *Todesrezeptoren* genannt, mit spezifischen, apoptotischen Liganden initiiert (Adams 2003; Danial & Korsmeyer 2004). Liganden dieser Rezeptorfamilie sind z.B. TNF- α , CD95L und TRAIL-R1 und TRAIL-R2. Charakterisiert sind diese *Todesrezeptoren* durch eine intrazelluläre Domäne, die so genannte *Todesdomäne*, die für die Weiterleitung des apoptotischen Signals essentiell ist. Dabei kommt es zur Rekrutierung von Caspase 8 und zur Bildung des Rezeptor-Ligand Komplexes DISC mit schneller Aktivierung des extrinsischen Weges.

Entscheidend für die Aktivierung des stressinduzierten Typ II Initiationsweges sind DNA-schädigende chemische oder physikalische Ereignisse. Diese verursachen Störungen der Mitochondrien und die Freisetzung von apoptotisch initialisierenden Proteinen in das Zytoplasma, wie bspw. Cytochrom C (Adams 2003). Die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran wird dabei über die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie gesteuert. Das zytosolische Cytochrom C bildet zusammen mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 den Apoptosom-Komplex, welches die Effektorphase durch die Aktivierung der Caspasen-Kaskade einleitet (Adams 2003; Arenz 2007). Diese sogenannten Effektor-Caspasen, vornehmlich Caspasen 3, 6 und 7, führen zum apoptotischen Tod der Zelle, wobei sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln abschnürt, die wiederum durch spezialisierte

Phagozyten aufgenommen werden. Eine schematische Darstellung der Aktivierung der apoptotischen Caspasen ist in Abbildung I.7 dargestellt.

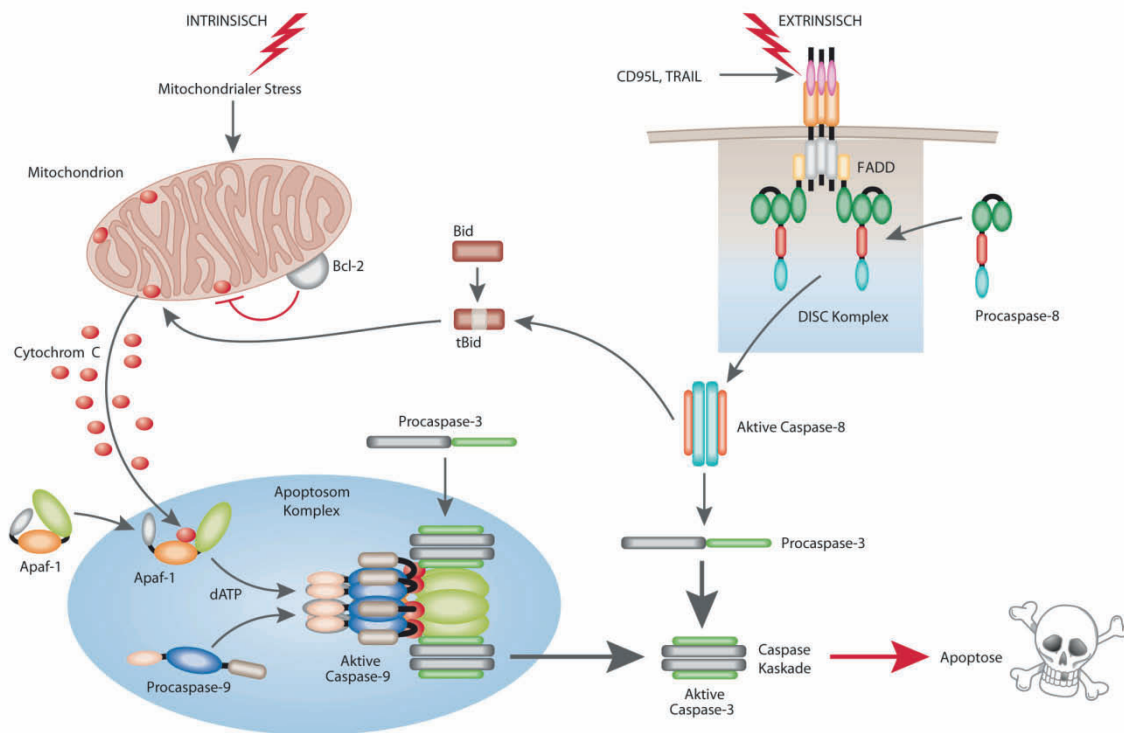


Abb. I.7 – Schematische Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Aktivierung der apoptotischen Caspasen. Der extrinsische Apoptoseweg wird Rezeptor-vermittelt aktiviert, der intrinsische über stressinduzierte Stimuli. Bei der extrinsischen Initialisierung kommt es durch Bindung von spezifischen Apoptose-Liganden (CD95L, TRAIL-R1 -R2) an Oberflächenrezeptor der TNF-Familie zur einer rapiden Aktivierung der Procaspase 8, die zusammen mit dem Adaptermolekül FADD (Fas-associated death domain protein) in einem Rezeptor-Ligand-Komplex (DISC) zur Aktivierung der Initiator-Caspase 8 führt. Der stressinduzierte, intrinsische Apoptoseweg führt zur Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C, was zusammen mit Apaf-1 und dATP einen Apoptosom-Komplex bildet, was für die Aktivierung der Initiator-Caspase 9 verantwortlich ist. Die aktivierten Caspasen 8 und 9 aktivieren daraufhin die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, worauf es zu den klassischen biochemischen und morphologischen Veränderungen des apoptotischen Phänotyps kommt. Die Freisetzung von Cytochrom C wird teilweise über Mitglieder der Bcl-2 Familie moduliert, wobei anti-apoptotische Faktoren (Bcl-2/ BclxL/ Mcl1) die Apoptose inhibieren und pro-apoptotische (Bax/ Bak/ tBid) diese fördern (Arenz 2007). Modifiziert nach MacFarlane und Williams (MacFarlane & A. C. Williams 2004).

1.3.3 Der NRF2 Signalweg als Antwort auf oxidativen Stress

Ein zentraler Faktor für die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress, wie er bei einer Strahlentherapie auftritt, ist die Induktion des Transkriptionsfaktor *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (NRF2). Unter physiologischen Bedingungen wird NRF2 durch KEAP1 im Zytoplasma gehalten und in seiner Aktivität inhibiert. Eine Erhöhung des intrazellulären Gehaltes von reaktivem Sauerstoffspezies (ROS) kann die Dissoziation des Transkriptionsfaktors NRF2 von seinem zytosolischen Bindungspartner KEAP1 bewirken, wodurch das NRF2-Protein in den Zellkern translokalisiert. Nach Ausbildung eines

Heterodimers mit weiteren Transkriptionsfaktoren kann dieses an das anti-oxidative responsive Element (*antioxidant response element*, ARE) binden, wodurch die Genexpression von diversen schützenden und anti-oxidativen Proteinen induziert wird (Lee & J. A. Johnson 2004; T. Yamamoto *et al.*, 2008). Zielgene von NRF2 sind unter anderem in zellulären Prozessen wie der Glutathionsynthese (z.B. *Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit* (Gclc), *glutamate-cysteine ligase, modifier subunit* (Gclm)), der Entfernung von ROS (z.B. *Thioredoxin reductase 1* (Txnrd1), *Peroxioredoxin 1* (Prdx1)), der Detoxifizierung von xenobiotischen Chemikalien (z.B. *NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1* (Nqo1), *Glutathione S-transferase* (Gst) Genfamilie) oder dem Transport von Medikamenten (z.B. Genfamilie der *Multidrug resistance-associated Proteine*) involviert (Taguchi *et al.*, 2011).

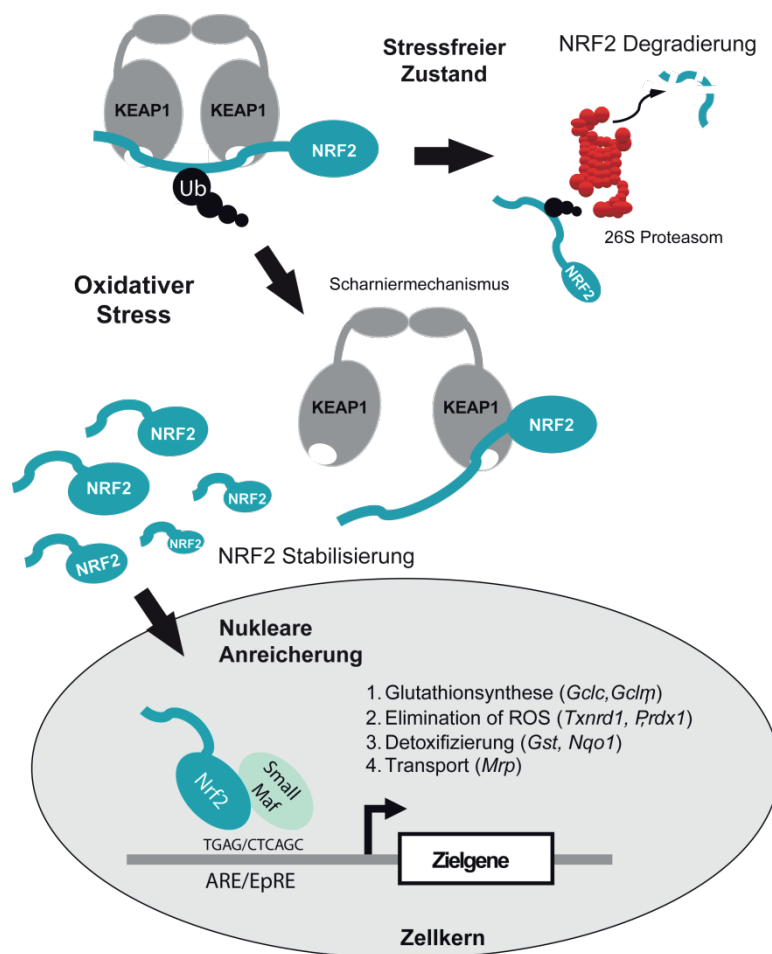


Abb. I.8 - Aktivierung NRF2 induzierter und schützender Zielgene als Antwort auf oxidativen Stress. Der ARE-bindende Transkriptionsfaktor NRF2 liegt im Normalzustand gebunden an KEAP1 im Zytosol vor. Im stressfreiem zellulären Zustand wird NRF2 durch das Ubiquitin-(Ub)-Proteasom-System konstant abgebaut. Bei oxidativen Stress wird NRF2 durch ein Scharniermechanismus von KEAP1 freigesetzt und kann in den Zellkern translokalisieren, wo es im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren (TF) an ARE/EpRE Promotorelementen von Zielgenen bindet und diese aktiviert. Dadurch werden Prozesse wie die Gluthathionsynthese, Eliminierung von ROS, Detoxifizierung xenobiotischer Stoffen und Transport von Molekülen vorangetrieben. Modifiziert nach Taguchi *et al.* (Taguchi *et al.*, 2011).

1.4 Strategien strahlungsresistenter Krebszellen

Obwohl die Strahlungsresistenz von Tumorzellen eine fundamentale Barriere der Effektivität einer Radiotherapie darstellt, sind die dabei zu Grunde liegenden molekularen Vorgänge größtenteils immer noch unverstanden. Es wird angenommen, dass geringe Strahlungsdosen spezifische Überlebens-Signalnetzwerke in Säugerzellen aktivieren (Reuter *et al.*, 2010). Die Proliferations- und Zellzyklusregulation sowie die DNA-Schadensüberwachungs- und Reparaturmechanismen sind die genetischen Schlüsselsignalwege auf das Ansprechen einer Radiotherapie (Amundson *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 1996; Brahme 2004; Brahme & Lind 2010; Fei & El-Deiry 2003; Friesen *et al.*, 2010; Nakamura 2004). Mindestens einer der Genprodukte dieser Signalwege ist in allen Krebserkrankungen alteriert, wobei im Allgemeinen mehrere dieser Gene und Signalwege involviert sind, was eine Erforschung auf Systemebene erfordert. Am Häufigsten ist das Tumorsuppressor- und Onkogen p53 und seine auf- und abwärts regulierten Gene betroffen (Friesen *et al.*, 2010). Im Jahre 1993 konnte Scott Lowe *et al.* an Thymozyten zeigen, dass strahlungsinduzierte Apoptose stark vom Transkriptionsfaktor p53 abhängig ist (Lowe *et al.*, 1993). Dies führte zur Annahme, dass p53 ein Hauptregulator der Apoptose ist und deswegen Tumore mit p53-Mutanten einen schlechten Therapieausgang nach medizinischer Bestrahlung und Chemotherapie haben könnten. Heute ist klar, dass die Rolle von p53 bei der Apoptose sehr zellspezifisch ist (Gudkov & Komarova 2003) und das p53 bestimmte Zellen gegen UV-Bestrahlung oder Cisplatin schützen könnte (McKay *et al.*, 2001; McKay *et al.*, 2000; McKay & M Ljungman 1999). Allerdings ist das p53 Gen und seine auf- und abwärts regulierten Gene sehr bedeutend für das Ansprechen einer Radiotherapie, insbesondere wenn p53 mutiert im Tumorgewebe vorliegt. Folglich könnte die gängige Zellzyklusblockade, die für gewöhnlich durch das Genprodukt von p21 und durch den p53-Signalweg und der Phosphorylierung von Serin15 und Serin20 an p53 induziert wird, verloren gehen und aufgrund nicht genügender Zeit zur Reparatur kann der Zellzyklus fortgesetzt werden, wodurch geschädigte, mutierte DNA ins Genom inkorporiert wird (Brahme & Lind 2010). Hinzukommend könnte der apoptotische Signalweg, der wiederum meistens durch p53 und dessen Phosphorylierung an Serin46 nach schwerwiegender DNA-Schädigung aktiviert wird (Nakamura 2004), ausbleiben und das Tumorgewebe kann Hypoxie und Bestrahlungsresistenz mit erhöhter Bösartigkeit entwickeln (Wouters & J. M. Brown 1997). In Zellen mit einem nicht mutierten p53 Gen kann hingegen der apoptotische Signalweg weiterhin funktional bleiben und führt demzufolge zu einem effektivem Zelltod nach dichter, fraktionierter Bestrahlung, welche generell eine höhere Apoptosefraktion, sogar in bestrahlungsresistenten, hypoxischen Tumoren, erzeugt (Svensson *et al.*, 2004). Letztendlich kann man die Zielgene von p53 entsprechend ihrer Funktion in Gruppen untergliedern. Darunter gehören Gene wie p21, 14-3-3 oder GADD45, die einen

Zellzyklusarrest einleiten und zum anderen Gene wie *BAX*, *PIG-3*, *NOXA*, *Puma*, *Fas/Apo-1* und *KILLER/DR5*, deren Produkte zur Induktion des programmierten Zelltods führen (Arenz 2007). Weiterhin ist p53 an Reparaturvorgängen in Zusammenspiel mit den p53-abhängigen Reparaturfaktoren DDB2 (Hwang *et al.*, 1999) und p53R2 (Tanaka *et al.*, 2000) beteiligt. Darüber hinaus nimmt p53 über transkriptions-unabhängige Mechanismen wie etwa die Interaktion mit weiteren Reparaturfaktoren Einfluss auf die Erkennung und Beseitigung von DNA Schäden (Arenz 2007; Rubbi & Milner 2003; M. L. Smith & Seo 2002; Therrien *et al.*, 1999).

Eine weitere entscheidende Rolle bei der Resistenz gegen ionisierende Strahlung spielt die Transkriptionsfamilie von NF- κ B, die mehr als 150 Zielgene reguliert (Reuter *et al.*, 2010). Eine erhöhte, basale NF- κ B Aktivität in bestimmten Krebsarten konnte mit einer Tumorresistenz gegen Chemo- und Radiotherapie assoziiert werden (Orlowski & Baldwin 2002). So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von NF- κ B in murinen epidermalen Zellen und humanen Keratinozyten die adaptive Strahlungsresistenz blockiert (Fan *et al.*, 2007). Zudem zeigten humane Brustkrebszellen, die einer mehrfachen, fraktionellen Bestrahlungen ausgesetzt wurden, eine verstärkte NF- κ B Aktivierung mit erhöhtem Kolonieüberleben (Guo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001).

Neben NF- κ B und p53 ist die Hypoxie eine prinzipielle Signatur des Tumor-Mikromilieus und wird als Hauptfaktor der klinischen Radioresistenz angesehen (Reuter *et al.*, 2010). Die Tumorantwort nach einer medizinischen Bestrahlung ist stark abhängig vom Sauerstoffgehalt und wird durch die Sauerstoff-Fixation-Hypothese erklärt (De Ridder *et al.*, 2008). Demnach ist Sauerstoff das beste Mittel für die Erhöhung der Strahlungssensitivität. De Ridder demonstrierte, dass die Induktion des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase, aktiviert durch pro-inflammatorische Zytokine, die Strahlensensitivität von Tumorzellen durch endogene Produktion von NO erhöhen kann (De Ridder *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass dieser strahlungssensitivierende Effekt transkriptional durch Hypoxie und NF- κ B kontrolliert wird. Übereinstimmend dazu wurde eine NF- κ B Inhibierung als ein Versuch zur Steigerung der Radiosensitivität von Tumorzellen mit dem Ziel einer simultanen Apoptose-Aktivierung und DNA-Reparaturblockade angewendet. Darüber hinaus wurden die inflammatorischen Mediatoren TNF- α und NO mehrfach als Ziele für die Erhöhung der Strahlungseffektivität verwendet (Janssens *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1999; Reuter *et al.*, 2010).

Während der klassische NF- κ B Signalweg einen lang etablierten Schlüsselweg in der Bestrahlungsresistenz darstellt, wird heutzutage der alternative NF- κ B Signalweg, vermittelt durch RelB, ebenfalls als signifikanter Faktor einer Strahlungsresistenz angesehen. Der alternative NF- κ B Signalweg resultiert in einer RelB vermittelnden Expressionserhöhung des anti-oxidativen, mitochondrial lokalisierten Enzyms namens Mangan-Superoxid-Dismutase

(MnSOD), welches ein Mitglied der Familie der Superoxiddismutasen (SOD) ist (Holley *et al.*, 2010). MnSOD könnte durch das Abfangen freier Radikale den induzierten, oxidativen Stress bei einer Radiotherapie entgegenwirken. Durch Blockade der RelB Aktivierung konnte in Prostatakrebszellen die Expression von MnSOD inhibiert und eine Sensitivierung der Zellen auf ionisierende Strahlung bewirkt werden (Holley *et al.*, 2010). RelB und MnSOD spielen somit eine wichtige Rolle bei der anti-oxidativen Kapazität von Prostata-Krebszellen und stellen einen wichtigen Mechanismus der Strahlungsresistenz dar. Neben den Superoxiddismutasen gibt es weitere anti-oxidative Enzymfamilien, wie die der Peroxidasen, Katalasen, Thioredoxine oder das Glutathion-System. Aber auch Stoffe wie Harnsäure und Melatonin oder Proteine wie Transferrin, Albumin, Coeruloplasmin, Hämopexin und Haptoglobin haben anti-oxidative Wirkungen. All diese anti-oxidativen, endogen vorkommenden Komponenten sind in der Lage die im Organismus vorhandenen ROS zu inaktivieren und könnten demnach einen Einfluss auf das Ansprechen einer Radiotherapie haben.

2 Das Zeitalter der Hochdurchsatz-Sequenzierung

Innerhalb der letzten 4 Jahre kam es in der Genomforschung zu einem fundamentalen, technologischen Wandel von der automatisierten Sanger-Sequenzierung der ersten Generation zur Hochdurchsatz-Sequenzierung der zweiten Generation (Next-Generation Sequenzierung, NGS) (Metzker 2010). Die Sanger-Sequenzierung durch Kapillarelektrophorese wurde in vielen historisch bedeutenden Großprojekten, bspw. beim Humangenomprojekt, eingesetzt und gilt als Goldstandard in Bezug auf Leseweite und Sequenzierungsgenauigkeit (Bonetta 2006). Durch die seit kurzer Zeit zur Verfügung stehenden neuen NGS Technologien ist man in der Lage im Vergleich zur klassischen Sanger-Sequenzierung Milliarden von Sequenzen in einem kurzem Zeitraum und zu deutlich geringerem Preis pro Base zu generieren (Schuster 2008; von Bubnoff 2008). In gewisser Hinsicht ist das Potential der NGS Technologien vergleichbar zu den frühen Tagen der Polymerase-Kettenreaktionstechnologie (PCR), wobei die primäre Einschränkung für Anwendungen am Vorstellungsvermögen des Anwenders lag. Allerdings werden mittlerweile die neuen NGS Technologien erfolgreich für die Identifikation von Bindungsstellen DNA-assoziierter Proteine (ChIP-Seq) (Bhinge *et al.*, 2007; D. S. Johnson *et al.*, 2007), zur transkriptomweiten Analyse der Genexpression (Hammer *et al.*, 2010; Ali Mortazavi *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2008) sowie zur Genom-Entschlüsselung eingesetzt (Bentley *et al.*, 2008; Wheeler *et al.*, 2008). Weiterhin liegt momentan ein Interessenschwerpunkt bei der zielgerichteten Sequenzierung von spezifischen Kandidatengenen und der Sequenzierung

gesamter Exome, die Gesamtheit der RNA-codierenden Abschnitte des Genoms, einer großen Anzahl von Individuen (Metzker 2010).

Die NGS als Anwendung für die Bestimmung der genomweiten Genexpression (RNA-Seq) bietet große Vorteile im Vergleich zu der bis dato verwendeten Mikroarray Technologie. Demnach ist man in der Lage Transkripte aller Art (miRNA, mRNA, ncRNA etc.) ohne *a priori* Wissen, mit geringem Hintergrundrauschen, in einem sehr großen Messbereich und ohne komplizierte Normalisierungsverfahren zu identifizieren und zu quantifizieren. Die NGS Technik stellt zudem sequenzbasierte Informationen über alternatives Spleißen, Insertionen, Deletionen, Punktmutationen, Einzelnukleotid-Polymorphismen, Genfusionierungen, chromosomale Aberrationen oder *Copy Number Variationen* (kurz CNV, deutsch Kopienzahlvariationen) bereit (Metzker 2010).

Die Ankunft der NGS Technologien auf dem freien Markt führt zu veränderten Denk- und Herangehensweise wissenschaftlicher Ansätze in der grundlagenbasierten, in der angewandten und in der klinischen Forschung. Die traditionelle Vorgehensweise der Isolierung einzelner individueller Gene und deren Untersuchung in einem Modellsystem wird durch die Datengenerierung einzelner Labore sowie durch große Konsortien, die diese neuen Hochdurchsatz-Technologien anwenden, zu einem großen Teil ersetzt werden (Hwang *et al.*, 1999).

Klinisch wird eine Untersuchung der Erbsubstanz in wenigen Jahren zur Routine gehören, auch auf der Ebene der Transkripte, deren regulative Rolle immer deutlicher wird. Die Möglichkeit einer Einteilung in Patienten-Untergruppen wird die Entscheidung über Behandlungsformen wie etwa bei der Radio- oder Chemotherapie vereinfachen und damit sowohl das Wohlbefinden des Patienten wie auch die Kosten-Nutzen Rechnung wesentlich verbessern. Zusätzlich dürften sich für viele bereits entwickelte Wirkstoffe, die in späten klinischen Phasen oder sogar nach Zulassung wegen ihrer Nebenwirkungen gescheitert sind, eine neue Chance ergeben, wenn der Personenkreis identifiziert werden kann, der keine Nebenwirkungen zeigt (Hoheisel 2009).

Demnach wird in der genomischen Hochdurchsatz-Ära die integrative Analyse der verschiedenen Daten (genomisch, transkriptomisch, CNV etc.) eine essentielle Rolle beim experimentellen Design spielen und nicht mehr länger ein Merkmal der Bioinformatik sein. Dennoch wird die Datenintegration aufgrund der hohen Diversität dieser Hochdurchsatzdaten und der endlos erscheinenden Analysen, die durchgeführt werden können, eine zukünftige Herausforderung sowohl für den Nasslaborbiologen als auch für den Bioinformatiker sein (Hawkins *et al.*, 2010).

3 Zielsetzung der Arbeit

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahre 2006 starben über 210.000 Menschen durch die Folgen einer Krebserkrankung, was in etwa mit jedem vierten Todesfall gleichzusetzen ist (Robert-Koch-Institut Berlin & Husmann 2010). Prostatakrebs ist mit 26 % mittlerweile die häufigste Krebserkrankung bei Männern und verursacht 10 % der Krebssterbefälle (Krebsinformationsdienst 2011). Neben der Chemotherapie und der operativen Entfernung ist die Strahlentherapie das wichtigste Instrument zur Bekämpfung von karzogenen Tumoren. 50 - 60 % aller Krebsbetroffenen erhalten im Laufe ihrer Behandlung eine Strahlentherapie, wobei sie bei etwa 50 % aller dauerhaften Tumorheilungen Bestandteil der Therapie oder sogar die einzige Behandlungsform darstellt (Deutsche Krebshilfe 2010). Trotz guter Heilungschancen kann ein Rezidiv bis zu 10 Jahre nach der Strahlentherapie beim Krebspatienten erfolgen, was zum Teil auf die hohe Resistenzfähigkeit einzelner Zellen des lokal vorkommenden Tumors zurückgeführt werden kann (Krebsinformationsdienst 2011).

Kommerziell verfügbare Prostata-Krebszelllinien sind etablierte und gut geeignete Modellsysteme für die Erforschung der molekularen Ursachen einer Strahlungsresistenz. Trotz einer aktiven Strahlungsbiologieforschung sind diverse Fragestellungen unbeantwortet. Insbesondere fehlen systemweite Untersuchungen, die die Dynamik der Genexpression in resistenten Tumorzellen vor und nach einer medizinischen Bestrahlung analysieren. Als Ausgangshypothese dieser vorliegenden Arbeit diente die Ansicht, dass Strahlungsresistenz auf ein spezielles, zelluläres Ansprechen auf oxidativen Stress beruht. Demnach weisen strahlungssensitive Krebszelllinien vor einer medizinischen Bestrahlung ein anderes Genexpressionsmuster auf als strahlungsresistente Krebszelllinien. Weiterhin besagt die Hypothese, dass resistente Prostata-Krebszellen nach einer medizinischen Bestrahlung ein systematisch und dynamisch verändertes Genexpressionsprofil aufweisen.

Durch Kultivierung geeigneter Prostata-Krebszelllinien als Zellmodelle für einen sensitiven und einen resistenten Tumor sollten anhand der globalen Genexpressionen Unterschiede zwischen beiden Zellmodellen dargestellt werden. Desweiteren sollte anhand der resistenten PC3 Zelllinie die zeitabhängige Genexpression nach Einwirkung ionisierender Strahlung in einem Zeitreihenversuch mit 8 Zeitpunkten Aufschluss über die molekularen Resistenzmechanismen geben. Durch die dabei generierte, enorme Datenmenge sollten mit Hilfe bereits vorhandener und noch zu entwickelnder bioinformatischer und statistischer Algorithmen und Verfahren beteiligte Netzwerke und Signalwege identifiziert werden, die letztendlich die Ausgangshypothesen bestätigen sollten.

Die Erkenntnisse und Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen neues Wissen generieren, welches zukünftig für eine verbesserte klinische Strahlentherapie eingesetzt werden könnte.

So sollen die gewonnenen, molekularbiologischen Einsichten dieser Arbeit dazu beitragen Biomarker zu identifizieren, die dem Arzt eine Vorhersage über das Ansprechverhalten eines Tumors auf eine Strahlentherapie anhand des Genaktivitätsmusters des Patienten ermöglichen könnte. Weiterhin sollen neue theoretische Ziele für medikamentöse Ansatzpunkte ermittelt werden, die die Effizienz einer medizinischen Bestrahlung erhöhen könnten. Letztendlich soll das Verständnis über die zellulären Antworten und Mechanismen auf oxidativen Stress näher beleuchtet werden, wodurch sich zukünftig neue Anwendungsmöglichkeiten im Kampf gegen Krankheiten wie Krebs ergeben könnten.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und biologisch reaktive Reagenzien von Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Applied Systems oder Invitrogen in *per analysis*-Qualität kommerziell erworben und verwendet.

1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer sind in den Abschnitten angegeben, in denen die entsprechenden Methoden beschrieben sind. Bei allen Puffern und Medien handelt es sich um wässrige Lösungen, die, sofern nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur gelagert wurden. Alle Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

1.3 Kommerzielle Reagenzien, Nachweis- und Reaktionssysteme

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten kommerziellen Reagenzien, Nachweis- und Reaktionssysteme mit Herstellerangaben sind in der nachfolgenden Tabelle II.1 aufgeführt.

Tab. II.1 – Verwendete kommerzielle Reagenzien, Nachweis- und Reaktionssysteme.

Bezeichnung	Hersteller
50 bp DNA Ladder	Invitrogen
6 % TBE-Urea Gels 1,0 mm, 10 well	Invitrogen
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies
Dynabeads [®] mRNA Purification Kit for mRNA Purification from Total RNA preps	Invitrogen
MiniElute [®] PCR Purification Kit	Qiagen
Novex [®] Pre-Cast TBE-Urea-Gelelektrophorese	Invitrogen
Novex [®] TBE-Urea Sample Buffer	Invitrogen
Nuklease-freies Wasser	Ambion
PureLink [™] PCR Micro Kit	Invitrogen
Qubit [®] dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen
Qubit [®] RNA Assay Kit	Invitrogen

Qubit [®] RNA BR Assay Kit	Invitrogen
RiboMinus [™] Concentration Module	Invitrogen
RNaseZap [®]	Ambion
SOLiD [™] EZ Bead Amplifier E80 Kit	Applied Biosystems
SOLiD [™] EZ Bead Emulsifier E80 Kit	Applied Biosystems
SOLiD [™] EZ Bead Enricher E80 Kit	Applied Biosystems
SOLiD [™] ToP Instrument Buffer Kit	Applied Biosystems
SOLiD [™] Pre Deposition Kit	Applied Biosystems
SOLiD [™] RNA Barcoding Kit, Module 1-16	Applied Biosystems
SOLiD [™] ToP Paired End Sequencing Kit - BC Frag. Lib., MM50/35/5	Applied Biosystems
SOLiD [™] ToP Workflow Analysis Reagents	Applied Biosystems
SOLiD [™] Total RNA-Seq Kit	Applied Biosystems
SOLiD [™] XD Slide & Deposition Kit	Applied Biosystems
Stratagene Absolutely RNA Miniprep Kit	Agilent Technologies
SYBR [®] Gold	Invitrogen

1.4 Verwendete Geräte und Systeme

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Geräte und Systeme sind in der nachfolgenden Tabelle II.2 aufgeführt.

Tab. II.2 – Verwendete Geräte und Systeme.

Bezeichnung	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Covaris [™] S2 System	Covaris Inc.
HeraCell 150 Liter CO ₂ Brutschrank	Thermo Scientific
Inverses Mikroskop DM IL LED	Leica
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Linearbeschleuniger Primus [®]	Siemens
Magnetpartikelkonzentrator Dynal MPC [™] -S	Invitrogen
Minizentrifugen	Sarstedt
NanoDrop [™] Spektrophotometer	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät FE20 – FiveEasy [™] pH	Mettler & Toledo
PowerPac [™] Universal Netzgerät	BioRad
Qubit [®] Fluorometer	Invitrogen

Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator	Invitrogen
Sicherheitswerkbank HeraSafe KS 12	Thermo Scientific
SOLiD™ EZ Bead™ Amplifier	Applied Biosystems
SOLiD™ EZ Bead™ Emulsifier	Applied Biosystems
SOLiD™ EZ Bead™ Enricher	Applied Biosystems
SOLiD™ Sequencer 4 System	Applied Biosystems
Spektralphotometer SpectraMax 250	Molecular Devices
Thermostat 5320	Eppendorf
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AC 504	Ditabis
Vortex Genie	Scientific Industries Inc.
Wasserbad WNB-Serie 14I	Memmert
XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophorese-System	Invitrogen
XP205 DeltaRange Analysenwaage	Mettler & Toledo
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus

1.5 Verwendete Zelllinien

Der Tabelle II.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten und kommerziell erhältlichen Zelllinien zu entnehmen.

Tab. II.3 – Experimentell verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Detail	Quelle
DU-145	Adenocarcinoma	Gehirnmetastase	ATCC (HTB-81)
DuCaP	Adenocarcinoma	Dura mater Metastase	Philips Forschung
PC3	Adenocarcinoma	Knochenmetastase	ATCC (CRL-1435)
RWPE-1	nicht transformiertes Epithel	Immortalisiert durch humanes Papilloma Virus 18 (HPV-18)	ATCC (CRL-11609)

1.6 Auflistung der Proben für die Hochdurchsatz-Sequenzierung

In Tabelle II.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten SOLiD™ 4 sequenzierten Proben aufgelistet.

Tab. II.4 – Auflistung der verwendeten Proben für die Hochdurchsatz-Sequenzierung.

Nr.	Proben	Klasse	Zelllinie	Detail
1	DU-145_A	-	DU-145	Nicht bestrahlte DU-145 Wildtyp Zelllinie
2	DU-145_B	-	DU-145	Nicht bestrahlte DU-145 Wildtyp Zelllinie, biologisches Replikat 1
3	DU-145_C	-	DU-145	Nicht bestrahlte DU-145 Wildtyp Zelllinie, biologisches Replikat 2

4	DuCaP_A	<i>DuCaP</i>	DuCaP	Nicht bestrahlte DuCaP Wildtyp Zelllinie
5	DuCaP_B	<i>DuCaP</i>	DuCaP	Nicht bestrahlte DuCaP Wildtyp Zelllinie, biologisches Replikat 1
6	DuCaP_C	<i>DuCaP</i>	DuCaP	Nicht bestrahlte DuCaP Wildtyp Zelllinie, biologisches Replikat 2
7	PC3_0_A	<i>PC3₀</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 00:00
8	PC3_0_B	<i>PC3₀</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 00:00, biologisches Replikat 1
9	PC3_0_C	<i>PC3₀</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 00:00, biologisches Replikat 2
10	PC3_1_A	<i>PC3₁</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 00:30
11	PC3_1_B	<i>PC3₁</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 00:30, biologisches Replikat 1
12	PC3_1_C	<i>PC3₁</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 00:30, biologisches Replikat 2
13	PC3_2_A	<i>PC3₂</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 01:03
14	PC3_2_B	<i>PC3₂</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 01:03, biologisches Replikat 1
15	PC3_2_C	<i>PC3₂</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 01:03, biologisches Replikat 2
16	PC3_3_A	<i>PC3₃</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 02:12
17	PC3_3_B	<i>PC3₃</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 02:12, biologisches Replikat 1
18	PC3_3_C	<i>PC3₃</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 02:12, biologisches Replikat 2
19	PC3_4_A	<i>PC3₄</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 04:38
20	PC3_4_B	<i>PC3₄</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 04:38, biologisches Replikat 1
21	PC3_4_C	<i>PC3₄</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 04:38, biologisches Replikat 2
22	PC3_5_A	<i>PC3₅</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 09:43
23	PC3_5_B	<i>PC3₅</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 09:43, biologisches Replikat 1
24	PC3_5_C	<i>PC3₅</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 09:43, biologisches Replikat 2
25	PC3_6_A	<i>PC3₆</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 20:25
26	PC3_6_B	<i>PC3₆</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 20:25, biologisches Replikat 1
27	PC3_6_C	<i>PC3₆</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 20:25, biologisches Replikat 2
28	PC3_7_A	<i>PC3₇</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 42:53
29	PC3_7_B	<i>PC3₇</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 42:53, biologisches Replikat 1
30	PC3_7_C	<i>PC3₇</i>	PC3	5 Gy resistente PC3 Zelllinie, Zeitpunkt 42:53, biologisches Replikat 2
31	RWPE-1_A	-	DuCaP	Nicht bestrahlte RWPE-1 Wildtyp Zelllinie
32	RWPE-1_B	-	DuCaP	Nicht bestrahlte RWPE-1 Wildtyp Zelllinie, biologisches Replikat 1
33	RWPE-1_C	-	DuCaP	Nicht bestrahlte RWPE-1 Wildtyp Zelllinie, biologisches Replikat 2

2 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Steril-Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zudem wurden alle verwendeten Materialien, Medien, Lösungen und sonstige Zusätze steril eingesetzt, bei 4 °C oder -20 °C gelagert und vor der Verwendung in einem sterilen Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt bzw. auf Raumtemperatur äquilibriert. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (95 %) kultiviert. Das fötale Kälberserum (FBS, Gibco) wurde vor Verwendung 30 Minuten bei 56 °C inkubiert, um enthaltene Komplementfaktoren zu inaktivieren.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen nach Erreichen einer ca. 80 – 90 %igen Konfluenz passagiert, um eine Kontaktinhibition der Zellen zu vermeiden. Hierzu wurden die adherent wachsenden Zellen in einer Zellkulturflasche (BD Falcon™ Zellkulturflaschen mit 25 cm², 75 cm² oder 300 cm²) oder in Zellkulturplatten (BD Falcon™ Multiwell-Zellkulturplatten mit 6, 12, oder 24 Kavitäten) zunächst vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend für maximal 5 Minute mit Trypsin/EDTA-Lösung (Lonza) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde dann durch Zugabe des zellspezifischen Kulturmediums gestoppt. Entsprechend einer gewünschten Verdünnung wurde ein Teil der jeweiligen Zellsuspension in eine frische Zellkulturflasche überführt und mit Kulturmedium aufgefüllt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Die Zentrifugationsschritte erfolgten für 5 Minuten bei 400 g und 20 °C mit anschließendem Absaugen des Überstandes.

PBS: 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 8,1 mM Na₂HPO₄ in ddH₂O; autoklaviert

2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

2.1.2.1 Kultivierung der Zelllinie DU-145

Die humane Zelllinie DU-145 wurde 1978 von Stone *et al.* aus einer Hirnmetastase eines 69-jährigen Prostatakarzinompatienten etabliert (Stone *et al.*, 1978). Es handelt sich um epitheliale, adherent wachsende Zellen, die kein prostataspezifisches Antigen (PSA) exprimieren. Diese Zellen wachsen androgen-unabhängig und exprimieren ein mutiertes und daher defektes p53-Genprodukt (Carroll *et al.*, 1993; Chapman *et al.*, 1999). Die aggressiv maligne DU-145 Zelllinie ist bereits in zahlreichen Bestrahlungsstudien charakterisiert und wird als bestrahlungsresistente Zelllinie angesehen (Bowen u. a. 1998; Deng u. a. 2011; Donna u. a. 2011; Sun u. a. 2007; Truman u. a. 2005; Trzeciak u. a. 2004; Vucic u. a. 2006; Xu u. a. 2010).

DU-145-Medium: Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640, Lonza);
10 % FBS; 100 U/mL Penicillin; 100 U/mL Streptomycin; 4 °C

2.1.2.2 Kultivierung der Zelllinie DuCaP

Die adhären wachsende Zelllinie DuCaP wurde aus einer Metastase der äußersten Hirnhaut (*Dura Mater*) eines Pateinten mit hormonresistentem bzw. -refraktärem Prostatakrebs gewonnen und etabliert. Die hypertriploiden Zellen weisen viele phänotypischen Eigenschaften des klinischen Prostatakrebs dar, wie die Expression von PSA, prostataspezifisches Membran-Antigen, Prostataphosphatase und des Androgenrezeptors (Lee *et al.*, 2001). Veröffentlichungen über Studien die Auskunft über Bestrahlungssensitivitäten dieser Zelllinie erlauben sind bis dato nicht vorhanden bzw. unveröffentlicht.

DuCaP-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco);
10 % FBS; 100 U/mL Penicillin; 100 U/mL Streptomycin; 4 °C

2.1.2.3 Kultivierung der Zelllinie PC3

Bei den 1976 isolierten Zellen der Linie PC3 handelt es sich um humane epitheliale, adhären wachsende Prostatakarzinomzellen (Kaighn *et al.*, 1979). Sie entstammen der Knochenmetastase des Grades IV eines Adenokarzinoms eines 62-jährigen Europäers. In diesen Zellen ist die Aktivität der Prostataphosphatase und der Testosteron-5-alpha-Dehydrogenase niedrig. Sie werden als androgen-unabhängig eingestuft, zeigen aber minimale Expression des Androgen-Rezeptors (Jarrard *et al.*, 1998; Kaighn *et al.*, 1979; Kinoshita *et al.*, 2000; M. F. Lin *et al.*, 1998). Des Weiteren exprimieren sie kein funktionales p53-Protein (Herrmann *et al.*, 1998). Die als aggressiv und malign eingestuft Zellen der PC3 Linie sind bereits in zahlreichen Bestrahlungsstudien charakterisiert und werden als bestrahlungsresistente Zellen angesehen (Dai *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2011; Donna *et al.*, 2011; Z. Fan *et al.*, 2000; M. Fan *et al.*, 2007; Inayat *et al.*, 2002; Singh-Gupta *et al.*, 2009; D. Tang *et al.*, 2005; Truman *et al.*, 2005; Trzeciak *et al.*, 2004; Udayakumar *et al.*, 2008; Zellweger *et al.*, 2002).

PC3-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco);
10 % FBS; 100 U/mL Penicillin; 100 U/mL Streptomycin; 4 °C

2.1.2.4 Kultivierung der Zelllinie RWPE-1

Die epitheliale, adhären wachsende, humane Prostata-Zelllinie RWPE-1 stellt eine nicht-maligne, androgen-abhängige Zelllinie dar (Webber, Bello, *et al.*, 1996; Webber *et al.*, 1997; Webber *et al.*, 2001). Zur Etablierung wurden epitheliale Zellen aus der peripheren Zone der

gesunden Prostata eines 54-jährigen Europäers mit dem humanen Papilloma Virus Typ 18 transfiziert (Bello *et al.*, 1997). Es sind bis dato nur wenige Veröffentlichungen über das Ansprechen ionisierender Strahlung auf RWPE-1 Zellen existent, wobei diese normale Prostata-Zelllinie als radiosensitiv eingestuft wird (Hasan *et al.*, 2010; Konsoula *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009).

RWPE-1-Medium: Keratinocyte SFM (Gibco); 2,5 µg humane Wachstumsfaktoren (EGF, Gibco); 2,5 mg Rinderhypophysenextrakt (BPE) (Gibco); 100 U/mL Penicillin; 100 U/mL Streptomycin; 4 °C

2.1.3 Auftauen und Einfrieren eukaryotischer Zellen

Um Zellen über eine lange Zeit lagern zu können, wurden Kryopräparationen von Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Bei der Kryokonservierung wurde 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel verwendet. Aufgrund des toxischen Charakters von DMSO wurden aus dem Flüssigstickstoff entnommene Zellen schnell bei 37 °C aufgetaut und zur Verdünnung der DMSO Konzentration in 20 ml zellspezifischem Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 10 ml PBS gewaschen, anschließend in 10 ml zellspezifischem Kulturmedium resuspendiert und alles in eine geeignete Zellkulturflasche ausgesät. Einzufrierende Zellen wurden zunächst zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, durch Trypsin von der Kulturflasche gelöst und durch Zentrifugation bei 4 °C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und nochmals bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, in Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst bei -80 °C in einer Styropor-Schachtel eingefroren. Später wurden die Kryopräparationen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.1.4 Der MTT-Test

Zur Bestimmung der Überlebensrate der vier Prostatazelllinien nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Energiedosen (5 Gy¹, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy) wurde ein MTT-Test angewendet, der auf der Reduktion des wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein wasserunlösliches Formazan beruht, die durch zelluläre Reduktionsmittel hervorgerufen wird und kolorimetrisch gemessen werden kann (Mosmann 1983). Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen auf Zellkulturplatten mit 12 Kavitäten verteilt, bis zu einer Konfluenz von 90 % expandiert und nach Bestrahlung in 400 µl Kulturmedium 72 h in 1 ml frischem Medium kultiviert. Dann wurden 0,5 g/L MTT zugefügt und die Zellen für weitere 120 min inkubiert. Nach Ablösen und Überführen in 1,5 ml

¹ 1Gy = 1 $\frac{J}{kg}$ = 1 $\frac{m^2}{s^2}$

Reaktionsgefäße wurden die Zellen zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 1 ml MTT-Stopplösung resuspendiert, bis der entstandene Farbstoff vollständig gelöst war. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Färbung der Überstände photometrisch bei 570 nm (SpectraMax 250) quantifiziert. Dabei korreliert die Konzentration an Formazan mit der Vitalität der Zellen.

MTT-Stopplösung: 40 mM HCl in Isopropanol

2.1.5 Der Trypanblau-Test

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Zellvitalität ist der sogenannte Trypanblau-Test oder auch Trypanblau Exclusion Assay. Mit ihm kann schnell und einfach eine direkte zytotoxische Wirkung nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Energiedosen (5 Gy, 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy, 40 Gy) ermittelt werden. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran können Trypanblau nicht aufnehmen, hingegen abgestorbene Zellen unter dem Mikroskop durch die Aufnahme des Farbstoffes blau erscheinen (Strober 2001).

Die vier Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von 90 % in Zellkulturplatten mit 12 Kavitäten expandiert, mit unterschiedlichen Energiedosen in 400 µl Kulturmedium bestrahlt und nach weiteren 72 h in 1 ml zellspezifischem Kulturmedium auf ihre Zellvitalität untersucht. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium jeder Kavität in ein separates 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Jede Kavität wurde danach zweimal mit PBS gewaschen, wobei die PBS Lösungen ebenfalls in das gleiche 15 ml Reaktionsgefäß überführt wurden, um alle toten Zellen zu sammeln. Die adhären Zellen wurden durch eine 5 min Inkubation mit 150 µl Trypsin/EDTA gelöst und mit 2 ml PBS in das entsprechende 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden daraufhin zentrifugiert und durch mehrmaligen Hoch- und Runterpipettieren in 150 µl PBS/EDTA vereinzelt. 15 µl der Zellsuspension wurden mit 80 µl 0,4 %igen Trypanblau (Sigma) für 2,5 min inkubiert. Wiederum 15 µl der Trypanblau-Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt und vier Quadrate mit mindestens 30 Zellen wurden ausgezählt. Die Trypanblau-Zellsuspension-Prozedur und die Zellzählung erfolgten pro Probe einzeln und sehr rasch, da Trypanblau zytotoxisch auf die Zellen wirkt. Die Viabilität der Zellen wurde prozentual ausgerechnet, wobei die lebenden Zellen (ungefärbt) ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt wurden.

2.1.6 Der Koloniebildungstest

Zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit der vier Zelllinien wurde als dritte Methode der Koloniebildungstest angewendet. Er gibt Aufschluss über die proliferative Kapazität der Zellen nach ionisierender Bestrahlung. Dabei wurde eine Dosisreihe von 0 bis 10 Gy angewandt, was die Darstellung einer Zellüberlebenskurve ermöglicht. Die Grundlage des

Experimentes ist die Ausbildung von Zellkolonien. Dabei wird nach Steel eine Kolonie mit mindestens 50 Zellen definiert (Steel 1993). Die Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen entsprechend der zu bestrahlenden Energiedosis in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten 24 h vor der Bestrahlung in 400 µl frischem Kulturmedium ausgesät. Tabelle II.5 listet die Zellzahlen zu den dazugehörigen Energiedosen auf. Es wurden zur Bestimmung des akuten Überlebens bei einer Bestrahlung von 0 – 10 Gy jeweils drei Zellkulturplatten pro Strahlendosis in Parallelansätzen untersucht. Nach der Bestrahlung in 400 µl Kulturmedium wurde 1 ml frisches Kulturmedium pro Kavität hinzugegeben. Das Koloniewachstum unter Kulturbedingungen wurde nach 11 Tage beendet.

Tab. II.5 – Auflistung der ausgesäten Zellen zur jeweiligen Strahlendosis.

Strahlendosis [Gy]	ausgesäte Zellen
0	500
2	750
4	1000
6	3000
8	5000
10	10000

Nach Beendigung des Koloniewachstums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 %igem Paraformaldehyd (Fluka) fixiert. Das Paraformaldehyd wurde nach 10 min entfernt und nach einem 10 min Waschschrift mit 70 %igem Ethanol folgte eine Lufttrocknung der Zellkulturplatten bei 37 °C. Das Anfärben der Zellen erfolgte mit Giemsa-Gebrauchslösung (Sigma) für 30 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Zellen mit Wasser gewaschen und bei 37 °C luftgetrocknet. Die Auszählung der Kolonien erfolgte mikroskopisch, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen bestehen musste.

2.1.7 Erfassung der zellulären Antwort von PC3 Zellen nach Bestrahlung

Für die Untersuchung der genomweiten Genexpressionsveränderung strahlungsresistenter PC3 Zellen nach medizinischer Bestrahlung wurde ein Zeitreihenexperiment konzipiert und durchgeführt. Zuerst wurden Wildtyp PC3 Zellen mit einer Energiedosis von 5 Gy bestrahlt, wobei die ca. 30 % überlebenden Zellen expandiert und für das Zeitreihenexperiment eingesetzt wurden. Die Zeitdauer t für den Zeitpunkt n für das Ernten der 5 Gy resistenten PC3 Zellen nach deren Bestrahlung mit einer Energiedosis von 1 Gy wurde beginnend mit t_0 30 min nach folgender Gleichung (II.1) berechnet.

$$t_n = 2,1 \cdot t_{n-1} \rightarrow n \in \{2 \dots 7\} \quad (\text{II.1})$$

Als Zeitpunkt t_0 wurden 5 Gy resistente PC3 Zellen ohne Bestrahlung bzw. direkt vor der Bestrahlung geerntet. Nach Gleichung (II.1) ergeben sich bei 7 Zeitpunkten die in Tabelle II.6 angegebenen Werte für die Zeitdauer t nach Bestrahlung.

Tab. II.6 – Auflistung der Zeitdauer t nach Bestrahlung.

Zeitpunkt n	Zeitdauer nach Bestrahlung t
0	00:00
1	00:30
2	01:03
3	02:12
4	04:38
5	09:43
6	20:25
7	42:53

Es wurde bewusst eine exponentielle Funktion angewendet, um die direkte dynamische Reaktion sowie länger anhaltende Ereignisse der Zellen auf die Bestrahlung zu erfassen. Weiterhin wurden die Zellen mit einer relativ geringen Energiedosis von 1 Gy bestrahlt, um apoptotische und nekrotische Ereignisse gering zu halten.

2.1.8 Kultivierung der Zelllinien für die Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die Kultivierung der Zellen für die Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgte in Zellkulturflaschen mit 300 cm² Fläche, um eine möglichst hohe Zellanzahl zu erhalten. Es wird davon ausgegangen, dass eine Zelle im Durchschnitt 10 pg Gesamt-RNA besitzt und diese aus 1 - 5 % mRNA besteht. Für den Beginn einer SOLiD™ 4 Bibliotheken-Präparation benötigt man 100 – 500 ng angereicherte mRNA, so dass man von mindestens 50 µg Gesamt-RNA ausgehen sollte, was einer Zellzahl von 5 Millionen entspricht. Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 300 cm² und einer 90 %igen Konfluenz weisen deutlich mehr als die benötigte Zellanzahl auf.

Zellen, die bestrahlt werden sollten, wurden 1 h vor der Bestrahlung mit PBS gewaschen, um tote Zellen zu entfernen, und anschließend mit frischem Kulturmedium bedeckt. Kurz vor der Bestrahlung wurden die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank entnommen und auf schnellstem Wege zum Linearbeschleuniger geschafft. Nach der schnell durchgeführten Bestrahlung wurde zu den Zellen 60 ml frisches Kulturmedium hinzugegeben. Bestrahlte Zellen wurden nach dem jeweiligen Zeitpunkt und nicht bestrahlte Zellen nach Erreichung

einer 90 %igen Konfluenz geerntet. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 2x 20 ml PBS durch Hoch- und Runterpipettieren von der Zellkulturflaschen gelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 4 min wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 1,4 ml PBS resuspendiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Durch eine weitere Zentrifugation bei 4000 rpm für 2 min wurden die Zellen wiederum pelletiert. Die Reaktionsgefäße mit den Zellpellets wurden direkt nach Absaugen des Überstandes in eiskaltem Ethanol mit Trockeneis schockgefroren und in einem mit Trockeneis gefüllten Styroporbehälter zum Max-Planck-Institut für molekulare Genetik nach Berlin gebracht wo sie bei -80 °C tiefgefroren gelagert wurden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellkulturen wurde das Absolutely RNA Kit (Agilent) verwendet. Bei diesem Verfahren wird die selektive Bindungseigenschaft einer Silikagel-Membran in der Gegenwart von chaotrophen Salzen mit der Mikrosäulenzentrifugationstechnik ausgenutzt. Die Durchführung der einzelnen Schritte wurde strikt nach Herstellerangaben realisiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem im Kit enthaltenden Lysis Puffer lysiert. Danach wurden die Proben in speziellen Pre-Filter-Säulen von Zellpartikeln und genomischer DNA gereinigt. Das Filtrat wurde danach auf die RNA-bindende Säule transferiert, mit einem gering salzhaltigen Puffer gewaschen und dann einer DNase I Behandlung über 15 min bei Raumtemperatur unterzogen, um eventuell noch vorhandene genomische DNA abzubauen. In mehrfachen Zentrifugationsschritten unter Zugabe von Waschpufferlösungen wurden Salze, Proteine und andere zelluläre Bestandteile von der Membran entfernt. Anschließend konnten die gereinigten RNA-Molekülstränge mit Nuklease-freiem Wasser von der Säulenmembran eluiert werden. Das Elutionsvolumen betrug 100 µl. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde an einem speziell gesäuberten und ausgewiesenen RNA-Arbeitsplatz unter Benutzung von sterilem bzw. RNase- und DNase-freiem Einmalmaterial durchgeführt. Die RNA-Isolierung mit dem Absolutely RNA Kit erfolgte bei Raumtemperatur, die eluierte RNA wurde sofort auf Eis gekühlt. Bis zur weiteren Analyse wurde die eluierte RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Anreicherung von mRNA aus Gesamt-RNA

Zur Anreicherung von protein-kodierender mRNA (*messenger* RNA) wurde das Dynabeads[®] mRNA Purification Kit von Invitrogen strikt nach Herstellerangaben angewendet. Die mRNA-Anreicherung erfolgte dabei mit Hilfe von magnetischen Polystyren-Kügelchen (Dynabeads),

an denen Oligo-dT-Sequenzen mit 25 Nukleotiden kovalent gebunden sind. Das Anreichern der reifen mRNA Moleküle beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung zwischen den für mRNA typischen Poly-A-Schwänzen und den Oligo-dT-Schwänzen sowie der Separation der „Dynabeads“ durch einen Magneten. RNA-Moleküle ohne Poly-A-Schwanz werden anschließend gewaschen. Die mRNA Anreicherung erfolgte unter Verwendung von 200 µl (1 mg) „Dynabead“-Suspension. Die „Dynabeads“ wurden einmal mit 100 µl Binde-Puffer gewaschen, in 100 µl Binde-Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA (maximal 75 µg in 100 µl Nuklease-freiem Wasser) 2 min bei 65°C inkubiert und zu der „Dynabead“-Suspension gegeben. Um die RNA zu binden, wurde die RNA-Dynabead-Suspension 5 min rotierend bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die „Dynabeads“ an den Magneten gebunden und zweimal mit jeweils 200 µl Wasch-Puffer gewaschen. Die mRNA wurde mit 20 µl 65 °C erwärmten, Nuklease-freiem Wasser nach 2 min Inkubation eluiert. Durch eine Qualitätskontrolle der angereicherten mRNA mittels eines Agilent Bioanalyzer 2100 Laufes (siehe Kapitel II.2.2.4) konnte der Anteil von ribosomaler RNA (rRNA) bestimmt werden. War dieser Anteil größer als 10 % wurde eine zweite mRNA Anreicherung nach dieser Methodik wiederholt.

2.2.3 Bestimmung der Konzentration aufgereinigter RNA

Die Bestimmung der Konzentration der aufgereinigten RNA erfolgte zunächst mit Hilfe des NanoDrop™ Spektrophotometers und wurde anschließend mit dem Qubit® Fluorometer überprüft. Im Gegensatz zum NanoDrop™ misst das Qubit® Fluorometer durch aktive Bindung des Farbstoffes nur funktionale RNA, wodurch in der Regel geringere Konzentrationswerte als bei einer NanoDrop™ Messung hervorgehen.

Die Konzentrationsbestimmungen isolierter RNA-Proben mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer erfolgte mit 1 µl der Probenlösung. Die RNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht 40 µg ssRNA/ml. Daraus folgt:

$$c \left[\frac{\mu\text{g RNA}}{\text{ml}} \right] = A_{260} \times 40. \quad (\text{II.2})$$

Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte für eine reine RNA etwa 1,9 - 2,1 sein. Atypische Absorptionsspektren und Absorptionsquotienten $< 1,7$ kamen in den eluierten RNA-Proben nicht vor. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt und daraus das arithmetische Mittel gebildet.

Die anschließenden Konzentrationsbestimmungen mit dem Qubit® Fluorometer wurde je nach zu erwartenden Konzentrationsbereich entweder mit dem Qubit® RNA Assay oder Qubit® RNA BR Assay Kit verwirklicht. Die Durchführung wurde strikt nach

Herstellerangaben realisiert. Dafür wurde ein Master-Mix aus $n \times 200 \mu\text{l}$ Quant-iT Buffer und $n \times 1 \mu\text{l}$ Farbstoff vorbereitet. Das Volumen des Master-Mix wurde für n Proben und zwei Standards ausgelegt und anschließend mit Hilfe eines Vortexer gut durchmischt. Es wurden $190 \mu\text{l}$ Master-Mix mit $10 \mu\text{l}$ Standard 1 und $190 \mu\text{l}$ Master-Mix mit $10 \mu\text{l}$ Standard 2 in farbdurchlässige Qubit[®] Mikroreaktionsgefäße vermengt und für die erforderliche Kalibrierung eingesetzt. Weiterhin wurden je nach zu erwartender Konzentration $180 \mu\text{l}$ - $199 \mu\text{l}$ Master-Mix mit $20 \mu\text{l}$ - $1 \mu\text{l}$ der zu bestimmenden Probe gemixt. Die Proben wurden 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und vor der Messung noch einmal kurz gevortext. Die Konzentration wurde durch Angabe der eingesetzten Menge an Probe ($1 \mu\text{l}$ – $20 \mu\text{l}$) durch das Qubit[®] Fluorometer berechnet. Die Messung wurde nach Protokoll durchgeführt und erfolgte per Dreifachbestimmung.

2.2.4 RNA Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der Qualität und Größenverteilung aufgereinigter Gesamt-RNA und angereicherter protein-kodierender mRNA erfolgte eine Kapillargelelektrophorese-Analyse mit dem RNA 6000 Nano LabChip Kit und den RNA 6000 Nano Reagents & Supplies im Agilent 2100 Bioanalyzer. Hierzu wurde zunächst der Chip mit einer Mischung aus $65 \mu\text{l}$ Gel-Matrix und $1 \mu\text{l}$ Farbstoffkonzentrat mittels einer Priming-Station mit definiertem Druck beladen. Danach wurden $5 \mu\text{l}$ des Markers in jede Vertiefung des Chips pipettiert. Nach Denaturierung bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde je $1 \mu\text{l}$ der RNA-Proben und des Größenstandards (RNA 6000 Ladder) auf den Chip gegeben. Anschließend wurde im Bioanalyzer die Kapillargelelektrophorese durchgeführt und die Daten ausgewertet. Nach einer mRNA Aufreinigung sollten das Elektropherogramm geringe bis keine Peaks bei 18s und 28s rRNA aufweisen. Nur wenn weniger als 5 % rRNA in der aufgereinigten Probe vorlag wurde mit der Bibliotheken-Präparation für die SOLiD[™] 4 Sequenzierung fortgeschritten. In Abbildung II.1 ist das Ergebnis der Aufreinigung der Gesamt-RNA sowie der ersten und zweiten mRNA-Anreicherung aus DuCaP Zellen in Form der vom Agilent Bioanalyzer 2100 erzeugten Elektropherogramme dargestellt.

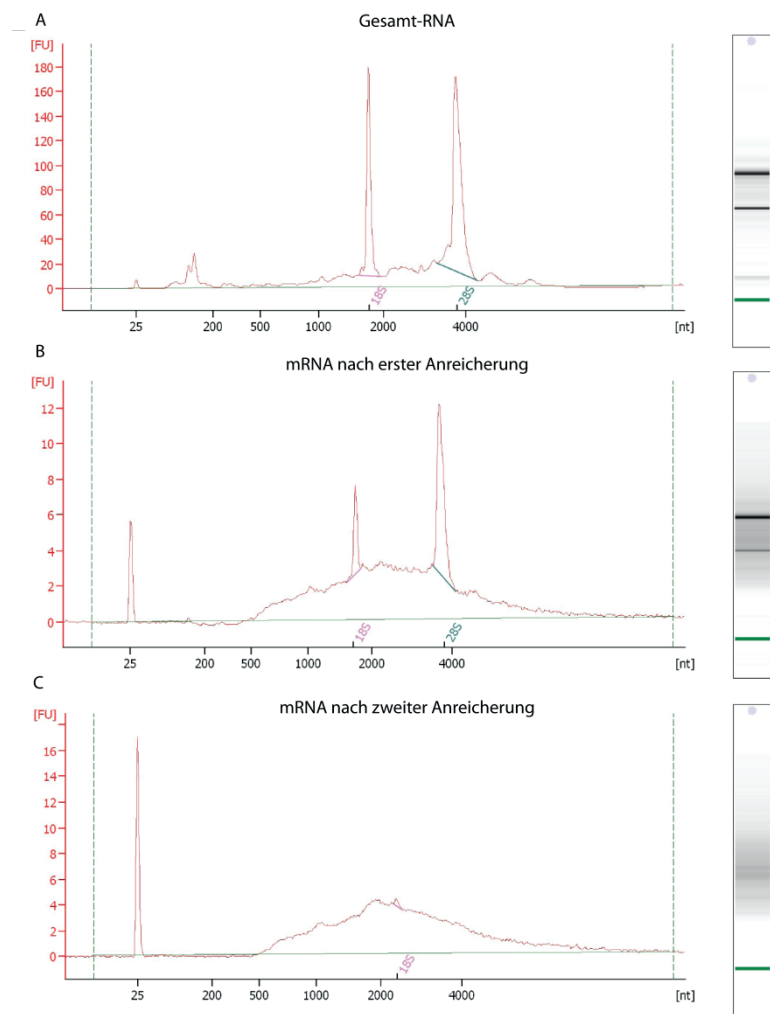


Abb. II.1 – Qualitätskontrolle der aufgereinigten Gesamt-RNA und mRNA nach der ersten und zweiten Anreicherung aus DuCaP Zellen. **A)** Dargestellt ist das Elektropherogramm nach Aufreinigung der Gesamt-RNA aus DuCaP Zellen. Es sind deutlich die 18S und 28S rRNA Banden zu erkennen. **B)** Gezeigt ist das Elektropherogramm nach der ersten mRNA Anreicherung. Aufgrund noch vorhandener rRNA wurde eine zweite mRNA Anreicherung durchgeführt, die in **C)** als Elektropherogramm ersichtlich ist. Nach der zweiten Anreicherung sind nur noch minimale Spuren an rRNA zu erkennen.

2.2.5 Ermittlung der Genexpression durch Hochdurchsatz-Sequenzierung

Zur Bestimmung der genomweiten Genexpression der Wildtyp-Zelllinien und der bestrahlten PC3 Zellen wurde eine Hochdurchsatz-Sequenzierung mit der SOLiD™ 4 Technologie (Life Technologies) angewendet. Die komplette Bibliotheken-Präparation, Bead-Präparation und der eigentliche Sequenzierungslauf wurden mit den vom Hersteller entwickelten Kits strikt nach Angaben umgesetzt. Als Ausgangsmaterial wurden 300 ng – 500 ng angereicherte und qualitativ hochwertige mRNA (Abschnitt II.2.2) eingesetzt. Zunächst wurde eine cDNA-Bank nach Herstellerangaben des SOLiD™ Total RNA-Seq Kits sowie dessen Protokoll zur Präparation ganzer Transkriptom-Banken erstellt. Während der Erstellung der cDNA-Bibliothek wurde die mRNA in jeder der Proben enzymatisch fragmentiert und die einzelnen Fragmente mit spezifischen Adaptoren hybridisiert und ligiert. Die mRNA wurde dann mit Hilfe von zu den Adaptoren komplementären Oligonukleotiden revers transkribiert und die hergestellte cDNA im Größenbereich von 150 nt bis 250 nt über ein 6 %iges Harnstoffgel (Novex® Pre-Cast Gel, Invitrogen) selektiert. Schließlich wurde die cDNA jeder Probe mit zu den Adaptoren komplementären Oligonukleotiden des SOLiD™ RNA Barcoding Kits, die zusätzlich noch jeweils mit einem spezifischen Barcode versehen sind, amplifiziert und

aufgereinigt. Die Barcode-Integration ermöglichte die Vereinigung von bis zu 12 fertigen SOLiD™ Bibliotheken, wodurch ein multiplexes Sequenzieren dieser 12 Proben mit einer Bead-Präparation und einer Sequenzierung realisiert werden konnte.

Die Bead-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe der SOLiD™ EZ Bead Emulsifier E80, Amplifier E80 und Enricher E80 Kits auf den Systemen SOLiD™ EZ Bead-Emulsifier, -Amplifier und -Enricher. Dabei wurde jede markierte DNA-Matrize der fertigen dsDNA-Bibliothek über SOLiD™ P1-DNA-Beads, kleine magnetische Partikel mit Adaptern, die partiell komplementär zu den markierten DNA-Fragmenten sind, in einer Wasser-in-Öl-Emulsions-PCR (ePCR) klonal amplifiziert. Danach wurden die Partikel, an denen die markierten DNA-Fragmente amplifiziert wurden, gewaschen, angereichert und mittels chemischer 3' Modifizierung auf einem Glaträger positioniert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend nach der Ligationmethode über das SOLiD™ 4 System mit 50 nt vorwärts und 35 nt rückwärts sequenziert, wobei zuerst 5 nt von der Barcode-Sequenz ermittelt wurden. Die folgende Abbildung II.2 verdeutlicht die SOLiD™ 4 Sequenzierung am Bead.

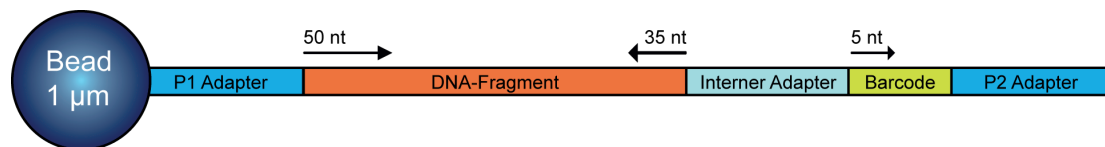


Abb. II.2 – Schematische Darstellung der ligations-basierten SOLiD 4 Sequenzierung am Bead.

Ein sequenzierungsbereites Partikel besteht aus dem magnetischen 1 µm großen Bead an dem nachfolgend ein P1 Adapter, das DNA-Fragment, ein interner Adapter, die Barcode-Sequenz und ein P2 Adapter vorliegen. Zuerst werden 5 nt des Barcodes zur Identifikation des Probe ermittelt. Danach erfolgt die rückwärts Sequenzierung von 35 nt. Zum Schluss werden vorwärts die ersten 50 nt des DNA-Fragmentes ermittelt.

Notwendige Konzentrationsmessungen der Nukleinsäuren erfolgten mit dem Qubit® dsDNA HS Assay und Qubit® RNA Assay Kit in einem Qubit® Fluorometer (siehe auch Abschnitt II.2.2.3). Die notwendigen Qualitätskontrollen wurden mit Hilfe der Agilent DNA 1000, Agilent RNA 6000 Pico sowie des Agilent RNA 6000 Nano Kits mit einem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt (siehe auch Abschnitt II.2.2.4). Aufreinigungen erfolgten mit dem MiniElute® PCR Purification Kit und dem PureLink™ PCR Micro Kit von Invitrogen über Anionenaustauscher-Säulen. Die SOLiD™ 4 Sequenzierung erfolgte am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Forschungsgruppe von Dr. Marc Sultan. Die Sequenzdatenanalyse (Abschnitt III.2) wurde an der Technischen Hochschule Wildau, im diagnostischen Bioinformatik-Labor, durchgeführt.

III DATEN UND ALGORITHMEN

1 Statistische Berechnungen der zellbiologischen Tests

1.1 Statistik für den MTT- und Trypanblau-Test

Bei beiden zellbiologischen Tests wurden die Datenreihen durch mindestens drei biologische Replikate in zeitlich versetzten und unabhängigen Experimenten erhoben. Beim MTT-Test wurden zusätzliche Daten durch technische Replikate bestimmt. Bei den in Diagrammen gezeigten Daten handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um die Mittelwerte der Datenreihen mit den dazugehörigen Mittelwertabweichungen. Die Normalisierung beim MTT-Test erfolgte auf den Mittelwerten der Datenreihen nicht bestrahlter Zellen. Das Signifikanzniveau zwischen verschiedenen Datenreihen wurde mit Hilfe von zweiseitigen t-Tests Typ 3 bestimmt, dabei wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von $P < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Als Modellannahme der beiden Stichproben wurde von einer Normalverteilung mit ungleicher Varianz ausgegangen.

1.2 Der Koloniebildungstest

Für die Datenerhebung einer Zelllinie wurden drei unabhängige biologische Replikate für jede Energiedosis durchgeführt. Die Überlebensfraktion S für die Bestrahlung mit der Energiedosis e wurde mit Hilfe der Platteneffizienz p , der gebildeten Kolonien c und der Anzahl ausgesäter Zellen n berechnet. Die Platteneffizienz p errechnet sich durch das Verhältnis der Anzahl der gebildeten Kolonien bei keiner Bestrahlung c_0 (0 Gy) zu der Anzahl der ausgesäten Zellen n_0 ,

$$p = \frac{c_0}{n_0} \quad (\text{III.1})$$

woraus die Überlebensfraktion S für die Energiedosis e sich wie folgt berechnet:

$$S_e = \frac{\left(\frac{c_e}{n_e}\right)}{p} = \frac{c_e \cdot n_0}{n_e \cdot c_0} \quad (\text{III.2})$$

Zur Darstellung der für jeden Zelltyp charakteristischen Dosis-Effekt-Kurve wurde die Überlebensfraktion S im logarithmischen Maßstab zur Basis 10 gegen die Energiedosis e in linearem Maßstab aufgetragen.

2 Die Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten

2.1 Die erzeugte Sequenzdatenmenge und deren Qualität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt von vier Zelllinien (DU-145, DuCaP, PC3, RWPE1) sowie von 7 bestrahlten PC3 Zellproben das genomweite Genexpressionsprofil durch Hochdurchsatz-Sequenzierung mittels der SOLiD™ Technologie in jeweils drei biologischen Replikaten erzeugt. Insgesamt wurden somit von 33 Zellproben 5.459.966.684 Sequenzen generiert, was einer durchschnittlichen Menge von 165.453.535 Sequenzen pro Zellprobe entspricht. Dafür wurden 6 vollständige Läufe mit jeweils 12fach multiplexen Proben pro Bead-Präparation durchgeführt, wobei entweder eine Bibliotheks- oder Bead-Präparation auf zwei Glaträgern als technisches Replikat lief. Bei einer addierten Sequenzlänge von 85 nt und einer Anzahl von insgesamt 5.459.966.684 Sequenzen wurden mehr als 464 GigaBasen an Sequenzdaten, also mehr als eine 150fache Abdeckung des menschlichen Genoms, generiert.

Durch die 50 nt + 35 nt Paired-End Sequenzierung wurden für jede Probe aus den Rohbildern jeweils zwei Sequenzdateien mit zwei dazugehörigen Qualitätsdateien von der im SOLiD™ 4 System implementierten „SOLiD™ Primary Analysis“ Software erzeugt (Applied Biosystems 2010), was insgesamt ca. 2 TB an Rohdaten ergibt. Die Sequenzdateien lagen im sogenannten „color space“ Fasta-Format vor, was durch die 2-Basen-Farbkodierung begründet ist. Die spezielle SOLiD™ Farbkodierung liefert den Vorteil eine Punktmutation bzw. einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) zu einem Sequenzierungsfehler eindeutig unterscheiden zu können. Weiterhin generierte die Software zu jedem „color call“ einen Qualitätswert (QV), der in der dazugehörigen Qualitätsdatei zu finden ist. Dieser Wert gibt die Vertrauenswahrscheinlichkeit für die Farbbestimmung an der spezifischen Sequenzposition an. Die SOLiD™ 4 System QVs werden ähnlich erzeugt wie bei Phred und der KB™ Basecaller Software für Kapillarelektrophorese-Sequenzierung, wobei der Qualitätswert q für einen bestimmten Farbwert mathematisch zur Wahrscheinlichkeit eines Fehlers p wie folgt verwandt ist (Ewing & Green 1998; Ewing *et al.*, 1998).

$$q = -10 \log_{10} p \quad (\text{III.3})$$

$$p = 10^{-q/10} \quad (\text{III.4})$$

Zum Verständnis der Qualitätswerteverteilung entlang der Sequenzposition ist der schematische Ablauf der ligationsbasierten SOLiD™ Sequenzierung wichtig. Bei dieser sequentiellen Sequenzierungstechnologie werden in fünf Universal-Primerrunden jeweils 10

bzw. 7 Ligationszyklen für die Sequenzierung von 50 nt bzw. 35 nt durchgeführt, wobei die sequenzierten Basen doppelt bestimmt werden. Weiterhin ist die Bestimmung der Basen in einer Universal-Primerrunde bei jedem Ligationszyklus um fünf Basen versetzt. Der schematische Ablauf dieser sequentiell ligationsbasierten SOLiD™ Sequenzierung kann der Abbildung III.1 entnommen werden.

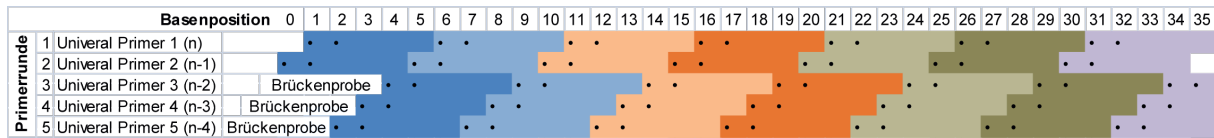


Abb. III.1 – Schematischer Ablauf der ligationsbasierten SOLiD™ Sequenzierung. Dargestellt ist der schematische Ablauf einer ligationsbasierten, sequentiell ablaufenden SOLiD™ Sequenzierung von 35 nt. In fünf Universal-Primerrunden werden durch jeweils 7 Ligationszyklen alle Basen eines DNA-Fragmentes doppelt bestimmt. Die Farbbestimmung erfolgt innerhalb einer Universal-Primerrunde pro Ligationszyklus um 5 Basen versetzt (Applied Biosystems 2010).

Um einen Eindruck über die Qualität und Fehlerfreiheit der generierten Sequenzdaten zu erhalten, wurden die QVs aller Farbbestimmungen näher untersucht, die in Abbildung III.2 als Qualitätsdiagramme exemplarisch für die DU-145_A Probe zu erkennen sind. Durch den sequentiellen Ablauf einer SOLiD™ Sequenzierung lässt sich zum einen die Qualität der Farbbestimmung zur Position in der erzeugten Sequenz (Abb. III.2 A) und zum anderen die Qualität der Farbbestimmung zum Ligationszyklus, also zum Zeitpunkt der Farbbestimmung innerhalb des gesamten Sequenzierungslaufes, ermitteln, wobei zuerst die 35 nt revers Sequenzen erzeugt werden (Abb. III.2 B). Dazu wurden für alle Sequenzen einer Probe die Verteilungen der dazugehörigen QVs für jede einzelne Basenposition bzw. zu jedem Ligationszyklus erzeugt und als Boxplot-Diagramm in einem Gesamtliniendiagramm vereint. Danach nimmt die Qualität der Farbbestimmung mit jedem Ligationszyklus deutlich ab und steigt mit Beginn einer neuen Universal-Primerrunde annähernd auf die Qualität des ersten Ligationszyklus der vorhergegangenen Universal-Primerrunde. Der Qualitätsverlust ist durch die steigende Fehleranfälligkeit der Fluorophor-Farbbestimmung begründet, da es bei jedem Ligationszyklus zu Fehlern kommt, die sich bis zum Ende der jeweiligen Universal-Primerrunde aufsummieren.

So fällt der Median der QVs (mittlere grüne Linie im dunkelgrünen Bereich, Abb. III.2 A) in den 50 nt langen Sequenzen ab ca. Basenposition 30 unter QV 20, was nach Gleichung III.4 eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 1 % entspricht, und endet bei ca. Basenposition 13 mit einer ca. 5 % Fehlerwahrscheinlichkeit. Das 75 %ige Perzentil (obere grüne Linie des dunkelgrünen Bereiches, Abb. III.2 A) bleibt deutlich über QV 20 wohingegen das 25 %ige Perzentil (untere grüne Linie des dunkelgrünen Bereiches, Abb. III.2 A) frühzeitig bis unter QV 10 fällt, was eine Fehlerwahrscheinlichkeit von über 10 % entspricht. Bei Betrachtung der revers ermittelten 35 nt Sequenzen fällt auf, dass der Median sowie das 75 %ige Perzentil gegenüber der 50 nt Sequenzen deutlich schneller abfallen. Das

arithmetische Mittel (rote Linie, Abb. III.2 A) hingegen verhält sich in beiden Sequenzen ähnlich. Charakteristisch für die ligationsbasierte SOLiD™ Sequenzierung erscheinen die Kurven des Medians und des arithmetischen Mittels leicht zickzackförmig, was aufgrund der fünf Basen versetzten Farbestimmungen innerhalb der Universal-Primerrunden zu erklären ist.

Betrachtet man sich die QVs in der zeitlichen Reihenfolge der Farbestimmungen, also zum jeweiligen Ligationsschritt innerhalb einer Universal-Primerrunde, erkennt man deutlich die Abnahme der QVs pro Ligationsschritt innerhalb einer Universal-Primerrunde, sowohl im Median und arithmetischen Mittel als auch beim 75 % und 25 % Perzentil (Abb. III.2 B). Da an einem monoklonalen Bead mindestens 60.000 identischer DNA-Fragmente parallel sequenziert werden (Applied Biosystems 2010), die Ligationen aber in der Regel nicht an allen dieser DNA-Fragmente zu 100 % stattfinden, kommt es zu Vermischungen von Farbsignalen bei den nachfolgenden Ligationen bis zum Ende der jeweiligen Universal-Primerrunde. Diese Farbvermischungen summieren sich auf und bewirken eine deutliche Abnahme der QVs für die einzelnen Farbestimmungen. Erst durch Beendigung der Universal-Primerrunde und der damit verbundenen Dehybridisierung aller DNA-Fragmente steigt die Fehlerfreiheit annähernd auf den Qualitätsausgangswert. Interessanterweise fallen die QVs in den revers ermittelten 35 nt Sequenzen schneller ab als bei den 50 nt Sequenzen, obwohl hier nur 7 anstatt 10 Ligationen pro Universal-Primerrunde stattfinden. Eine mögliche Ursache dafür könnte der größere Abstand der ligierten, fluorophormarkierten Primer zum Bead sein, was eine Vermischung von Farbsignalen mit benachbarten, eng aneinander liegenden Beads bei der Detektionsprozedur hervorrufen könnte. Aufgrund dieser charakteristischen Eigenschaften der ligationsbasierten SOLiD™ Sequenzierung haben wir hier eine sehr stark ausgeprägte Zickzackkurve, die durch die Ligationen innerhalb der Universal-Primerrunden begründet ist. Zu beachten ist, dass zeitlich zuerst die revers 35 nt Sequenzen (Basenpositionen 1-35 in Abb. III.2 B) ermittelt werden und darauffolgend die 50 nt Sequenzen (Basenpositionen 36-85 in Abb. III.2 B).

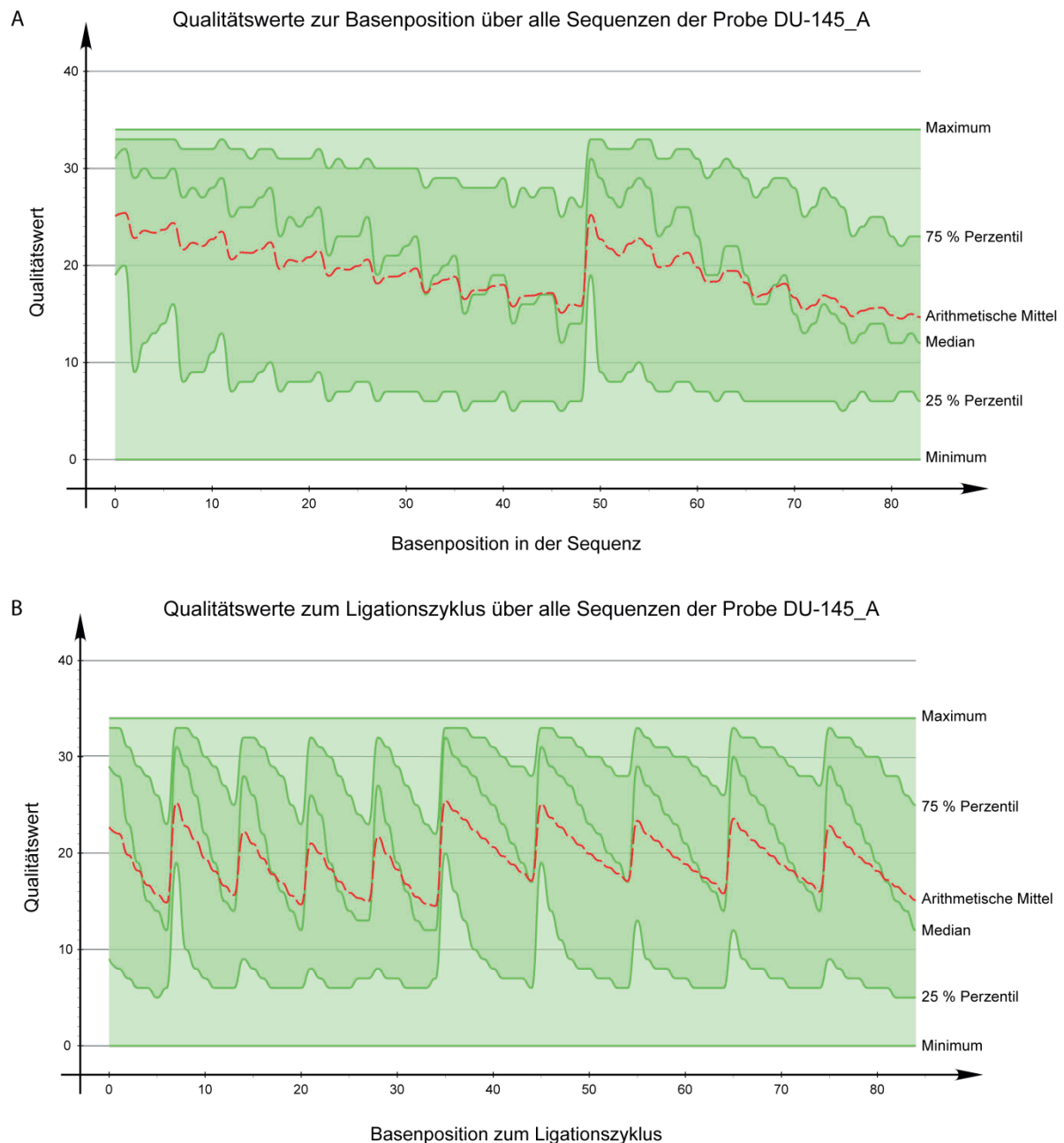


Abb. III.2 – Qualitätsverhalten der SOLiD™ generierten Sequenzen über die Basenposition und zum Ligationszyklus. A, B Bei beiden Diagrammen sind das 75 %ige und 25 %ige Perzentil (obere und untere grüne Linie) sowie das arithmetische Mittel (rote Linie) und der Median (grüne mittlere Linie) der von der SOLiD™ Primary Analysis Software mitgelieferten QVs für die Probe DU-145_A abgebildet. **A)** Dargestellt sind die Verteilungen der QVs über die Basenposition in der 50 nt (1-50) und 35 nt (51-85) Sequenzen. In beiden Sequenzgruppen ist ein deutlicher Abfall der QVs zum Ende der Sequenzen zu beobachten, wobei eine kleine Zickzackkurve innerhalb jeder Universal-Primerrunde wahrzunehmen ist, die durch die 5 Basen versetzte Farbbestimmung erklärt werden kann. **B)** Zu sehen sind die Verteilungen der QVs nach der zeitlichen Reihenfolge der Farbbestimmung bzw. zum Ligationszyklus, wobei hier zuerst die revers 35 nt Sequenzen (1-35) und darauffolgend die 50 nt Sequenzen (36-85) ermittelt wurden. Hier ist für beide Sequenzgruppen eine deutlich ausgeprägte Zickzackkurve zu erkennen, die aufgrund der Ligationsreaktionen innerhalb der Universal-Primerrunden begründet ist. Modifiziert nach Amberg (Amberg *et al.*, 2009).

2.2 Alignment und Statistiken

Um eine hohe Fehlerfreiheit der generierten Sequenzen zu gewährleisten, wurden für das Alignment nur die Nukleotide 2 - 23 der beiden SOLiD™ generierten Sequenzgruppen (50 nt + 35 nt) pro Zellprobe verwendet. Beide 22 nt Sequenzen wurden unabhängig voneinander mit der Erlaubnis von zwei Fehlbasen (engl. *mismatch*) gegen das humane Referenzgenom, *Homo Sapiens GRCh37.p5* vom Februar 2009, im *True Solid Mode* align, wobei das Genom im sogenannten *color space* Format vorlag. Somit wurden Sequenzen mit mehr als zwei Ns, also Positionen bei der eine eindeutige Base von der SOLiD™ Software nicht bestimmt werden konnte, von vorherein aus der Datenmenge entfernt. Das komplette Alignment sowie die Bestimmung der Expressionswerte annotierter und nicht-annotierter genomischer Bereiche wurde mit der hauseigene WIOS Software (*Wildau In-Silico Sequence Analysis Pipeline*) durchgeführt (Amberg *et al.*, 2009; Hammer *et al.*, 2010), wobei für die Annotation die Version 62.37 von der Ensembl Datenbank verwendet wurde.

Zur Bestimmung des Expressionsprofils einer Probe wurden die beiden unabhängig alignen 22 nt Sequenzen jeder Probe gemeinsam betrachtet, wobei eine Sequenz-Klassifikation in *Unique Matching Reads* (UMR), *Multi Matching Reads* (MMR) und *Non Matching Reads* (NMR) vollzogen wurde. Ein UMR bezeichnet eine Sequenz, die nur einmal im ganzen Genom abgebildet werden konnte, ein MMR bezeichnet eine Sequenz, die an mehreren Stellen im Genom abgebildet werden konnte und ein NMR bezeichnet eine Sequenz, die an keiner Stelle des Genoms gefunden werden konnte.

Insgesamt wurden von den insgesamt 5.459.966.684 erzeugten SOLiD™ Sequenzen aufgrund einer zu geringen Qualität, d.h. eine Sequenz mit mehr als zwei Ns, 18.373.849 Sequenzen (0,34 %) entfernt, so dass letztendlich 5.441.592.835 Sequenzen (99,66 %) prozessiert wurden. Von all diesen prozessierten Sequenzen konnte der Großteil mit 40,33 % (2.202.197.078) einmalig auf dem Genom wiedergefunden und als UMR klassifiziert werden. Bedingt durch die kurze Sequenzlänge von 22 nt wurden 1.916.695.390 (35,11 %) als MMR identifiziert. 24,22 % (1.322.700.367) aller prozessierten Sequenzen konnte keiner Stelle im Genom zugewiesen werden. Diese NMR Sequenzen können durch folgende Umstände begründet sein:

- Sequenz entstammt einer Spleißstelle, Exon-Exon Grenze, des Transkriptes
- Spezielle Sequenz vom Y Chromosom, was nicht im Referenzgenom integriert ist
- Fehlerhafte Abschnitte durch Assembly-Fehler im verwendeten Referenzgenom
- Sequenzierungsfehler
- Genetische Unterschiede (SNPs, Deletionen, Insertionen, chromosomale Aberrationen etc.) zwischen den Zelllinien und dem verwendeten Referenzgenom
- Kontamination mit viraler, bakterieller oder anderer Fremd-DNA

Die folgende Tabelle III.1 stellt die Sequenz-Klassifikation nach dem Alignment übersichtlich dar.

Tab. III.1 – Übersicht der prozessierten und klassifizierten SOLiD™ Sequenzen.

Qualitätskontrolle	Absolute Anzahl	Relativer Anteil
SOLiD™ Sequenzen	5.459.966.684	100,00 %
Sequenzen mit geringer Qualität	18.373.849	0,34 %
prozessierte Sequenzen	5.441.592.835	99,66 %
Sequenz-Klassifikation	Absolute Anzahl	Relativer Anteil
NMR	1.322.700.367	24,22 %
MMR	1.916.695.390	35,11 %
UMR	2.202.197.078	40,33 %

Um einen Überblick der Verteilung der auf dem Referenzgenom abgebildeten UMR Sequenzen zu erhalten, wurde eine Annotationsstatistik angefertigt, die der Abbildung III.3 zu entnehmen ist. Demzufolge hat mit 63,60 % aller UMR Sequenzen der als Exon annotierte Bereich den mit Abstand größten Anteil, gefolgt von der intronischen Region mit 21,65 % und der intergenetische Region mit 14,75 %. Während ein hoher Anteil des Exon-Bereiches aufgrund der Poly-A Anreicherung (siehe Abschnitt 2.2.2.2) zu erwarten war, sind die ca. 35 % nicht exonisch abgebildeter UMR Sequenzen resultierend aus echt transkribierten Regionen des Genoms, welche noch nicht in der Datenbank als entsprechend annotierte Bereiche vorliegen, sowie aufgrund der kurzen Sequenzlänge begründete Zuordnungsfehler.

Statistik der abgebildeten UMR Sequenzen

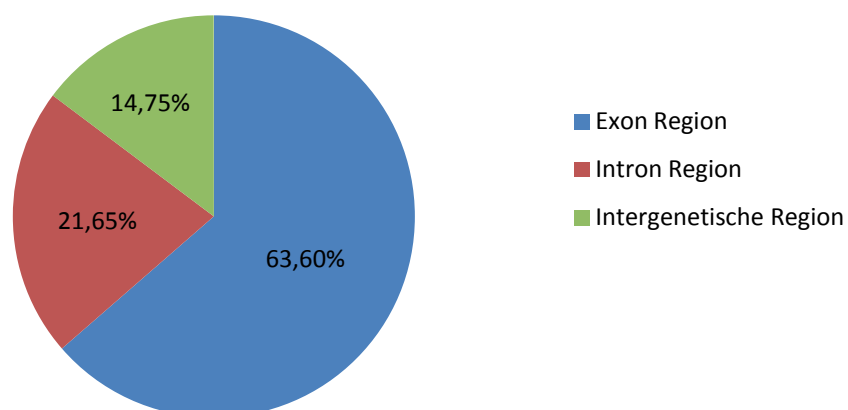


Abb. III.3 – Statistik der auf dem Referenzgenom abgebildeten UMR Sequenzen aller SOLiD™ sequenzierten Proben. Erwartungsgemäß werden die meisten UMR Sequenzen mit 63,60 % in der Exon Regionen abgebildet, während mit 21,65 % (Intron Region) und 14,75 % (Intergenetic Region) deutlich weniger in nicht exon-annotierte Bereiche fallen.

2.3 Bestimmung der Genexpression

Zur Bestimmung der Expressionshöhe der Gene einer Probe wurden nur annotierte exonische Bereiche proteinkodierender Gene, nach der Annotation Version 62.37 der Ensembl Datenbank, betrachtet. Außerdem wurde für eine erhöhte Sicherheit der Fehlerfreiheit des Alignments nur UMR klassifizierte Sequenzen zur Genaktivitätsbestimmung verwendet. Zuerst wurde ein Sequenzhistogramm h über alle Chromosomen c durch das Zählen der Sequenzen, die eine Basenposition x abdecken gebildet, beschrieben als

$$h_c(x). \quad (\text{III.5})$$

Für die Berechnung der individuellen Bestimmung der Expression $c(g,s)$ eines Gens g einer Probe $S = \{s_1 \dots s_2\}$ (siehe Tabelle II.4) wurde die Summe jeder einzelnen Basenhöhe aus dem Histogramm III.5 für jedes annotierte Exon $E = \{e_1 \dots e_2\}$ eines Gens g folgendermaßen gebildet:

$$c(g,s) = \sum_{e \in E} c(e,s). \quad (\text{III.6})$$

Anschließend wurde die Genexpression $c(g,s)$ auf die absolute Anzahl aller UMR Sequenzen für die jeweilige Probe s wie folgt gebildet:

$$n(g,s) = \frac{(c(g,s)+1) \cdot 10^7}{\sum_g (c(g,s)+1)} \quad (\text{III.7})$$

Das bedeutet, dass die Summe der Basenhöhen pro Gen $c(g,s)$ im Verhältnis zu 10 Millionen Sequenzen pro Probe normalisiert wurde. Zusätzlich wurde zu jedem Expressionswert pro Gen eine 1 addiert, um die Möglichkeit einer Division durch 0 in nachfolgenden Berechnungen zu vermeiden (Amberg *et al.*, 2010; Hammer *et al.*, 2010).

2.4 Reproduzierbarkeit der biologischen und technischen Replikate

Um einen Eindruck über die Fehlerfreiheit des gesamten Sequenzierungsablaufes von der biologischen Zellprobe, über die Bibliotheks- und Bead-Präparation bis hin zur ligationsbasierten Sequenzierung zu erhalten, wurden technische Replikate (siehe Abbildung III.5) gefahren und durch Korrelationsanalysen auf ihre Reproduzierbarkeit hin untersucht. Weiterhin wurden jeweils drei unabhängige und zeitversetzte biologische Replikate sequenziert, um die natürliche Varianz der Zellproben zu ermitteln (siehe Abbildung III.4). Für die Korrelationsanalyse wurde die normalisierte Genexpression nach den Gleichungen

III.6 und III.7 im binären Logarithmus (*logarithmus dualis*) berechnet, wobei der Korrelationskoeffizient r nach Pearson, wie in Gleichung III.9 angegeben, ermittelt wurde. Dazu wurde zuerst die mittlere Expression aller Gene für eine Probe nach Gleichung III.8 berechnet

$$m(g, s) = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J n(g_j, s), \quad (III.8)$$

um anschließend den Korrelationskoeffizient r zwischen zwei Proben wie folgt zu ermitteln,

$$Kor(S_1, S_2) = r_{s_1 s_2} = \frac{\sum_{i=1}^I (n(g_i, s_1) - m(g, s_1))(n(g_i, s_2) - m(g, s_2))}{\sqrt{\sum_{i=1}^I (n(g_i, s_1) - m(g, s_1))^2 \cdot \sum_{i=1}^I (n(g_i, s_2) - m(g, s_2))^2}} \quad (III.9)$$

Um die technischen Varianzen der komplexen Präparierungs- und Sequenzierungsprozesse einzuschätzen zu können, wurden zum einen Beads einer Präparation parallel auf zwei Glaträgern sequenziert (Abbildung III.4 A, B), und zum anderen wurden aus einer Bibliothek zwei Bead-Präparationen hergestellt und unabhängig sequenziert (Abbildung III.4 C, D). Beispielhaft sind für die Zellproben PC3-2_C und PC3-0_C diese technischen Replikate mit ihrem dazugehörigen Genexpressions-Korrelationsdiagramm in Abbildung III.4 dargestellt.

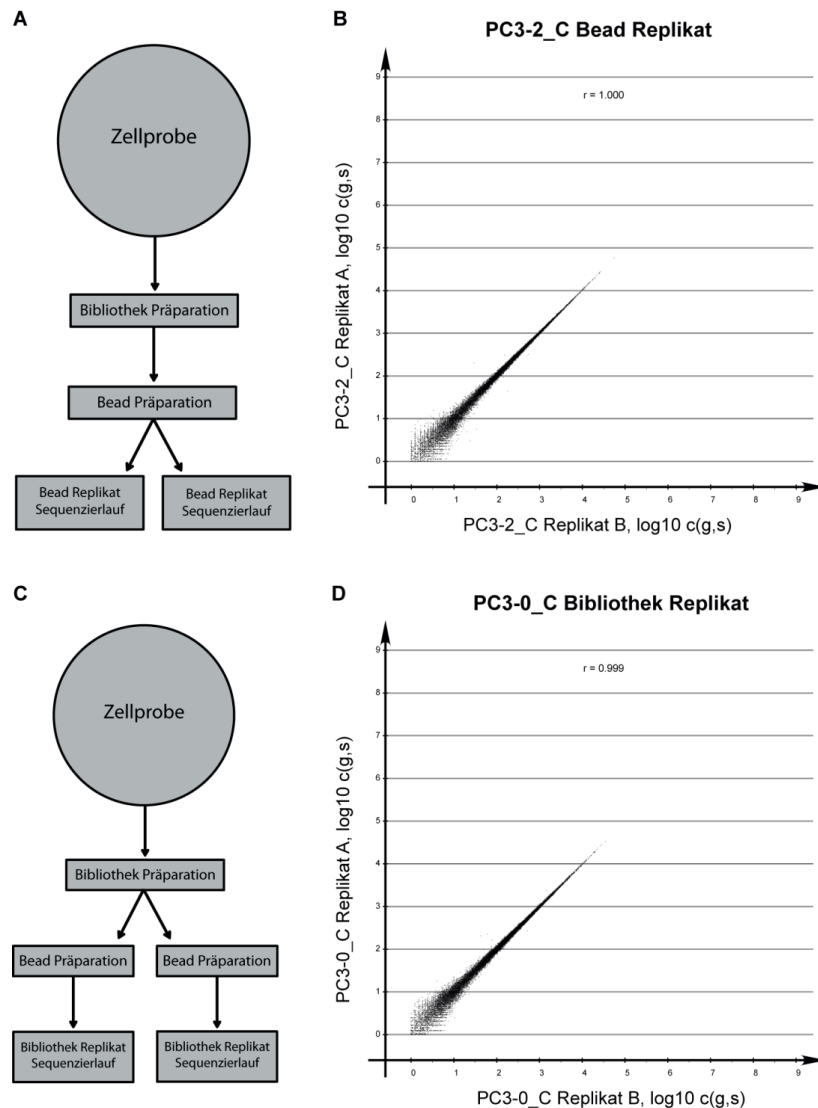


Abb. III.4 – Schematische Darstellung der Präparation technischer Replikate mit Korrelationsdiagramm der Genexpression. **A)** Aus der RNA einer Zellprobe wird eine Bibliotheks- und Bead-präparation anfertigt und in zwei unabhängigen Sequenzierungen quantifiziert. **B)** Korrelationsdiagramm des technischen Bead-Replikats der Zellprobe PC3-2_C, wobei mit $r = 1.000$ (gerundet) annähernd eine 100 % positive Korrelation der Genexpression vorliegt. **C)** Aus der RNA einer Zellprobe werden aus einer Bibliothek zwei Bead-Präparationen unabhängig anfertigt und in zwei getrennten Sequenzierungen quantifiziert. **D)** Korrelationsdiagramm des technischen Bibliothek-Replikats der Zellprobe PC3-0_C, wobei mit $r = 0.999$ (gerundet) annähernd eine 100 % positive Korrelation der Genexpression vorliegt. Modifiziert nach Amberg (Amberg *et al.*, 2010).

Mit einem Korrelationskoeffizienten r von annähernd 1 für die Genexpression beider technischen Replikate liegt eine sehr geringe und vernachlässigbare Varianz in den Prozessen der Bead-Präparation und der ligationsbasierten Sequenzierung vor. Weiterhin wirkt die bioinformatische Vorgehensweise für die Quantifizierung der Genaktivität der annotierten Exon-Bereiche nach den Abschnitten III.1.2.2 und III.1.2.3 äußerst vertrauensvoll.

Um nun die biologische Varianz zweier gleicher Zellproben zu untersuchen wurde die ermittelte Genexpression der biologischen Replikate und zwei experimentell unterschiedlichen Zellproben verglichen. Die Abbildung III.5 zeigt die entsprechenden Korrelationsdiagramme für beide Vergleiche.

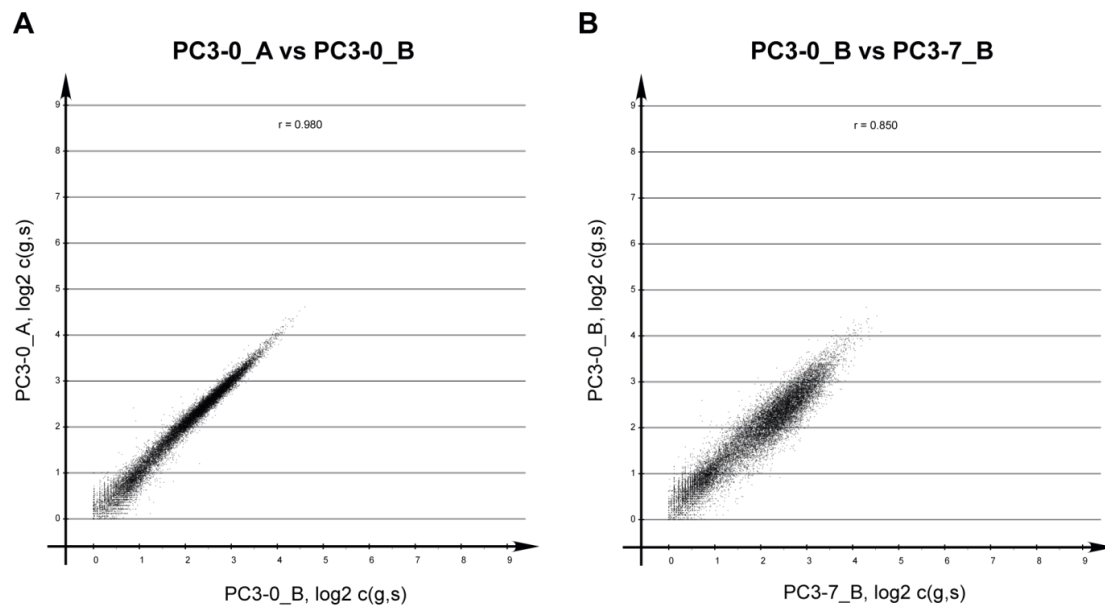


Abb. III.5 – Korrelationsdiagramm der Genexpression eines biologischen Replikats (A) und zweier experimentell unterschiedlicher Zellproben (B). **A)** Korrelationsdiagramm der Genexpression der Zellproben PC3-0_A und PC3-0_B. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.98$ liegt eine sehr hohe positive Korrelation zwischen beiden biologischen Zellprobenreplikaten vor. **B)** Korrelationsdiagramm der Genexpression der Zellproben PC3-0_B und PC3-7_B. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.85$ liegt eine positive Korrelation zwischen beiden experimentell unterschiedlichen Zellproben vor, wobei ein deutlicher Unterschied zum Korrelationskoeffizienten des biologischen Replikates vorliegt. Modifiziert nach Amberg (Amberg *et al.*, 2010).

Anhand des Korrelationsvergleiches zwischen dem biologischen Replikaten und den experimentell unterschiedlichen Zellproben ist sichergestellt, dass die interne biologische Varianz sehr gering ist und die zu erwartenden Unterschiede der Genexpression nach Bestrahlung der Zellen zu erkennen sind. Weiterhin gibt der hohe Korrelationskoeffizient $r = 0.98$ für das biologische Replikat Aufschluss über die Varianz der Bibliotheks-Präparationen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Dementsprechend zeigt auch die Bibliotheks-Präparation, ähnlich wie die Bead-Präparationen und die Schritte der ligationsbasierten Sequenzierung, eine sehr geringe Varianz auf, was für eine sehr hohe Fehlerfreiheit aller Einzelprozesse der SOLiD™ Sequenzierungstechnologie steht. Ebenso sprechen diese geringen Varianzen für ein statistisch richtiges Vorgehen für die Bestimmung der Genexpression nach den Abschnitten III.1.2.2 und III.1.2.3.

3 Genexpressions- und Netzwerkanalysen

3.1 Schwellwert für die Genexpression

Um das Hintergrundrauschen der Genexpressionsdaten zu entfernen bzw. zu minimieren wurden für alle weiteren Analysen ein Schwellwert T für die Expression eines Gens g_j von $T = 50$ gesetzt, wobei dieser Schwellwert mit dem Durchschnitt der drei biologischen Replikate i der Zellprobe S_z entsprechend Gleichung III.10,

$$\arg \max_{z \in Z, i = \{1,2,3\}} \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I c(g_j, S_{z_i}) \geq T, \quad (\text{III.10})$$

gegenübergestellt wurde, wobei Z_{Marker} für die Marker-Identifikation

$$Z_{\text{Marker}} = \{PC3_0, DuCaP\} \quad (\text{III.11})$$

und Z_{Zeit} für das Zeitreihenexperiment

$$Z_{\text{Zeit}} = \{PC3_0, PC3_1, PC3_2, PC3_3, PC3_4, PC3_5, PC3_6, PC3_7\} \quad (\text{III.12})$$

die Probenzugehörigkeit nach Tabelle II.4 widerspiegeln. Lag bei allen Zellproben S_z der durchschnittliche Expressionswert $\emptyset c(g_j, S_z)$ des entsprechenden Gens g_j unter dem Schwellwert T wurde das entsprechende Gen und dessen Werte aus den Expressionsprofilen aller Zellproben S_z und deren Replikaten i entfernt. Lag hingegen schon bei einer Zellprobe S_z der durchschnittliche Expressionswert $\emptyset c(g_j, S_z)$ der drei Replikate i gleich bzw. über dem Schwellwert T , wurde das Gen in allen Zellproben beibehalten und für die weiterführenden Analysen verwendet.

Die Ausgangszahl für alle bekannten proteinkodierenden Gene betrug 19.708, wobei beim Setzen eines Schwellwertes für die Genexpression von $T = 50$ eine Anzahl von 8.742 Genen für Z_{Marker} und 8.868 Genen für Z_{Zeit} entfernt wurden und somit 10.966 bzw. 10.840 Gene für die weiteren Untersuchungen übrig blieben. Da für die Identifikation von signifikanten Genen nur welche mit einer sicheren Expression von Interesse sind, werden durch das Setzen eines Schwellwertes von $T = 50$ für die Genexpression keine bedeutenden Gene für die nachfolgenden Analysen herausgefiltert. Als Zellproben wurden aufgrund der Ergebnisse der Bestrahlungsvitalitätstests (siehe Abschnitt IV.1) als sensitive Zelllinie DuCaP und als resistente Zelllinie PC3 verwendet. Für das Zeitreihenexperiment und die Erfassung der transkriptomweiten, dynamischen Veränderungen nach Bestrahlung wurde ebenfalls die Zelllinie PC3 verwendet. Weiterhin wurden alle weiteren Analysen nur mit annotierten,

proteinkodierenden Genen ausgeübt. Gründe für die Existenz eines Hintergrundrauschens können Fehlern bei der Barcodezuordnung zur eigentlichen Zellprobe, Sequenzierungs- und Detektionsfehler oder ein fehlerhaftes Alignment aufgrund zu kurzer Sequenzen sein.

Zur Verdeutlichung des Hintergrundrauschens wurden zuerst Histogramme über alle Genexpressionswerte der Probenmengen Z_{Marker} und Z_{Zeit} mit unterschiedlichen Schwellwerten erstellt. In Abbildung III.6 sind die Verteilungshistogramme für die Probenmenge Z_{Marker} mit den Schwellwerten $T = 0$ (A) und $T = 50$ (B) dargestellt.

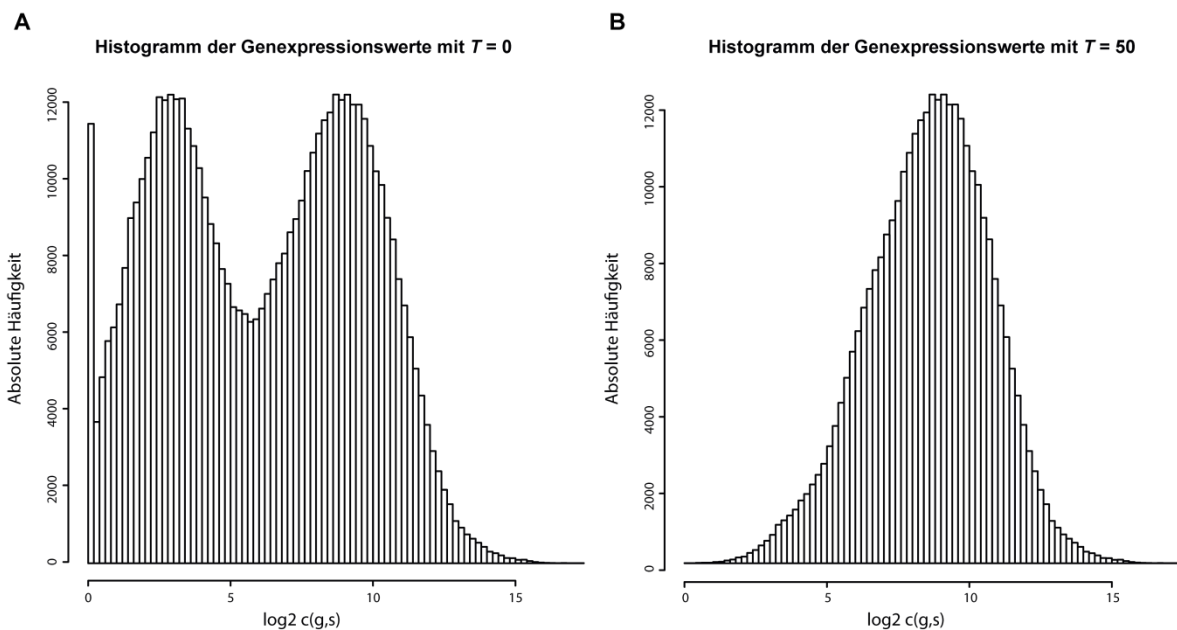


Abb. III.6 – Verteilung der Genexpressionswerte ohne (A) und mit einem Schwellwert von $T = 50$ (B). **A)** Verteilung der Genexpressionswerte $c(g,s)$ im binären Logarithmus über die Probenmenge Z_{Marker} mit den Zelllinien DuCaP und PC3. Aufgrund des Vorhandenseins eines Hintergrundrauschens bzw. sehr gering exprimierter Gene bilden sich zwei Maxima in der Verteilung der Genexpressionswerte aus. Weiterhin ist beim Wert 0 eine Erhöhung erkennbar, die durch die Anwesenheit von Gene ohne eine Expression resultiert. **B)** Verteilung der Genexpressionswerte $c(g,s)$ im binären Logarithmus über die Probenmenge Z_{Marker} mit den Zelllinien DuCaP und PC3 und einem Schwellwert von $T = 50$. Durch das Entfernen nicht bzw. nur sehr gering exprimierter Gene zeigt die Genexpressionsverteilung nur noch ein Maximum bei ca. 9 auf.

Demnach sind bei der Betrachtung der Verteilung ohne das Setzen eines Schwellwertes zwei deutliche Maxima erkennbar. Zudem sind Gene mit keiner Expression beinhaltet. Setzt man hingegen einen Schwellwert von $T = 50$ werden Gene mit keiner oder einer nur sehr geringen Expression entfernt und es bildet sich annähernd eine Normalverteilung mit nur einem Maximum aus. Weiterhin wurde das Verhalten der Anzahl der Gene zum Schwellwert der Genexpression untersucht, was in der nachfolgenden Abbildung III.7 ersichtlich ist.

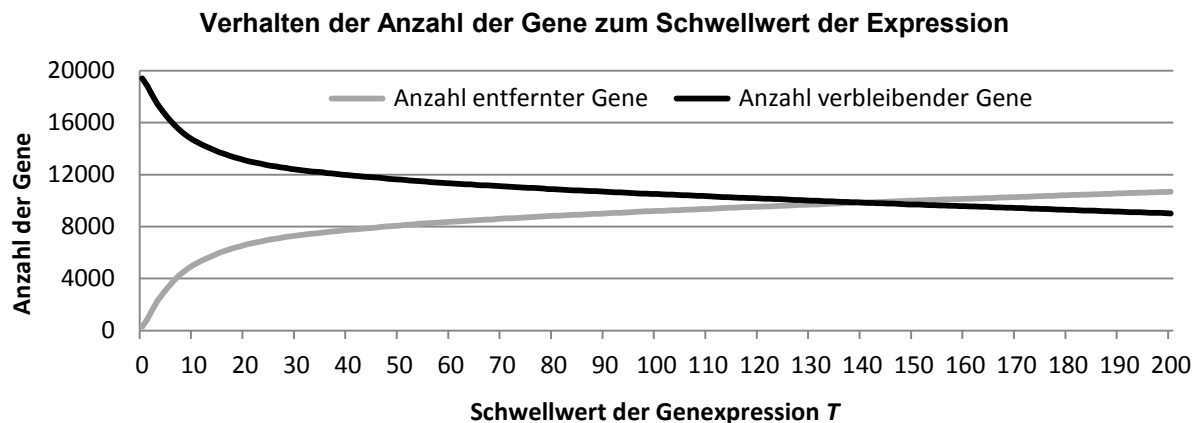


Abb. III.7 – Verhaltensdiagramm der Anzahl der Gene zum Expressionsschwellwert. Während bei kleineren Schwellwerten ein exponentieller Abfall der Anzahl der verbleibenden Gene zu erkennen ist, stellt sich ab ca. $c(g,s) = 30$ ein linearer Zusammenhang dar.

Demnach werden die meisten Gene bei kleinen Schwellwerten herausgefiltert bis sich bei ca. $T = 30$ ein linearer Zusammenhang ablesen lässt. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde für ein hohes Maß an Sicherheit die nachfolgenden Arbeiten mit einem Schwellwert für die Genexpression von $T = 50$ festgelegt.

Für die weiterführenden Analysen wurde, wie in Gleichung III.13 zu entnehmen, auf jedem Genexpressionswert $c(g,s)$ eine 1 addiert, um nachfolgend die Werte, ohne negative Zahlen zu erhalten, in den binären Logarithmus überführen zu können

$$lc(g,s) = \log_2 (c(g,s) + 1). \quad (\text{III.13})$$

Demzufolge weist das Gen ENSG00000107984, DKK1 (*dickkopf homolog 1*), in der Zellprobe PC3_7_A mit einem absolut normalisierten Wert nach Gleichung III.7 von 85340,11 und einer logarithmierten Wert nach Gleichung III.13 von 17,34622 die stärkste Expression in allen Zellproben auf. Die durchschnittliche Expressionshöhe aller proteinkodierenden Genen betrug 629,5677 bzw. 9,298218 im binären Logarithmus nach Gleichung III.13.

3.2 Ermittlung signifikant differentiell exprimierter Gene

Zur Bestimmung und Identifikation der signifikant beteiligten Gene am Prozess der Bestrahlungsresistenz wurden die Zellproben wie folgt eingeteilt und behandelt:

1. Zur Identifikation von Biomarkern zur Vorhersage der Bestrahlungsresistenz eines Tumors wurde die sensitive Zelllinie DuCaP und die nicht bestrahlten Zellen der Linie PC3 in zwei Klassen in der Probenmenge Z_{Marker} nach Gleichung III.11 und Tabelle II.4 eingeteilt. Mit Hilfe eines zweiseitigen t-Testes Typ 3 wurde das Signifikanzniveau und die

Irrtumswahrscheinlichkeit P zwischen den beiden Klassen für jedes Gen g errechnet. Weiterhin wurde für jedes Gen g der Fold Change (FC) F durch Subtraktion des Mittelwertes der Expression e eines Gens g_j der beiden Klassen $DuCaP$ und $PC3_0$ nach den Gleichungen III.14 bis III.17 berechnet:

$$F_{g_j, Z_{Marker}} = e(g_j, DuCaP) - e(g_j, PC3_0) \quad (III.14)$$

wobei

$$e(g_j, DuCaP) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N lc(g_j, DuCaP_i) \quad (III.15)$$

und

$$e(g_j, PC3_0) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N lc(g_j, PC3_{0_i}) \quad (III.16)$$

entsprechen. Für jede Klasse in Z_{Marker} existieren dabei N biologische Replikate

$$i = \{1 \dots N\}. \quad (III.17)$$

2. Zur Erfassung der dynamischen, zeitversetzten Reaktionen der PC3 Zelllinie auf eine medizinische Bestrahlung mit 1 Gy wurden für jeden der 8 Zeitpunkte die entsprechenden Zellproben der Klassenmenge Z_{Zeit} nach Gleichung III.12 und Tabelle II.4 zugewiesen. Demnach entspricht jede Klasse in der Klassenmenge Z_{Zeit} einem Zeitpunkt. Für je zwei Klassen benachbarter Zeitpunkte wurde nun wiederum mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests Typ 3 das Signifikanzniveau und die Irrtumswahrscheinlichkeit P zwischen den beiden Klassen bzw. Zeitpunkten für jedes Gen g errechnet. Weiterhin wurde für jedes Gen g der FC F durch Subtraktion des Mittelwertes der Expression e eines Gens g_j der Klassen $PC3_i$ und $PC3_{i+1}$ nach den Gleichungen III.18 bis III.20 berechnet,

$$F_{g_j, Z_{Zeit}} = e(g_j, PC3_i) - e(g_j, PC3_{i+1}). \quad (III.18)$$

wobei

$$e(g_j, PC3_i) = \frac{1}{N} \sum_{a=1}^N lc(g_j, PC3_{i_a}) \quad (\text{III.19})$$

entspricht. Für jede Klasse in Z_{Zeit} existieren dabei N biologische Replikate

$$a = \{1 \dots N\}. \quad (\text{III.20})$$

3. Da jeweils nur drei biologische Replikate für jede Klasse vorlagen und folglich eine alleinige Betrachtung der Ergebnisse des studentischen t-Tests und der FC-Berechnungen nur eine geringe statistische Sicherheit zulassen, wurde ein Score S für jedes Gen g ermittelt. Dafür wurde für jedes Gen g die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten P des studentischen t-Tests gemäß der Gleichung III.21 in den negativen Logarithmus zur Basis 20 transformiert, wobei ein P von 0,05 eine 1 ergibt, und mit dem dazugehörigen FC F , nach Gleichung III.22, multipliziert.

$$\hat{P}_g = -\log_{20}(P_g) \quad (\text{III.21})$$

$$S_g = \hat{P}_g \cdot F_g \quad (\text{III.22})$$

Die Gen-Score Berechnung erfolgte für jeden durchgeführten Klassenvergleich aus den Klassenmengen Z_{Marker} (III.11) und Z_{Zeit} (III.12). Die Vereinigung der Irrtumswahrscheinlichkeit P mit dem FC F bietet den Vorteil einer höheren statistischen Sicherheit für die Signifikanz des Expressionsunterschiedes eines Gens zwischen zwei Klassen. So beinhaltet der Gen-Score die statistische Varianz durch den P -Wert und die Expressionsveränderung im FC-Wert. Ein Signifikanzniveau P von 0,05 entspricht für den negativen Logarithmus zur Basis 20 den Wert 1, sodass kleinere P -Werte als 0,05 den Gen-Score S im Bezug zum FC erhöhen und größere P -Werte als 0,05 den Gen-Score S im Bezug zum FC erniedrigen.

3.3 Identifizierung von involvierten Gennetzwerken

Um ein umfassenderes Verständnis über die molekularbiologischen Vorgänge der zellulären Antwort auf eine medizinische Bestrahlung zu erhalten, wurden nicht nur einzelne, signifikant differentiell exprimierte Gene betrachtet. Vielmehr wurde versucht durch Klassifizierung und Gruppierung von Genen ganze Netzwerke, Signalwege und biologische Prozesse zu identifizieren. Für diese Identifizierung wurden zum einen bereits bekannte und validierte Netzwerke und Prozesse aus den Datenbanken *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, (Kanehisa & Goto 2000)) und *Gene Ontology* (GO, (Ashburner *et al.*, 2000))

herangezogen. Zum anderen wurde mit der *Ingenuity Pathway Analysis Software* (IPA, Ingenuity Systems, (Ingenuity 2012)) nach Mustern in den Genexpressionsdaten in bekannten Netzwerken und Signalwegen gesucht.

Zuerst erfolgte das Erstellen von TAB-separierten Annotationsdateien für die beiden Datenbanken KEGG und GO. Die Generierung einer GO Datei mit den Spalten 'Ensembl Gen ID', 'GO ID', 'Gene Ontology' und 'GO Term' wurde durch ein MySQL Befehl aus der MySQL Ensembl Datenbank *homo_sapiens_core_62_3* realisiert. Alle humanen KEGG Signalwege wurde mit Hilfe der Bioconductor Pakete *BioIDMapper* (X. Sun *et al.*, 2010) und *KEGG.db* (Carlson *et al.*, 2010) in R (Version 2.13.1) herausgefiltert und ebenfalls als TAB-separierte Datei abgespeichert. Dazu mussten zuerst die Ensembl ID's in Entrez ID's mittels *BioIDMapper* konvertiert werden, um nachfolgend alle Gene zu den humanen KEGG Signalwegen zu zuordnen zu können.

Um nun aus den vorgegebenen Netzwerken die am meisten Beteiligten herauszufiltern, wurde ein Netzwerk-Score B wie folgt errechnet. Dazu wurde zuerst der absolute, durchschnittliche Gen-Score S aller exprimierten Gene g_{w_i} eines Netzwerk w wie folgt berechnet,

$$G_w = \frac{1}{N_w} \left| \sum_{i=1}^{N_w} S_{g_{w_i}} \right|, \quad (\text{III.23})$$

wobei N_w die Anzahl der exprimierten Gene im Netzwerk w darstellt. Zum zweiten wurde das Verhältnis der Anzahl exprimierter Gene im Netzwerk N_w zu der Anzahl aller Gene im gleichen Netzwerk M_w bestimmt,

$$V_w = \frac{N_w}{M_w}. \quad (\text{III.24})$$

Zum dritten wurde, um einen Faktor der Netzwerkgröße einfließen zu lassen, der dekadischen Logarithmus der Anzahl aller Gene im Netzwerk gebildet,

$$L_w = \log_{10}(M_w). \quad (\text{III.25})$$

Der Netzwerk-Score B wurde nun durch die Multiplikation dieser drei Faktoren für jedes Netzwerk w berechnet,

$$B_w = G_w \cdot V_w \cdot L_w, \quad (\text{III.26})$$

unter der Bedingung, dass die Anzahl der Gene des Netzwerkes w mindestens 5 ist,

$$M_w \geq 5, \quad (\text{III.27})$$

und das mindestens 75 % aller Gene im Netzwerk w durch den erhobenen Genexpressionsdatensatz exprimiert sind,

$$V_w \geq 0,75. \quad (\text{III.28})$$

Dabei ist N_w die Anzahl der durch den erhobenen Genexpressionsdatensatz als exprimiert definierten Gene g_{w_i} im Netzwerk w ,

$$i = \{1 \dots N\}, \quad (\text{III.29})$$

M_w die Anzahl aller Gene im vorgegebenen Netzwerk w ,

$$m = \{1 \dots M\}, \quad (\text{III.30})$$

und W die Anzahl der vorgegebenen Netzwerke durch die GO- und KEGG-Datenbanken,

$$w = \{1 \dots W\}. \quad (\text{III.31})$$

Diese Berechnung erfolgte für alle Klassenvergleiche nach den Klassenmengen in Z_{Marker} (III.11) und Z_{Zeit} (III.12). Durch die Sortierung vom größten zum kleinsten Wert der berechnete Netzwerk-Scores B können nun die am meisten beteiligten Netzwerke identifiziert werden. Zum Vergleich der Veränderungen zwischen den Zeiträumen wurde ein Netzwerk-FC F_w nach Gleichung III.32 berechnet. Dieser wurde durch Subtraktion des Netzwerk-Scores B_w von einem Zeitpunktvergleich t zum nächstfolgenden Zeitpunktvergleich $t+1$ ermittelt,

$$F_{w_t} = B_{w_t} - B_{w_{t+1}}. \quad (\text{III.32})$$

Eine abschließenden Sortierung vom größten zum kleinsten Wert der absoluten Netzwerk-FC Scores F_w liefert eine Reihenfolge der am meisten aktivitätsveränderten Netzwerke zwischen den entsprechenden Zeitabschnitten.

3.4 Normierung zur Heatmap-Darstellung der Zeitpunktvergleiche

Zur Darstellung der Aktivitätsänderungen von Genen und Netzwerken zum jeweiligen Zeitpunktvergleich t wurde für jedes Gen ein relativer Gen-Score S_{norm_g} bzw. für jedes Netzwerk ein relativer Netzwerk-Score F_{norm_w} gebildet. Diese Normierung hat den Vorteil einen Zahlenbereich zwischen -1 und 1 zu ergeben, was den Vergleich der Aktivitätsänderungen zwischen den einzelnen Genen bzw. Netzwerken in einer Heatmap-Abbildung vereinfacht. Dafür wurde jeder Gen-Score S für jeden Zeitpunktvergleich normiert, indem der relative Anteil zum maximalen bzw. minimalen Gen-Score S_g für den jeweiligen Zeitpunktvergleich t nach Gleichung III.33 bzw. III.34 berechnet wurde,

$$S_{norm_{g,t}} = \frac{S_{g,t}}{\max_{S_g > 0} S_t} \quad \text{III.33}$$

$$S_{norm_{g,t}} = - \left(\frac{S_{g,t}}{\min_{S_g < 0} S_t} \right). \quad \text{III.34}$$

Analog zur Berechnung der normierten Gen-Scores S_{norm_g} wurden die normierten Netzwerk-Scores F_{norm_w} berechnet, indem der relative Anteil zum maximalen bzw. minimalen Netzwerk-Score F_w für den jeweiligen Zeitpunktvergleich t nach Gleichung III.35 bzw. III.36 ermittelt wurde.

$$F_{norm_{w,t}} = \frac{F_{w,t}}{\max_{F_w > 0} F_t}, \quad \text{III.35}$$

$$F_{norm_{w,t}} = - \left(\frac{F_{w,t}}{\min_{F_w < 0} F_t} \right). \quad \text{III.36}$$

Anschließend wurde für jeden Zeitpunktvergleich t eine absteigende Sortierung der absoluten, normierten Gen-Scores $|S_{norm_{g,t}}|$ bzw. Netzwerk-Scores $|F_{norm_{w,t}}|$ durchgeführt, um die am stärksten verändert exprimierten Gene bzw. Netzwerke zwischen den Zeitpunkten zu ermitteln. Weiterhin wurde zur Ermittlung der aktivsten Gene bzw. Netzwerke über den gesamten Zeitbereich die Summe der absoluten, normierten Gen-Scores $\sum |S_{norm_g}|$ bzw. Netzwerk-Scores $\sum |F_{norm_w}|$ aller Zeitpunktvergleiche gebildet und absteigend sortiert.

Mit Hilfe der Heatmap Funktion *heatmap.2* aus dem R Paket *gplots* wurden unter Anwendung der implementierten, hierarchischen Clusterfunktion die normierten Werte als Heatmap-Abbildung dargestellt (Warnes *et al.*, 2012).

IV ERGEBNISSE

1 Bestrahlungssensitivitäten der Prostata-Krebszelllinien

1.1 Energiedosis-abhängiger Zelltod nach Bestrahlung

Um die in dieser Arbeit verwendeten Prostata-Krebszelllinien auf ihre Bestrahlungssensitivität zu charakterisieren, wurden zwei unabhängige Viabilitäts- bzw. Zytotoxizitätstests durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zellen der Linien PC3 und DU-145 als strahlungsresistent angesehen werden, hingegen die Zellen der Linie RWPE-1 eher als strahlungssensitiv charakterisiert werden (Bowen *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2011; Donna *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2007; Inayat *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2010; Konsoula *et al.*, 2011; Singh-Gupta *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2005; Truman *et al.*, 2005; Trzeciak *et al.*, 2004; Udayakumar *et al.*, 2008; Vucić *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010). Über die DuCaP Zelllinie liegen bis dato keine Studien über ihre Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung vor.

Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen MTTs in ein wasserunlösliches Formazan, die durch zelluläre Reduktionsmittel hervorgerufen werden und kolorimetrisch gemessen werden kann (Mosmann 1983; Berridge *et al.*, 1996). Die Zellen wurden dabei einer Strahlendosis von 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy und 20 Gy ausgesetzt und nach 72 h Inkubation dem MTT-Test unterzogen. Als Kontrollen wurden die vier Zelllinien ohne Bestrahlung herangezogen. Die Abbildung IV.1 zeigt die Ergebnisse als Balkendiagramm mit der Überlebensfraktion der jeweiligen Zelllinie gegenüber der ausgesetzten Strahlendosis normalisiert auf die Kontrolle der jeweiligen Zelllinie. Demnach zeigen bei 5 Gy die Zellen der Linien PC3 mit über 90 % und DU-145 mit knapp 83 % Überlebensfraktion eine höhere Strahlungsresistenz auf als die Zelllinien DuCaP und RWPE-1 mit 78 % bzw. 71 %. Zudem zeigt sich diese Signifikanz auch bei einer Energiedosis von 20 Gy, wobei hier die Überlebensfraktionen bei ca. 65 % für PC3 und 61 % für DU-145 sowie bei ca. 47 % für DuCaP und 48 % für RWPE-1 liegen. Bei einer Strahlendosis von 15 Gy weisen die RWPE-1 Zellen mit rund 50 % Überlebensfraktion eine statistisch signifikant höhere Strahlungsempfindlichkeit gegenüber den anderen drei Zelllinien auf, die alle drei eine Überlebensfraktion von ca. 58 % vorzeigen. Erstaunlicherweise ergab sich bei einer Strahlendosis von 10 Gy eine knappe statistische Signifikanz ($P \sim 0,04$) für die DU-145 (66,7 %) und DuCaP (66,5 %) Zelllinien gegenüber der PC3 Zelllinie (62,4 %), was dem generellen Trend und den aus der Literatur bekannten Strahlungsempfindlichkeiten widerspricht (Bowen *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2011; Donna *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2007; Inayat *et al.*, 2002; Singh-Gupta *et al.*, 2009; Sun

et al., 2007; Tang *et al.*, 2005; Truman *et al.*, 2005; Trzeciak *et al.*, 2004; Vucić *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010; Zellweger *et al.*, 2002). Insgesamt ist ein zu erwartender Abfall der Überlebensfraktionen bei höheren Strahlendosen zu erkennen.

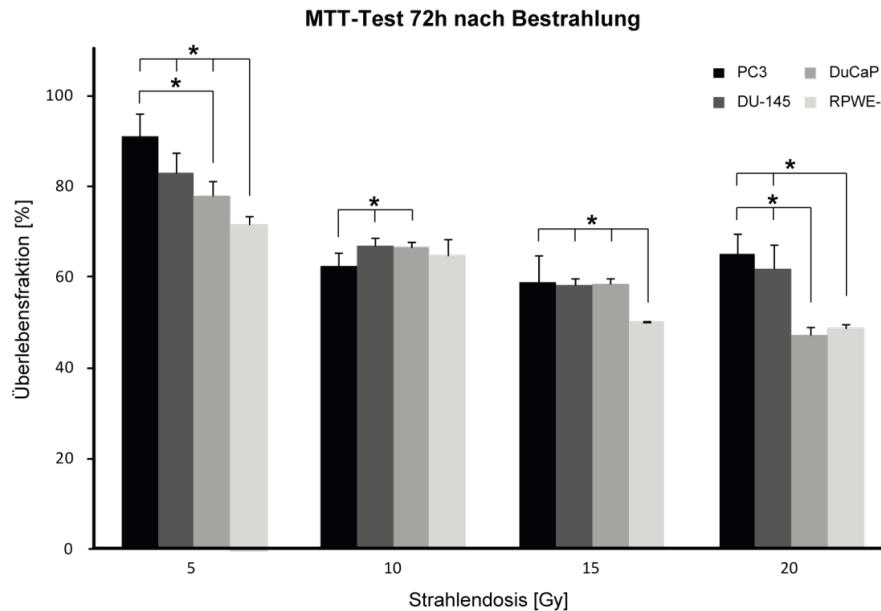


Abb. IV.1 – Strahlendosis-abhängiges Zellüberleben im MTT-Test 72 h nach Bestrahlung. Erwartungsgemäß nehmen die Überlebensfraktionen der Zellen bei zunehmender Strahlendosis ab. Bei 5 Gy und 20 Gy weisen die Zellen der Linien PC3 und DU-145 eine höhere Strahlungsresistenz auf als die Zelllinien DuCaP und RWPE-1. Bei 15 Gy hat die RWPE-1 Zelllinie eine signifikant verringerte Überlebensfraktion während die drei anderen Zelllinien sich ähnlich verhalten. Überraschenderweise ist bei 10 Gy die PC3 Zelllinie die Strahlungssensitivste. $n = 6$, 3x biologisch, 2x technisch; * $P < 0,05$.

Um eine höhere Sicherheit über die Strahlungssensitivitäten der vier Zelllinien zu erhalten wurde ein weiterer unabhängiger Viabilitätstest, der sogenannte Trypanblau-Test, durchgeführt. Dieser beruht auf der Eigenschaft, dass der Farbstoff Trypanblau die beschädigte Zellmembran abgestorbener Zellen durchdringt, wohingegen lebende Zellen mit ihrer intakten Zellmembran diesen Farbstoff nicht aufnehmen (Strober 2001). Dafür wurden die vier Zelllinien mit den Strahlendosen 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy und 40 Gy bestrahlt und nach 72 h mit einer Trypanblau-Färbung mikroskopisch ausgezählt. Als Kontrollen dienten wiederum nicht bestrahlte Zellen, dessen Werte für die Normalisierung herangezogen wurden. Ähnlich zum MTT-Test liegt auch hier eine Strahlendosis-abhängige Überlebensrate vor, wobei hier die Überlebensraten deutlich geringer ausfallen als beim MTT-Test, was am unterschiedlichen Prinzip der beiden Tests liegt (siehe Abschnitt V.1.1). Bei allen Strahlendosen weist die PC3 Zelllinie die höchsten Überlebensraten auf. Lediglich bei einer Strahlendosis von 5 Gy hat die RWPE-1 Zelllinie mit 52,2 % eine knapp 3 %ige höhere Überlebensfraktion als die PC3 Zelllinie. Dagegen fallen die Überlebensraten der RWPE-1

Zelllinie bei allen anderen Strahlendosen deutlich niedriger aus als die der PC3 Zelllinie. Weiterhin wird durch dieses Experiment die DuCaP Zelllinie bei allen Strahlendosen als strahlungssensitivste Zelllinie charakterisiert. Bereits bei einer Strahlendosis von 5 Gy liegen nur noch 21,1 % lebende DuCaP Zellen vor. Die DU-145 Zelllinie verhält sich mit Ausnahme zur Überlebensrate bei 5 Gy ähnlich wie die RWPE-1 Zelllinie. Festzuhalten ist, dass die PC3 Zelllinie bei allen Strahlendosen statistisch signifikant höhere Überlebensraten aufweist als die DuCaP Zelllinie. Anhand dieser Ergebnisse kann die PC3 Zelllinie als die Strahlungsresistenteste und die DuCaP Zelllinie als Strahlungssensitivste der vier Zelllinien angesehen werden.

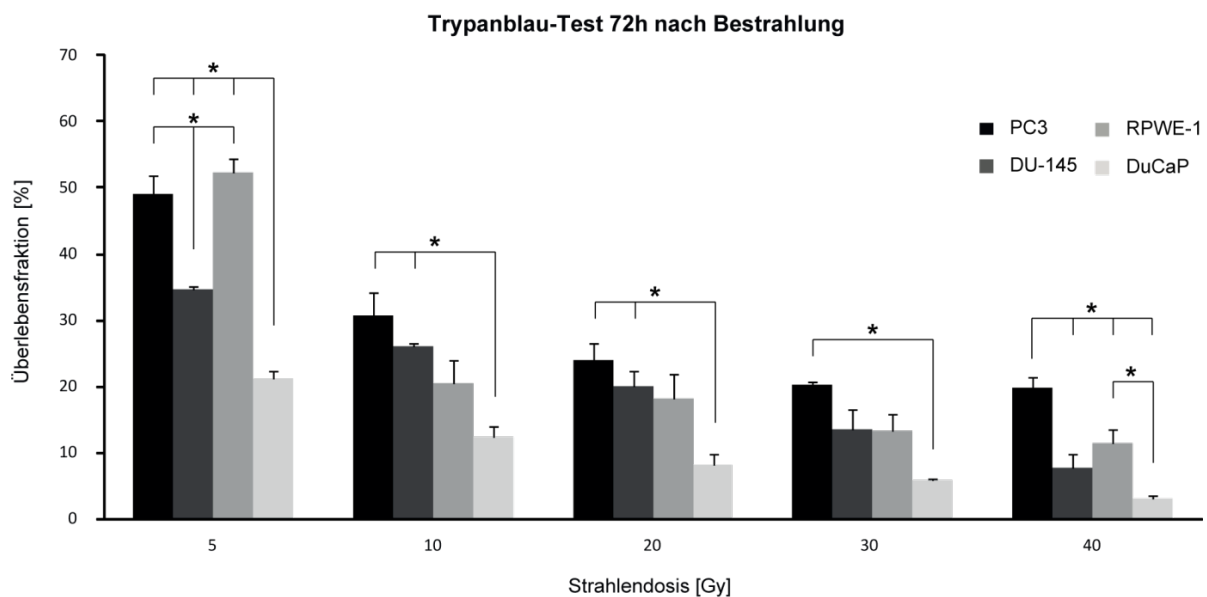


Abb. IV.2 – Strahlendosis-abhängiges Zellüberleben im Trypanblau-Test 72 h nach Bestrahlung. Wie erwartet nehmen die Überlebensfraktionen der Zelllinien bei zunehmender Strahlendosis deutlich ab. Die PC3 Zelllinie weist bei allen Strahlendosen, mit Ausnahme bei 5 Gy, die höchsten Überlebensfraktionen auf. Gegensätzlich dazu hat die DuCaP Zelllinie die niedrigsten Überlebensraten, was statistisch bei allen Strahlendosen mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ gegenüber der PC3 Zelllinie verdeutlicht wird. Die RWPE-1 und DU-145 Zelllinien verhalten sich mit Ausnahme bei einer Strahlendosis von 5 Gy ähnlich. Entsprechend diesen Ergebnissen können die PC3 Zellen als strahlungsresistenteste und die DuCaP Zellen als strahlungssensitivste Linien angesehen werden. $n = 3$, 3x biologisch; * $P < 0,05$.

1.2 PC3 und DU-145 Zelllinien mit größter proliferativer Kapazität

Neben dem MTT- und Trypanblau-Test wurde als dritte unabhängige Strahlungssensitivitätsbestimmung mit dem Koloniebildungstest durchgeführt. Dieser gibt Aufschluss über die proliferative Kapazität der Zellen nach ionisierender Bestrahlung und ist ein etabliertes Verfahren der Strahlenbiologie. Die Grundlage des Experimentes ist die Ausbildung von Zellkolonien, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen bestehen muss (Steel 1993). Dazu wurden Zellen in einer sehr dünnen Zelldichte ausgesät und mit einer Strahlendosenreihe von 0 bis 10 Gy bestrahlt. Nach einer Kultivierung der Zellen von 11

Tagen wurden die Kolonien mit Hilfe einer Giemsa-Anfärbung mikroskopisch ausgezählt. Als Kontrollen zur Berechnung der Platteneffizienz und der maximalen Koloniefraktion (100 %) wurde die jeweilige Zelllinie in einer sehr geringen Zelldichte und ohne Bestrahlung kultiviert. Die Zellen der Linie RWPE-1 konnten bei keiner Strahlendosis Kolonien ausbilden, was darauf hindeutet, dass diese nicht maligne Prostata-Krebszelllinie in den eingesetzten Zelldichten keine proliferative Kapazität besitzt. Da dieses Verhalten auch bei den nicht bestrahlten Zellen der Kontrollen auftrat wurde diese Zelllinie für diesen Test als nicht anwendbar eingestuft.

In Abbildung IV.3 sind die Koloniefaktionen im dekadischen Logarithmus gegenüber der eingesetzten Strahlendosis für die Zelllinien PC3, DU-145 und DuCaP aufgetragen. Ein zu erwartender, annäherungsweise exponentieller Abfall der Koloniebildung bei erhöhter Strahlendosis ist für alle drei Zelllinien wahrzunehmen. Folglich fallen bei einer Strahlendosis von 5 Gy die Koloniefaktionen bei allen drei Zelllinien unter 10 % und bei 10 Gy sogar unter 1 %. Jedoch weisen die Zelllinien PC3 und DU-145 ein deutlich höheres Proliferationsverhalten auf als die DuCaP Zelllinie. Übereinstimmend zum MTT- und Trypanblau-Test kann somit festgehalten werden, dass die DuCaP Zelllinie als die Strahlenempfindlichste der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien charakterisiert werden kann. Die PC3 und DU-145 Zelllinien verhalten sich in diesem Strahlenempfindlichkeitstest ähnlich und können in diesem Fall als strahlungsresistent angesehen werden.

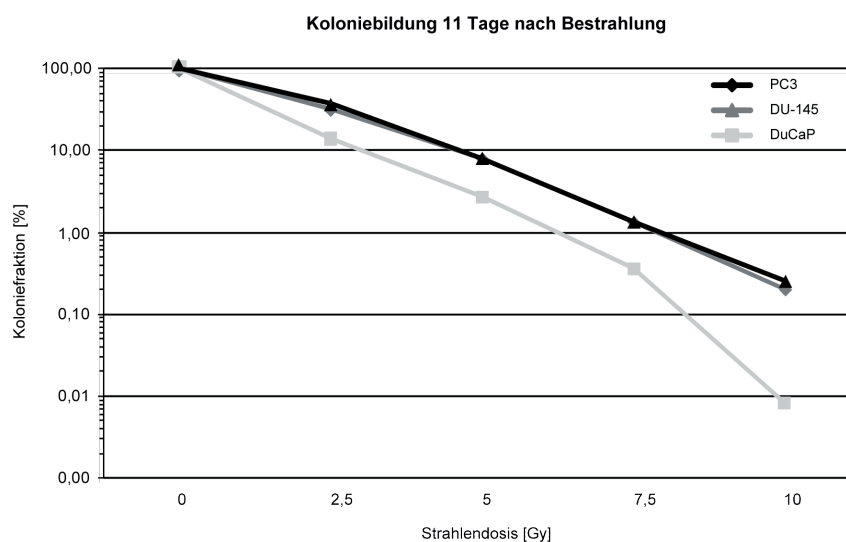


Abb. IV.3 – Proliferative Kapazität der Prostata-Krebszelllinien 11 Tage nach Bestrahlung. Wie zu erwarten fallen die Koloniefaktionen bei steigenden Strahlendosen annähernd exponentiell ab. Die deutlichste Abnahme kann bei der DuCaP Zelllinie beobachtet werden, wohingegen sich die Zellen der Linien PC3 und DU-145 mit einer höheren proliferativen Kapazität ähnlich darstellen. $n = 3$, 3x biologische Replikate.

Als ein weiterer Versuch wurde das proliferative Verhalten der PC3 Zelllinie als Wildtyp mit PC3 Zellen verglichen, die zuvor einer 5 Gy Strahlendosis ausgesetzt waren und

nachfolgend expandiert wurden. Anhand dieses Bestrahlungsversuches sollte aufgeklärt werden, ob überlebende Zellen nach einer Bestrahlung eventuell ein höheres Resistenzvermögen gegen ionisierende Strahlung offenbaren. In Abbildung IV.4 ist das Proliferationsverhalten dieser beiden PC3 Zelllinien mit der Koloniebildung im dekadischen Logarithmus gegenüber der ausgesetzten Strahlendosis dargestellt. Wie beim vorherigen Koloniebildungsexperiment fallen auch hier die Koloniefractionen bei steigenden Strahlendosen annähernd exponentiell ab. Beide Zelllinien weisen ein nahezu identisch proliferatives Verhalten auf, was dafür spricht, dass eine Expansion überlebender Zellen nach einmaliger Bestrahlung keine höhere Strahlungsresistenz nach sich zieht.

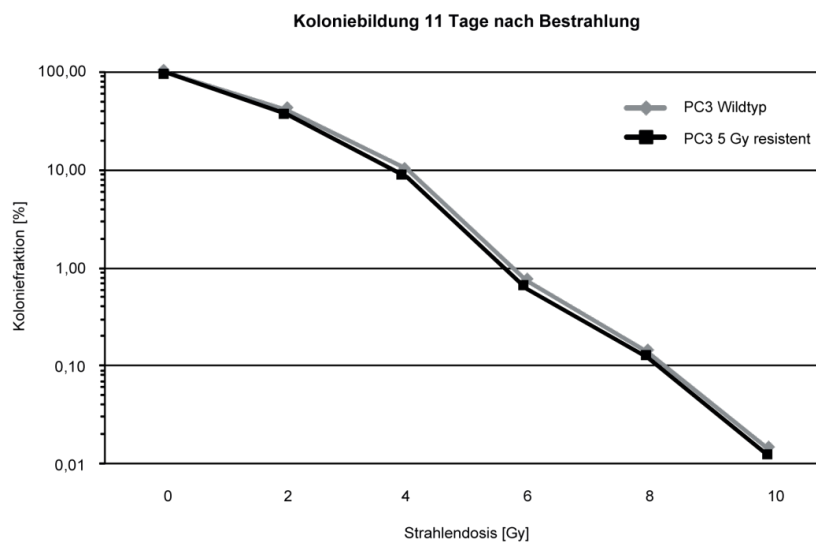


Abb. IV.4 – Gleiche proliferative Kapazität von Wildtyp und bestrahlten PC3 Zellen. Wie zu erwarten fallen die Koloniefractionen bei steigenden Strahlendosen bei beiden Zelllinien annäherungsweise exponentiell ab. Beide PC3 Zelllinien verhalten sich identisch. Demnach bilden überlebende Zellen nach einer 5 Gy Bestrahlung keine höhere Strahlungsresistenz aus. $n = 3$, 3x biologische Replikate.

1.3 PC3 und DuCaP als geeignete Zellmodelle

Nach Betrachtung der Resultate aus den drei unabhängigen Strahlungsempfindlichkeitsexperimenten kann festgehalten werden, dass die PC3 Zelllinie in allen drei Tests die höchste Strahlungsresistenz aufwies, während gleichzeitig die DuCaP Zelllinie die höchste Strahlungsempfindlichkeit aufzeigte. Die Zellen der Linien DU-145 und RWPE-1 zeigten teilweise kontroverses Verhalten. Insbesondere konnte im Trypanblau-Test keine eindeutige Unterscheidung dieser beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer Bestrahlungssensitivität beobachtet werden. Um für die Identifikation von Biomarkern zur prädiktiven Bestimmung der Strahlungsresistenz einer Zelllinie bzw. eines Tumors eine erhöhte Sicherheit zu gewährleisten, wurde nur mit den Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten der PC3 und DuCaP Zelllinien, als Zellmodellssysteme für eine erhöhte Strahlungsresistenz und -sensitivität,

fortgefahren. Eine Übersicht der Resultate aus den drei Bestrahlungsexperimenten ist in der nachfolgenden Tabelle IV.1 dargestellt.

Tab. IV.1 – Resultate der Bestrahlungsexperimente.

Bestrahlungsexperiment	Resultat
MTT-Test	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PC3 und DU-145 Zelllinien haben größte Zellüberlebensfraktionen ▪ DuCaP und RWPE-1 Zelllinien haben die kleinsten Zellüberlebensfraktionen
Trypanblautest	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PC3 Zelllinie hat die größte Zellüberlebensfraktion ▪ DuCaP Zelllinie hat die kleinste Zellüberlebensfraktion ▪ DU-145 und RWPE-1 Zelllinien haben eine durchschnittliche Zellüberlebensfraktion
Koloniebildungstest	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PC3 und DU-145 Zelllinien haben die meisten Koloniebildungen ▪ DuCaP Zelllinie hat eine deutlich geringere Koloniebildungsanzahl ▪ RWPE-1 Zelllinie war nicht für diesen Test anwendbar

2 Markersuche zur Vorhersage der Bestrahlungseffizienz

2.1 Massiver Genexpressionsunterschied zwischen PC3 und DuCaP Zellen

Aus den Ergebnissen der Bestrahlungsexperimenten ist hervorgegangen, dass die PC3 und die DuCaP Zelllinien geeignete Zellmodellsysteme für die Identifikation von Markern zur Vorhersage der Strahlungsresistenz eines Tumors sind. Aus diesem Grund wurde mit den Hochdurchsatz-Sequenzierungsdaten dieser zwei Zelllinien eine Analyse auf signifikant differentiell exprimierten Genen durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Korrelationen gemäß Gleichung III.8 mit den Genexpressionswerten beider Zellproben und ihren biologischen Replikaten ermittelt. Demnach variieren die Korrelationen des normalisierten und der nach Abschnitt III.3.1 verarbeiteten Genexpressionswerte innerhalb der drei biologischen Replikaten beim PC3 Datensatz zwischen 0,946 und 0,984 und beim DuCaP Datensatz zwischen 0,921 und 0,940. Die Korrelation zwischen den beiden unterschiedlichen Zelllinien liegt mit 0,608 und 0,734 deutlich unter denen der biologischen Replikate. Die errechneten Korrelationswerte schließen auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Experimente und auf einen massiven Genexpressionsunterschied zwischen der DuCaP und PC3 Zelllinie. Eine grafische Darstellung der Korrelationen zwischen jedem Datensatz ist in Abbildung IV.5 A ersichtlich.

Diese Korrelationen spiegeln sich auch augenfällig in den FC-Verteilungen wieder, die in Abbildung IV.5 B dargestellt sind. Demzufolge sind die beiden FC-Verteilungen der durchschnittlichen FC-Werte der biologischen Replikate eindeutig schmaler und höher in

ihrem Verlauf als die FC-Verteilung von DuCaP gegen PC3. Das durchschnittliche 99 % Vertrauensintervall der Replikativergleiche lag beim 0,5 % Perzentil bei -1,223 und beim 99,5 % Perzentil bei 1,229. Anhand dieser Grenzen konnten beim Vergleich zwischen der DuCaP und PC3 Zelllinien 1.528 Gene in den DuCaP Zellen als höher exprimiert identifiziert werden, während 1.701 Gene in der PC3 Zelllinie als höher exprimiert gelten. Zu vermerken ist, dass bei dieser FC-Analyse die Varianzen der drei biologischen Replikate nicht einfließen.

Im Weiteren wurde, angelehnt an einem sogenannten MA-Plot, das Verhalten der FC-Werte gegenüber der durchschnittlichen Genexpression veranschaulicht (siehe Abbildung IV.5 C). Hierbei wird deutlich, dass bei kleineren Genexpressionswerten eine höhere Anzahl von Genen FC-Werte aufweisen, die oberhalb oder unterhalb des 99 % Konfidenzintervall (rote horizontale Linien) liegen. Ebenfalls ist das Anwenden des Schwellwertes mit $T = 50, 5,64$ im binären Logarithmus, durch eine mittige Einkerbung bei kleineren Genexpressionswerten erkennbar. Charakteristisch für diese Darstellung befindet sich die Hauptwolke mittig vom Plot und wird nach außen dünner, was eine große Anzahl an gleich exprimierten Genen in beiden Zelllinien symbolisiert.

Als letzte Darstellung wurde ein sogenannter Volcano-Plot erzeugt, der in Abbildung IV.5 D zu sehen ist. Diese Betrachtung beinhaltet den negativen dekadischen Logarithmus der P -Werte gegenüber den FC-Werten für jedes Gen. Durch die Integration des P -Wertes fließt hiermit auch die statistische Varianz der Genexpressionsdaten ein, wodurch eine höhere Sicherheit in der Interpretation induzierter und supprimierter Gene zwischen den beiden Zelllinien erzielt wird. Wie der Name Volcano-Plot bereits verdeutlicht, bildet sich eine Art Vulkan in der Darstellung aus, wobei die meisten Punkte sich um einen FC-Wert von 0 mit geringen P -Werten konzentrieren. Mit größer werdenden FC-Werten und transformierten P -Werten nimmt die Anzahl der Gene deutlich ab. Diese Gene stellen die am deutlichsten unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den beiden Zelllinien dar. Durch das Begrenzen anhand des 99 % Vertrauensintervalls in Kombination mit dem Setzen des P -Wertes auf 0,05, bzw. für noch stringenteren Bedingungen auf 0,01, können nun die signifikantesten differentiell exprimierten Gene zwischen der DuCaP und der PC3 Zelllinie identifiziert werden. Die Tabelle IV.2 beinhaltet eine Übersicht der Anzahl von Genen bei unterschiedlichen Bedingungen. Demnach sind bei alleiniger Betrachtung des P -Wertes 2.626 Gene bei $P < 0,05$ und 845 Gene bei $P < 0,01$ signifikant. Kombiniert man nun die entsprechenden P -Werte mit den FC-Grenzen des 99 % Konfidenzintervalls sinkt die Genanzahl bei $P < 0,05$ auf 2.050, wobei 996 Gene induziert und 1.054 Gene supprimiert sind, und bei $P < 0,01$ mit 425 induzierten und 305 supprimierten auf 730 Genen. Dieser Vergleich bezieht sich auf DuCaP gegen PC3, d.h. 425 Gene sind deutlich aktiver in der DuCaP Zelllinien und 305 Gene sind deutlich aktiver in der PC3 Zelllinie.

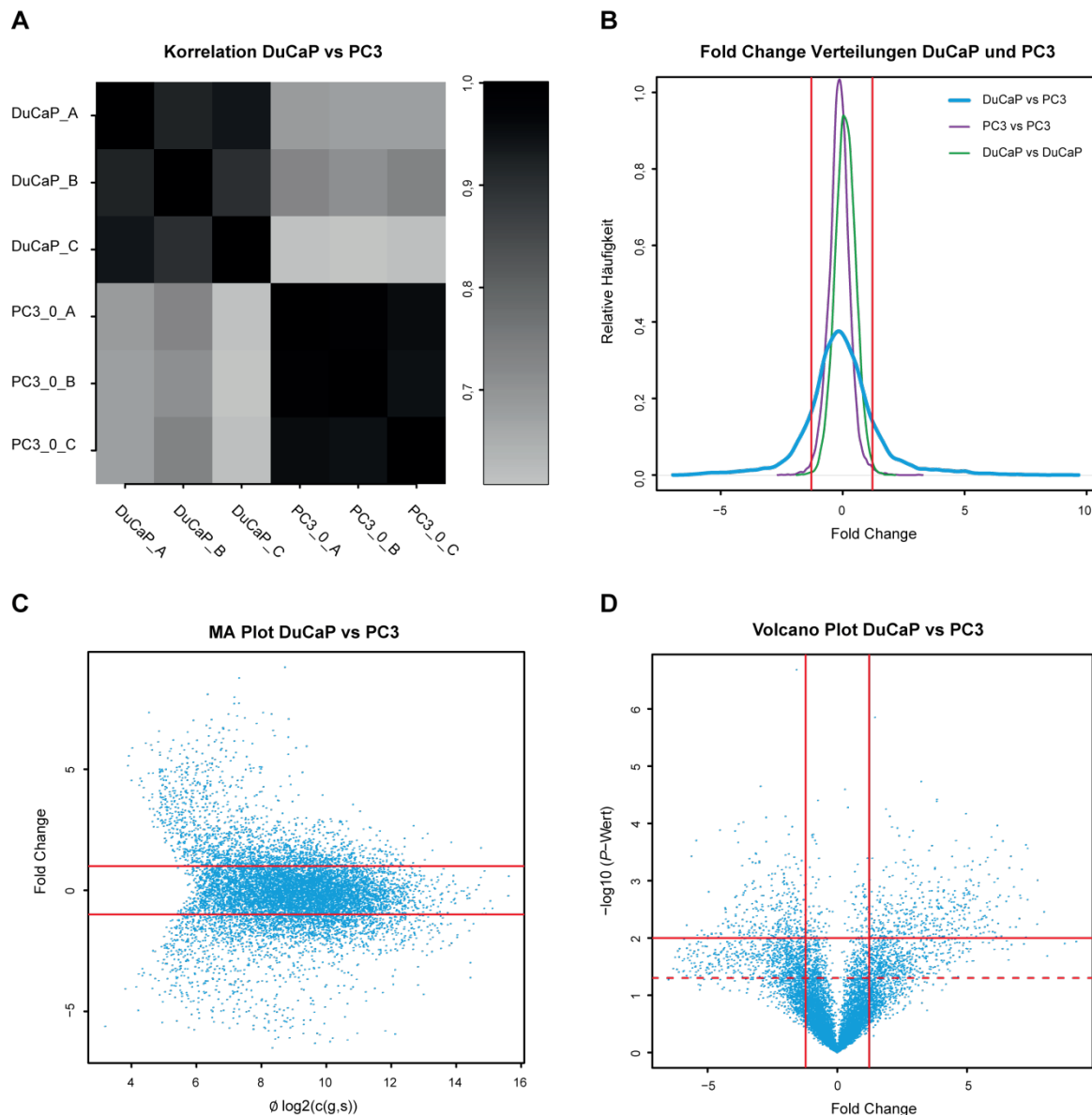


Abb. IV.5 – Statistische Betrachtung der globalen Genexpression von DuCaP und PC3 Zellen.

A) Korrelationsdarstellung aller möglichen Vergleiche der 6 Zellproben. Aufgrund hoher Korrelationskoeffizienten von über 0,9 innerhalb der Zellprobenreplikate kann man auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Experimente schließen. Deutlich niedrigere Korrelationswerte beim Vergleich der unterschiedlichen Zellproben deuten auf einen starken Genexpressionsunterschied hin. **B)** Darstellung der durchschnittlichen FC-Verteilungen für die biologischen Replikate der DuCaP und PC3 Zelllinien sowie zwischen den beiden Zelllinien. Während die Kurven der beiden FC-Verteilungen derselben Zelllinie relativ konzentriert um den Wert 0 liegen, ist die Kurve der FC-Verteilung zwischen der DuCaP und PC3 Zelllinie deutlich breiter, was ebenfalls auf einen starken Genexpressionsunterschied deutet. Die zwei roten Linien kennzeichnen das 99 % Konfidenzintervall. **C)** Angelehnt am MA-Plot ist der FC-Wert gegenüber dem durchschnittlichen Genexpressionswert aller Zellproben dargestellt. Charakteristisch für diese Darstellung konzentrieren sich die meisten Punkte mittig im Plot, was die klar höhere Anzahl nicht veränderter Gene verdeutlicht. Auffällig sind größere FC-Werte bei geringeren Expressionswerten. Horizontale rote Linien deuten das 99 % Konfidenzintervall an. **D)** Der Volcano-Plot integriert die Varianz der Genexpressionswerte mittels dem negativen dekadischen Logarithmus des P -Wertes mit dem dazugehörigen, durchschnittlichen FC-Wert. Mit zunehmenden FC-Werten und transformierten P -Werten nimmt die Anzahl der Gene, die am Sichersten unterschiedlich exprimiert sind, deutlich ab. Rot gestrichelte, horizontale Linie P -Wert = 0,05, rot horizontale Linie P -Wert = 0,01, rot senkrechte Linien 99 % Vertrauensintervall.

Tab. IV.2 – Statistik differentiell exprimierter Gene im Vergleich DuCaP gegen PC3.

Genklasse	Resultat
Alle Protein-kodierende Gene	19.708
Entfernte Gene aufgrund zu geringer Expression	8.742
Gene mit ausreichender Expression	10.966
Differenziell exprimierte Gene mit <i>P</i> -Werten < 0,05	2.626 (1.242↓, 1.384↑)
Differenziell exprimierte Gene mit <i>P</i> -Werten < 0,01	845 (368↓, 477↑)
Differenziell exprimierte Gene anhand von FC-Werten	3.229 (1.528↓, 1.701↑)
Differenziell exprimierte Gene anhand von FC-Werten und <i>P</i> -Werten < 0,05	2.050 (996↓, 1.054↑)
Differenziell exprimierte Gene anhand von FC-Werten und <i>P</i> -Werten < 0,01	730 (305↓, 425↑)

In Tabelle IV.3 ist eine Übersicht der drei am meisten induzierten und supprimierten Gene. Das aktivste Gen in der PC3 Zelllinie ist *TSPAN8* (*tetraspanin 8*). Das entsprechende Protein ist ein Mitglied der Transmembran 4 Superfamilie und wird in vielen Karzinomen exprimiert. Es handelt sich dabei um ein Zelloberflächenprotein, was dafür bekannt ist, mit Integrine Komplexe zu bilden (Szala *et al.*, 1990). Neuste Studien zeigen, dass die Expression von *TSPAN8* Melanomzellen das Überqueren der kutanen Basalmembran ermöglicht, was zur dermalen Invasion und zur Metastasenbildung führen kann (Berthier-Vergnes *et al.*, 2011). Die Proteine diese Familie vermitteln zudem Signalweiterleitungen, welche eine Rolle bei der Regulation der Prozesse Zellentwicklung, -aktivierung, -wachstum und -motilität spielen (Rana *et al.*, 2011).

An zweiter und dritter Stelle rangieren die Gene *MAGEA3* (*melanoma antigen family A, 3*) und *HSD17B2* (*hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2*), welche beide mit Krebs in Verbindung gebracht werden. Die Funktion von *MAGEA3* ist überwiegend unbekannt aber anscheinend spielt es eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Tumortransformation und beim Krebsverlauf (Hudolin *et al.*, 2006; K.-H. Kim *et al.*, 2006). *HSD17B2* kodiert für ein Enzym was die gegenseitige Umwandlung von Testosteron und Androstendion sowie Estradiol und Estron katalysiert (Wu *et al.*, 1993). Zudem wurde es in einigen Veröffentlichungen mit Blut-, Brust-, Darm-, und Prostatakrebs in Verbindung gebracht (Bhavani *et al.*, 2009; Canzian *et al.*, 2010; Guey *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Pfeiffer *et al.*, 2011).

Das aktivste Gen in der DuCaP Zelllinie ist das sogenannte *PTRF* (*polymerase I and transcript release factor*). Das Geneprodukt spielt eine bedeutende Rolle bei der Transkription, da es für die Unterbrechung der Elongation und somit bei der Freisetzung der prä-ribosomalen RNA und der Polymerase I von der DNA Matrize beteiligt ist (Mason 1997; Jansa 1998). Bei einer Überexpression von *PTRF* wird die Aggressivität der PC3 Zelllinie verändert und ein vermindertes Migrationsverhalten liegt vor (Aung *et al.*, 2011).

Gefolgt wird *PTRF* von den beiden Genen *CYP24A1* (*cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1*) und *BTG3* (*BTG family, member 3*). *CYP24A1* gehört zu der Cytochrom P450-Superfamilie und ist ein mitochondriales Enzym, welches maßgeblich am Abbau der Vitamin-D-Metabolite beteiligt ist. Neben der katalysierten Reaktion könnte eine Überexpression des Enzyms, aufgrund des resultierenden Mangels an Vitamin D, zur Tumorentstehung beitragen (Albertson *et al.*, 2000). Interessanterweise wird das *BTG3* Gen als ein Tumorsuppressorgen angesehen (Majid *et al.*, 2009; Ou *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008). Diese sehr hohe Genaktivitäten in der DuCaP Zelllinie verglichen zur PC3 Zelllinie könnte ein guter Indikator für den unterschiedlichen Schweregrad und der Resistenzfähigkeiten dieser beiden Zelllinien sein.

Tab. IV.3 – Die signifikantesten differentiell exprimierten Gene, DuCaP gegen PC3.

Gen-Symbol	Beschreibung	∅ DuCaP	∅ PC3	FC	P-Wert
TSPAN8	tetraspanin 8	5,298	11,102	-5,803	0,00600
MAGEA3	melanoma antigen family A, 3	0,361	5,976	-5,614	0,00037
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	3,799	9,231	-5,431	0,00019
PTRF	polymerase I and transcript release factor	10,994	3,286	7,708	0,00570
CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	11,148	3,425	7,722	0,00098
BTG3	BTG family, member 3	11,132	3,155	7,977	0,00348

2.2 Hohe Aktivitäten krebsrelevanter Netzwerke

Für die Identifikation relevanter, interagierender Gengruppen wurden die Netzwerke der GO- und KEGG-Datenbanken untersucht. Es sollten die Gengruppen identifiziert werden, bei den durchschnittlich die höchsten Expressionsunterschieden zwischen den DuCaP und PC3 Zelllinien vorherrschen. Diese Gengruppen sollen zusammen betrachtet eine höhere Sicherheit bei einem Biomarkertest gewährleisten als eine einzelne Betrachtung der Gene. Die Vorgehensweise zur Identifikation ist im Abschnitt III.3.3 beschrieben, wobei ein Netzwerk aus mindesten 5 Genen bestehen musste. Weiterhin mussten 75 % der Gene des Netzwerkes durch den gegebenen Genexpressionsdatensatz erfasst worden sein. Die GO-Datenbank besteht aus einer Ontologie, die die drei Bereiche "Zelluläre Komponente", "Biologischer Prozess" und "Molekulare Funktion" abdeckt. Jeder Terminus besteht aus einem Namen, einer Nummer und assoziierten Daten bzw. Genen. Diese Gene müssen dabei nicht zwangsläufig miteinander interagieren, sondern können unabhängig voneinander für eine Kategorie-Ontologie verantwortlich sein. Genauso können einige von ihnen inhibierend wirkend, während andere einen aktivierenden Einfluss aufweisen. Aus diesem Grunde wurde die Richtung des Expressionsunterschiedes eines Genes im Netzwerke, also

induzierend oder supprimierend, außer Betracht gelassen und allein der absolute Genexpressionsunterschied wurde als Kriterium angesehen. In Tabelle IV.4 sind die aktivsten Gengruppen der GO-Datenbank gelistet. Demnach sind die meisten vertretenden Bereiche die des biologischen Prozesses, wobei die Liste mit einer molekularen Funktion, der Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität (*aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity*), angeführt wird, gefolgt von der zellulären Komponente der Zell-Zell-Verbindung (*cell-cell junction*). Verschiedene NAD(P)⁺-abhängige Aldehyd-Dehydrogenasen, welche die Oxidation von Aldehyden katalysieren, werden bereits in Verbindung mit Krebs gebracht und gelten auch als potentielle Biomarker für die Diagnose. So sind z.B. die beiden Aldehyd-Dehydrogenasen *ALDH1A1* und *ALDH1B1* in Darmkrebs drastisch hochreguliert, was sie zu einem potentiellen Biomarker für die Diagnose von Darmkrebs machen (Chen *et al.*, 2011).

Tab. IV.4 – Die aktivsten GO-Netzwerke, DuCaP gegen PC3.

GO ID W	Ontologie	GO Terminus	Anzahl der Gene im Netzwerk M_w	Anzahl exprimierter Gene N_w	GO Score B_w
GO:0004030	Molekulare Funktion	<i>aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity</i>	5	4	3,405
GO:0005911	Zelluläre Komponente	<i>cell-cell junction</i>	90	69	3,303
GO:0043407	Biologischer Prozess	<i>negative regulation of MAP kinase activity</i>	28	22	3,272
GO:0035035	Molekulare Funktion	<i>histone acetyltransferase binding</i>	13	11	3,175
GO:0006983	Biologischer Prozess	<i>ER overload response</i>	9	9	3,154
GO:0034446	Biologischer Prozess	<i>substrate adhesion- dependent cell spreading</i>	20	19	3,024
GO:0002244	Biologischer Prozess	<i>hemopoietic progenitor cell differentiation</i>	9	8	3,023
GO:0035313	Biologischer Prozess	<i>wound healing, spreading of epidermal cells</i>	8	7	2,991
GO:0050919	Biologischer Prozess	<i>negative chemotaxis</i>	11	9	2,941

Die Größen der Gengruppen M_w variieren in der gezeigten Tabelle IV.4 von 5 bis 90, was dafür spricht, dass der angewandte Algorithmus keine Verzerrung aufgrund der unterschiedlichen Netzwerkgrößen aufzeigt. Weiterhin ist zu beobachten, dass die GO-Netzwerk-Scores B relativ nahe beieinanderliegen, so dass keine Ausreißer vorliegen. Das 90 % Perzentil der GO Netzwerk-Scores B liegt bei 1,765. Von den insgesamt 11.795 GO-Kategorien sind nach Anwendung der Bedingungen 1.422 übrig gebliebenen. Somit liegen 143 GO-Netzwerke über dem 90 % Perzentil der GO-Netzwerk-Score Verteilung.

Neben der GO-Datenbank wurde die frei zugängliche KEGG-Datenbank mit ihren humanen Stoffwechselwegen nach der gleichen Vorgehensweise untersucht. Da auch hier in den Netzwerken sowohl inhibierende als auch aktivierende Geninteraktionen vorliegen, wurde nur die absolute, durchschnittliche Genaktivität betrachtet. Nach Anwendung der Bedingungen lagen von den insgesamt 228 humanen Netzwerken noch 132 vor. Das 90 % Perzentil der KEGG-Netzwerk-Scores B lag bei 2,257, wobei 14 KEGG-Netzwerke einen höheren Netzwerk-Score B aufwiesen. Wie bei der GO-Datenbankanalyse liegen auch hier keine Ausreißer beim Netzwerk-Score B vor.

An den erster Stellen rangiert der Metabolismus für die Biosynthese von Mucin-spezifischen O-Glykane (*Mucin type O-Glycan biosynthesis*). Es ist schon länger bekannt, dass bei Tumoren veränderte Protein-Glykosylierungen vorliegen und diese als potentielle Biomarker für die Diagnose angesehen werden (Thaysen-Andersen *et al.*, 2008; Brockhausen 1999). An zweiter Stelle ist der Metabolismus des Krebs im Allgemeinen (*Pathways in cancer*) platziert, was nicht weniger verwunderlich ist, da die DuCaP und PC3 Zellproben zwei Prostata-Krebszelllinien darstellen. Passend mit dem identifizierten GO-Netzwerk der Zell-Zell-Verbindung (*cell-cell junction*) rangiert auf Rang 4 das Netzwerk der *Tight junction*.

Tab. IV.4 – Die aktivsten KEGG Stoffwechselwege, DuCaP gegen PC3.

KEGG ID W	Beschreibung	Anzahl der Gene im Netzwerk M_w	Anzahl exprimierter Gene N_w	KEGG Score B_w
hsa00512	<i>Mucin type O-Glycan biosynthesis</i>	24	19	3,326
hsa05200	<i>Pathways in cancer</i>	301	235	2,922
hsa04360	<i>Axon guidance</i>	122	93	2,915
hsa04530	<i>Tight junction</i>	113	89	2,566
hsa00280	<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	42	40	2,554
hsa00600	<i>Sphingolipid metabolism</i>	34	29	2,538
hsa05213	<i>Endometrial cancer</i>	52	45	2,437
hsa01100	<i>Metabolic pathways</i>	942	776	2,437
hsa05214	<i>Glioma</i>	62	51	2,332
hsa04144	<i>Endocytosis</i>	184	155	2,310

2.3 Aktive zellspezifische Netzwerke

Zur Untersuchung zellspezifischer Netzwerke mit Betrachtung der Richtung der Genaktivitätsänderung zwischen der DuCaP und der PC3 Zelllinie, also induzierend oder supprimierend, wurde die kommerzielle Wissensdatenbank IPA (*Ingenutiy Pathway Analysis*, Ingenuity 2012) verwendet. Dafür wurden zwei Listen erstellt, die zum einen die induzierten Gene und zum anderen die supprimierten Gene mit ihren dazugehörigen Gen-Scores S

beinhalteten. Mit beiden Listen wurde zuerst die in IPA zur Verfügung stehenden *Core* und *Metabolomics* Analysen durchgeführt. Anschließend wurde mit dem *Pathway Build* Werkzeug nach aktiven Netzwerken, sowohl in der DuCaP als auch in der PC3 Zelllinie, gesucht. Weiterhin wurde mit einer Vereinigung dieser beiden Listen eine *Biomarker* Analyse durchgeführt, in der eine Gruppe von 34 Genen als potentielle Marker herausgefiltert werden konnte. Kriterium dieser Suche war, dass diese Gene bereits klinisch oder in Tiermodellen für die Berechnung von Prognosen oder Therapieerfolgswahrscheinlichkeiten Anwendung finden.

Beide IPA Analysen, *Core* und *Metabolomics*, brachten weitgehend übereinstimmende Ergebnisse mit den Untersuchungen der GO- und KEGG-Datenbanken. So wurde ebenfalls durch IPA der bereits bei der KEGG-Datenbankanalyse identifizierte Stoffwechselweg der Biosynthese von O-Glykane als signifikantester Metabolismus ermittelt. Als die am meisten assoziierten, funktionalen Netzwerke wurden Prozesse wie Zelltod, zellulärer Wachstum und Proliferation, Krebs, reaktive Sauerstoffspezies-Neutralisierung oder Zell-Zell-Kommunikation und -interaktion bewertet.

Um nun potentielle Gengruppen für eine Vorhersage der Bestrahlungseffizienz bei Tumoren zu bestimmen, wurde neben der von IPA bereitgestellten *Biomarker* Analyse das manuell anzuwendende *Pathway* Werkzeug genutzt. Dafür wurden nur Gene betrachtet, die nach der Genexpressionsbestimmung entweder eine deutlich erhöhte Aktivität in der strahlungssensitiven DuCaP Zelllinie oder in der strahlungsresistenten PC3 Zelllinie aufwiesen. Beispielhaft sind zwei dieser Netzwerke in den Abbildungen IV.6 und IV.7 dargestellt. Das zentrale Gen im aktivem Netzwerk der DuCaP Zelllinie ist das Protoonkogen *FOS* welches für den Leucin-Zipper DNA-bindenden Transkriptionsfaktor c-FOS translatiert. c-FOS ist bei einer Vielzahl biologischer Prozessen involviert, wonach FOS Proteine als Regulatoren der Zellproliferation, Differenzierung und Transformation angesehen werden. In einigen Fällen ist eine Expression des *FOS* Gens mit dem apoptotischen Zelltod, auch in Prostata-Krebszellen, assoziiert (Ishihara *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Die Expression des *FOS* Gens wird im dargestellten Netzwerk durch die Transkriptionsfaktoren TP53, STAT3, STAT5B und MITF forciert, hingegen *FOS* für die Aktivierung, Expression und Transkription der restlichen Gene mitverantwortlich ist. Darunter fallen die Transkriptionsfaktoren TP53, EGR1 und NFATC1, die Enzyme CASZ1 und IRS2, der G-Protein-gekoppelte Rezeptor FZD6, die Kinase ZAK und die weiteren Proteine ADD2, EMB, CADM1, HOOK1, CELF2 und SERPIN89. Insgesamt besteht das Netzwerk somit aus 18 Genen, die alle in der DuCaP Zelllinie signifikant höher exprimiert sind. Somit könnte es möglich sein, dass die Genexpressionsbestimmung dieser spezifischen Gene eine Aussage über die Strahlungsempfindlichkeit von Tumorzellen erlauben könnte.

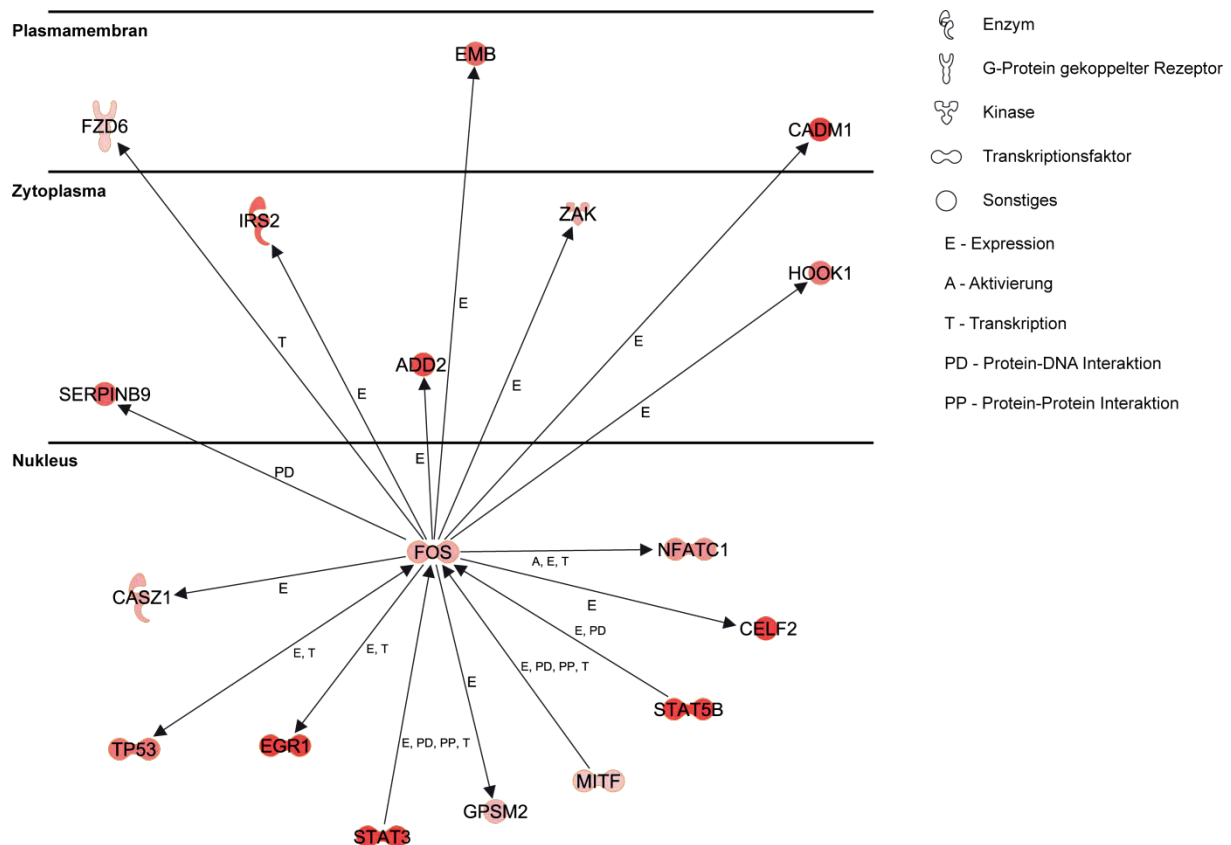


Abb. IV.6 – Darstellung eines DuCaP zellspezifischen, aktiven Netzwerkes. Alle der insgesamt 18 Gene sind in der strahlungssensitiven DuCaP Zelllinie signifikant höher exprimiert als in der strahlungsresistenten PC3 Zelllinie. Das zentrale Gen ist das Protoonkogen *FOS*, welches für den Leucin-Zipper DNA-bindenden Transkriptionsfaktor c-FOS translatiert. Dieses aktiviert wiederum die Expression der Gene für die Proteine TP53, EGR1, NFATC1, CASZ1, IRS2, FZD6, ZAK, ADD2, EMB, CADM1, HOOK1, CELF2 und SERPIN89. Für die Expression von *FOS* hingegen ist das sich gegenseitig beeinflussende Gen des Transkriptionsfaktors TP53 sowie STAT3, STAT5B und MIF zuständig. Die Stärke der Rotfärbung korreliert mit dem errechneten Gen-Scores *S* (Ingenuity 2012).

Bedeutend interessanter für die Vorhersage einer Tumorresistenz gegenüber einer medizinischen Bestrahlung sind aktive Netzwerke von interagierenden Genen bzw. dessen Genprodukten in der strahlungsresistenten PC3 Zelllinie. Exemplarisch ist in der Abbildung IV.7 ein solches Netzwerk dargestellt. Hierbei ist das Protoonkogen *JUN*, welches zur Klasse der Transkriptionsfaktoren gehört, das zentrale Element. *JUN* wird in diesem Netzwerk durch die Kinase *GSK3B* phosphoryliert und mit Hilfe der Aktivierung durch den Liganden-induzierten Transkriptionsfaktor *AHR* und dem DNA-bindenden Faktor *FBXW7* exprimiert. *JUN* wiederum aktiviert die Expression bzw. interagiert mit den Genprodukten von *FTH1*, *GJA1*, *WNT5A*, *IL7R*, *LPAR1*, *IGFBP4*, *LTBP1*, *ITGB8*, *TMSB10/TMSB4X*, *CCND1* und *HES1*. Insgesamt liegen somit 15 aktive Gene in diesem Netzwerk vor, die zeitgleich in der strahlungssensitiveren DuCaP Zelllinie signifikant niedriger exprimiert sind. Somit könnte es möglich sein, dass die Ermittlung der Expression dieser spezifischen Gene für die Bestimmung der Strahlungsresistenz von Tumorzellen aussagekräftig sein könnte.

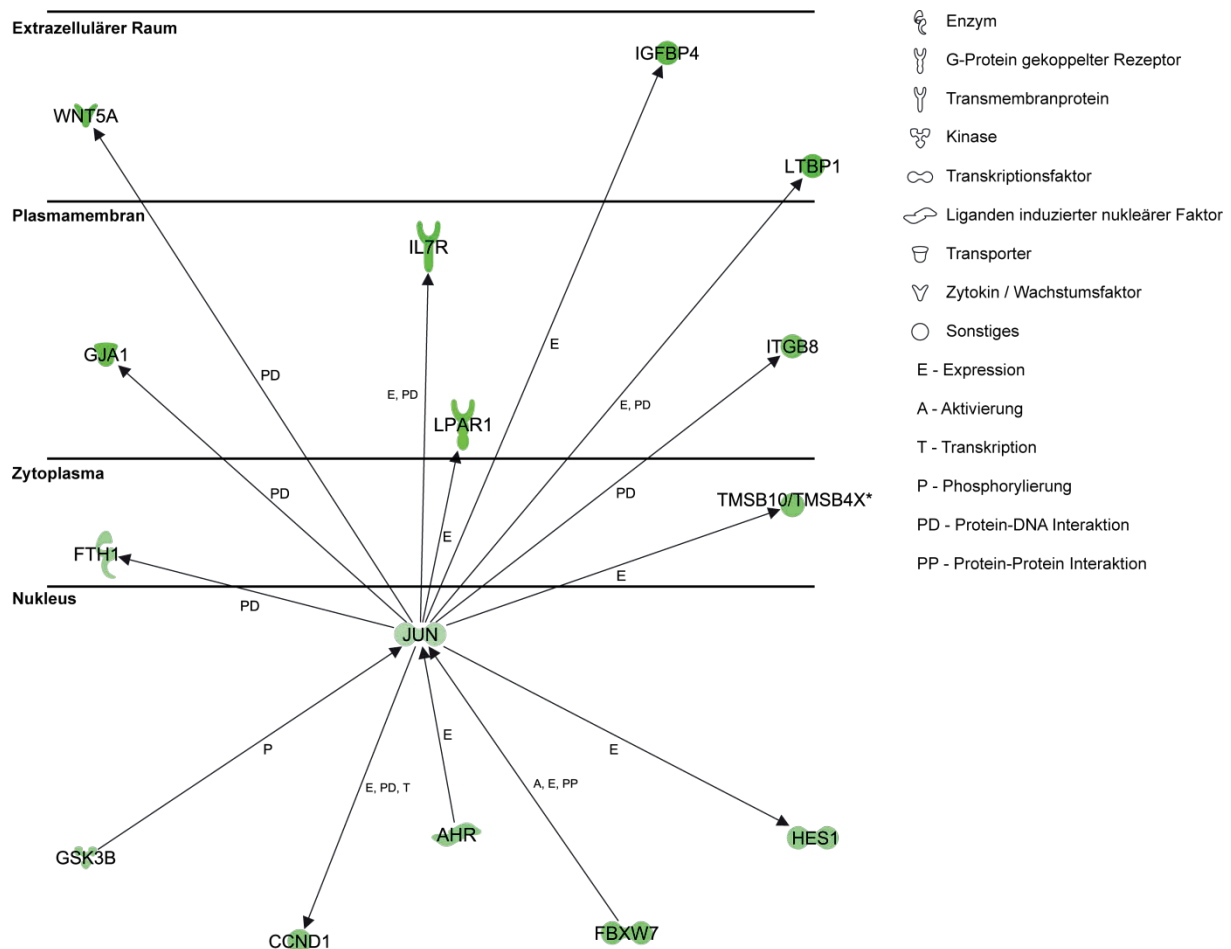


Abb. IV.7 – Darstellung eines PC3 zellspezifischen, aktiven Netzwerkes. Alle der insgesamt 15 Gene in diesem Netzwerk sind in der strahlungsresistenten PC3 Zelllinie signifikant höher exprimiert als in der strahlungssensitiven DuCaP Zelllinie. Als zentrales Gen fungiert JUN, welches als Transkriptionsfaktor die Expression von CCND1, HES1, FTH1, GJA1, WNT5A, IL7R, LPAR1, IGFBP4, LTBP1, ITGB8 und TMSB10/TMSB4X* forciert bzw. mit den Genprodukten interagiert. Die Genprodukte von AHR und FBXW7 hingegen aktivieren die Expression von JUN, während die Kinase GSK3B JUN phosphoryliert. Die Stärke der Grünfärbung korreliert mit den errechneten Gen-Scores S (Ingenuity 2012).

3 Transkriptomweite Erfassung der Genexpression

3.1 Zeitabhängige Regulation der globalen Genexpression

Um die transkriptomweite Dynamik der Genexpressionsveränderung einer strahlungsresistenten Prostata-Krebszelllinie nach medizinischer Bestrahlung zu studieren, wurde die PC3 Zelllinie direkt vor und 7 Zeitpunkte (siehe Abschnitt II.2.1.6) nach der Bestrahlung auf ihre Genaktivität mittels einer SOLiD™ 4 Hochdurchsatz-Sequenzierung analysiert. Die Zeitpunkte wurden dabei exponentiell auseinanderliegend gewählt, um sowohl eine kurzfristige, Minuten bis Stunden, als auch eine mittelfristige, 1 bis 2 Tage, Zeitdauer für die zelluläre Antwort zu überbrücken. Ziel der Untersuchung ist die Aufklärung

der molekularen Schutzmechanismen von strahlungsresistenten Tumorzellen. Um möglichst eine geringe Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen zu erhalten, wurden die Zellen mit einer geringen Dosis von 1 Gy bestrahlt. Das Bestrahlungsexperiment wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten vollzogen. Die PC3 Zelllinie wurde zuvor mit 5 Gy bestrahlt und deren expandierte Überlebensfraktion wurde für dieses Zeitreihenexperiment verwendet.

In Abbildung IV.8 ist eine Zusammenfassung des transkriptomweiten Genexpressionsverhalten über die 8 Zeitpunkte des Bestrahlungsexperimentes dargestellt. Betrachtet man die Summe der absoluten Gen-Scores S , was gleichzusetzen ist mit der Stärke und Anzahl induzierter (grün) und supprimierter (rot) Gene, zwischen den benachbarten Zeitpunkten (Abb. IV.8 A) wird deutlich, dass am Anfang der Zeitreihe im Absoluten eine mittlere Veränderung der Genexpression vorliegt, die bis zum Zeitpunkt 5 (04:38) sinkt und darauffolgend stark ansteigt. Besonders auffällig ist die fast ausschließliche Suppression (rot) von Genen direkt nach der Bestrahlung (00:00 - 00:30), was sich bei den drei nachfolgenden Zeitpunktvergleichen (00:30 - 01:03, 01:03 - 02:12, 02:12 - 04:38) durch eine klare Induktion (grün) von fast allen verändert exprimierten Genen genau andersrum darstellt. In den nachfolgenden Zeitpunkten steigt die absolute Genexpression wieder deutlich an, wobei hier die Suppression von Genen bei 04:38 - 09:43 und 20:25 - 42:53 klar über denen der induzierten Genen liegt. Beim Zeitpunktvergleich 09:43 - 20:25 sind annähernd gleich viele hoch- und runterregulierte Gene zu beobachten. Vergleicht man die absolute Genexpressionsänderung zwischen dem ersten Zeitpunkt (00:00) und dem letzten Zeitpunkt (42:53) erhält man den höchsten Wert, was dafür spricht, dass sich die globale Genexpression innerhalb von ca. 43 h nach der Bestrahlung enorm geändert hat. Demnach sind innerhalb dieses Zeitraumes ca. 1/3 der Gene hoch- und 2/3 runterreguliert worden. Da zwischen den beiden letzten Zeitpunkten (20:25 - 42:53) die deutlichste Veränderung zwischen zwei benachbarten Zeitpunkten vorliegt, scheinen die meisten dieser Genexpressionsveränderungen nach ca. 20 h einzutreten. In Abbildung IV.8 B sind exemplarisch die Genexpressionsverläufe über alle Zeitpunkte von 14 stark veränderten (blau) und 7 gleichbleibenden Genen (schwarz) dargestellt. Dabei wird erkennbar, dass die größten Veränderungen der Genexpression, wie nach Abbildung IV.8 A bereits zu erwarten ist, zwischen den letzten beiden Zeitpunkten (20:25, 42:53) vorherrschen.

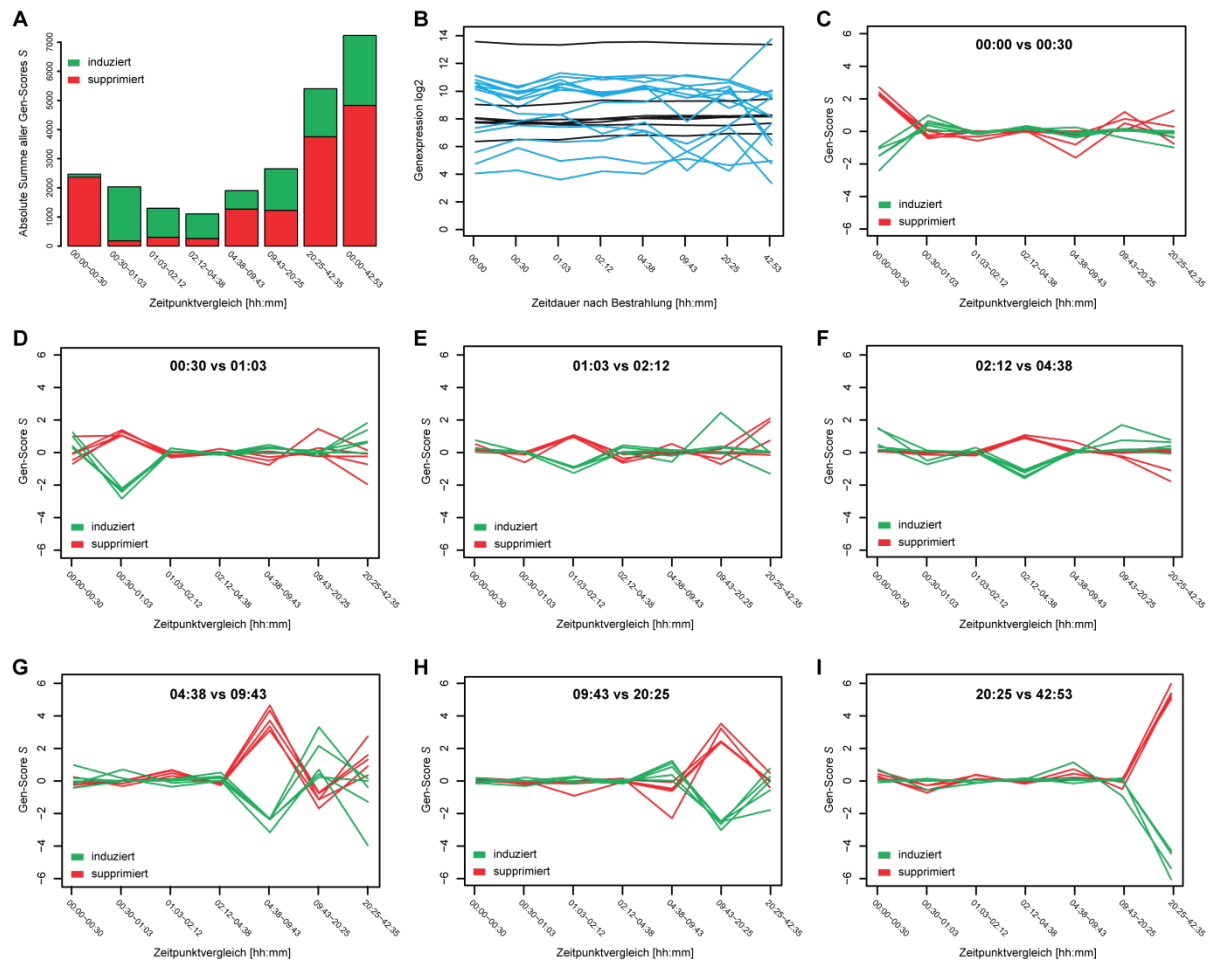


Abb. IV.8 – Transkriptomweites Genexpressionsverhalten der PC3 Zelllinie nach medizinischer Bestrahlung mit 1 Gy. **A)** Übersicht der absoluten Genexpressionsveränderung zwischen den Zeitpunkten. Während zu Beginn eine mittlere Veränderung vorliegt, sinkt diese bis zum Zeitpunkt 04:38 um folgend pro Zeitpunktvergleich wieder deutlich anzusteigen. Auffällig ist die kurz nach der Bestrahlung (00:30) fast ausschließliche Suppression (rot) von Genen, während bei den drei darauffolgenden Zeitpunktvergleichen eine überwiegende Induktion (grün) der globalen Genexpression wahrnehmbar ist. Während nach 20:25 die Induktion und Suppression von Gene sich die Waage hält, ist bei 09:38 und 42:53 eine ca. 2/3 höhere Suppression zu erkennen. Betrachtet man die Genexpression vom Ausgangsstadium bis zur letzten Messung nach 42:53 fällt ein massiver Genexpressionsunterschied auf, in dem wiederum 2/3 der Gene supprimiert sind. **B)** Exemplarische Darstellung von 14 unterschiedlich exprimierten Genen (blau) und 7 annähernd gleichbleibend exprimierten Genen (schwarz) über alle Zeitpunkte. Die größten Expressionsunterschiede sind in den letzten Zeitpunkten festzustellen. **C – I)** Darstellung der fünf am meisten induzierten (grün) und supprimierten (rot) Gene für jeden Zeitpunktvergleich. Die Gen-Score-Werte liegen bei den ersten beiden Zeitpunktvergleichen bei ca. ± 2 , sinken dann bis zum Zeitpunkt 04:38 auf ca. ± 1 , um bis zum letzten Zeitpunktvergleich auf bis zu ± 6 zu steigen. Insgesamt ist eine Ähnlichkeit zum Verlauf der absoluten Genexpressionsverhalten aus (A) wahrnehmbar.

Die Abbildungen IV.8 C - I zeigen für jeden benachbarten Zeitvergleich die jeweils fünf am meisten induzierten (schwarz) und supprimierten (rot) Gene mit ihrem Expressionsverlauf. Aufgetragen ist dabei der Gen-Score S, der den FC- und P-Wert, also ein Maß für die Expressionsänderung eines Gens, nach Gleichung III.22 vereinigt. Es ist eine Übereinstimmung der Stärke und zeitlichen Änderung der Expression dieser Gene mit der absoluten transkriptomweiten Expressionsveränderung (Abb. IV.8 A) wahrnehmbar.

Demnach liegt für diese 10 Gene bei den ersten beiden Zeitpunktvergleichen eine mittlere Veränderung vor, mit einem Gen-Score S von ca. ± 2 , die nachfolgend bis zum Zeitpunktvergleich 02:12 - 04:38 sinkt (Gen-Score S ca. ± 1) und danach bis zum Ende der Zeitdauer mit einem Gen-Score S von bis zu ± 6 deutlich ansteigt.

Eine Übersicht der 30 am stärksten verändert exprimierten Gene zwischen den einzelnen Zeitpunktvergleichen und über alle Zeitpunkte ist als Heatmap-Darstellung in Abbildung IV.9 einsehbar. Die Berechnung der normierten Gen-Score-Werte erfolgte gemäß nach Abschnitt III.3.4. Dabei signalisiert rot eine Supprimierung, grün eine Aktivierung und schwarz eine gleichbleibende Expression der Gene. Betrachtet man die Gene mit der unterschiedlichsten Genexpression über alle Zeitpunkte ist erkennbar, dass sich die Gene generell zu jedem Zeitpunkt in ihrer Expression deutlich ändern, wobei einige im Wechsel, also pro Zeitpunkt, auf- und ab-reguliert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Heatmap-Abbildungen der am unterschiedlichsten exprimierten Gene zwischen den benachbarten Zeitpunkten eine klare Intensität von grün und rot in der jeweiligen Spalte des entsprechenden Zeitpunktvergleiches. Ebenso werden erwartungsgemäß nach Abbildung IV.8 A die Verhältnisse zwischen induzierten und supprimierten Genen wiedergespiegelt. Auch wird häufig deutlich, dass nach einer Aktivierung oder Inaktivierung eines Gens dieses im nächsten Zeitpunktvergleich entweder leicht entgegengesetzt oder gleichbleibend (schwarz) exprimiert wird. Schlussfolgernd und übereinstimmend mit den Beobachtungen aus den Abbildung IV.8 und IV.9 ist eine zeitabhängige Expression spezifischer Gene feststellbar.

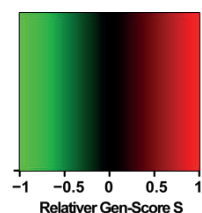
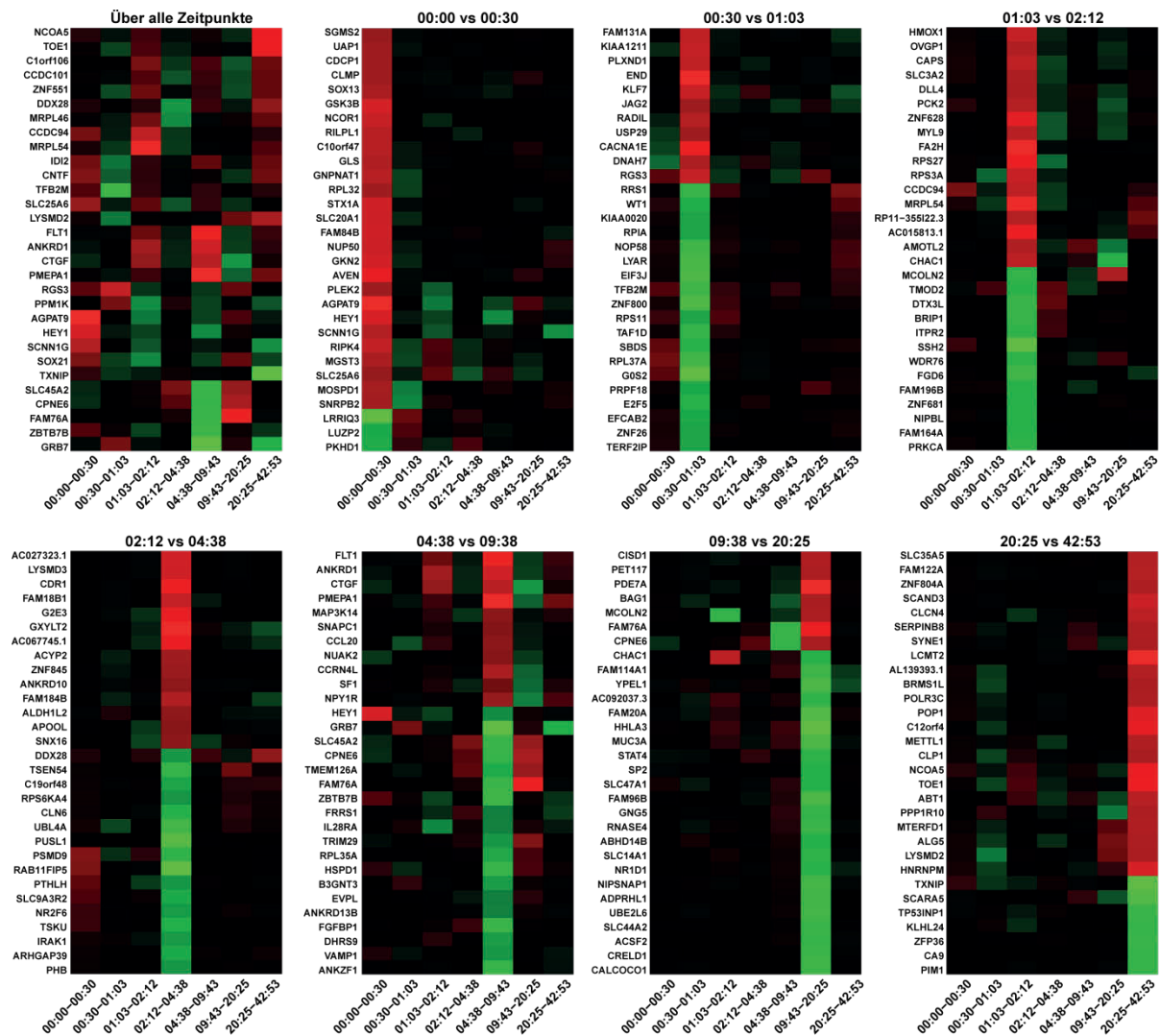


Abb. IV.9 – Genexpressionsprofil der 30 am deutlichsten differentiell exprimierten Gene pro Zeitpunktvergleich und über alle Zeitpunkte. Während die am unterschiedlichsten exprimierten Gene über alle Zeitpunkte generell zu jedem Zeitpunkt hoch- und runterreguliert werden, zeigen die differentiell exprimierten Gene pro Zeitpunktvergleich eine spezifische Expression, wobei diese Expression nachfolgend zumeist leicht entgegengesetzt oder konstant (schwarz) bleibt. Weiterhin wird das Verhältnis von induzierten (grün) und supprimierten (rot) Genen, wie bereits durch Abbildung IV.8 A zu erwarten war, wiedergespiegelt. Auffällig dabei ist die extreme Inaktivierung der Mehrzahl an Genen kurz nach der Bestrahlung, zwischen den Zeitpunkten 00:00 und 00:30.

3.2 Netzwerkspezifische Genexpression

Für die Ermittlung involvierter Netzwerke als zelluläre Antwort auf ionisierende Strahlung und zur Identifikation spezifischer Schutzmechanismen strahlungsresistenter Zellen wurde mit den Netzwerken der Datenbanken KEGG und GO ein Netzwerk-FC F_w nach Gleichung III.32 berechnet. Zur Filterung und Darstellung der am stärksten involvierten Netzwerke wurde der Netzwerk-FC für jeden Zeitpunktvergleich nach der Gleichung III.35 bzw. III.36 normiert. Eine Übersicht der 20 aktivsten Netzwerke über den gesamten Zeitbereich ist als Heatmap-Darstellung in Abbildung IV.10 einsehbar. Demnach besagt eine grüne Färbung eine

Aktivierung, eine rote Färbung eine Inaktivierung und eine schwarze Färbung eine unveränderte Aktivität des jeweiligen Netzwerkes.

Übereinstimmend mit zu erwartenden krebsrelevanten KEGG-Netzwerken, wie bspw. *p53 signaling pathway* oder *Pathways in cancer*, sind auch Reparaturnetzwerke wie die HR (*Homologous recombination*) oder der BER-DNA-Reparaturmechanismus (*Base excision repair*) aufgelistet. Interessanterweise konnte auch hier, wie schon der bei Identifikation von Biomarkern zur Vorhersage der Strahlungsempfindlichkeit von Tumorzellen (Abschnitt IV.2.2), der Biosyntheseweg von O-Glykanen als ein relevantes Netzwerk ermittelt werden. Weiterhin ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Ankurbelung der Genexpression über Signaltransduktionswege wie die MAP-Kinase- oder Jak-STAT-Netzwerke festzuhalten. Auffällig ist, dass im ersten und letzten Zeitraum alle Netzwerke, mit Ausnahme der Biogenese von Ribosomen (*Ribosome biogenesis in eukaryotes*), runterreguliert vorliegen und die aktiven Phasen dieser KEGG-Netzwerke zwei- bis dreimal in den Zwischenzeiträumen fallen.

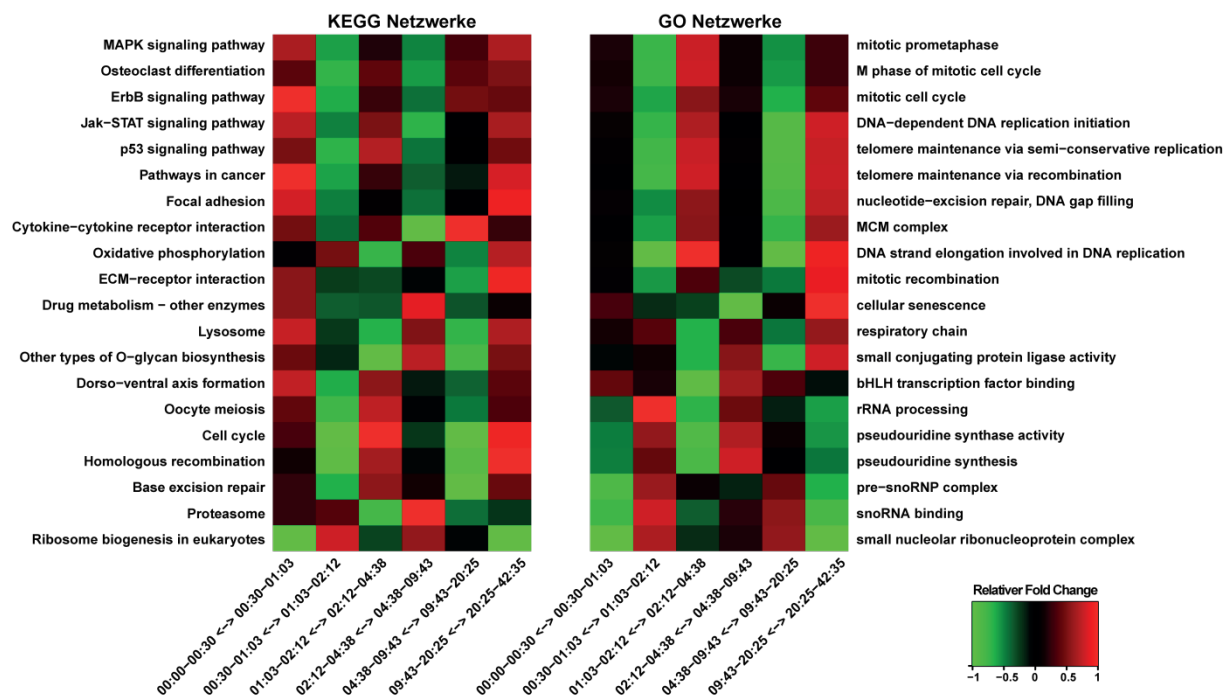


Abb. IV.10 – Profil der 20 aktivsten KEGG- (links) und GO-Netzwerke (rechts) über den gesamten Zeitraum. Beide Netzwerk-Datenbanken weisen die DNA-Reparaturmechanismen der HR und der BER als gemeinsame Netzwerke auf. Neben krebsrelevanten KEGG-Netzwerken fallen die p53-, ErbB-, MAPK- und Jak-STAT-Signaltransduktionswege auf, die eine Auswirkung auf die globalen Genexpression haben. Bei den GO-Netzwerken sind neben DNA-Reparatur- und Replikationsmechanismen die Instandsetzung von Telomeren, snoRNA Vorgänge sowie ribosomale und zellzykluspezifische Prozesse zu finden. Beide Heatmap-Darstellungen zeigen eine abwechselnde Aktivierung (grün) und Inaktivierung (rot) der Netzwerke über den gesamten Zeitraum.

Bei Betrachtung der aktivsten GO-Netzwerke über alle Zeiträume fallen deutlich verschiedene Instandsetzungs- und Reparatur- sowie zellzyklusrelevante Netzwerke ins

Auge. Dabei stehen insbesondere Telomer-Instandsetzungen (*telomere maintenance*), DNA-Reparatur und -Replikationsmechanismen, snoRNA (*small nucleolar RNAs*) und ribosomale Prozesse sowie zellzyklusspezifische Abläufe im Vordergrund. Auch hier werden die entsprechenden GO-Netzwerke innerhalb der kompletten Zeitperiode in der Regel zwei- bis dreimal deutlich aktiviert und inaktiviert.

3.3 Zyklische Expressionsveränderungen spezifischer Netzwerke

Wichtige Stressantworten einer Zelle auf hochenergetischer Bestrahlung sind insbesondere die Zellzyklus-Arretierung, die Aktivierung von DNA-Reparatursignalwegen, die Genexpression von antioxidativen Proteinen und die Einleitung der Apoptose (Amundson *et al.*, 2003). Zur Überprüfung der Veränderungen strahlenbiologisch relevanter Netzwerke wurden spezifische GO-Netzwerke auf ihre Aktivität untersucht. Nach zeitlichen Aspekten sollten zunächst Netzwerke in den Zellen aktiviert werden, die eine Antwort auf oxidativen Stress und daraus resultierenden Zellschädigungen beinhalten. In Abbildung IV.11 sind die dafür vorhandenen GO-Kategorien mit ihren Aktivitätsprofilen dargestellt. Grün symbolisiert eine Aktivierung, rot eine Inaktivierung und schwarz eine unveränderte Aktivität des jeweiligen GO-Netzwerkes. Im ersten Zeitabschnitt ist nur die GO-Kategorie der Detektion und Antwort auf DNA-Schäden hochreguliert, während alle anderen Stress- und Schadenskategorien runterreguliert vorliegen. Im anschließenden, zweiten Zeitpunktvergleich werden alle anderen Stress- und Schadensnetzwerke aktiviert. Die Stresskategorien steigern sich in ihrer Aktivität bis ca. 20 h nach der Bestrahlung kontinuierlich, bis nach ca. 42 h ihre Aktivität heruntergefahren wird. Die GO-Kategorien der DNA-Schädigungen verhalten sich überwiegend abwechselnd hoch- und runterreguliert. Deutlich wird auch, dass zeitlich dazu Zellzyklus-Checkpoints und -Arretierung, Signaltransduktionswege (p53, MAPK-Kaskade), Protein-Phosphorylierungen und auch die Einleitung der Apoptose geschieht. Im letzten Zeitraum sind die GO-Netzwerke für die Einleitung der Apoptose, für die Regulation der Transkription als Antwort auf oxidativen Stress, für den Checkpoint des G2/M Zellzyklus-Überganges nach DNA-Schädigung und für die Detektion von DNA-Schäden aktiv. Definitiv ist ein zeitliches Ansprechen der PC3 Zelllinie nach der medizinischen Bestrahlung mit 1 Gy wahrzunehmen.

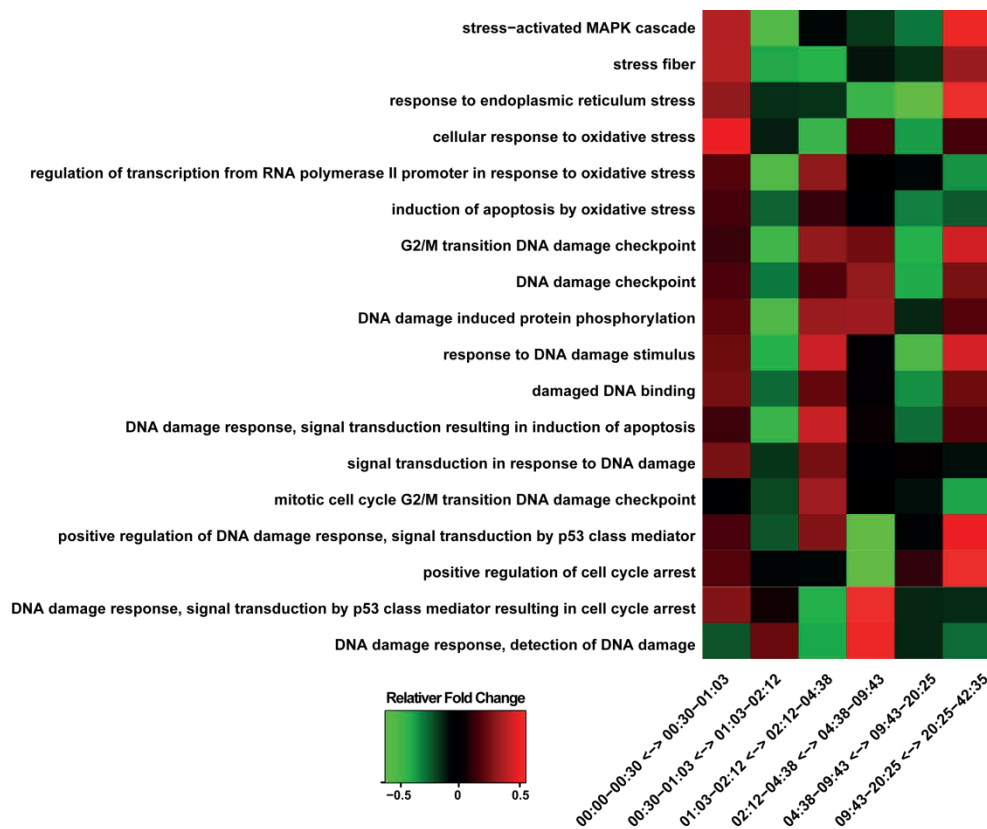


Abb. IV.11 – Profil der Aktivitätsänderungen der GO-Kategorien für Schädigungen (*damage*) und zellulärer Antworten (*response*) auf Stress. Kurz nach der Bestrahlung findet die Antwort und Detektion von DNA-Schädigungen statt. Im zweiten Zeitraum werden Netzwerke für die Signaltransduktionswege von p53 und der MAPK Kaskade, Checkpoints und Arretierung des Zellzyklus, Protein-Phosphorylierungen, die Einleitung der Apoptose und diverse Stressantworten aktiviert (grün). Während die Stressnetzwerke bis zum letzten Zeitraum, ca. 20 h, aktiv bleiben, werden die anderen GO-Netzwerke runterreguliert (rot), um im vorletzten Zeitabschnitt, zwischen ca. 9 h und 20 h, wieder hochreguliert (grün) zu werden. Im abschließenden Zeitraum werden die GO-Netzwerke für die Einleitung der Apoptose, für die Regulation der Transkription als Antwort auf oxidativen Stress, für den Checkpoint des G2/M Zellzyklus-Überganges nach DNA-Schädigung und für die Detektion von DNA-Schäden weiter hochreguliert (grün), während die restlichen GO-Netzwerke runterreguliert sind (rot).

Nachdem die Zellen mit einer Antwort auf den oxidativen Stress und den daraus resultierenden DNA-Schäden reagiert haben, folgt theoretisch die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen. Die oxidativen Schädigungen zellulärer Bestandteile und deren Reparatur treten dabei in den Vordergrund, da diese Netzwerke als geeignete Ziele medikamentöser Behandlungen zur Steigerung der Effizienz einer medizinischen Bestrahlung dienen könnten. Betrachtet man die vorhandenen GO-DNA-Reparaturkategorien und ihr Aktivitätsprofil fällt auf, dass fast alle DNA-Reparaturmechanismen im Zeitraum zwischen 1 h - 2 h und später ein zweites Mal zwischen 9 h - 20 h aktiviert werden, während sie in der Anfang-, Zwischen- und Endphase runterreguliert sind. Zudem sind alle bekannten GO-DNA-Reparaturnetzwerke aktiv, was dafür spricht, dass alle möglichen DNA-Schädigungen durch die Bestrahlung hervorgerufen wurden. Demzufolge werden DNA-Doppelstrangbrüche durch HR und NHEJ, DNA-Einzel-

und Mehrfach-Basenschäden durch die BER und NER Mechanismen und des *Gap Fillings* behoben. Die Abbildung IV.12 zeigt alle vorhandenen *repair* Kategorien der GO-Datenbank und ihr Aktivitätsänderungen über die gesamte Zeitdauer. Demnach besagt eine grüne Färbung eine Aktivierung, eine rote Färbung eine Inaktivierung und eine schwarze Färbung eine unveränderte Aktivität zwischen den Zeitabschnitten für die jeweilige GO-Kategorie.

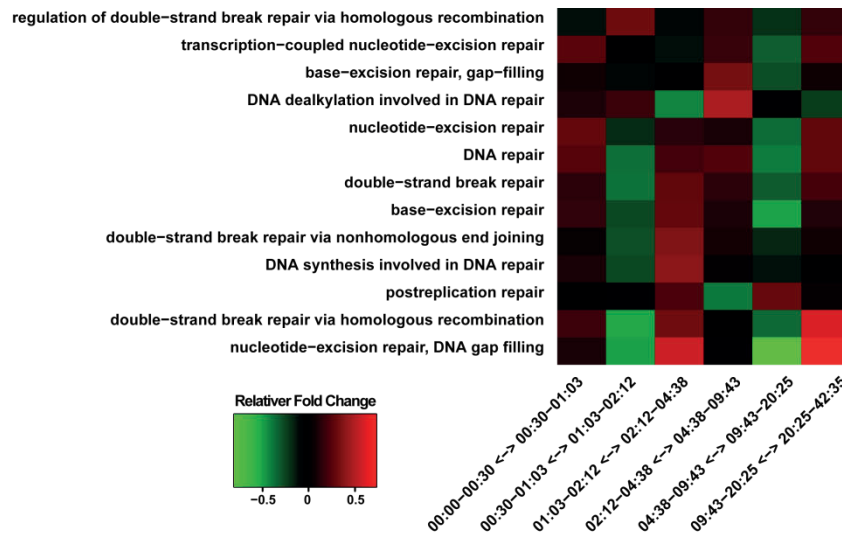


Abb. IV.12 – Profil der Aktivitätsänderungen der GO-Kategorien für DNA-Reparaturen. Im Zeitraum zwischen 1 h - 2 h und 9 h - 20 h kommt es zur Aktivierung einer Vielzahl an DNA-Reparaturmechanismen. Insbesondere der BER und NER Mechanismus, das *Gap Filling*, die HR und das NHEJ sind dabei für die Beseitigung der unterschiedlichen DNA-Schädigungen zuständig (grün - aktivierend, rot - inaktivierend, schwarz - unverändert)

Neben dem Erkennen und Beseitigen von zellulären Schäden ist auch der induzierte Zelltod von Interesse. Insbesondere stellt sich die Frage, wie stark sich der Zelltod bei einer Energiedosis von 1 Gy darstellt und ob anti-apoptotische Prozesse initiiert werden, die dem Zelltod entgegenwirken. Solche krebsbekannten Charakteristika sind auch von hohem Interesse für die Effizienzsteigerung einer Strahlentherapie durch den gezielten Einsatz medikamentöser Substanzen. Zur Untersuchung der zeitlichen Dynamik apoptotischer und zelltodeinleitender Netzwerkaktivitäten nach medizinischer Bestrahlung der PC3-Zelllinie wurden entsprechende GO-Kategorien analysiert.

Zu Beginn der Zeitreihe liegt die Regulation anti-apoptotischer Prozesse gefolgt vom programmierten Zelltod am Aktivsten vor, während die restlichen GO-Kategorien runterreguliert oder unverändert auftreten. Unterdessen kommt es im zweiten Zeitabschnitt zur Hochregulierung der restlichen Netzwerke. Insbesondere die Induktion der Apoptose durch DNA-Schädigung und der dadurch resultierende zelluläre Abbau weisen die deutlichsten Veränderungen auf. Aber auch die durch den oxidativen Stress induzierte Apoptose, die positive Regulation des programmierten Zelltodes und auch der CD95-zelltodinduzierende Signalkomplex weisen Aktivitätserhöhungen auf. All diese Netzwerke unterliegen in den folgenden Zeitabschnitten höherer und niedriger Aktivität, wobei zum Ende der Zeitreihe speziell die Kategorien der Todesrezeptorbindung (*death receptor binding*, *CD95 death-inducing signaling complex*) und des autophagischen Zelltodes

(*autophagic cell death*) am meisten aktiviert werden. Interessant ist auch die im ersten, vierten und letzten Zeitabschnitt erhöhte Aktivität der Regulation der Anti-Apoptose (*regulation of anti-apoptosis*), was dafür spricht, dass sowohl Zellen durch die Schädigungen der Bestrahlung zu einem in den Zelltod geführt werden, während bei einem anderen Teil der Zellpopulation gegen diesen apoptotischen Trend gearbeitet wird. Charakteristisch für ionisierende Bestrahlung und deren schädigenden Zellauswirkungen werden eine Reihe von apoptotischen und zelltodeinleitenden Prozesse induziert.

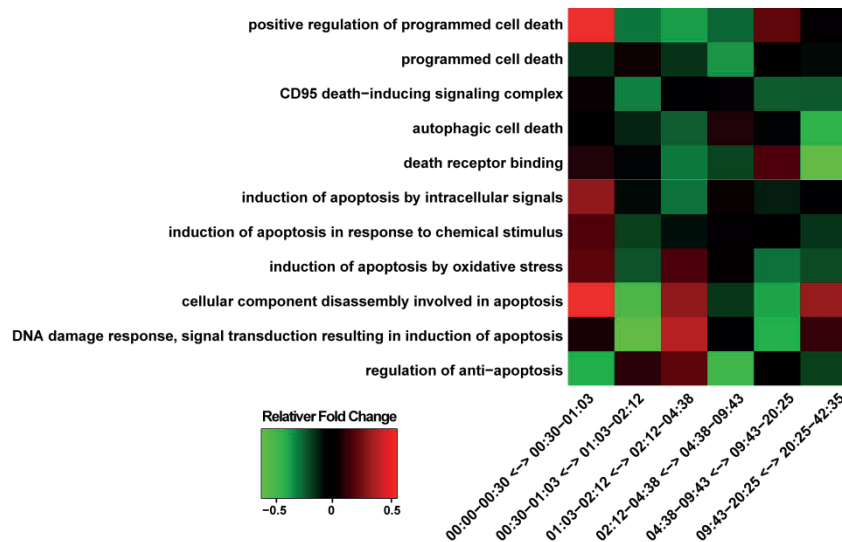


Abb. IV.13 – Profil der Aktivitätsänderungen der GO-Netzwerke für die Apoptose und dem Zelltod (*cell death*). Die ionisierende Bestrahlung hat die Aktivierung (grün) einer Reihe von apoptotischen und zelltodeinleitenden Prozesse über den gesamten Zeitraum zur Folge. Interessanterweise werden auch anti-apoptotische Maßnahmen aufgegriffen, was dafür spricht dass ein Teil der Zellpopulation den Prozess des Zelltodes entgegenwirkt (grün - aktivierend, rot - inaktivierend, schwarz, unverändert).

3.4 Aktiver NRF2-Signalweg wirkt oxidativen Stress entgegen

Die Kapazität von Zellen den Prozess der Homöostase während der Einwirkung von oxidativem Stress aufrechtzuhalten, ist abhängig von der Induktion und der Aktivierung schützender Enzyme (Kang *et al.*, 2005). NRF2 (*Nuclear-factor-E2-related factor*) ist dabei ein Schlüsseltranskriptionsfaktor zur Aktivierung einer Vielzahl an anti-oxidativen Genen durch Bindung an das *anti-oxidative response element* (ARE) im Promotorbereich dieser Gene (Singh *et al.*, 2010). Durch die Bestrahlung der Zellen und der damit verbundenen oxidativen Stresseinwirkung kommt es zur einer schnellen Aktivierung von NRF2 und der Hochregulation diverser anti-oxidativer und schützender Gene. Die Abbildung IV.14 zeigt das NRF2-Netzwerk mit allen beteiligten Genen und deren Expression im Zeitpunktvergleich 00:30 - 01:03 sowie die Aktivitätsänderung pro Zeitpunkt für die beteiligten Gene als Heatmap. Dabei signalisiert grün eine Aktivierung, rot eine Inhibierung und schwarz eine unveränderte Expression. Während im ersten Zeitabschnitt, zwischen 00:00 - 00:30, alle Gene noch runterreguliert vorliegen, kommt es im zweiten Zeitabschnitt bereits zur Expression von NRF2 sowie einer Vielzahl von schützenden Genen.

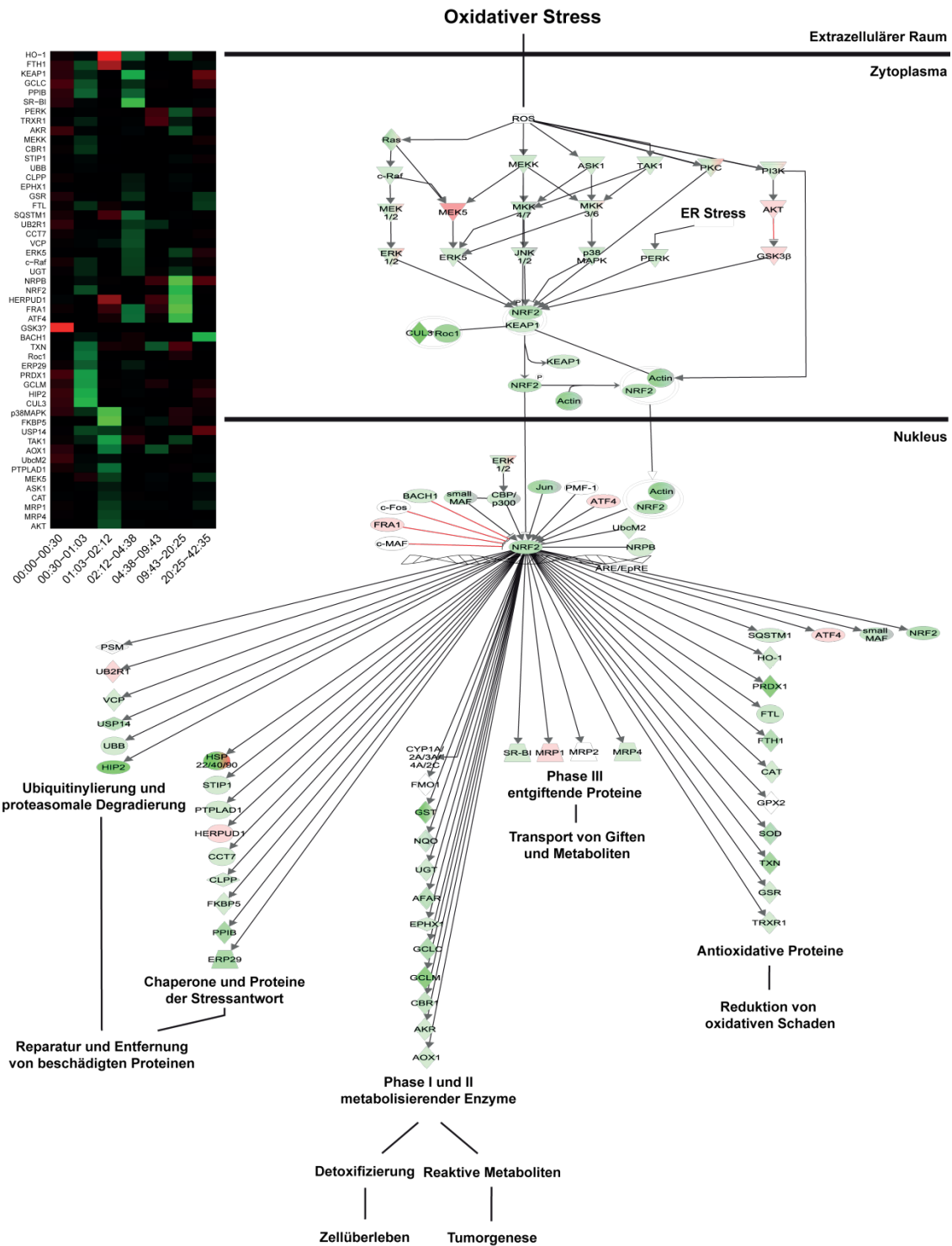


Abb. IV.14 – Der NRF2-Signalweg nach oxidativer Stresseinwirkung für den Zeitpunktvergleich 00:30 - 01:03 und dem Expressionsverhalten der mitwirkenden Gene . Dargestellt ist zum einen das Aktivitätsprofil der beteiligten Genen über die Zeitpunkte als Heatmap (links) und zum anderen das induzierte NRF2-Netzwerk und die darauffolgende Aktivierung von diversen schützenden Proteinen. Bereits nach kurzer Zeit sind fast alle NRF2-positiv wirkenden Gene hochreguliert (grün), wobei das komplette Netzwerk über die gesamte Zeitdauer überwiegend aktiv vorliegt. Gene die eine inhibierende Wirkung auf NRF2 haben (rote Linien) sind zudem entweder gar nicht exprimiert (weiß) oder runterreguliert (rot). Als Folge der Aktivierung des NRF2-Netzwerkes kommt es zur Hochregulierung zellüberlebender Prozesse wie bspw. die Reparatur oder Degradierung geschädigter Proteine, die Detoxifizierung und der Abtransport giftiger Metaboliten oder die Neutralisierung oxidativer Stoffe durch die Expression von anti-oxidativen Proteinen (Ingenuity 2012).

Interessanterweise sind in diesem Zeitraum die meisten inhibierenden Gene für die Expression von *NRF2* (rote Linien) entweder unverändert exprimiert oder runterreguliert. In den nachfolgenden Zeiträumen liegt eine eher wechselhafte Expression der zugrundeliegenden Gene vor. Auffällig ist, dass zwischen 09:43 und 20:25 *NRF2* die höchste Expression von allen Zeitpunkten vorliegt. Die Daten suggerieren, dass ausgehend vom Transkriptionsfaktor *NRF2* diverse schützende Prozesse aktiviert werden, die das Zellüberleben bei enormer Stresseinwirkung, wie sie bei einer medizinischen Bestrahlung auftritt, ermöglichen. Darunter fallen insbesondere die proteasomale Degradierung oder Reparatur von geschädigten Proteinen, die Reduktion von Oxidantien durch die Expression anti-oxidativer Proteine sowie die Detoxifizierung und der Abtransport reaktiver Metaboliten.

3.5 Schnelle Reparatur von DNA-Schäden

Zur Bewertung der zellulären Reaktion auf die durch ionisierende Strahlung entstandenen DNA-Schädigungen wurden im Folgenden die gängigen DNA-Reparaturmechanismen bei Basenschäden, DNA-Einstrangbrüchen und DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht. Dazu wurden die Signalwege des *Mismatch Repairs* (MMR), des *Strang-Exzision Repairs* (NER), der *homologen Rekombination* (HR) und des *nicht-homologen End Joinings* (NHEJ) sowie die Expressionen der jeweils beteiligten Gene über den gesamten Zeitraum betrachtet. Die Genexpressionsverläufe sind innerhalb der entsprechenden DNA-Reparaturnetzwerke als Heatmap-Darstellung erkennbar, wobei grün für eine Aktivierung, rot für eine Inaktivierung und schwarz für eine gleichbleibende Expression stehen. Besonders auffällig ist, dass die dargestellten DNA-Reparaturmechanismen hauptsächlich ab ca. 1 h nach der Bestrahlung aktiviert werden und die Vorgänge der Reparaturen nach ca. 10 h abgeschlossen sind. Wie bereits bei all den anderen untersuchten Gennetzwerken und wie laut Abbildung IV.8 A zu erwarten ist, liegen auch hier bei allen DNA-Reparaturnetzwerken im ersten Zeitabschnitt (00:00 - 00:30) alle Gene runterreguliert vor. Die Abbildung IV.15 stellt die ablaufenden, internen Prozesse des MMR DNA-Reparaturmechanismus als Signalweg für den Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 dar. Bereits zwischen dem Zeitpunkt 00:30 - 01:03 kommt er zur leichten Expressionssteigerung der Mehrzahl an Genen, wie bspw. *PCNA*, *PMS2* oder *MSH6*. Im zweiten Zeitabschnitt, 01:03 - 02:12, sind alle Gene mit ihrem Maximum exprimiert, um dann überwiegend gleichbleibend bis ca. 20 h nach der Bestrahlung aktiv zu bleiben. Zwischen den Zeitpunkten 09:43 und 20:25 kommt es dann zur langsamen Runterregulierung des gesamten Netzwerkes.

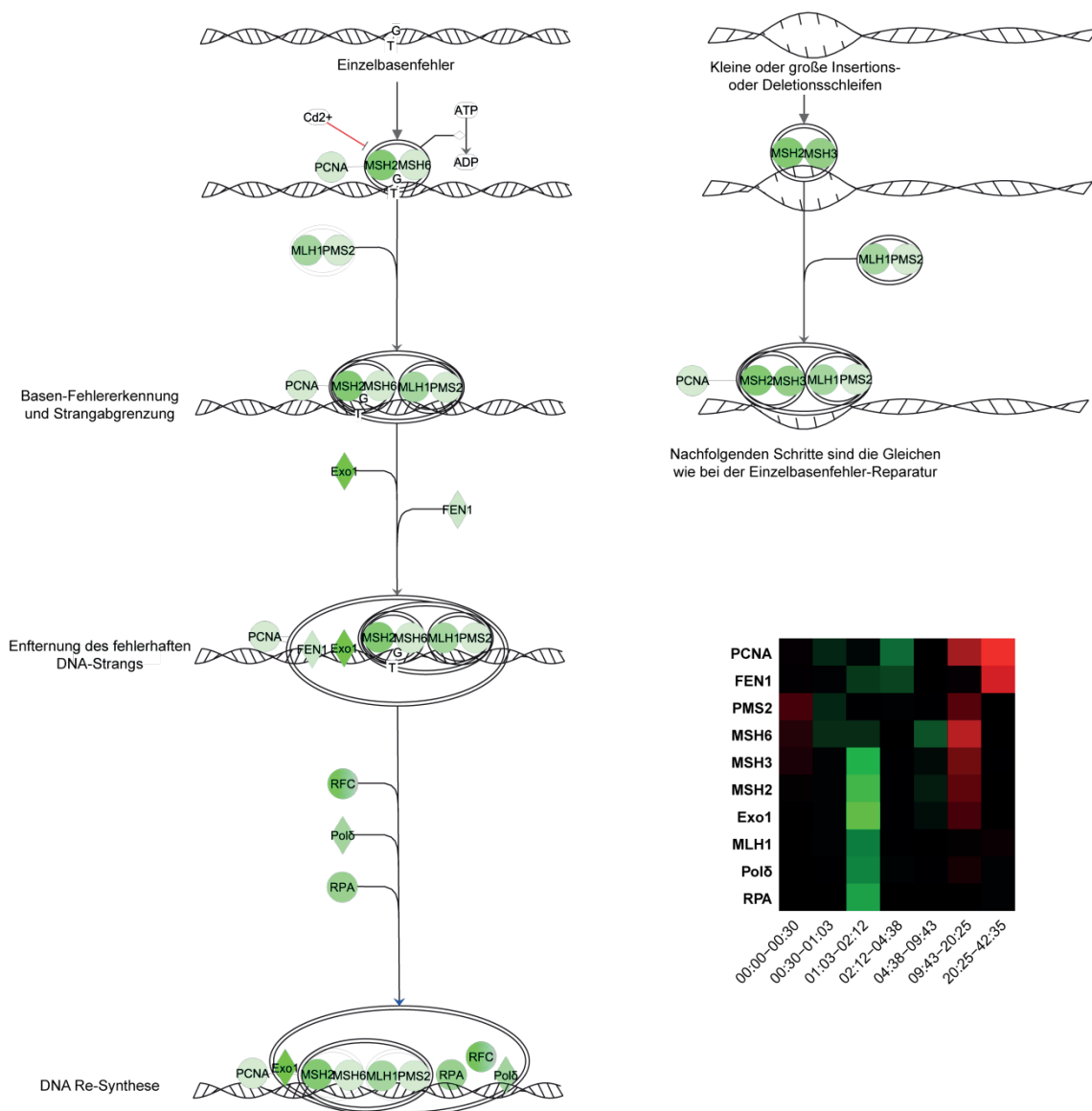


Abb. IV.15 – Signalweg des MMR DNA-Reparaturmechanismus für den Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 mit dazugehörigem Genexpressionsverlauf der beteiligten Gene. Nachdem im ersten Zeitabschnitt noch alle Gene unverändert (schwarz) bzw. leicht runterreguliert erscheinen (rot), kommt es im zweiten und dritten Zeitraum zur starken Aktivierung (grün) des gesamten Netzwerkes, was bis zum Zeitpunktvergleich 09:43 - 20:25 unverändert bleibt (schwarz). In den beiden letzten Zeitabschnitten werden alle Gene des Netzwerkes runterreguliert, was vermuten lässt, dass die Reparaturvorgänge des MMR DNA-Reparaturmechanismus beendet sind (Ingenuity 2012).

Der bei Mehrfachbasenschädigungen an einem DNA-Strang aktive NER DNA-Reparaturmechanismus ist in zwei verschiedenen Formen aktiv. Zum einen als *Global Genome Repair* (GGR), welcher Schäden in transkriptionsinaktiven Bereichen der DNA behebt und zum anderen als *Transcription Coupled Repair* (TCR), welcher Schäden an augenblicklich transkribierender DNA behebt. Beide DNA-Reparaturmechanismen des NERs sind in Abbildung IV.16 mit ihren internen Abläufen und den dazugehörigen Expressionsverläufen der mitwirkenden Gene für den Zeitabschnitt 02:12 - 04:38 abgebildet.

Dabei wird auch hier deutlich, dass nachdem kurz nach der Bestrahlung (00:00 - 00:30) eine leichte Supprimierung stattfindet, im zweiten, dritten und vierten Zeitraum die Expressionen fast aller beteiligten Gene hochreguliert werden und zum Ende der Zeitreihe ein Abfall des gesamten Netzwerkes zu vernehmen ist. Den Daten zur Folge werden auch beide Formen des NERs, also GGR und TCR, gleichermaßen aktiviert. Interessanterweise wird das *ERCC1* Gen, im Gegensatz zu den anderen Genen, im vorletzten Zeitraum, 09:43 - 20:25, stark hochreguliert. *ERCC1* wurde bereits in klinischen Studien als ein Marker diskutiert, da die Genexpression mit einer Resistenz zu einer Platin-Chemotherapie korreliert (Kirschner & Melton 2010).

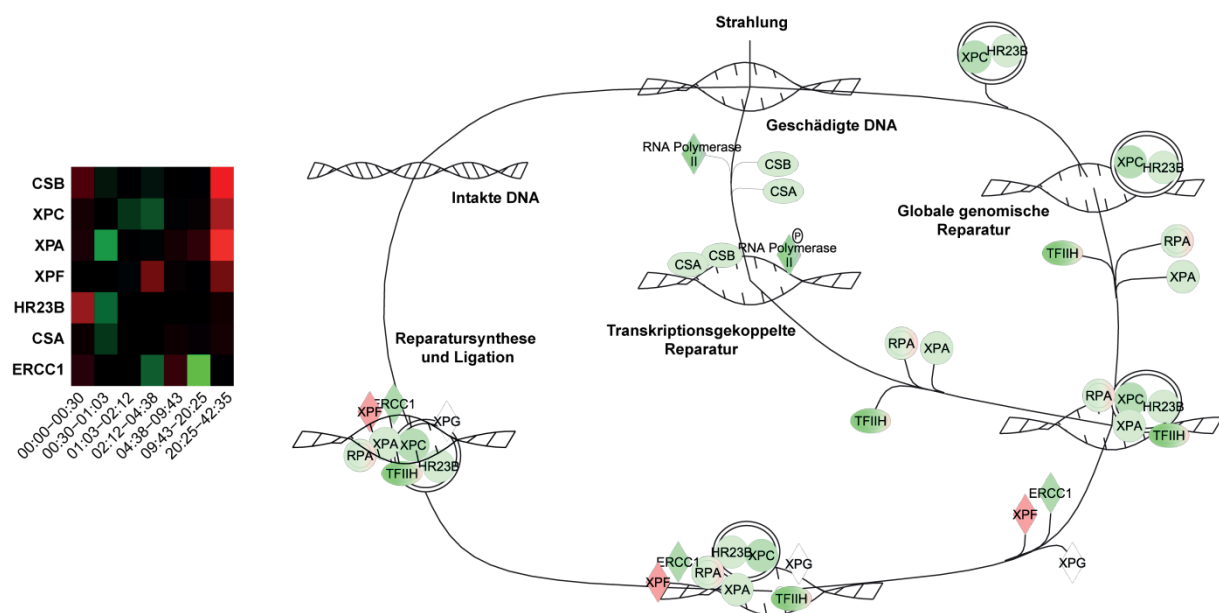


Abb. IV.16 – Signalweg des NER DNA-Reparaturmechanismus für den Zeitpunktvergleich 02:12 - 04:38 mit dazugehörigem Genexpressionsverlauf der mitwirkenden Gene. Beide Formen des NER Signalweges, GGR und TCR, welche sich nur in ihrer Schadenserkenkung unterscheiden, sind annähernd gleich stark über den gesamte Zeitreihe aktiviert. Wie in all den anderen DNA-Reparatursignalwegen kommt es nach einer Supprimierung (rot) kurz nach der Bestrahlung zu einer Expressionssteigerung (grün) des gesamten Netzwerkes bis im letzten Zeitraum die meisten Gene runterreguliert werden. Auffällig ist die starke Expressionssteigerung von *ERCC1* im vorletzten Zeitabschnitt 09:43 - 20:25 (Ingenuity 2012).

Für das Zellüberleben von größter Bedeutung ist das frühzeitige Erkennen und Beheben von DNA-Doppelstrangbrüchen, da bereits ein nicht reparierter DNA-Doppelstrangbruch zum Zelltod führen kann (Khanna & Jackson 2001; Zhou & Elledge 2000). Die DNA-Reparaturmechanismen der HR und des NHEJ sind die beiden Hauptreparaturwege bei einem DNA-Doppelstrangbruch. In Abbildung IV.17 ist das Netzwerk mit den internen Abläufen der HR für den Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 und dem Expressionsverhalten der beteiligten Gene über den gesamten Zeitraum ersichtlich.

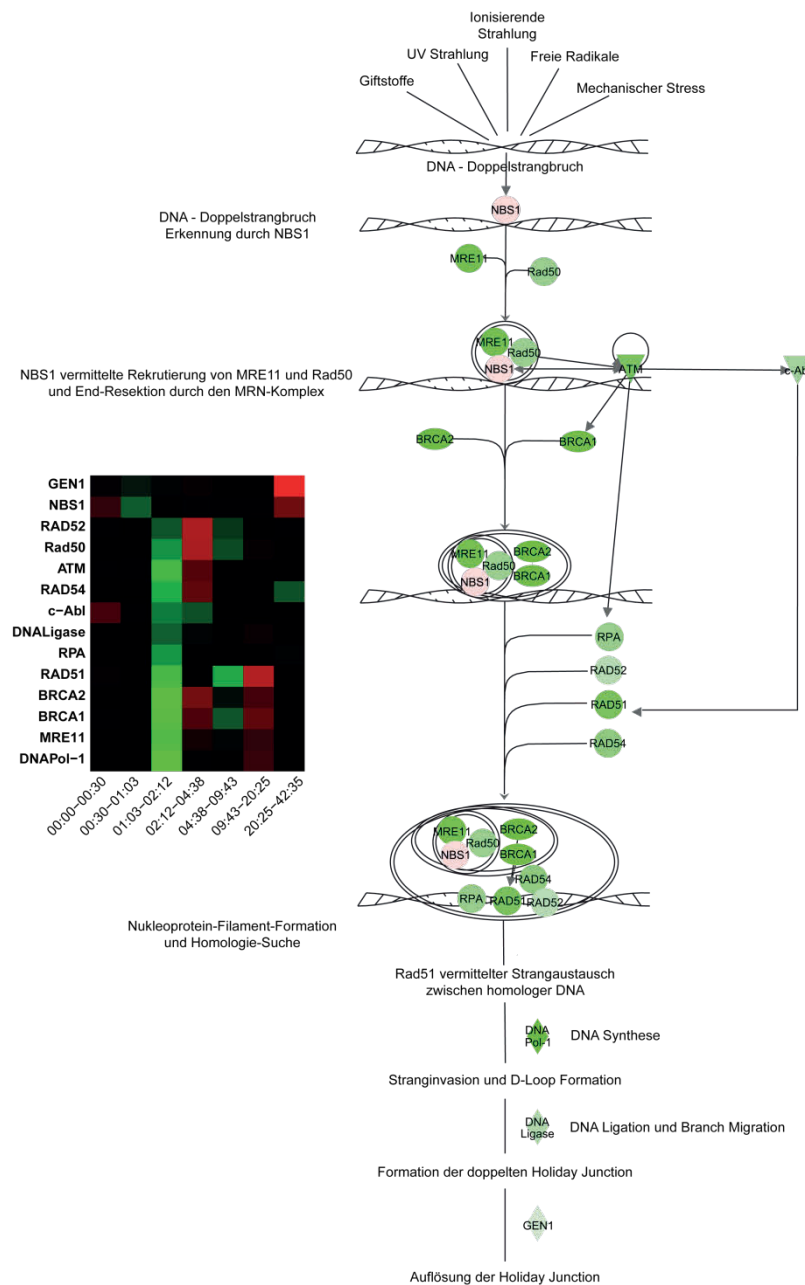


Abb. IV.17 – Signalweg des HR DNA-Reparaturmechanismus für den Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 mit dazugehörigem Expressionsverlauf der beteiligten Gene. Nachdem im ersten Zeitabschnitt die Gene noch überwiegend unverändert (schwarz) vorliegen, kommt es bei den zwei folgenden Zeitabschnitten zur Hochregulierung (grün) des gesamten Netzwerkes. Das Initiatorgen *NBS1* wird als eines der ersten Gene im zweiten Zeitabschnitt hochreguliert und ist bis zum letzten Zeitpunktvergleich fast unverändert exprimiert. Die restlichen Gene werden in den nachfolgenden Zeiträumen teils runter-, hoch- und unverändert reguliert vor (Ingenuity 2012).

Auch hier ist zuerst keine Veränderung (schwarz) oder sogar eine Deaktivierung (rot) der Gene kurz nach der Bestrahlung (00:00 - 00:30) wahrnehmbar, gefolgt von einer starken Aktivierung, die ihr Maximum zwischen 01:03 und 02:12 aufweist. Das Initiatorgen *NBS1* wird nach knapp 30 min hochreguliert (grün) und bleibt dann bis fast zum Ende der Zeitreihe gleichbleibend aktiv (schwarz). Die anderen Gene werden zwischen 02:12 und 04:38 kurzzeitig supprimiert, um dann im folgenden Zeitraum, 04:38 - 09:43, wieder überwiegend hochreguliert zu werden. In den letzten beiden Zeiträumen herrscht teils eine unveränderte und teils eine supprimierte Genexpression vor.

Der durch eine einfache koordinierte Verknüpfung von gebrochenen DNA-Enden gekennzeichnete DNA-Reparaturmechanismus zur Beseitigung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist der Prozess des NHEJs. Die internen Abläufe dieses Signalweges

und das Genexpressionsverhalten der mitwirkenden Gene für den Zeitabschnitt 01:03 - 02:12 ist in der Abbildung IV.18 aufgezeigt. Verglichen zu den Signalwegen des MMRs und des HRs verhalten sich die Genexpressionsverläufe beim NHEJ ähnlich. Während wiederum kurz nach der Bestrahlung (00:00 - 00:30) die beteiligten Gene vermehrt runterreguliert (rot) oder unverändert (schwarz) vorliegen, kommt es im zweiten und dritten Zeitabschnitt zur Hochregulierung (grün) des gesamten Netzwerkes, wobei die überwiegende Anzahl der Gene des Netzwerkes bis zum Ende der Zeitreihe langsam runterreguliert werden.

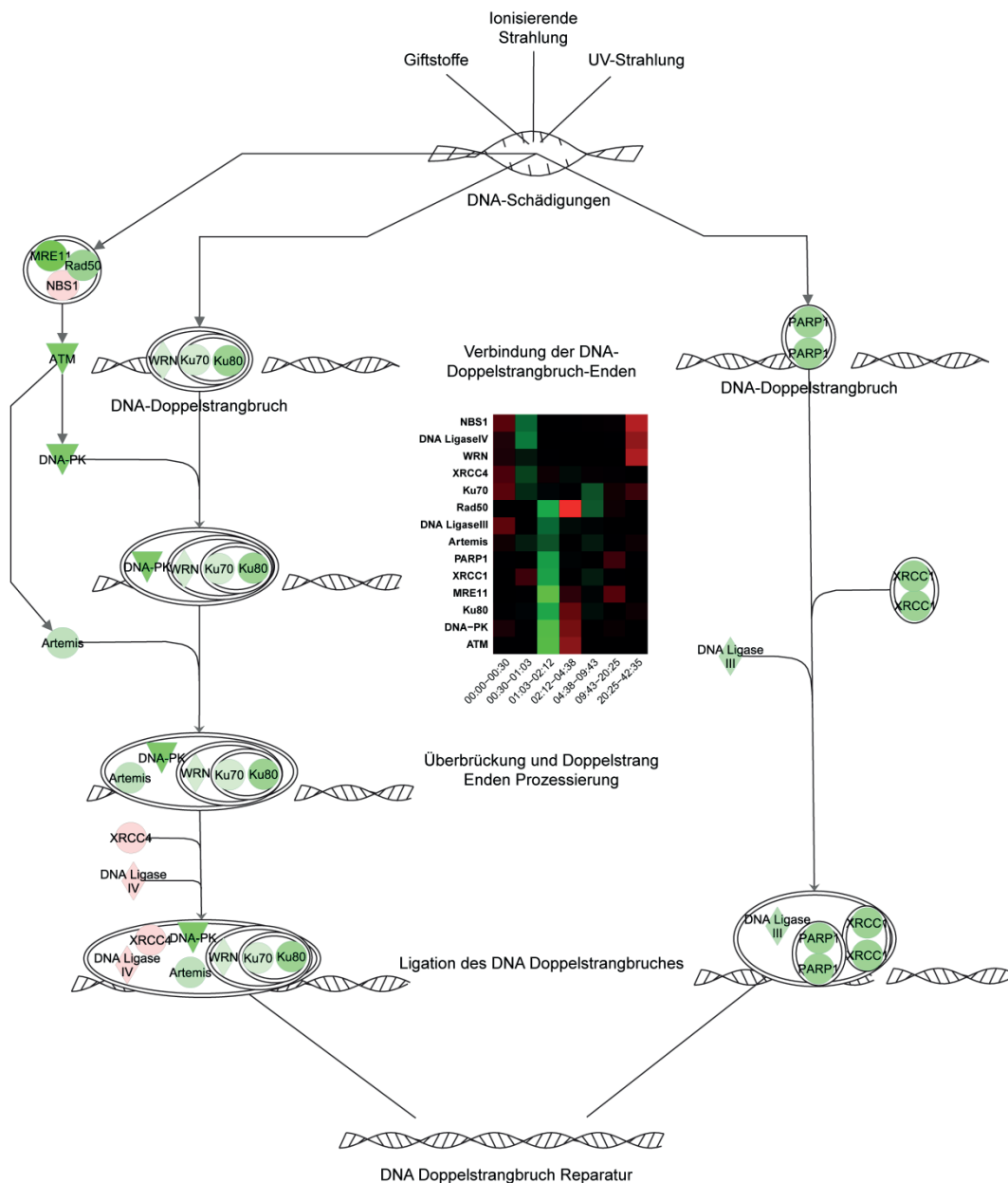


Abb. IV.18 – Signalweg des NHEJ DNA-Reparaturmechanismus für den Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 mit dazugehörigem Genexpressionsverlauf der mitwirkenden Gene. Nachdem im ersten Zeitabschnitt die Genexpression gleichbleibt (schwarz) oder runterreguliert (rot) wird, kommt es im zweiten und dritten Abschnitt zu einer starken Aktivierung (grün) aller beteiligten Gene. In den folgenden Zeiträumen erfährt die überwiegende Anzahl der Gene nur geringe Änderungen bis in den beiden letzten Zeitabschnitten das Netzwerk wieder langsam runterreguliert wird (Ingenuity 2012).

3.6 Aktives ATM reguliert Zellzyklus und DNA-Reparatur

ATM ist ein Schlüsselregulator von multiplen Signalkaskaden als Antwort auf DNA-Schädigungen durch ionisierende Strahlung, anderer DNA-schädigenden Faktoren oder auch in normalen zellulären Prozessen. Die ATM-induzierten Antworten beinhalten die Aktivierung von zellzyklusregulierenden Proteinen, der DNA-Reparaturmechanismen und der Apoptose. In nicht bestrahlten Zellen existiert ATM als Dimer- oder Multimerkomplexen durchweg im Zellkern. Nach der Einwirkung ionisierender Strahlung auf Zellen und der Entstehung struktureller DNA-Veränderungen kommt es zu einer Autophosphorylierung von ATM was zur Monomerisierung und Aktivierung des ATM-Signalweges führt (Ingenuity 2012).

Die Abbildung IV.19 stellt die ATM-induzierenden, internen Abläufen mit den Expressionsverhalten der beteiligten Gene für den Zeitraum 01:03 - 02:12 dar. Demzufolge kommt es im zweiten und dritten Zeitabschnitt zur Aktivierung (grün) der meisten mitwirkenden Gene. Interessanterweise sind die für den G2/M Zellzyklusarrest inhibierenden Gene *p21CIP1* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1, CDKN1A*) und *GADD45* (*Growth arrest and DNA-damage-inducible protein*) im Zeitraum 01:03 - 02:12 runterreguliert (rot), während zeitgleich eine induzierte Expression von *CDK1* und *Cyclin B*, die eine Arretierung der G2/M Phase bewirken, vorliegt. Weiterhin ist auch zu bemerken, dass *p53* und *p73*, beides Gene die mit der Apoptose in Verbindung gebracht werden, nicht exprimiert vorkommen. Außerdem wirken über den gesamten Zeitraum mehrfach induzierte Gene wie *BRCA1*, *Rad51* oder *CREB* (*cAMP response element-binding*) positiv auf das Zellüberleben. Nichtsdestotrotz treten auch Gene für das Fortschreiten des Zellzyklus in die S und G2-M Phasen induziert auf, was für ein Gemisch aus apoptotisch induzierten und supprimierten Zellen spricht. Auffällig ist auch der Wechsel an Induktion und Suppression der Gene von Zeitpunkt zu Zeitpunkt und die unveränderte und supprimierte Expression kurz nach der Bestrahlung im ersten Zeitabschnitt (00:00 - 00:30).

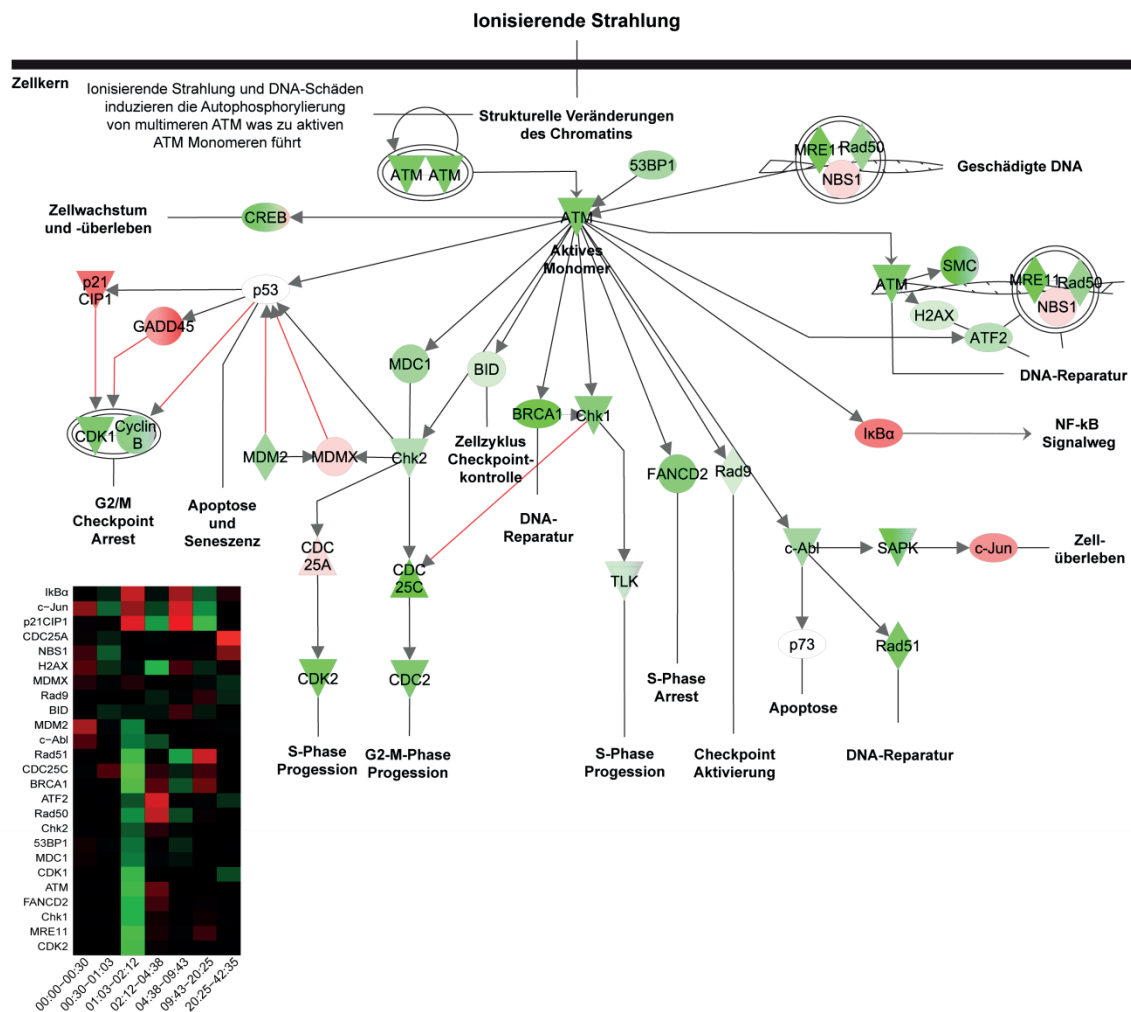


Abb. IV.19 – ATM-Signalweg für den Zeitpunktvergleich 02:12 - 04:38 mit dazugehörigem Genexpressionsverlauf der mitwirkenden Gene. Das ATM Gen wird im dritten Zeitabschnitt stark induziert und hat als aktives Monomer Auswirkungen auf die DNA-Reparatur, die Einleitung der Apoptose, die Zellzyklusregulation und auf den stressinduzierten NFkB-Signalweg. Im ersten Zeitraum (00:00 - 00:30) liegt eine unveränderte (schwarz) bzw. supprimierte (rot) Expression der beteiligte Gene des ATM-Netzwerkes vor. Im zweiten, dritten und vierten kommt es zur Aktivierung (grün) des ATM-Signalweges, wobei auf die G2/M Zellzyklusarretierung inhibierende Gene runterreguliert und aktivierende Gene hochreguliert sind. Die mit der Apoptose in Verbindung gebrachten Gene *p53* und *p73* liegen nicht exprimiert vor. Gene, die durch die Ankurbelung von DNA-Reparatur und Zellzyklusarretierung positiv auf ein Zellüberleben wirken sind ebenfalls über mehrere Zeiträume induziert (Ingenuity 2012).

3.7 Zellüberleben und Zelltod im Gleichgewicht

Als eine Antwort auf den durch die ionisierende Strahlung induzierten zellulären Stress ist zu erwarten, dass ein Teil der bestrahlten Zellen aufgrund zu großer Schäden durch die Aktivierung von Caspasen in den Prozess der Apoptose geleitet werden. Sollten die ebenfalls eingeleiteten DNA-Reparaturvorgänge ausreichend sein, kann die Apoptose angehalten werden und essentielle Prozesse wie die Transkription und Replikation werden wieder aufgenommen (Ljungman 2010). Die internen Abläufe anti- und pro-apoptotischer Vorgänge mit dem dazugehörigen Expressionsverhalten der mitwirkenden Gene für Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 kann der Abbildung IV.20 entnommen werden.

Durch die ionisierende Bestrahlung kommt es zur Blockade der Transkription, welche im ersten Zeitabschnitt (00:00 - 00:30) durch eine überwiegende Supprimierung (rot) der meisten mitwirkenden Gene ersichtlich wird. Im zweiten, dritten und vierten Zeitraum werden dann die meisten Gene des gezeigten Apoptose-Netzwerkes induziert (grün), darunter auch Apoptose entgegenwirkende Proteine und Komplexe wie bspw. PARP, cIAP oder BIRC6 (*baculoviral IAP repeat containing 6*). Zum Ende der Zeitreihe ist feststellbar, dass Proteine wie bspw. CASPASE 3, CASPASE 7, CASPASE 6, AIF (*apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated*) oder auch ACINUS, die für apoptotische Prozesse wie der Chromatinkondensation, der DNA-Fragmentierung oder dem zellulären Abbau entscheidend sind, runterreguliert werden. Außerdem ist erwähnenswert, dass das für die Ankurbelung der DNA-Reparaturmaschinerie entscheidende Gen *PARP* zum Anfang der Zeitreihe induziert (grün) vorliegt. Weiterhin ist auch das Protein BIRC6, welches in der Lage ist die CASPASE 3 zu inhibieren und die CASPASE 7 zu binden (Bartke *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2005), wodurch höchstwahrscheinlich keine inhibierende Wirkung mehr auf das DNA-Reparationsprotein PARP wirken könnte, ebenfalls am Anfang der Zeitreihe induziert ist und dann über die gesamte Zeitdauer unverändert aktiv bleibt. Insgesamt kann ein konkurrierender Wettkampf zwischen anti- und pro-apoptotischen Faktoren über die Zeitreihe abgeleitet werden, wobei in den letzten beiden Zeiträumen die pro-apoptotischen Faktoren sich sogar supprimierter darstellen. Bemerkenswert ist zudem, dass sich die eigentlich stark vom Transkriptionsfaktor p53-abhängige strahlungsinduzierte Apoptose (Lowe *et al.*, 1993) ohne eine Expression von *p53* zeigt.

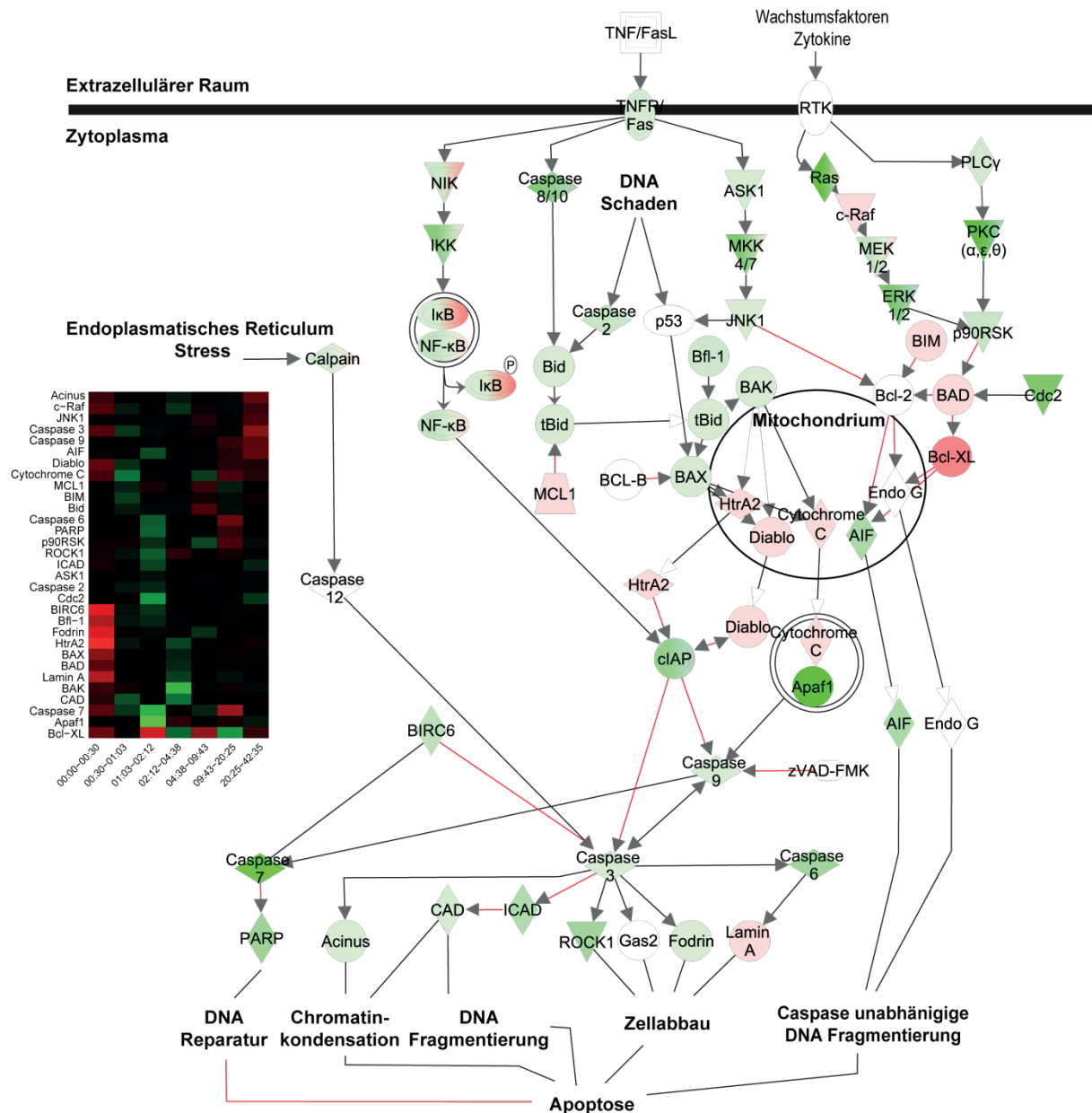


Abb. IV.20 – Signalweg des programmierten Zelltods (Apoptose) für den Zeitpunktvergleich 01:03 - 02:12 mit dazugehörigem Expressionsverlauf der mitwirkenden Gene. Nach einer Supprimierung der Genexpression kurz nach der Bestrahlung kommt es zur Aktivierung (grün) des gesamten Netzwerkes. Demnach liegt ein konkurrierender Kampf zwischen anti- und pro-apoptotischen Faktoren vor, wobei sich die pro-apoptotischen Faktoren in den letzten beiden Zeitabschnitten eher supprimiert (rot) darstellen (rote Linien - inhibierende Wirkung), (Ingenuity 2012).

V DISKUSSION

1 Zellmodelle für strahlenbiologische Experimente

1.1 Größte Strahlenempfindlichkeitsdifferenz zwischen PC3 und DuCaP

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es für die vier zur Verfügung stehenden Prostata-Krebszelllinien die strahlenbiologischen Eigenschaften zu ermitteln, um anhand dieser eine Auswahl an strahlungssensitiven und -resistenten Zellmodellen treffen zu können. Generell kann festgehalten werden, dass durch eine erhöhte Strahlendosis es zu einer verringerten Überlebensfraktion bei jeder Zelllinie kommt. Diese korreliert mit einer vermehrten Schädigung von zellulären Bestandteilen, insbesondere der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Zellkern. Nach Friedberg *et al.* (1995) finden in einer einzelnen menschlichen Zelle etwa $10^4 - 10^6$ DNA-Schadensereignisse pro Tag statt, was in einem erwachsenen Menschen mit etwa 10^{12} Körperzellen demnach $10^{16} - 10^{18}$ Reparaturereignisse erfordert (Friedberg *et al.*, 1995). Arenz konnte 2007 ermitteln, dass 10 Minuten nach Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlen ein initiiertes Schaden von 37 ($\pm 12,5$) Doppelstrangbrüchen pro Zellkern in der Lungenepithelzelllinie A549 induziert wurde (Arenz 2007). Nun hängt es von der Reparaturkapazität des jeweiligen Zelltyps ab wie viele zelluläre Schäden abgefangen werden können, was mit der zellspezifischen Strahlungsresistenz gleichzusetzen ist.

Am augenfälligsten verhielten sich dabei in den angewendeten Viabilitätstests (Abschnitt VI.1.1) und im Koloniebildungstest (Abschnitt VI.1.2) die Zelllinien DuCaP, als Strahlungsempfindliche, und PC3, als Strahlungsresistente. Hingegen konnte die aus der Literatur als strahlungsresistente eingestufte Linie der DU-145 Zellen diese Eigenschaften in den drei angewandten Tests nicht eindeutig vorweisen (Bowen *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2011; Donna *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2007; Truman *et al.*, 2005; Trzeciak *et al.*, 2004; Vucić *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2011). Insbesondere im Trypanblau-Test wies diese Linie nur eine mittelmäßige Strahlungsresistenz auf, wohingegen sie beim MTT-Test mit den zweithöchsten Überlebensfraktionen hinter der PC3 Zelllinie rangiert. Ein gleiches, mittelmäßiges Überlebensverhalten stellte die RWPE-1 Linie im Trypanblau-Test dar, die nach bisherigen Veröffentlichungen als strahlungssensitive Zelllinie eingestuft wurde (Hasan *et al.*, 2010; Konsoula *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2009). Im Gegensatz zum Trypanblau-Test war die RWPE-1 Zelllinie im MTT-Test über fast alle Strahlendosen die sensitivste Linie. Allerdings war die Durchführung des Koloniebildungstest mit dieser Zelllinie nicht möglich, wodurch Aussagen über die proliferative Kapazität nach Bestrahlung schwierig zu interpretieren sind. Weshalb

die RWPE1 Zelllinie nicht für den Koloniebildungstest anwendbar war könnte an der zu geringen Zelldichte bei diesem Experiment liegen. Nichtsdestotrotz konnte in zwei Studien ein Koloniebildungstest mit dieser Zelllinie durchgeführt werden, wobei allerdings zuerst die Bestrahlung in einer höheren Dichte von 2×10^5 Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche durchgeführt wurde und danach ein verdünntes Aussäen von 200 - 250 überlebten Zellen geschah (Konsoula *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2010). Diese zur Literatur gering widersprüchlichen Ergebnisse begründen die alleinige Auswahl der beiden Zelllinien PC3 und DuCaP für die Markersuche zur Vorhersage einer Strahlungseffizienz (Abschnitt IV.2), da diese beiden Zelllinien mit höchster Sicherheit die größten Überlebensdifferenzen nach Bestrahlung durch die drei unabhängigen Tests aufwiesen.

Das leicht kontroverse Verhalten der RWPE-1 und DU-145 Zelllinien zu bisherigen Veröffentlichungen kann durch verschiedene Faktoren begründet sein. Zuerst muss festgehalten werden, dass die Anzahl an biologischen Replikaten bei allen drei Verfahren statistisch gesehen mit jeweils nur drei biologischen Wiederholungen äußerst gering ist, wodurch Ausreißer und Messfehler einen größeren Einfluss auf das Endergebnis haben können. Dazu kommt, dass alle drei Tests ein hohes Maß an manuellen Einzelschritten benötigen, was vermehrt zu Fehlern führen kann und sich in Kombination mit der geringen Anzahl an Wiederholungen negativ auf die Genauigkeit des Endergebnis ausüben könnte. Weitere Gründe für die Differenzen zu bisherigen Studien können auch zelluläre Veränderungen über die Dauer der Kultivierung sein, was in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben ist (Esquenet *et al.*, 1997; Briske-Anderson *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 2004). So konnte beobachtet werden, dass Unterschiede in der Bestrahlungsempfindlichkeit mit einer erhöhten Anzahl an Zellpassagen assoziiert ist (Chang-Liu & Woloschak 1997). Für die experimentelle Durchführungen dieser Arbeit wurden die Zellen für eine Zeitdauer von 35 Wochen kultiviert und passagiert. Bei einer Passagierhäufigkeit von zweimal die Woche erhält man allein für diese Untersuchungen Zellpassagen im 70ziger Bereich. Somit kann, hinzukommend mit der Anzahl der Passagen vor dem Erhalt der Zelllinien, der Effekt von Veränderungen strahlenbiologischer Eigenschaften bei hohen Zellpassagen hier durchaus auftreten. Weiterhin werden die Zelllinien in verschiedenen, zellspezifischen Nährmedien kultiviert (Abschnitt II.2.1.2), die unterschiedliche Zusammensetzungen von Stoffen aufweisen, was wiederum einen Einfluss auf die Absorptionsfähigkeit von ionisierender Strahlung und der Neutralisierung von freien Radikalen nach sich ziehen könnte.

Vergleicht man die Überlebensfraktionen des MTT-Tests mit denen des Trypanblau-Tests fallen relativ hohe Differenzen auf (siehe Abbildung IV.1 und IV.2). Diese sehr deutlichen Unterschiede liegen am ungleichen Messprinzip dieser beiden Verfahren. Im MTT-Test wird eine Farbreaktion durch die Reduktion von MTT in ein wasserunlösliches Formazan durch

zelluläre Reduktionsmittel hervorgerufen (Mosmann 1983). Dabei korreliert die Bildung an Farbstoff mit der Überlebensfraktion. Bei apoptotischen und nekrotischen Zellen liegen diese zellulären Reduktionsmittel noch teilweise funktional vor, wodurch trotz bereits kaputter Zellen eine höhere Zellüberlebensrate vorherrschen kann. Demgegenüber wird beim Trypanblau-Test der Farbstoff nur bei einer nicht intakten Zellmembran aufgenommen. Der Farbstoff Trypanblau besitzt dazukommend eine toxische Wirkung auf Zellen, wodurch bei zu langen Inkubationszeiten falsch positive, tote Zellen detektiert werden könnten.

Abschließend kann jedoch festgehalten werden, dass aufgrund der prozentualen Differenzen der Überlebensfraktion von ca. 15 % bei 5 Gy und 20 Gy im MTT-Test sowie von bis zu 30 % im Trypanblau-Test und der dabei resultierenden Signifikanzen, die beiden Zelllinien PC3 und DuCaP als zweckmäßige Zellmodelle für strahlungsresistente und -sensitive Eigenschaften angesehen werden können. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse im Koloniebildungstest gestützt, wobei hier neben der PC3 Zelllinie auch die DU-145 eine deutlich erhöhte Koloniebildung pro Strahlendosis gegenüber der klar sensitiveren Linie der DuCaP Zellen vorweist.

1.2 Keine Resistenzveränderung nach Bestrahlung

In verschiedenen Veröffentlichungen konnte eine erhöhte Radio- und auch Medikamentenresistenz erlangt werden, indem Zellen fraktioniert, also mehrfach, über einen längeren Zeitraum mit einer geringen Dosis bestrahlt wurden (Bottke *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2009). In der klinisch angewandten Radiotherapie wird am Häufigsten eine tägliche, fraktionierte Bestrahlung mit geringer Dosis über mehrere Wochen durchgeführt, um das umliegende Normalgewebe zu schonen. Allerdings zeigt sich dabei oft, dass überlebende Tumorzellen sich erholen und daraufhin wieder expandieren, was die Erfolgsaussichten der Radiotherapie verschlechtert und die Radioresistenz der Tumorzellen erhöht (Shimura 2011).

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob bereits durch eine einmalige Bestrahlung der als resistent eingestuften PC3 Zelllinie eine weitere Erhöhung der Bestrahlungsresistenz erzielt werden kann. Anhand des anschließenden Koloniebildungstests (Abbildung IV.4) wird allerdings klar, dass die proliferative Kapazität der 5 Gy bestrahlten und überlebten Zellen (ca. 30 %) kein Unterschied zur proliferativen Kapazität des Wildtyps der PC3 Zelllinie aufzeigt. Demnach konnte augenscheinlich keine Erhöhung der Strahlungsresistenz durch eine einmalige Exposition erzielt werden. Bei einer ionisierenden Bestrahlung unterscheidet man nach dem *International Commission on Radiological Protection* zwischen deterministischen und stochastischen Effekten. Deterministische Effekte besitzen einen Schwellwert für die Strahlendosis, die notwendig ist, um diese Effekte entstehen zu lassen. Grundlage sind dabei strahlenbiologische Reaktionen an den Zellbausteinen, die sich auf die

Funktionen der Zellen und Organe auswirken. Ab einer bestimmten Dosis, die gleichzusetzen ist mit dem Schwellwert, sind sie nicht mehr reparabel und manifestieren sich als Schäden. Stochastischen Effekte sind rein zufällige Ereignisse, die schon bei geringsten Dosen Mutationen in der DNA erzeugen und somit eine genetische und karzinogene Wirkung haben. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sind die Ereignisse in jeder Zelle einzigartig und steigen mit der Höhe der Strahlendosis an. Es ist davon auszugehen, dass die Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy sowohl deterministische als auch stochastische Ergebnisse induziert. Zellen mit deterministischen Effekten sind irreparabel und erleiden den Zelltod, hingegen Zellen mit stochastischen Ereignissen, abhängig vom Schadensort im genetischen Code, die Schäden reparieren können oder zum Zelltod führen. Durch eine einmalige Bestrahlung und Herbeiführung dieser zufälligen Ereignisse sind nach Betrachtung der Ergebnisse des Koloniebildungstest (Abbildung IV.4) keine wahrnehmbaren Veränderungen in der proliferativen Kapazität der überlebten Zellen erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die zufälligen DNA-Veränderungen keine Resistenzveränderung hervorgerufen haben. Das lässt darauf hindeuten, dass mehrmalige Bestrahlungen der überlebenden Zellen notwendig sind, um eine Vielzahl an zufälligen DNA-Veränderungen herbeizuführen, die erst in der Summe einen positiven Einfluss auf die Bestrahlungsresistenz bewirken könnten.

Klinisch betrachtet könnten dadurch zwei unerwünschte Ereignisse auftreten. Während durch fraktionierte Bestrahlung mit geringer Dosis (1 -2 Gy) über mehrere Wochen bis zur einer Gesamtdosis von bis zu 70 Gy die Wahrscheinlichkeit einer Tumorresistenzentwicklung erhöht wird, treten bei einer einmaligen Bestrahlung mit einer hohen Dosis deterministische Ereignisse auf, die umliegendes Normalgewebe schädigen und irreparabel sind. Nichtsdestotrotz wird in der heutigen Radiotherapie die Fraktionierung bevorzugt, da sie es ermöglicht, vielen Patienten sehr hohe Gesamtstrahlendosen zu geben, ohne ihr Risiko für dauerhafte Spätfolgen zu steigern. In wie viele Einzeldosen eine Gesamtstrahlendosis tatsächlich am besten fraktioniert werden sollte und wie lange die Abstände zwischen den einzelnen Therapiesitzungen sein sollten, ist heute aber noch Gegenstand zahlreicher klinischer Studien. Seltener werden Strahlentherapieformen angewandt, bei denen eine einmalige Bestrahlung durchgeführt wird. Dabei wird die gesamte Strahlendosis bei einer Sitzung verabreicht, wobei kleinere Tumore, deren Zerstörung nicht allzu belastend ist, und eine Schonung des gesunden Gewebes Voraussetzungen sind. Weil hier die Strahlen wie ein Skalpell oder Messer eingesetzt werden, spricht man auch von Radiochirurgie (DKFZ 2009). Um diesen klinischen Dilemma Einhalt zu gebieten, ist die strahlenbiologische Forschung auf der Suche nach tumorspezifischen und effizienzsteigernden Substanzen, um bei einer angewandten Radiotherapie Resistenzentwicklungen zu verhindern und Therapieaussichten zu verbessern.

2 Vorhersage des Ansprechens einer Radiotherapie

2.1 RNA-Seq, eine vertrauensvolle Methode

RNA-Seq ist eine Hochdurchsatz-Methode, die mit höchster Präzision die Quantifizierung des gesamten Transkriptoms in kurzer Zeit ermöglicht und dabei einen Messbereich besitzt, die der Mikroarray Technologie deutlich übersteigt. Zudem wird kein *a priori* Wissen benötigt, ist nur eine geringe Menge an Ausgangsmaterial erforderlich, entfallen komplizierte Normalisierungsverfahren und Hintergrundrauscheffekte sind minimal (Z. Wang *et al.*, 2009; Wilhelm & Landry 2009). Weiterhin können die gewonnen Sequenzinformationen in einer Auflösung von einer Base genutzt werden, um alternatives Spleißen, Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen zu identifizieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Daten beziehen sich lediglich auf die Quantifizierung annotierter, proteinkodierender Gene und deren Untersuchung auf unterschiedliches Expressionsverhalten zwischen den beiden Zelllinien DuCaP und PC3. Allein für diese Analyse wurden 850.512.064 Reads der Länge 22 nt prozessiert, was ca. 18,7 GigaBasen entsprechen. Für die Genexpressionsbestimmungen wurden außerdem nur UMR klassifizierte Reads verwendet, die im Exonbereich der annotierten, proteinkodieren Genen abgebildet werden konnten. Insgesamt konnte nach Setzen eines Expressionsschwellwerte für 10.966 Gene eine Expression in mindestens einer der beiden Zelllinien nachgewiesen werden, was gut mit den Zahlen bisheriger Veröffentlichungen von RNA-Seq Experimenten übereinstimmt (Hammer *et al.*, 2010; Sultan *et al.*, 2008; Mortazavi *et al.*, 2008). Die sehr hohen Korrelationswerte der technischen Replikate von nahezu 1 belegen (siehe Abbildung III.4), dass die RNA-Seq Methode eine zuhöchst akkurate und reproduzierbare Technologie darstellt. Weiterhin zeigen die ebenfalls hohen Korrelationen der Genexpressionswerte zwischen den biologischen Replikaten ($> 0,92$, siehe Abbildung IV.5 A) eine geringe biologische Varianz der Zellmodelle auf, obwohl diese über mehrere Passagen und Wochen kultiviert und in unabhängigen Experimenten sequenziert wurden. Dieses Korrelationsverhalten wird auch in der Darstellung der FC-Verteilungen, als ein schmaler und hohen Verlauf innerhalb von 1 und -1, klar sichtbar (siehe Abbildung IV.5 B). Ebenfalls zeigen der klassische MA-Plot (siehe Abbildung IV.5 C) und der sogenannte Volcano-Plot (siehe Abbildung IV.5 D) ihre charakteristischen Wolken- bzw. Vulkanausprägungen für die Verteilungen und Zusammenhänge des FC- und des *P*-Wertes sowie des durchschnittlichen Genexpressionswertes. Somit erscheinen die angewandte RNA-Seq Technologie, die verwendeten Zelllinien und die bioinformatischen Prozessierungen aus experimenteller Sicht sehr vertrauensvoll und bestens für die Bestimmung der transkriptomweiten Genexpression und differentiell exprimierter Gene geeignet zu sein.

2.2 Aktivitätsprofiling DuCaP versus PC3

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit war die Identifikation von potentiellen Genmarkern zur Vorhersage des Ansprechens eines Prostata-Tumors auf eine Strahlentherapie. Als bestmögliche Zellmodellvertreter konnten aus den vier zur Verfügung stehenden Prostata-Krebszelllinien die DuCaP als strahlungssensitive und die PC3 als strahlungsresistente Zelllinie ermittelt werden (siehe Abschnitt IV.1). Zur Charakterisierung des transkriptomweiten Aktivitätsmusters der proteinkodierenden Gene beider Zelllinien wurde die sehr präzise und sensitive NGS-Technologie der RNA-Seq Methode verwendet. In Kombination dieser Technologie mit statistischen Analysen konnten mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,01$ und einem 99 % Konfidenzintervall 730 Gene bestimmt werden, die zwischen diesen beiden Zelllinien mit hoher Sicherheit signifikant differentiell exprimiert sind. Von diesen 730 Genen sind 425 Gene in der sensitiven DuCaP Zelllinie höher exprimiert, während 305 Gene in der PC3 Zelllinie aktiver vorliegen. Demnach liegt ein enormer Genexpressionsunterschied zwischen diesen beiden Zelllinien vor, was durch niedrige Korrelationswerte und einer breiten und flachen FC-Verteilung wiedergespiegelt wird. Dabei muss beachtet werden, dass dieser massive Unterschied auch aufgrund des veränderten Karyotyps in beiden Zelltypen resultieren kann (Y. G. Lee *et al.*, 2001; van Bokhoven *et al.*, 2003). Mit diesem Hintergrundwissen wäre eine Normalisierung auf die tatsächlich vorliegenden Chromosomenabschnittshäufigkeiten durchaus nachvollziehbar. Allerdings wurde bewusst auf eine derartige Normalisierung verzichtet, da gerade aufgrund dieser chromosomalen Veränderungen und der damit einhergehenden transkriptomweiten Genexpressionsveränderung es zur Ausbildung einer Strahlenresistenz kommen könnte.

Es ist eindeutig klar, dass dieser massive transkriptomweite Genexpressionsunterschied nicht nur durch ein verändertes Karyotyp oder wegen einer erhöhten Strahlungsresistenz bzw. -sensitivität resultiert, sondern vielmehr aufgrund der unterschiedlichen und zellspezifischen Zellphysiologie beruht. Demnach sind potentielle Genmarker aus der Fülle der signifikant exprimierten Gene durch weitere Analysen herauszufiltern. Dazu zählen zum Beispiel der Vergleich mit anderen veröffentlichten Studien, auch mit anderen Tumorarten (siehe Abschnitt V.2.3 und V.2.4), oder die Gruppierung in Netzwerken (siehe Abschnitt V.2.5). Prinzipiell muss festgehalten werden, dass der Vergleich von nur zwei Zelllinien das absolute Minimum darstellt und eine Betrachtung mehrerer sensibler und resistenter Zelllinien bzw. Tumoren eine deutlich höhere Trefferwahrscheinlichkeit eines Genmarkers ergeben würde. Nichtsdestotrotz sollten in dieser Menge der 730 signifikant differentiell exprimierten Gene auch die für die Vorhersage einer Strahlungseffizienz geeigneten Gene beinhaltet sein. Betrachtet man den Trend und die Entwicklung der Hochdurchsatz-Sequenzierung in Bezug auf Kosten, Durchsatz und Durchführungsdauer scheint es allerdings in absehbarer Zeit keine Diagnostik mehr auf einzelnen Genen oder Gengruppen

zu geben, sondern werden transkriptomweite Messungen durchgeführt, aus denen Algorithmen des maschinellen Lernens und der Mustererkennung die Informationen aus den globalen Genaktivitätsmustern extrahieren werden, um Krankheitsdiagnostik, -prognose und Therapieansprechen zu bestimmen.

2.3 Potentielle Genmarker

Um aus der Fülle der signifikant differentiell exprimierten Gene eine bessere Eingrenzung von potentiellen Markern herstellen zu können, bietet sich der Vergleich von bereits veröffentlichten Studien zur Vorhersage des Ansprechens eines Tumors auf eine Radiotherapie an. Bisher wurden einige dieser Studien durchgeführt, wobei stets die Methode der Mikroarray Technologie zur Genexpressionsbestimmung angewandt wurde. Als Tumorarten wurden dabei Gebärmutterhalskrebs, Kopf- und Halskrebs, Dickdarmkrebs, Brustkrebs, Speiseröhrenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Lungenkrebs, Glioblastom, Leberkrebs und Hautkrebs auf ihren Strahlungssensitivität und -resistenz untersucht (Kitahara *et al.*, 2002; Hanna *et al.*, 2001; Harima *et al.*, 2004; Helland *et al.*, 2006; Higo *et al.*, 2005; Ghadimi *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006; Otomo *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2007; Tewari *et al.*, 2005; Vallat *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2006; Kumagai *et al.*, 2006). Somit liegen hiermit erstmals Daten von Prostata-Tumorgewebe vor. Eine Übersicht einiger potentieller Genmarker, die im Vergleich zwischen den DuCaP und PC3 Zelllinien und bereits in anderen Veröffentlichungen auffällig wurden, ist in der Tabelle V.1 gezeigt, wobei der Pfeil hinter der Referenz das Genexpressionsverhalten in den Studien symbolisiert.

Tab. V.1 - Potentielle Genmarker zur Effizienzvorhersage einer Radiotherapie.

Gensymbol	Ø DuCaP	Ø PC3	FC	P-Wert	Referenz
CA9	2,687	7,006	-4,31	0,0029	(Wykoff <i>et al.</i> , 2000)↓
CA12	7,423	9,287	-1,86	0,0028	(Ogawa <i>et al.</i> , 2007; Kitahara <i>et al.</i> , 2002; Harima <i>et al.</i> , 2004; Wong <i>et al.</i> , 2006; Tewari <i>et al.</i> , 2005)↓
CCND1	11,538	13,778	-2,24	0,0048	(Hanna <i>et al.</i> , 2001)↓
CPNE3	10,074	11,221	-1,14	0,0272	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
CTSL1	11,562	8,709	2,85	0,0353	(Harima <i>et al.</i> , 2004; Kitahara <i>et al.</i> , 2002; Kumagai <i>et al.</i> , 2006; Ogawa <i>et al.</i> , 2007; Tewari <i>et al.</i> , 2005; Wong <i>et al.</i> , 2006)↑
EIF5A2	7,260	9,947	-2,68	0,0128	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
FN1	8,700	12,773	-4,07	0,005	(Amundson & Smilenov 2011)
GDF15	4,941	10,522	-5,58	0,0332	(Ogawa <i>et al.</i> , 2007; Helland <i>et al.</i> , 2006)↓
JUN	9,381	10,594	-1,21	0,0034	(Hanna <i>et al.</i> , 2001; Higo <i>et al.</i> , 2005;

					Ishigami <i>et al.</i> , 2007; Miura <i>et al.</i> , 1997; Ogawa <i>et al.</i> , 2007)↓
<i>KTN1</i>	11,778	13,63	-1,85	0,0222	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
<i>LGALS3</i>	8,775	11,328	-2,55	0,0136	(Kumagai <i>et al.</i> , 2006)↓
<i>MGLL</i>	9,923	11,059	-1,13	0,0268	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
<i>MUC5B</i>	5,363	8,708	-3,34	0,044	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
<i>MYC</i>	10,906	12,178	-1,27	0,0161	(Vallat <i>et al.</i> , 2003; Ogawa <i>et al.</i> , 2007)↓
<i>PDGFC</i>	7,358	8,557	-1,19	0,0234	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
<i>PRAC</i>	3,421	8,706	-5,28	0,0304	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
<i>PRKAR2B</i>	9,9388	3,668	6,27	0,0018	(Kitahara <i>et al.</i> , 2002)↑
<i>RAB5C</i>	9,3944	2,376	7,01	0,0045	(Kitahara <i>et al.</i> , 2002)↑
<i>RAC2</i>	6,187	8,068	-1,88	0,0293	(Ogawa <i>et al.</i> , 2007; Ghadimi <i>et al.</i> , 2005; Watanabe <i>et al.</i> , 2006)↓
<i>RRBP1</i>	8,846	11,368	-2,52	0,0031	(Harima <i>et al.</i> , 2004)↓
<i>SCNN1B</i>	3,253	7,178	-3,92	0,0387	(Ghadimi <i>et al.</i> , 2005)↓
<i>SEMA5A</i>	4,572	8,775	-4,2	0,0061	(Hanna <i>et al.</i> , 2001)↓
<i>SOCS3</i>	7,826	9,758	-1,93	0,0218	(Harima <i>et al.</i> , 2004)↓
<i>p53</i>	9,746	5,068	4,67	0,0089	(Ogawa <i>et al.</i> , 2007; Guo <i>et al.</i> , 2005)↑
<i>VCL</i>	12,629	14,906	-2,27	0,0063	(Harima <i>et al.</i> , 2004)↓

Zu einigen dieser potentiellen Genmarkern können Interpretationen aufgrund ihrer zellulären Funktionen und Interaktionen geschlossen werden. So konnten Harima *et al.* eine Reihe von Genen identifizieren, die mit einer Thermoradiosensitivität in Gebärmutterhalskrebs assoziiert werden (Harima *et al.*, 2004). Dabei verglichen sie die Expressionsprofile von 8 thermoradiosensitiven und 11 thermoradioresistenten Tumor-Biopsie-Proben mittels eines cDNA Mikroarray, wobei auf der Basis von Clusteranalysen und Cross-Validierungen 35 Gene bestimmt werden konnten. Darunter fielen u.a. die Apoptose assoziierten Gene *carbonic anhydrase XII (CA12)* und *STAT induced STAT inhibitor 3 (SOCS3)* sowie *cathepsin L (CTSL1)*, welches mit Zellinvasion und Metastasierung von Tumoren in Verbindung gebracht wird. *CA12* und *CTSL1* wurden zudem noch durch weitere unabhängigen Studien als potentieller Genmarker identifiziert (Kitahara *et al.*, 2002; Kumagai *et al.*, 2006; Tewari *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2006). Interessanterweise konnten als Zielgene von *HIF-1 (Hypoxia-inducible factor)*, ein Schlüsselprotein nach hypoxischer Stimulation, die Transmembranproteinegene *CA9* und *CA12* identifiziert werden, die beide unter Hypoxie in Epithelkrebszelllinien hochreguliert sind (Wykoff *et al.*, 2000). Hypoxie ist ein entscheidender Faktor für die Ineffizienz einer Radiotherapie (Gatenby *et al.*, 1988; Fyles *et al.*, 1998; Tannock & Guttman 1981), sodass *CA9* und *CA12* durchaus prognostisches Charakter haben könnten. Ebenso wie *CA9* und *CA12* könnte auch das Gen *eukaryotic translation*

initiation factor 5A-2 (EIF5A2) prognostische Eigenschaften für den Therapieausgang aufweisen. So konnte *EIF5A2* bereits in unterschiedlichen Studien anhand einer Überexpression in Gebärmutterhalskrebs, nicht-kleinzelligem Lungen- und urotheliale Blasenkarzinomen als vielversprechender Marker zur Prognose des Krankheitsverlaufes bestimmt werden (Chen et al., 2009; He et al., 2011; G.-F. Yang et al., 2009). Auch das zur Klasse der Signaltransduktionsgene gehörige Gen *GDF15* (growth/differentiation factor 15) könnte Markerfunktion besitzen, da es nach Bestrahlung von Darmkrebs- und Brustkrebszellen zu einer Induktion der Genexpression von *GDF15* kommt (Okazaki et al., 2006; Helland et al., 2006). Einer der vielversprechendsten potentiellen Marker ist der Transkriptionsfaktor *JUN*, auch als *c-Jun* bezeichnet, welcher im Zusammenspiel mit *NRF1* (Nuclear respiratory factor 1) und *NRF2* die Expression von detoxifizierenden Enzymen einleitet (Venugopal & Jaiswal 1998). Weiterhin konnte *JUN* noch in weiteren Studien als möglicher Genmarker für das Ansprechen einer Radiotherapie identifiziert werden (Hanna et al., 2001; Higo et al., 2005; Ishigami et al., 2007). So zum Beispiel korreliert die Überexpression von *JUN* mit der Radioresistenz von klinischen Kehlkopftumorproben (Miura et al., 1997). Das Gen *MYC*, welches für den Transkriptionsfaktor *c-Myc* kodiert, wird eigentlich mit der Einleitung der Apoptose in Verbindung gebracht (Evan et al., 1992), so dass die erhöhte Expression in strahlungsresistenten Zellen eher auf die transkriptionelle Aktivierung anderer schützender Faktoren begründet sein muss (Vallat et al., 2003). *SOCS3* (*STAT-induced STAT inhibitor*) ist für die Inhibierung der *STAT* (*signal transducer and activator of transcription*) Transkriptionsfamilie bekannt, die wiederum auch bei der Induzierung des Zelltodes involviert ist (Kisseleva et al., 2002).

Unter den bisher Literatur bekannten Genen, die für eine erhöhte Strahlungssensitivität stehen, befinden sich *PRKAR2B* (*cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit*), *RAB5C* (*Ras-related protein Rab-5C*), *FN1* (*Fibronectin 1*), *p53* und *CTSL1*. Das die PC3 Zelllinie kein funktionales *p53*-Protein exprimiert ist schon seit 1998 bekannt (Herrmann et al., 1998). *p53*, ein Tumorsuppressorgen und Wächter des Zellzyklus, wird mit einer hemmenden Wirkung auf die Entstehung von Krebs assoziiert und wird als Antwort auf oxidativen Stress und DNA-Schädigungen aktiviert (Han et al., 2008). Demnach könnte ein nicht mutiertes *p53* Gen für die Sensitivität einer Zelle gegenüber ionisierender Strahlung mit verantwortlich sein. *PRKAR2B*, eine regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) ist in jedem Zelltyp ubiquitär exprimiert und spielt bei einer Vielzahl an zellulären Effekten eine essentielle Rolle. So zum Beispiel aktiviert PKA Transkriptionsfaktoren wie *CREB*, welches die Transkription von diversen Zielgenen ermöglicht, die über ein cAMP-Antwort-Element verfügen und bei der Regulation der Proliferation und Apoptose beteiligt sind (Shemarova 2009). *RAB5C* ist ein Mitglied der Rab Familie, die wiederum Mitglied der Ras Superfamilie ist und ein Proto-Onkogene. Eine

Hauptfunktion dieser kleinen GTPasen ist der vesikuläre Membrantransport. Das *FN1* Genprodukt Fibronectin führt nach Bestrahlung zur verstärkten Bindung des Integrins zur extrazellulären Matrix, wodurch die integrinabhängige Weiterleitung mit der Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges resultiert, was für das Zellüberleben nach Bestrahlung kritisch ist (Amundson & Smilenov 2011).

Die in der Tabelle V.1 nicht näher interpretierten, potentiellen Markergene sind zwar bereits in Mikroarray Untersuchungen als signifikant differentiell exprimierte Gene auffällig geworden, allerdings fällt aufgrund des bis dato mangelnden Wissens über die möglichen Gründe eines prognostischen Charakters für den Erfolg einer Radiotherapie eine Interpretation sehr schwer.

2.4 Differentielle Expression verwandter Markergene

Auffallend im erfassten Genexpressionsdatensatz der DuCaP und PC3 Zelllinien war, dass sich neben einer Vielzahl an tendenziell zur Literatur gleich verhaltenen Genexpressionen einige entgegengesetzt oder gar nicht exprimiert waren. Gründe dafür können zum einen die Expressionsspezifität des bis heute nicht auf das Ansprechen einer Radiotherapie untersuchten Prostata-Tumorgewebes sein und zum anderen eine Expression von verwandten, homologen Genen mit gleicher Funktionalität. Tabelle V.2 listet einige dieser Gene übersichtlich auf. Somit scheinen im Prostata-Tumorgewebe andere, zellspezifische Gene exprimiert zu sein, die allerdings funktional den klassischen, etablierten Gene der Strahlenbiologie ähneln.

Tab. V.2 - Differentielle Expression verwandter Markergene.

Potentielle Markergene	Verwandtes Gen	Ø DuCaP	Ø PC3	FC	P-Wert
<i>BCL2</i>	<i>BCL2L1</i>	11,136	13,369	-2,23	0,0032
<i>IGFBP3</i>	<i>IGFBP4</i>	9,093	13,291	-4,19	0,0050
<i>IGFBP4</i>	<i>IGFBP5</i>	3,740	6,378	-2,63	0,0008
<i>IGFBP7</i>					
<i>ALDH1</i>	<i>ALDH2</i>	9,152	4,035	5,11	0,0009
<i>RBP1</i>	<i>RBP7</i>	8,377	6,480	1,89	0,0027
<i>ERCC5</i>	<i>ERCC6</i>	6,988	9,894	-2,90	0,0018

Die in der Strahlenbiologie schon als klassisch etablierten Gene zur Vorhersage der Effizienz einer Strahlentherapie *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*, Lee *et al.*, 1999; Henríquez-Hernández *et al.*, 2011), *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP7* (*insulin-like growth factor binding protein*, Kumagai *et al.*, 2006; Hanna *et al.*, 2001), *ALDH1* (*aldehyde dehydrogenase 1*, Kitahara *et al.*, 2002), *RBP1* (*retinol binding protein 1*, Kitahara *et al.*, 2002) oder auch *ERCC5* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation*

group 5, Ogawa *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2006) konnten nicht im DuCaP versus PC3 Datensatz als signifikant differenziell exprimiert bestimmt werden. So lassen sich allerdings verwandte Gene, wie bspw. für *BCL2* das verwandte Gen *BCL2L1* (*BCL2-like 1*), für *IGFBP3*, *IGFBP4* und *IGFBP7* die Gene *IGFBP4* und *IGFBP5*, für *ALDH1* das Gen *ALDH2*, für *RBP1* das Gen *RBP7* und für *ERCC5* das verwandte Gen *ERCC6* als signifikant differentiell exprimiert finden.

2.5 Funktionale Netzwerkeanalyse zur Therapieprognose

Wie im vorherigen Abschnitt V.2.4 erläutert kommt es teilweise zur signifikant differentiellen Expression verwandter anstatt klassisch etablierter, strahlenbiologisch bekannter Gene. Diese Tatsache wird je nach Tumor- und Gewebeart spezifisch auftreten, so dass eine Analyse auf Netzwerkebene, die aktive zellulären Prozesse in der Gesamtheit betrachtet, sinnvoller erscheint. Außerdem wird durch die Gruppierung von Genen und ihrer zusammenhängenden Funktionen die Relevanz eines Markertests, im Gegensatz bei nur einer alleinigen Betrachtung einzelner Gene, erhöht. Demnach könnte eine Gengruppe und dessen Funktionalität als Netzwerk-Marker verwendet werden.

Das aktivste GO-Netzwerk ist die *Aldehyd-Dehydrogenase NAD(P)⁺-Aktivität* (GO:0004030), wobei hier das Gen *ALDH2* deutlich stärker in der sensitiven Zelllinie DuCaP exprimiert. Eine Erklärung für die erhöhte Expression von *ALDH2* in Verbindung mit *RBP7* in der strahlungssensitiven DuCaP Zelllinie könnte sein, dass *ALDH2* in der Retinolsäure-Synthese beteiligt ist (Ambroziak & Pietruszko 1991) und *RBP7* ein Transporter von Retinol ist (Bhat *et al.*, 1995). Gebärmutterhalskrebszellen, die vor einer medizinischen Bestrahlung mit Retinolsäure behandelt wurden, wurden daraufhin strahlungssensitiver (Benbrook *et al.*, 1997). Außerdem induziert Retinolsäure die Expression von TRAIL und bringt somit den Prozess der Apoptose voran (Altucci *et al.*, 2001). Demnach könnte die erhöhte Expression dieser Gene bei der Retinolsäure-Synthese beteiligt sein und somit die Apoptose nach Bestrahlung begünstigen (Kitahara *et al.*, 2002). Allerdings muss beachtet werden, dass in der resistenteren PC3 Zelllinie die Gene *ALDH1A3* (*aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3*) und *ALDH3A1* deutlich aktiver vorliegen. Allgemein spielen die Aldehyd-Dehydrogenasen eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Aldehyden, welche durch Alkoholmetabolismus und Lipidperoxidation entstehen. Bei dem Prozess der Lipidperoxidation interagieren freie Radikale mit Elektronen von Lipiden in der Zellmembran und verursachen so eine Kettenreaktion, die zur Zellschädigung führt. Demnach könnte eine erhöhte Konzentration auch ein Art Schutz vor freien Radikalen bieten und zur Folge eine erhöhte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung haben. Die Expression der einzelnen Gene dieser GO-Kategorie sind der Tabelle V.3 entnehmbar.

Als zweitplatzierte GO-Kategorie kommt die zelluläre Komponente der *Zell-Zell-Verbindung* (*cell-cell junction*, GO:0005911), die mit 69 exprimierten von insgesamt 90 Genen ein relativ großes GO-Netzwerk darstellt. Anzumerken ist hierbei, dass die Kultivierung der hier verwendeten Zelllinien in den Bestrahlungsexperimenten zweidimensional als Monoschicht erfolgte. Solide Tumore in lebenden Organismus wachsen allerdings dreidimensional, so dass die Verteilung, im Gegensatz zur zweidimensionalen Zellkultur, von Sauerstoff und Nährstoffen nicht überall gleich ist. Die großen Unterschiede bei der Reaktion auf Bestrahlung oder Chemotherapie von Monoschicht-Zellkulturen einerseits oder Tumoren *in vivo* andererseits, begründen sich darauf, dass die räumliche Verteilung und die Zell-zu-Zell-Kontakte unterschiedlich sind, was auch einen Einfluß auf die Expression der Gene für die Zell-Zell-Kommunikation haben könnte. Somit ist die Platzierung dieser GO-Kategorie mit Vorsicht zu betrachten.

Die restlichen aktiven GO-Netzwerke repräsentieren außer der molekularen Funktion der *Histon-Acetyltransferase-Bindung* (*histone acetyltransferase binding*, GO:0043407) die GO-Ontologie des biologischen Prozesses. Bindungen an der Histon-Acetyltransferasen können dabei sowohl eine Aktivierung als auch eine Inaktivierung des Enzyms nach sich ziehen. Histon-Acetyltransferasen sind Enzyme, die konserviertes Lysin von Histon-Proteinen aber auch von Transkriptionsfaktoren und nuklearen Rezeptoren acetylieren und somit einen Einfluss auf die generelle transkriptionelle Aktivierung haben können. Die GO-Kategorie *Negative Regulation der MAP Kinasen-Aktivität* (*negative regulation of MAP kinase activity*, G:0043407) scheint auch ein gut geeignetes Netzwerk zu sein, da die Signaltransduktionswege der MAP Kinasen auch durch Stress aktiviert werden und mit Prozessen der Proliferation oder Apoptose in Verbindung gebracht werden (Laskin 2002).

Erwähnt werden muss, dass eine Interpretation der meisten dieser identifizierten Netzwerke relativ schwer fällt, da der Algorithmus zur Berechnung des Netzwerk-Scores *B* (Abschnitt III.3.3) die Richtung der Expression, also in welcher Zelllinie das Gen eine höhere Expression aufweist, vernachlässigt und fast jede GO-Kategorie signifikant stärker exprimierte Gene aus beiden Zelllinien vorweist. Der Grund für die Anwendung des Algorithmus ist, dass es in jeder Kategorie sowohl inhibierende als auch aktivierende Gene für den jeweiligen Prozess des Netzwerkes geben kann, so dass eine nachfolgende Analyse der Interaktionen jedes einzelnen Genproduktes einbezogen werden sollte. Trotzdem gib es Kategorien, die überwiegend von nur einer Zelllinie deutlich aktiver repräsentiert werden. So ist bei Betrachtung der biologischen Prozesse der GO-Kategorien *Wundheilung und Ausbreitung epidermaler Zellen* (*wound healing, spreading of epidermal cells*, GO:0035313) und *Negative Chemotaxis* (*negative chemotaxis*, GO:0050919) erkennbar, dass fast alle Gene der beiden Netzwerke in der PC3 Zelllinie deutlich aktiver vorliegen (siehe

Tabelle V.3). Somit könnten diese Kategorien für eine erhöhte Resistenzfähigkeit gegenüber ionisierender Strahlung sprechen.

Beim Prozess der *Wundheilung und Ausbreitung epidermaler Zellen* fallen die sehr hohen Expressionen der beiden Untereinheiten, *SCNN1G* und *SCNN1B*, des Membran-gebundenen Natriumkanals *SCNN1* (*sodium channel non-neuronal 1*) auf, wobei bisher keine Assoziationen mit einer Strahlungsresistenz bekannt sind. Das für die alpha-1-Kette des Typ V-Kollagens kodierende Gen *COL5A1* konnte bereits in Plattenepithelkarzinom der Zunge seinen prognostischen Charakter auf einen Therapieerfolg zeigen (Suresh *et al.*, 2012). Weiterhin konnte durch Blockade des Gens *pro-heparin-binding EGF (HBEGF)* eine Verstärkung des Apoptose-Prozesses nach Behandlung eines Tumors mit dem Chemotherapeutika *Doxorubicin* beobachtet werden (Fischer *et al.*, 2004). Interessanterweise wird die stressinduzierte Aktivierung der *p38-MAPK* (*p38*-mitogenaktivierte Proteinkinasen) in humanen Karzinomzellen auch durch die Metalloprotease *ADAM17* vermittelt (Fischer *et al.*, 2004), die auch mit dem Prozess der Apoptose assoziiert ist (Y. Wang *et al.*, 2011). Somit könnte diese GO-Kategorie ein geeignetes Netzwerk zur Vorhersage des Ansprechens einer Radiotherapie sein.

Tab. V.3 - Expression der Gene spezieller GO-Kategorien

GO-Kategorie	Gen	Gen Score S	FC	P-Wert
<i>Wundheilung und Ausbreitung epidermaler Zellen</i>	<i>SCNN1G</i>	-11,167	-3,612	0,00009
	<i>COL5A1</i>	-5,087	-3,898	0,020
	<i>SCNN1B</i>	-4,258	-3,924	0,038
	<i>HBEGF</i>	-1,923	-1,816	0,041
	<i>AJUBA</i>	-1,552	-1,186	0,019
	<i>ITGA5</i>	0,002	0,077	0,920
	<i>ADAM17</i>	2,508	1,735	0,013
	<i>ACVRL1</i>	-	-	-
<i>Negative Chemotaxis</i>	<i>WNT5A</i>	-7,481	-3,767	0,002
	<i>SLIT2</i>	-5,908	-5,358	0,036
	<i>NRP2</i>	-4,774	-2,090	0,001
	<i>SEMA3F</i>	-3,847	-3,106	0,024
	<i>EPHA7</i>	-3,414	-3,224	0,041
	<i>SEMA3A</i>	-2,936	-3,456	0,078
	<i>RYK</i>	-0,043	-0,200	0,525
	<i>PDGFA</i>	-0,001	-0,044	0,935
	<i>EFNA5</i>	2,666	2,418	0,036
	<i>SLIT1</i>	-	-	-
	<i>SLIT3</i>	-	-	-
<i>Aldehyd-Dehydrogenase NAD(P)+ Aktivität</i>	<i>ALDH1A3</i>	-8,092	-4,294	0,003
	<i>ALDH3A1</i>	-3,987	-2,628	0,010
	<i>ALDH3A2</i>	-0,392	-0,822	0,238
	<i>ALDH2</i>	11,886	5,116	0,0009
	<i>ALDH3B2</i>	-	-	-

Die negative Chemotaxis eukaryontischer Zellen ist die Fähigkeit der Migration weg von chemischen Substanzen. Eine biologische Erklärung der hohen Einstufung dieser GO-Kategorie für das Ansprechen eines Tumors auf eine Radiotherapie ist nicht gegeben und bisherige Veröffentlichungen über einzelne Gene dieser Kategorie stehen teils im Widerspruch. Allerdings wirkt das Glykoproteing *WNT5A* (*Wingless-type MMTV integration site family, member 5A*) über eine Beteiligung bei den Signalkaskaden Src/ERK und PI3Kinase/AKT anti-apoptotisch in Osteoblasten (Almeida *et al.*, 2005). Es ist zudem bekannt, dass eine erhöhte *WNT5A* Expression in mesangialen Zellen eine verringerte Caspase-3 Aktivierung mit einer Reduzierung des Apoptosevorgangs bewirkt (Lin *et al.*, 2006). Widersprüchlich dagegen wird eine erhöhte Expression des Gens *WNT5A* in Prostata-Tumorgewebe mit einem besseren klinischen Therapieausgang assoziiert (Syed Khaja *et al.*, 2011). Ebenfalls widersprüchlich ist die hohe Expression von *SLIT2* (*slit homolog 2*) in der PC3 Zelllinie, da bisherige Untersuchungen *SLIT2* als Tumorsuppressorgen darstellen und eine erhöhte Expression mit einem verringerten Migrationsverhalten von Tumorzellen einhergeht (Tseng *et al.*, 2010). *NRP2* (*Neuropilin-2*) ist ein hochaffiner Rezeptor für *SEMA3F* (*semaphorin 3F*) wird schon länger als ein karzogener Faktor zum Tumorwachstum und als Ziel von Therapeutika angesehen (Gray *et al.*, 2008; Grandclement & Borg 2011). *SEMA3F* hingegen bewirkt bei erhöhter Expression eine Supprimierung der Tumorgenese in Nacktmäusen und verändert das zelluläre Ansprechen von Zytostatika durch Induzierung der Apoptose (Xiang *et al.*, 2002). Letztendlich muss festgehalten, dass durch die widersprüchlichen Aussagen der Gene der *Negativen Chemotaxis* GO-Kategorie über die Tumorgenese dieses Netzwerk zur Vorhersage einer Erfolgsaussicht einer Strahlentherapie ungeeignet scheint. Welche Ursachen für die hohe Aktivität dieser GO-Kategorie in der strahlungsresistenten PC3 Zelllinie stehen ist nicht eindeutig erklärbar.

2.6 Das zellspezifische Glykosylierungsmuster als prognostischer Marker

Neben der GO-Datenbank wurde die öffentlich zugängliche KEGG-Datenbank mit ihren Netzwerken untersucht, wobei im Stoffwechselweg der *Biosynthese von Mucin-Typ O-Glykanen* (*Mucin type O-Glycan biosynthesis*) die deutlich höchste Dichte an differentiell exprimierten Gene zwischen den Zelllinie DuCaP und PC3 bestimmt werden konnte. Die Glykosylierung von Proteinen ist die am weitesten verbreitete posttranslationale Modifikation und Glykoproteine spielen grundlegende Rollen in mannigfaltigen biologischen Prozessen (Z. Yang & Hancock 2004). Mucine sind Proteine die einen hochgradigen Besatz an O-Glykosylierung aufweisen und von allen Arten von Epithelzellen exprimiert werden. Die Mucine können dabei in der Membran verankert sein oder in einer sekretierten Form, durch alternatives Spleißen oder proteolytische Prozessierung, auftreten. Durch den dichten O-glykosidischen Besatz mit hydrophilen, negativ geladenen Glykanen bilden die Mucine

eine viskose, elastische Schicht, die Mukosa, über den Epithelzellen aus, wodurch ein physikalischer und chemischer Schutz gewährleistet ist (Teitz 2006). Dies ist generell eine der Hauptfunktionen der O-Glykosylierung, nämlich die Etablierung einer schützenden Barriere, wie sie z.B. im Verdauungstrakt erforderlich ist (Amerongen *et al.*, 1995). Eine weitere wichtige Rolle der O-Glykosylierung ist die Vermittlung zellulärer Kommunikation und die Funktion als Bindungspartner in Prozessen der Zell-Zell-Erkennung (Teitz 2006).

Die Glykoproteine von Tumorzellen sind häufig verändert, sowohl in der Struktur als auch in der Anzahl. Insbesondere die Mucin-Typ O-Glykane haben verschiedene krebsassoziierte Strukturen. Diese strukturellen Veränderungen können dabei die Funktionen einer Zelle und derer antigene und adhäsive Eigenschaften sowie das Verhalten von Invasion und Metastasierung ändern (Brockhausen 2006). Somit könnten krebsrelevante Mucin-Antigene für die Diagnose und Prognose einer Krebserkrankung durchaus ausgenutzt werden, was bereits durch weitere Veröffentlichungen glaubwürdig dargestellt wird (Abbott *et al.*, 2008; An & Lebrilla 2010). Deswegen ist eine Vorhersage der Effizienz einer Radiotherapie durchaus realistisch. Allerdings müssten dafür noch tiefgehende Untersuchungen über das Glykosylierungsmuster strahlungsresistenter Krebszellen durchgeführt werden.

2.7 Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos

Neben dem Ansatz einer Netzwerkaktivitätsanalyse ohne Einbeziehung der Richtung der differentiell exprimierten Gene (Abschnitt III.2.2) wurde mit Hilfe der kommerziellen Wissensdatenbank IPA (Ingenuity 2012) eine Analyse von interagierenden Gengruppen durchgeführt, in denen entweder alle Gene in der sensitiven DuCaP oder in der resistenten PC3 Zelllinie signifikant höher exprimiert vorliegen mussten. Dabei wurden zwei vielversprechende Netzwerke identifiziert (Abschnitt III.2.3), die jeweils durch die beiden gut bekannten Protoonkogene und Transkriptionsfaktoren *JUN* und *FOS* als zentrales Element initiiert werden, wobei das *JUN*-Netzwerk mit 15 Genen das signifikant aktivere Netzwerk in der PC3 Zelllinie und das *FOS*-Netzwerk mit 18 Genen das deutlich aktivere Netzwerk in der DuCaP Zelllinie ist. Beide Netzwerke bestehen aus unterschiedlichen funktionalen Proteinen, wobei einige aktivierend auf c-Jun und c-Fos wirken, und andere erst durch die Transkriptionsfaktoren exprimiert bzw. aktiviert werden. Weiterhin finden auch Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktionen zwischen den beteiligten Genprodukten statt. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass ein Markertest beruhend auf einer höheren Anzahl an gleichverhaltender Gene, die untereinander in Interaktion stehen, ein höheres Potential aufweist, als wenn nur einzelne Gene oder Gengruppe ohne direkte Interaktion betrachtet werden. Weiterhin wurde *JUN* bereits als ein vielversprechender Genmarker für eine hohe Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung in unabhängigen Studien identifiziert. (Hanna *et al.*, 2001; Higo *et al.*, 2005; Ishigami *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 2007).

Nichtsdestotrotz muss das Expressionsverhalten dieser zwei Netzwerke und ihrer beteiligten Genen in weiteren unabhängigen Strahlungsuntersuchungen verifiziert werden, um strahlenbiologisch fundierte Interpretationen aufstellen zu können.

Interessanterweise bilden c-JUN und c-FOS durch Interaktion ein Heterodimer namens AP1 (*activator protein 1*). AP1 ist ebenfalls ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus den Transkriptionsfaktoren der c-Fos, c-Jun, ATF und JDP Familien zusammengesetzt ist und die Genexpression, verursacht durch unterschiedlichste Stimuli wie bspw. durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stress oder bakteriellen und viralen Infekten, reguliert (Hess *et al.*, 2004). Dadurch werden eine Reihe von zellulären Prozessen kontrolliert, die einen Einfluss auf Proliferation und Apoptose haben (Ameyar *et al.*, 2003). Es könnte möglich sein, dass das Expressionsverhältnis zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung des Heterodimers AP1 hat und dadurch Empfindlichkeitsveränderungen gegenüber oxidativem Stress hervorgehen könnten. Schaut man auf die Expressionswerte von *JUN* und *FOS* so ist das durchschnittliche Verhältnis in der sensitiven DuCaP Zelle ähnlich und in der resistenten PC3 Zelllinie äußerst ungleich (siehe Tabelle V.4). Demnach liegt in der resistenten PC3 Zelllinie *FOS* nur minimal exprimiert vor, während *JUN* einen sehr hohen Expressionswert aufweist. Dadurch könnte eine reguläre Bildung von AP1 gestört sein und Prozesse, die einen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit haben, wie die Regulation der Apoptose, könnten verändert vorliegen.

Tab. V.4 - Expression von *JUN* und *FOS*

Gen Symbol	∅ DuCaP	∅ PC3	FC	P-Wert	Gen Score S
<i>JUN</i>	9,381	10,594	-1,213	0,0034	-2,29
<i>FOS</i>	8,179	4,366	3,811	0,0420	4,03

3 Zeitliche Dynamik zellulärer Prozesse nach Bestrahlung

3.1 Das experimentelle Design

Ein weiteres Hauptziel dieser Arbeit war es die zellulären Prozesse und Schutzmechanismen einer strahlungsresistenten Zelllinie nach einer medizinischen Bestrahlung in ihrer dynamisch zeitlichen Antworten mittels der RNA-Seq Methode zu studieren. Um die Anzahl an apoptotischen Zellen nach der Bestrahlung möglichst gering zu halten, wurde mit einer niedrigen Energiedosis von 1 Gy bestrahlt, was bei einer fraktionierten Bestrahlung eines Krebspatienten eine einmalige Sitzung darstellt. In der Gesamtheit variieren die Energiedosen in Abhängigkeit der Tumorart und des Krankheitsstadiums zwischen 40 Gy -

70 Gy, welche in Einzeldosen von 1 - 2 Gy täglich über mehrere Wochen verabreicht werden. Bei der Wahl der Zeitpunkte wurde eine Zeitspanne von 0 min bis ca. 43 h nach der Bestrahlung durch 8 Zeitpunkte abgedeckt, was einer exponentiellen Vergrößerung der Zeiträume zwischen den einzelnen Zeitpunkten entspricht. Dadurch sollte zum einen eine kurzfristige Antwort der Zelle von Minuten bis Stunden und zum anderen eine mittelfristige Expressionsveränderung von Stunden bis Tagen überbrückt werden.

Festzuhalten ist, dass ein linearer Zeitverlauf mit deutlich mehr Zeitpunkten für eine längerfristige Gesamtdauer eine bessere und hochauflösendere Analyse der dynamischen und zeitversetzten Genexpressionsveränderungen gewährleistet hätte. Praktisch wäre allerdings mit dem zur Verfügung stehenden Finanzen, Laborequipment und Personal eine solche Realisierung nicht möglich gewesen. Allein für die Aufarbeitung der Zellen bis zum Schockfrieren war eine Dauer von ca. 30 min notwendig, so dass bei alleiniger Bearbeitung dies die kurzmöglichste Zeitdauer zwischen zwei Zeitpunkten ergibt. Sollte eine lineare Gesamtdauer von 43 h untersucht werden, wären theoretisch von einer Person 86 Zellproben pro Zeitreihenbestrahlungsexperiment zu leisten, wobei diese Person ca. zwei Tage durcharbeiten müsste. Abgesehen vom menschlich limitierenden Faktor wäre auch das labortechnische Equipment eines solchen Unterfangens nicht gewachsen gewesen. Bei einem Zeitreihenbestrahlungsexperiment werden 8x 300 cm² Zellkulturflaschen benötigt, die alleine schon einen 150 Liter CO₂ Inkubator platztechnisch an die Grenzen bringen. Weiterhin hätten die Kosten für die Sequenzierungen die finanziell zur Verfügung stehende Mittel deutlich überstiegen, zumal durch die erhöhte Anzahl an Sequenzierungen und die enorme Vergrößerung der generierten Datenmenge es neue kostspielige IT-Infrastrukturen vorausgesetzt hätte.

Ein weiterer Punkt des experimentellen Ablaufes war die Fragestellung, ob eine parallele Bestrahlung einer strahlungssensitiven Zelllinie mit den gleichen Zeitpunkten für einen Expressionsvergleich sinnvoll gewesen wäre. Abgesehen von der dadurch entstehenden doppelten Probenanzahl wäre ein solcher Vergleich hinsichtlich strahlenbiologischer Entdeckungen vermutlich nicht gewinnbringend. Eine sensitive Zelllinie würde bei einer Bestrahlung größtenteils in den apoptotischen Zelltod übergehen, so dass eine Bestimmung der Genexpression letztendlich auf die Untersuchung des programmierten Zelltodes hinauslaufen würde und keine strahlenbiologisch relevanten Schutzmechanismen zum Vorschein gekommen wären. Auch ein Vergleich mit der gleichen strahlungsresistenten PC3 Zelllinie mit den gleichen Zeitpunkten allerdings ohne diese zu bestrahlen wäre fragwürdig. Bei dieser Konstellation würde man bei der nicht bestrahlten PC3 Zelllinie, die eine Verdopplungszeit von ca. 48 h aufweist, keine strahlenbiologisch relevanten und vergleichbaren Ergebnisse erwarten, sondern Vielmehr in der Gesamtheit aller Zellen einen kompletten Durchlauf des Zellzyklus wahrnehmen. Ob die dadurch zusätzlichen Einblicke im

Verhältnis zu den damit verbundenen experimentellen und finanziellen Mehraufwand gerechtfertigt wären ist demnach eher zu verneinen. Weiterhin zeigen die in dieser Arbeit erzeugten Daten viele strahlenbiologische Aspekte auf und bieten ein enormes Potential für ein besseres Verständnis über die Schutzmechanismen strahlungsresistenter Zellen, so dass der hier angewandte experimentelle Ablauf als logisch und sinnvoll betrachtet werden kann.

3.2 Die Normalisierung der Genexpressionsveränderungen

Bei Betrachtung der globalen Genexpressionsveränderungen fällt auf, dass diese nach Zeitpunkt 04:38 anfangen drastisch zu steigen. Da sich die Zeiträume zwischen den Zeitpunkten mehr als verdoppeln, liegt dementsprechend auch deutlich mehr Zeit für eine entsprechende Genexpressionsveränderung vor. Beim Vergleich der Genexpressionsveränderungen vom ersten Zeitpunkt 00:00 zum letzten Zeitpunkt 42:53 fallen die meisten und stärksten Genexpressionsveränderungen auf, was einerseits für eine langfristige, massive und globale Aktivitätsveränderung des Transkriptoms spricht und andererseits an dem großen zeitlichen Abstand von fast 43 h liegen könnte. Um eine ideale Normalisierung durchführen zu können, wäre eine Zugabe einer sequenzbekannten und einzigartigen Kontroll-mRNA mit einer definierten Konzentration in die total RNA Proben der aufbereiteten Zellen eine mögliche Anwendung. Aus den Expressionswerten dieser Kontroll-mRNA und der dazugehörigen bekannten Konzentration könnten die Konzentrationen jeglicher mRNA über einen einfachen Dreisatz berechnet werden. Somit wären Rückschlüsse über die tatsächlichen mRNA-Konzentrationen gegeben. Solche Kontroll-RNAs werden seit kurzer Zeit für die RNA-Seq Methode von Biotechnologieanbieter kommerziell zur Verfügung gestellt. Eine weitere Methodik, ohne den Einsatz von zusätzlicher RNA, ist die Normalisierung durch Berechnung des relativen Anteils der Genexpressionsveränderung pro Zeitpunktvorgleich, was nach Sortierung einem Gen-Ranking nach der Stärke der Genexpressionsveränderung entspricht (siehe die Gleichungen IV.1 und IV.2). Dadurch werden die absoluten Veränderungen zwar vernachlässigt aber eine Ermittlung der am stärksten verändert exprimierten Gene ist damit gegeben. Eine weitere Möglichkeit der Normalisierung ist die Berechnung der Genexpressionsveränderung pro Zeit, wobei der FC, oder auch Gen Score S , durch die Zeitdauer zwischen den beiden Genexpressionsbestimmungen dividiert wird. Allerdings ist diese Normalisierung äußerst fragwürdig, da sich die Stärke der Genexpressionsveränderungen nicht linear zur Zeitdauer zwischen den zwei Genexpressionsmessungen verhält und es bei größer werdenden Zeitabständen, wie sie in der angewandten Zeitreihe vorkommen, zur Verzerrung hin zu kleineren Genexpressionsveränderungen kommen würde.

3.3 Parallele Hochdurchsatz-Sequenzierung Millionen individueller Zellen

Bei einer SOLiD™ Hochdurchsatz-Sequenzierung muss beachtet werden, dass bei einer Sequenzierung Millionen von Zellen parallel sequenziert werden. Da der Prozess der ionisierenden Bestrahlung zufällig in jeder einzelnen Zelle individuelle Schäden verursacht liegt ein Gemisch an einzigartigen Zellen vor, indem jede einen eigenen unterschiedlichen Schädigungsgrad aufweist. Einige werden gar keine oder nur sehr geringe Schäden haben, anderen haben viele aber reparable Schäden und wiederum andere haben irreparable Schädigungen. Je nach Schädigungsgrad gibt es somit so gut wie keine Änderungen der zellphysiologische Prozesse wie dem Zellzyklus (bei keinen oder sehr geringen Schädigungen), kommt es zur Arretierung des Zellzyklus, der Aktivierung von Reparatursignalwege oder der Expression anti-apoptotischer und anti-oxidativer Gene (bei reparablen Schädigungen) oder aufgrund zu großer Schäden wird die Apoptose eingeleitet. Diese Tatsache spiegelt sich dementsprechend auch in den Genexpressionsprofilen wieder. Trotz einer geringen gewählten Energiedosis von 1 Gy für die Bestrahlung beim Zeitreihenexperiment liegt die Wahrscheinlichkeit einer heterogenen Zellpopulation relativ hoch. Schaut man auf die Netzwerkaktivitäten der verschiedenen funktionalen Zellvorgängen fallen ähnliche Aktivitätsstärken auf, z.B. bei Zellzyklusprozessen, Reparatursignalwegen oder der Apoptose (siehe Abschnitt 3.3). Durch die Vermischung diese gleichzeitig ablaufenden verschiedenen zellulären Prozessen liegt ein sehr heterogener Genexpressionsdatensatz vor, dessen biologische Ursachen dadurch teilweise unklar bzw. schwer zu interpretieren sind. Es ist allerdings davon auszugehen, dass bei der klinischen Anwendung der Radiotherapie genau diese Effekte auch auftreten und demnach ein äußerst realistischer Zustand vorliegt.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass bei dieser Zeitreihe Genexpressionsbestimmungen nur von der gleichen PC3 Zelllinie durchgeführt wurden und es bei der Berechnung der FC, der *P*-Werte und des Gen Scores *S* kein Vergleich zu einer anderen Zelllinie stattfand. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Stärken der Genexpressionsveränderungen niedriger ausfallen und auch weniger Gene signifikant differentiell exprimiert sind, da die Grundlage der zellphysiologischen Vorgänge die gleiche ist. Ebenso muss bei kurzen Zeitabschnitten, die vor allem am Anfang dieser Zeitreihe auftreten, bedacht werden, dass sich die Expressionsänderungen von einem Gen über mehrere Zeitpunkte aufsummieren können. Ein Beispiel dafür ist das Proteoglycan-Gen *SPOCK3* (*sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3*), welches im zweiten Zeitabschnitt mit einem Gen Score *S* von -0,842 und im dritten Zeitpunkt mit einem Gen Score *S* von -0,516 höher exprimiert wird. Einzel betrachtet liegt keine Verdopplung der Genexpression vor, während die Summe beider Expressionsveränderungen mehr als eine doppelte Induzierung der Expression verrät.

3.4 Dynamische und systemweite Genexpressionsveränderungen

Die zeitversetzte transkriptomweite Erfassung der Expression aller bekannten proteinkodierenden Gene durch die Hochdurchsatz-Sequenzierung der mRNA nach Bestrahlung der als strahlungsresistent eingestuften PC3 Zelllinie zeigt klar eine zeitabhängige, dynamische und spezifische Genexpressionsveränderung aufgrund des oxidativen Stresses und den dadurch verursachten Zellschäden (siehe Abschnitt IV.3.1). Tabelle V.5 zeigt eine Übersicht der Anzahl an stark und moderat differentiell induzierten und supprimierten Genen pro Zeitpunktvorgleich. Kurz nach der Bestrahlung (00:00 - 00:30) kommt es zur fast vollständigen Runterregulierung aller differentiell exprimierten Gene, was einem schützenden Rückzug der Zellen nach einem oxidativen Angriff entspricht. Dadurch kann die Zelle zeitweilig Energie einsparen und verhindert fehlerhafte Transkript- und Proteinsynthesen. Lediglich vier Gene sind nach 30 min doppelt so hoch induziert wie direkt von der Bestrahlung ($S > 1$). Darunter fallen *LRR1Q3* (*leucine-rich repeats and IQ motif containing 3*), *LUZP2* (*leucine zipper protein 2*), *ZPLD1* (*zona pellucida-like domain containing 1*) und *PKHD1* (*polycystic kidney and hepatic disease 1*), wobei bei allen vier Genen bisher keine Assoziationen mit einer erhöhten Genexpression nach Einwirken von oxidativem Stress bekannt sind. Im zweiten, dritten und vierten Abschnitt, also zwischen 00:30 bis 04:38, sinken die globale Genexpressionsveränderungen, wobei überwiegend die Induktion spezifischer Gene und Netzwerke initiiert wird, wie bspw. die Ankurbelung der MAPK, Jak-Stat oder p53 Transkriptionssignalwege, die daraufhin weitere stressinduzierte Schadenserkennungs-, Reparatur-, Zellzyklusarrest- oder Apoptose-Signalwege aktivieren. Eine Begründung für die geringen globalen Genexpressionsveränderungen in diesen drei Zeitabschnitt könnte sein, dass in diesem Zeitraum alle nicht schützenden Aktivitäten unverändert bleiben, die teilweise im ersten Zeitabschnitt nach 30 min runterreguliert wurden, und der gesamte Transkriptionsvorgang den Genen für die stressinduzierte zelluläre Antwort gewidmet ist. In den folgenden fünften, sechsten und siebten Zeitabschnitten, 04:38 bis 42:53, steigen die globalen Genexpressionsveränderungen wieder deutlich an, wobei sich die Anzahl supprimierender Gene in den beiden Zeiträumen 04:38 - 09:43 und 20:25 - 42:53 deutlich höher liegt, wohingegen im dazwischenliegenden Zeitraum 09:43 - 20:25 mehr Gene induziert werden. Nachdem zwischenzeitlich die hochregulierten Gennetzwerke wieder runterreguliert wurden, kommt es somit im vorletzten Zeitraum zu einer wiederholten Aktivierung, was ein oszillierendes Verhalten der Gen- und Netzwerkaktivitäten darstellt. Es wird deutlich, dass die Zellen nach einer mehrstündigen Pause, um zum Beispiel über die Atmungskette oder der oxidativen Phosphorylierung Energie (siehe Abbildung IV.9, KEGG-Netzwerk *Oxidative phosphorylation* und GO-Netzwerk *respiratory chain*) zu gewinnen, die Reparatur wieder aufgenommen haben, um die restlichen Zellschäden zu beseitigen. Insgesamt sind nach ca. 43 h der Bestrahlung mit 2.525 Genen (77,91746↓) sehr viele

induzierte oder supprimierte Gene zu beobachten, was dafür spricht, dass die Bestrahlung einen massiven Einfluss auf die Genexpression hat und nach 43 h eine Expressionsveränderung von mehr als 23 % aller exprimierten Gene (10.840) vorliegt. Bei Betrachtung der Summe der signifikanten Genexpressionsänderungen über alle Zeitpunkte erhält man insgesamt 1.696 supprimierte und 974 induzierte Gene, also zusammen 2.670 Gene. Diese Zahlen an verändert exprimierten Gene übersteigen nochmals deutlich die durch Amundson *et al.* in einer Mikroarray Untersuchung identifizierten 1.344 Gene (Amundson *et al.*, 1999). Kis *et al.* konnten in ihrer Veröffentlichung, bei der sie primäre humane Fibroblasten Zelllinien mit 2 Gy bestrahlt haben und die transkriptionelle Antwort nach 2 h mittels einer Mikroarray-Genexpressionsbestimmung ermittelt haben, ca. 200 Gene identifizieren (Kis *et al.*, 2006). Durch die hohe Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit der RNA-Seq Technologie zeigt sich ein noch komplexeres Bild der transkriptionellen, dynamisch zellulären Vorgänge als bisher sichtbar gemacht werden konnte. Somit sind globale, transkriptomweite und zeitliche unterschiedliche Ereignisse für das Ansprechen von strahlungsresistenten Krebszellen klar gegeben, was eine Erforschung auf Systemebene voraussetzt, um die Gesamtheit aller molekularen Ursachen einer Strahlungsresistenz erfassen zu können.

Tab. V.5 - Anzahl differentiell exprimierter Gene pro Zeitpunktvergleich

Expressions-verhalten	00:00	00:30	01:03	02:12	04:38	09:43	20:25	00:00
	00:30	01:03	02:12	04:38	09:43	20:25	42:53	42:53
stark induziert $S < -1$	4	184	1	10	66	282	427	779
moderat induziert $-0,5 > S > -1$	24	937	207	271	233	681	713	854
stark supprimiert $S > 1$	186	8	2	0	179	173	1321	1746
moderat supprimiert $0,5 < S < 1$	1007	41	56	20	521	566	1230	1213
unverändert exprimiert $-0,5 < S < 0,5$	9619	9670	10574	10539	9841	9138	7149	6248

3.5 Schnelle Expressionserhöhung von Transkriptionsfaktoren

Erwartungsgemäß werden im Zeitraum von 00:00 bis 02:12 wichtige Transkriptionsfaktoren induziert, die mit strahlenbiologisch relevanten Prozessen wie dem Zellzyklus, der Apoptose, DNA-Schadenserkennung und -reparatur oder auch Tumorsuppressorgenen in Verbindung gebracht werden. Während kurz nach Bestrahlung nur vier Regulatoren der Transkription moderat induziert werden, kommt es zwischen den Zeitpunkten 00:30 und 01:03 zur starken Induzierung vieler Transkriptionsfaktoren, die zudem bis zum letzten Zeitbereich von 20:25

bis 42:53 gleichbleibend exprimiert sind. Somit ist dieser Zeitabschnitt der Entscheidende für die Aktivierung der notwendigen zellulären Prozesse zum Sicherstellen des Zellüberlebens. Im dritten Zeitbereich werden wieder deutlich weniger Transkriptionsfaktoren induziert, wobei dies auch nur moderat geschieht. Nichtsdestotrotz kann auch eine geringe Expressionssteigerung eines Transkriptionsfaktors eine große Auswirkung auf die zellulären Vorgängen haben, da sie in der Lage sind die Transkription von vielen Gene, meist im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, simultan zu regulieren. Einige der früh induziert exprimierten Transkriptionsfaktoren sind in der Tabelle V.6 mit ihren Gen Scores S zum jeweiligen Zeitpunktvergleich gelistet.

Tab. V.6 - Schnelle Expression von Transkriptionsfaktoren

Transkriptions- faktor	00:00	00:30	01:03	01:03	02:12	02:12	04:38	04:38	09:43	09:43	20:25	20:25	42:53
	00:30	01:03	02:12	04:38	09:43	20:25	42:53						
<i>HLF</i>	-0,635	0,022	-0,033	0,149	0,173	-1,037	-1,497						
<i>IKZF2</i>	-0,690	0,849	-0,556	0,127	-0,370	0,173	-0,769						
<i>NEO1</i>	-0,625	0,689	-0,097	0,040	0,006	-0,043	-0,065						
<i>TFEC</i>	-0,596	0,024	-0,026	0,041	0,058	-0,174	-0,056						
<i>E2F5</i>	0,116	-1,890	0,013	0,163	0,036	-0,027	0,220						
<i>EIF3J</i>	0,306	-2,352	0,080	-0,001	0,363	-0,020	1,412						
<i>AHCTF1</i>	0,330	-1,016	0,011	0,000	0,003	0,000	0,895						
<i>NFXL1</i>	0,583	-1,405	0,009	0,006	-0,013	0,000	1,167						
<i>NKRF</i>	0,333	-1,332	0,123	-0,010	0,350	-0,278	0,938						
<i>SRSF2</i>	0,537	-1,429	0,168	-0,062	1,028	-0,113	1,338						
<i>TAF13</i>	0,662	-1,096	0,099	-0,004	0,160	-0,047	0,835						
<i>TCEB3</i>	0,346	-1,001	0,094	-0,025	0,002	-0,010	0,969						
<i>WT1</i>	0,539	-1,797	0,069	-0,019	0,006	0,001	2,136						
<i>ZNF354B</i>	0,159	-1,264	0,006	0,082	0,004	0,000	0,658						
<i>ZNF131</i>	0,265	-1,330	0,000	0,003	0,016	-0,002	1,853						
<i>ZNF134</i>	0,197	-1,097	0,113	0,001	0,293	-1,755	0,461						
<i>ZNF398</i>	0,462	-1,161	0,026	0,000	0,065	-0,369	1,949						
<i>ZNF639</i>	0,761	-1,164	0,000	-0,001	0,014	0,103	0,808						
<i>BAZ1B</i>	0,251	-0,079	-0,786	-0,004	-0,084	0,419	0,266						
<i>E2F7</i>	0,173	-0,011	-0,775	0,107	-0,005	0,266	-0,361						
<i>NIPBL</i>	0,257	-0,129	-0,872	0,006	0,003	0,024	0,471						
<i>SIX4</i>	0,283	-0,293	-0,826	0,447	-0,044	0,037	-1,331						

S < -1 stark induziert	-0,5 > S > -1 moderat induziert	S > 1 stark supprimiert	0,5 < S < 1 moderat supprimiert
---------------------------	------------------------------------	----------------------------	------------------------------------

Auffällig ist insbesondere die Klasse der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, die in Form der Gene *IKZF2* (*IKAROS family zinc finger 2*), *NFXL1* (*nuclear transcription factor, X-box binding-like 1*), *ZNF354B*, *ZNF131*, *ZNF134*, *ZNF398*, *ZNF639* (*zinc finger protein*) frühzeitig

und stark induziert werden. Bisher sind keine Assoziationen von Zink-Finger-Proteinen mit oxidativen Stress in Säugetierzellen gegeben, allerdings ist eine erhöhte Expression dieser Proteinklasse in Pflanzen als Antwort auf Stress durchaus bekannt (Kielbowicz-Matuk 2012; Blanvillain *et al.*, 2011). Es scheint als sei die erhöhte Expression dieser Zink-Finger-Proteinklasse als Antwort auf Stress evolutionär konserviert und fungiert heutzutage in resistenten Tumorzellen als Mechanismus zur schnellen Aktivierung schützender zellulärer Prozesse.

Weitere auffallende Gene für Transkriptionsfaktoren sind *E2F5* (*E2F transcription factor 5*), *E2F7* (*E2F transcription factor 7*), *BAZ1B* (*bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B*), *HLF* (*hepatic leukemia factor*), *NIPBL* (*Nipped-B homolog*), *SIX4* (*SIX homeobox 4*), *WT1* (*Wilms tumor 1*), *SRSF2* (*serine/arginine-rich splicing factor 2*) oder *AHCTF1* (*AT hook containing transcription factor 1*), die allesamt mit Prozessen der DNA-Schadensbekämpfung, Proliferation, Zellzyklusregulation, Apoptose oder dem Zellüberleben in Verbindung gebracht werden (Ingenuity 2012). Die restlichen, frühzeitig exprimierten Transkriptionsfaktoren fungieren u.a. als Regulator der Transkription und Translation durch Bindung spezieller Protein (*EIF3J*, *eukaryotic translation initiation factor 3*), als Zelloberflächenprotein und Signalgeber (*NEO1*, *neogenin 1*), als transkriptioneller Repressor NFκB-angehöriger Gene (*NKRF*, *NF-kappa-B-repressing factor*), als Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor (*TFEC*, *transcription factor EC*) oder als Elongationsfaktor (*TCEB3*, *transcription elongation factor B*) (Ingenuity 2012). Das Zusammenspiel dieser unterschiedlich agierenden Faktoren und Regulatoren auf die Transkription und Translation verdeutlicht die hohe Komplexität der zellulären Antwort einer strahlungsresistenten Zelllinie auf ionisierende Strahlung.

3.6 Expressionssteigerungen stressresistenz-assoziierter Gene

Es gibt bereits einige Untersuchungen von strahlungsresistenten Zellen und ihr Ansprechen auf induzierte Zellschädigungen bspw. durch ionisierende Bestrahlung, wobei nur ein Bruchteil dieser Veröffentlichungen ein Zeitreihenbestrahlungsexperiment durchgeführt hat (Akerman *et al.*, 2005; Ghandhi *et al.*, 2011; Kis *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2007; Sokolov *et al.*, 2006). Zudem bestehen die in der Literatur angewandten Zeitreihen aus weniger als 8 Zeitpunkten und die Zeitabstände variieren stark. Somit ist ein direkter Vergleich mit veröffentlichten Ergebnisse aus Zeitreihenbestrahlungsexperimenten nur bedingt möglich. Weiterhin muss beachtet werden, dass sich die Kinetik der Genexpression von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden und diese auch von der eingesetzten Energiedosis anhängig ist, was in einer hohen Komplexität für die Interpretation und den Vergleich solcher Datensätze resultiert (Amundson 2008). Nichtsdestotrotz finden sich übereinstimmende Ergebnisse mit

bekannten stressinduzierten Genen und Netzwerken, wobei bei einer Vielzahl an Genen nur eine moderate Induzierung erfolgte.

Die cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKI) *CDKN1A*, *CDKN2A* und *CDKN2D* (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) weisen im Zeitraum 09:43 - 20:25 eine deutliche Genexpressionserhöhung auf (*CDKN1A* = -1,003, *CDKN2A* = -1,952, *CDKN2D* = -2,245). Bemerkenswerterweise zeigen *CDKN1A* und *CDKN2A* im Zeitbereich davor eine signifikante Supprimierung, was dem oszillierenden Verhalten der Netzwerkaktivitäten bei den GO- und KEGG-Analysen ähnelt. CKIs wirken im Allgemeinen inhibierend auf die Aktivierung der Cyclin E/*CDK2* und Cyclin D/*CDK4/6* Komplexe. Dadurch haben sie einen entscheidenden Einfluß auf die Zellzyklus-Arretierung und auf den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase (Gartel & Radhakrishnan 2005; Rodriguez & Meuth 2006). Durch die starke Expression dieser CKIs im vorletzten Zeitraum wird womöglich die überwiegende Anzahl der Zellen in der G1-Phase arretiert, wodurch der DNA-Doppelstrang-Reparaturmechanismus des NHEJs gegenüber dem der HR dominieren sollte. Die HR benötigt eine homologe DNA-Matrize, das Schwesterchromatid, und diese ist in der G1-Phase nicht gegeben, da die Chromosomen in dieser Zellzyklusphase nur aus einem Chromatid bestehen. Nach Abbildung IV.11 liegen die beiden, sowie wie fast alle weiteren DNA-Reparaturwege, im zweiten und vorletzten Zeitbereich leicht aktiv vor, wobei kein merklicher Aktivitätsunterschied zwischen HR und NHEJ vorherrscht. Schaut man auf die einzelnen Genexpressionen beider Reparaturwege (siehe Abbildungen IV.14 und IV.15) fällt auf, dass die höchsten Aktivierungen bereits im dritten Zeitbereich, 01:03 - 02:12, auftreten und danach eine gleichbleibende oder leicht verringerte Expression sich darstellt. Dieses Netzwerk- und Genaktivitätsverhalten spricht für eine schnelle Reparatur der DNA-Schädigungen. Ein weiteres auffälliges Gen ist das zur FOS Familie gehörige *FOSL1* Gen, welches in der Lage ist mit den Genen der JUN Familie als Heterodimer den AP-1 Komplex zu bilden, um Zellproliferation, -differenzierung und -transformation zu regulieren. *FOSL1* wurde bereits durch Amundson *et al.* 1999 als ein strahlenbiologisch relevantes Gen identifiziert und wird im vorletzten Zeitraum stark induziert (Amundson *et al.*, 1999). Faktoren, die bei der Beteiligung der Chromatinstrukturierung eine Rolle spielen wurden mit einer leichten bis starken Induzierung kurz nach Bestrahlung exprimiert. Darunter fallen die Histon-modifizierenden Gene *EZH2* (*Enhancer of zeste homolog 2*), *SET*, *SIRT4* (*sirtuin 4*) und die Chromatin-Remodellierungsgene *DNTTIP2* (*deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2*) und *INO80C* (*INO80 complex subunit C*, Polo & Jackson 2011). Außerdem kommt es in verschiedenen Zeiträumen zur moderat bis stark induzierten Expression von stressassoziierten DNA-Reparatur- und Schadenssignal-Genen wie bspw. *ATMIN* (*ATM interactor*), *GADD45A*, *RAD51*, *RAD54B*, *RAD23A*, *XRCC2*, *XPA*, *BRCA1*, *BRCA2*. Weiterhin werden auch stressresistenz-assoziierte Gene wie die der Proteinkinasen

PRKD2 und PRKD3 (*protein kinase D 2 und 3*) zu unterschiedlichen Zeitpunkten moderat bis stark induziert. Auch ist eine erhöhte Expression von anti-oxidativen Genen zu verschiedenen Zeitpunkten wahrnehmbar, wie bspw. die Gene *TXNL1* (*Thioredoxin-like 1*) oder *SOD2* (*Superoxide dismutase 2, mitochondrial*). Als ein Vertreter des programmierten Zelltodes werden die Gene *TP53INP1* (*Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1*) und *FADD* (*Fas (TNFRSF6)-associated via death domain*) im letzten Zeitraum äußerst stark induziert, was dafür sprechen könnte, dass in diesem Zeitraum viele Zellen in die Apoptose geleitet werden, da eine zellüberlebende Reparatur nicht möglich war. Die nachfolgende Tabelle V.7 listet die beschriebenen Gene mit ihren Gen Scores S für jeden Zeitpunktvorgleich auf.

Tab. V.7 - Expressionsveränderung Stress-assoziierte Gene gezeigt am Gen Score S.

Gen	00:00	00:30	01:03	02:12	04:38	09:43	20:25
Symbol	00:30	01:03	02:12	04:38	09:43	20:25	42:53
<i>DNTTIP2</i>	0,590	-1,224	0,133	0,020	0,003	-0,011	1,657
<i>TXNL1</i>	0,772	-1,349	0,060	-0,002	0,002	0,011	1,294
<i>SET</i>	0,421	-0,683	0,002	-0,322	0,025	0,000	0,500
<i>GADD45A</i>	0,905	-0,635	0,229	-0,260	0,652	0,000	-0,333
<i>SIRT4</i>	0,000	-0,949	0,108	0,150	-0,006	0,290	-0,205
<i>XPA</i>	0,166	-0,626	-0,015	-0,034	0,251	0,288	1,964
<i>INO80C</i>	0,109	-0,939	0,208	-0,052	0,145	-0,054	0,294
<i>ATMIN</i>	0,474	-0,517	0,000	-0,025	0,157	-0,012	0,781
<i>EZH2</i>	0,013	-0,005	-0,510	0,015	-0,070	0,789	0,000
<i>BRCA1</i>	-0,018	0,008	-0,500	0,161	-0,437	0,678	0,008
<i>BRCA2</i>	0,010	-0,004	-0,512	0,226	-0,124	0,523	0,003
<i>PRKD3</i>	0,041	0,002	-0,544	0,092	-0,092	0,207	-0,359
<i>RAD54B</i>	0,014	0,000	-0,583	0,069	-0,769	1,507	-0,009
<i>XRCC2</i>	0,079	-0,002	-0,545	0,064	-0,566	0,958	0,231
<i>RAD51</i>	0,090	0,000	-0,432	0,011	-0,787	1,182	0,026
<i>CDKN1A</i>	0,105	-0,004	0,372	-0,394	1,744	-1,003	0,045
<i>CDKN2A</i>	0,507	-0,157	0,160	-0,158	1,875	-1,952	-0,065
<i>CDKN2D</i>	0,092	0,057	-0,009	-0,017	0,310	-2,245	-0,167
<i>FOSL1</i>	0,254	0,031	0,223	-0,293	0,800	-1,3053	0,285
<i>RAD23A</i>	0,442	0,098	0,000	-0,064	0,093	-0,871	0,128
<i>PRKD2</i>	0,151	0,042	-0,132	-0,026	-0,239	0,037	-1,275
<i>TP53INP1</i>	-0,119	0,089	-0,164	0,099	0,000	-0,017	-4,492
<i>FADD</i>	0,624	-0,409	0,185	-0,351	0,163	0,000	2,371
<i>SOD2</i>	0,337	-0,293	0,000	0,019	0,179	-0,013	-1,389

S < -1
stark induziert

-0,5 > S > -1
moderat induziert

S > 1
stark supprimiert

0,5 < S < 1
moderat supprimiert

Somit verhalten sich eine Vielzahl der durch andere Studien als stressresistenz-assoziierten Gene tendenziell in ihrer Expression gleich. Generell muss allerdings festgehalten werden, dass die meisten literaturbekanntesten, stressresistenz-assoziierten Gene nur moderat induziert werden. Dies kann zum einen darin liegen, dass die Expression dieser Gene basal hoch ist und zum anderen die moderaten Induzierungen ausreichend für ein Zellüberleben der geschädigten aber reparablen Zellen sind. Zudem weisen diese Gene und ihre interagierenden Partner innerhalb eines Netzwerkes ähnliche Werte der Expressionsänderung in den gleichen Zeiträumen auf, was in den Grafiken der Ergebnisabschnitten III.3.4 bis III.3.7 deutlich feststellbar ist.

3.7 Oszillierende Aktivitätsänderungen von Netzwerken

Eine interessante Beobachtung ist das nahezu oszillierende Aktivierungsverhalten der aktivsten KEGG- und GO-Netzwerke über den gesamten Zeitbereich (Abbildung IV.10). So kommt es direkt nach Bestrahlung zu sehr geringen Expressionsveränderungen der Gene in fast allen KEGG-Netzwerken, um nachfolgend im Wechsel starke und schwache Expressionsveränderungen vorliegen zu haben. Bedacht werden muss, dass sich die Zeitabstände der Zeitreihenmesspunkte nicht linear sondern exponentiell vergrößern. Außerdem sind in den Abbildungen IV.10 - IV.13 die Differenzen des Netzwerk-Scores B , also die Differenz der Stärke der mittleren, absoluten Genexpressionsveränderung eines Netzwerkes zwischen zwei benachbarten Zeitpunktvergleichen (siehe Gleichungen III.35 - III.44) ohne Berücksichtigung der Richtung der Veränderung (induzierend oder supprimierend) dargestellt. So kann es sein, dass zuerst die Gene eines Netzwerkes stark hoch- oder runterreguliert werden (grün, da starke Expressionsveränderung), dann im nächsten Zeitabschnitt unverändert exprimiert werden (rot, da zuvor starke Expressionsveränderung und nun keine Expressionsveränderung vorliegt), im nachfolgenden Zeitabschnitt ebenfalls unverändert exprimiert werden (schwarz, da wieder keine Expressionsveränderung), um im darauffolgenden Zeitbereich wieder stark hoch- oder runterreguliert zu werden (grün, da nach keiner Expressionsveränderung wieder eine starke Expressionsveränderung folgt). Aus diesem Grunde wird der Effekt des oszillierenden Verhaltens der aktivsten GO- und KEGG-Netzwerke verstärkt. Die Berechnung des Netzwerk-Scores B funktioniert zur Identifikation der aktivsten Netzwerke, allerdings können keine Aussagen über eine Aktivierung oder Inaktivierung eines Netzwerkes für den jeweilige Zeitbereich getroffen werden. Für diese Informationen wären weitere detaillierte Analysen der einzelnen Genaktivitäten innerhalb des Netzwerkes notwendig, um die Richtungsänderung der Genexpressionen ermitteln zu können. Hinzukommend ist allerdings der Fakt, dass diese Netzwerke überwiegend aus inhibierenden und aktivierenden Genen bestehen und somit beide Formen der Genexpressionsrichtung zeitgleich in einem Netzwerk

vorliegen können. Um diesen Fakt zu entgegen, wäre eine direkte Interaktionsinformation zwischen zwei Genen, ob inhibierende oder aktivierende Wirkung, notwendig. Solche Interaktionsinformation sind heutzutage noch äußerst unvollkommen und werden in ausreichender Qualität nur von kommerziellen Datenbanken meistens ohne Freigabe dieser Daten gestellt. Nichtsdestotrotz konnten durch die Berechnung des hier angewandten Netzwerk-Scores (Gleichung III.40) und der Bildung des Netzwerk-FC nach Gleichung III.44 interessante GO- und KEGG-Netzwerke identifiziert werden (siehe Abschnitt V.3.8 und V.3.9).

3.8 Zellzyklus, RNA Prozesse und Signaltransduktionswege

Durch die Bildung des Netzwerk-FC (Gleichung III.46) konnten mit Hilfe der GO- und KEGG-Datenbanken unter den aktivsten Netzwerken einige Zellzyklus-Kategorien zugeordnet werden. Darunter fallen die GO-Kategorien *mitotic prometaphase*, *M phase of mitotic cell cycle*, *mitotic cell cycle*, *MCM complex*, *mitotic recombination*, *DNA-dependent DNA replication initiation* aber auch das KEGG-Netzwerk *Cell cycle*. Demnach werden viele Gene des mitotischen Zellzyklus, insbesondere der M-Phase, stark in ihrer Genexpression verändert. Das der Zellzyklus und dessen Arretierung eine bedeutende Rolle bei der Antwort einer Zelle auf ionisierende Strahlung spielt ist hinreichend beschrieben (Arenz 2007; Reinhardt & Yaffe 2009). Wo hingegen die Ursachen für die hohen Aktivitäten der M Phase liegen ist allerdings unsicher. Eine Begründung könnte die Aktivierung des Kontrollpunktes G2/M sein (Abbildung IV.11, GO-Kategorien *G2/M transition DNA damage checkpoint* und *mitotic cell cycle G2/M transition DNA damage checkpoint*), welche durch die Einwirkung von oxidativen Stress herbeigeführt werden kann (Furukawa-Hibi 2002). Bei Betrachtung zeitlich ähnlich verhaltender Kategorien fällt auf, dass Prozesse der Replikation, Reparatur und Instandsetzung von DNA ebenfalls auftreten, welche durch die GO-Netzwerke *DNA-dependent DNA replication initiation*, *telomere maintenance via semi-conservative replication*, *telomere maintenance via recombination*, *nucleotide-excision repair*, *DNA gap filling* oder durch die KEGG-Netzwerke *Homologous recombination* und *Base excision repair* repräsentiert werden. Somit könnte es sein, dass im zweiten Zeitabschnitt die Zellzyklus-Arretierung mit dem zeitgleichen Beginn von Reparaturen und Instandsetzungen der DNA-Schäden vorangetrieben wurde und bereits im vorletzten Zeitabschnitt diese Schäden größtenteils repariert waren und es dadurch wieder zur simultanen Runterregulierung dieser Netzwerke kam. Diese These wird auch durch die Darstellungen der einzelnen DNA-Reparatur-Signalwege (Abbildungen IV.15 - IV.18) und den Profilen der GO-Netzwerke für Schädigungen, zelluläre Antworten und Reparaturen gestützt (Abbildung IV.11 - IV.12). Äußerst interessant sind die steigenden Aktivitäten RNA-gesteuerter Ereignisse, insbesondere Aktivitäten von snoRNA (*small nucleolar RNAs*) und Pseudouridin-Prozessen,

welche durch beide Datenbanken dargestellt werden (*Ribosome biogenesis in eukaryotes*, *rRNA processing*, *pseudouridine synthesis*, *pseudouridine synthase activity*, *pre-snoRNP complex*, *snoRNA binding*, *small nucleolar ribonucleoprotein complex*). Nach Überprüfung der einzelnen Genaktivitäten liegt eine erhöhte Aktivierung dieser Netzwerke direkt nach Bestrahlung vor, wobei diese bis zum letzten Zeitraum stabil bleibt, um dann heruntergefahren zu werden. Es wird damit offensichtlich, dass funktionale RNA Einfluß auf die Antwort einer Strahlentherapie haben könnte. RNA-Modifikationen (z.B. tRNA oder mRNA) geschehen durch Katalyse von Uridin zu Pseudouridin durch Ψ -Synthasen. snoRNAs sind an der Prozessierung und Modifikation anderer RNA (z.B. rRNA) beteiligt. Sie codieren nicht für Proteine sondern arbeiten als *guide* RNA, indem sie die katalytischen Proteine an die richtigen Stellen der RNA bringen. Bisher sind wissentlich nur zwei Assoziationen zu oxidativen Stress gegeben. β -Pseudouridin, ein Bestandteil von Bier, reduziert strahleninduzierte chromosomale Aberrationen in humanen Lymphozyten (Monobe *et al.*, 2003) und durch den Verlust der drei snoRNAs *U32a*, *U33* und *U35a* konnte in Säugerzellen eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress erzielt werden (Michel *et al.*, 2011). Demnach scheinen diese RNA-modifizierenden Netzwerke einen bisher unbekanntem funktionalen und schützenden Einfluss auf das Zellüberleben nach Einwirkung ionisierender Strahlung zu haben und sollten für zukünftige Bestrebungen einer verbesserten Strahlentherapie berücksichtigt werden.

Weiterhin auffallend sind die frühzeitigen und mittleren Aktivierungsänderungen der MAPK-, ErbB-, Jak-STAT- und p53-Signalwege der KEGG-Datenbank. Bemerkenswert ist, dass obwohl *p53* in der PC3 Zelllinie nicht exprimiert wird, die *p53*-vermittelnden Prozesse trotzdem aktiv sind. Dementsprechend müssen redundant wirkende Systeme diese Prozesse unabhängig von *p53* steuern, wobei eine Resistenzerhöhung einhergehen könnte. Es ist bekannt, dass mutiertes *p53* einen negativen Einfluß auf das Ansprechen einer Radiotherapie durch Veränderungen der Zellzyklus- und Apoptose-Prozesse hat (Arenz 2007; Brahme & Lind 2010; Nakamura 2004). Die weiteren Signalkaskaden sind bereits in vielen Veröffentlichungen mit unterschiedlichsten Krebserkrankungen und deren Therapieansprechen bekannt. Der MAP-Kinase-Weg wird über Stress aktiviert (Abbildung IV.11, *stress-activated MAPK cascade*), was Antworten wie Entzündungen, Apoptose, Wachstum oder Differenzierung zur Folge haben kann (Kisseleva *et al.*, 2002). Verstärkte ErbB-Signalaktivitäten werden mit der Entwicklung einer Vielzahl von soliden Tumoren assoziiert und ist ein kritischer Faktor für die Böshaftigkeit und das Therapieansprechen (Marmor *et al.*, 2004). Die Jak-STAT-Signalkaskade wird mit der Pathogenese einiger humanen bösartiger Tumore assoziiert und ein defekter Signalweg könnte zum negativen Ansprechen einer Tumorthherapie führen (Boudny & Kovarik 2002). Es scheint, als ob diese vier Signaltransduktionswege die entscheidenden zellulären Wege zur schnellen Einleitung

der schützenden Maßnahmen darstellen, indem sie hunderte von Zielgenen aktivieren, die wiederum den oxidativem Stress und den dadurch verursachten Zellschädigungen entgegenwirken.

3.9 Zeitlich abgestimmtes Zusammenspiel schützender Signalwege

Um das Zusammenspiel der induzierten und supprimierten Gene und deren Auswirkungen auf das zeitlich zelluläre Ansprechen einer strahlungsresistenten Zelllinie auf ionisierende Strahlung besser zu verstehen, ist die systemweite Betrachtung der Aktivierung ganzer Signalkaskaden und spezifischer Prozesse von großer Bedeutung. Erst durch das systemweite Verständnis der stressvermittelten Prozesse können zielgerichtete Therapieverfahren entwickelt werden, die die Effizienzsteigerung einer Radiotherapie bei gleichzeitiger Verringerung der Nebenwirkungen ermöglicht.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Netzwerkanalysen in den Abschnitten IV.3.2 bis IV.3.6 fällt auf, dass alle strahlenbiologisch relevanten Prozesse und Signalwege stattfinden. Während es bei den Genen des NRF2-Signalweges (Abbildung IV.14) nach Einwirken des oxidativen Stresses zur zeitspezifisch induzierten Genexpression kleinere Gengruppen über den gesamten Zeitraum kommt, sind Genexpressionssteigerungen der DNA-Reparaturmechanismen des MMR, NER, HR und NHEJ (Abbildungen IV.15 - IV.18) überwiegend im frühen Zeitbereich von 00:30 bis 02:12 zu beobachten. Somit finden durch die Aktivierung des NRF2-Signalweges Prozesse wie die Reparatur oder Degradierung von geschädigten Proteinen, die Entgiftung und der Abtransport toxischer Metaboliten und die Neutralisierung von oxidativen Stoffen über die gesamte Zeitdauer statt. Hingegen werden die lebensnotwendigen Reparaturen der DNA, insbesondere der DNA-Doppelstrangbrüche, zügig voran gebracht. Nur mit einer intakten DNA sind die Zellen in der Lage Gene abzulesen und überlebensnotwendige Prozesse anzukurbeln. Während die Aktivierung des NER DNA-Reparaturmechanismus gering ausfällt, werden die beiden Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die HR und das NHEJ, zeitgleich mit der MMR-Reparatur stark aktiviert. Da bereits ein DNA-Doppelstrangbruch den Tod der Zelle herbeiführen kann besitzt diese Art der Reparatur demnach eine besondere Bedeutung. Es ist bemerkenswert wie in den beiden Zeiträumen 00:30 - 01:03 und 01:03 - 02:12 gleichermaßen diese DNA-Reparaturnetzwerke hochreguliert werden. Die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen und Basenschädigungen wird zeitgleich zur HR, zum NHEJ und zum MMR vom BER-Reparaturmechanismus vollzogen, was durch die KEGG-Analyse ersichtlich wird (Abbildung IV.10 link, *Base excision repair*). Weiterhin ist die ATM-vermittelte Zellzyklus-Regulation (Abbildung IV.19) zeitlich im Einklang mit den DNA-Reparaturnetzwerken. Somit findet eine nahezu synchron abgestimmte Aktivierung und Interaktion der überlebensnotwendigen Netzwerke und ihrer Gene statt. Im Gegensatz dazu

zeigen die Expressionswerte des Apoptose-Netzwerkes (Abbildung IV.13 und IV.20) nur eine geringe zeitspezifische Aktivierung der beteiligten Gene auf. Diese Tatsache spricht für ein Kampf zwischen pro- und anti-apoptotische Faktoren und ein Gemisch an Zellen, die in den programmierten Zelltod eintreten und die, die der Apoptose durch Reparatur der zellulären Schäden entgehen. All diese schützenden Netzwerke und ihre zeitspezifischen Interaktionen sind essentiell für das Überleben von Zellen nach Einwirkung von oxidativem Stress und zeigen ein komplexes aber im Einklang befindliches Zusammenspiel vieler Einzelkomponenten zu einem systemweit ablaufenden Programm.

3.10 Therapeutische Ansätze zur Sensibilisierung

Ein Hauptproblem bei der Behandlung von Krebserkrankungen mit Chemo- und Radiotherapie ist das Risiko eines Rezidivs aufgrund resistenter Tumorzellen, die die Behandlung überleben und zu einem späteren Zeitpunkt wieder unkontrolliert proliferieren. Um dieses Risiko zu minimieren, arbeiten Forscher und Ärzte weltweit an Lösungen zur Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber der angewandten Therapieform. Insbesondere sind dabei Gene von Signalwegen und Netzwerken von hohem Interesse, die für eine Resistenz verantwortlich gemacht werden. Darunter fallen hauptsächlich Netzwerke der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparaturmechanismen und des programmierten Zelltodes, wobei bereits beachtliche Erfolge in der Manipulation solcher Netzwerke erzielt werden konnten (Kesari *et al.*, 2011; Gerspach *et al.*, 2011). All diese Netzwerke zeigten eine gesteigerte, zeitspezifische Aktivität im Zeitreihenbestrahlungsexperiment in der in dieser Arbeit untersuchten, resistenten PC3 Zelllinie und scheinen prinzipiell ein ideales Ziel eines medikamentösen Angriffs zur Effizienzsteigerung einer Strahlentherapie zu sein. Einige induzierten Gene in der Zeitreihenanalyse waren bereits Ziele in Studien zur Sensibilisierung von Prostatakarzinomen auf eine Strahlentherapie. Unter anderem schlussfolgern Anai *et al.* aus ihren Untersuchungen, dass eine Runterregulierung des Gens *CA9*, welches beim Vergleich der Zelllinien DuCaP und PC3 signifikant aktiver (S von $-4,31$) in der resistenten PC3 Zelllinie vorlag und im Zeitbereich 20:25 - 42:53 eine enorme Induzierung mit einem Gen Score S von $-4,32$ erfuhr, zur Sensibilisierung für eine Radiotherapie führen könnte (Anai *et al.*, 2007). Bei Untersuchung zur Radiosensibilisierung von Prostata-Tumoren wurden durch Aptamer-shRNA (*small hairpin RNA*) Chimäre in humanen Tumor-Xenotransplantaten signifikante Empfindlichkeitssteigerungen durch Runterregulierung der Gene *BRCA2*, *RAD54L*, *PRKDC*, *NBN* (*Nibrin*) und *RAD23B* erzielt (Ni *et al.*, 2011). Die Expressionssteigerungen dieser Gene verhalten sich am Anfang der Zeitreihe tendenziell induzierend (*BRCA2* mit S $-0,51$ für 01:03 - 02:12; *RAD54L* mit S $-0,38$ für 01:03 - 02:12; *PRKDC* mit S $-0,41$ für 01:03 - 02:12; *NBN* mit S $-0,40$ für 00:30-01:03; *RAD23B* mit S $-0,44$ für 00:30-01:03), sodass eine kombinierte, zielgerichtete Runterregulierung dieser Gene

durchaus Potential aufweisen könnte. Weiterhin konnte durch RNAi (*RNA interference*) gegen das Gen *HSPB1* eine erhöhte Apoptose-Aktivität simultan zu einem verringerten Glutathion-Spiegel erlangt werden, was zu einer Radiosensibilisierung in mehreren Prostata-Krebszelllinien geführt hat (Aloy *et al.*, 2008). Das *HSPB1* (*heat shock 27kDa protein 1*) Gen wies im Zeitbereich 09:43 - 20:25 eine moderate Induzierung mit einem Gen-Score *S* von -0,69 auf, was es demnach auch zu einem potentiellen Ziel macht.

Letztendlich sind viele Gene potentielle Ziele für eine medikamentöse Manipulation mit dem Zweck einer Radiosensibilisierung. Es ist davon auszugehen, dass eine kombiniert synchrone Manipulation mehrerer Gene eine höhere Auswirkung auf die Radiotherapieeffizienz haben wird als eine Einzelgen-Manipulation. Für eindeutigere Aussagen sind definitiv weitere und tiefgehendere Analysen notwendig. Eine mögliche Methodik wäre ein RNAi Hochdurchsatz-Screening vieler potentieller Gene mit anschließenden Bestrahlungsexperimenten. Aber auch wenn gutfunktionierende Wirkstoffe validiert sind ist eines der größten Probleme, wie bei allen medikamentösen Behandlungen, der zielgerichtete Transport des Wirkstoffes zum Zielort, in diesem Fall zur Krebszelle. Neuste Entwicklungen in der Nanotechnologie haben ein großes Potential zur Herstellung von Nanopartikeln aus Diamant, Silizium, Siliziumkarbid, Polymeren oder Germanium, die den Wirkstoff in sich beherbergen, um ihn nach Eindringen in der Zelle freizusetzen (Fan & Chu 2010). Für das zielgerichtete Eindringen in Krebszellen, ohne dabei normale Zellen anzugreifen, werden diese Nanopartikel mit speziellen Oberflächenmolekülen, insbesondere Glykoproteine, ausgestattet. Das Prinzip beruht auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, da Krebszellen spezielle Oberflächenmoleküle aufweisen, an die die Nanopartikel andocken, um eindringen zu können. Demnach sind die krebsspezifischen Oberflächenmoleküle entscheidend für eine effiziente Wirkstofffreisetzung. Zur Ermittlung dieser speziellen Erkennungsmuster wären vorhergehende RNA-Seq Untersuchungen von Tumor-Biopsie-Proben durchaus denkbar, um das entsprechende Arsenal an Oberflächenproteinen für die Nanopartikel zu definieren.

4 Ausblick

Obwohl in dieser Arbeit die meisten strahlenbiologisch relevanten Fragestellungen hinsichtlich der Zielsetzung beantwortet werden konnten und dadurch viele aufschlussreiche Details über das zeitliche Ansprechen einer resistenten Prostata-Krebszelllinie auf ionisierende Strahlung oder die Möglichkeit einer Vorhersage zur Strahlungsempfindlichkeit näher beleuchtet wurden, bietet dieser erhobene Datensatz noch enormes Potential für weitere Enthüllungen karzinogener Resistenzmechanismen. Insbesondere der RNA-Seq Datensatz

und seine bisher nicht untersuchten Bereiche könnten bedeutendes, biologisches Wissen beherbergen. Speziell könnte dabei die Analyse der spezifischen Expression verschiedener Transkripte eines Genes oder die Beleuchtung von intronischer und intergenetischer Expression zum Auffinden nicht-annotierter Transkripte neue und weitere interessante Aufschlüsse ergeben. Auch bergen Klassifikationsverfahren ein großes Potential, um neue Zusammenhänge von zeitlich korrelierenden Gengruppen und deren Zusammenspiel nach einer Bestrahlung, ohne Anwendung von *a priori* Wissen, aufzuspüren. Erste Untersuchungen mit den Zeitreihen-Clusteranalyse-Programmen *STEM* (*Short Time-series Expression Miner*) und *GHMM* (*General Hidden Markov Model library*) deuten auf vielversprechende Ergebnisse hin (Costa *et al.*, 2005; A. Schliep *et al.*, 2003; Alexander Schliep *et al.*, 2004; J. Ernst *et al.*, 2005; Jason Ernst & Ziv Bar-Joseph 2006). Um die systemweiten Vorgängen der zellulären Strahlenantwort im Ganzen zu verstehen, wären auch Modellierungen und Simulationen mit dem Genexpressionsverhalten ganzer Netzwerk durch Differentialgleichungssysteme förderlich. Neben diesen bioinformatischen Ansätzen wäre auf labortechnischer Ebene die Untersuchung weiterer strahlungssensitiver und -resistenter Ziellinien für eine bessere Gewichtung der entscheidenden Faktoren und der Identifizierung zellspezifischer Reaktionen einer Strahlenantwort von großem Vorteil. Außerdem wäre auch der Zugriff von Patienten-Biopsie- oder Blutproben mit ärztlichen *follow up* Daten über Therapieerfolg und Krankheitsrückfällen von großem Wert. Für eine Eingrenzung potentieller prognostischer Marker wäre eine Runterregulierung der identifizierten Gene mittels der RNAi Technologie mit anschließenden neu durchgeführten Bestrahlungs- und Vitalitäts-Experimenten sehr sinnvoll. Runterregulierte Gene, die eine Erhöhung der Bestrahlungssensitivität nach sich ziehen, würden demnach eine besondere strahlenbiologische Relevanz besitzen und könnten als prognostischer Marker und Ziele von medikamentösen Manipulationen dienen.

VI LITERATUR

- Abbott, K.L., Nairn, A.V., Hall, E.M., Horton, M.B., McDonald, J.F., Moremen, K.W., Dinulescu, D.M., Pierce, M., 2008. Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer. *Proteomics* 8, 3210–3220.
- Abraham, R.T., 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177–2196.
- Achary, M.P., Jaggernauth, W., Gross, E., Alfieri, A., Klinger, H.P., Vikram, B., 2000. Cell lines from the same cervical carcinoma but with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression. *Cytogenet. Cell Genet.* 91, 39–43.
- Adams, J.M., 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17, 2481–2495.
- Akerman, G.S., Rosenzweig, B.A., Domon, O.E., Tsai, C.-A., Bishop, M.E., McGarrity, L.J., Macgregor, J.T., Sistare, F.D., Chen, J.J., Morris, S.M., 2005. Alterations in gene expression profiles and the DNA-damage response in ionizing radiation-exposed TK6 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 188–205.
- Albertson, D.G., Ylstra, B., Seagraves, R., Collins, C., Dairkee, S.H., Kowbel, D., Kuo, W.L., Gray, J.W., Pinkel, D., 2000. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat. Genet.* 25, 144–146.
- Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Manolagas, S.C., Kousteni, S., 2005. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J. Biol. Chem.* 280, 41342–41351.
- Al-Mohanna, M.A., Al-Khodairy, F.M., Krezolek, Z., Bertilsson, P.A., Al-Houssein, K.A., Abousekhra, A., 2001. p53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G(1) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 22, 573–578.
- Aloy, M.-T., Hadchity, E., Bionda, C., Diaz-Latoud, C., Claude, L., Rousson, R., Arrigo, A.-P., Rodriguez-Lafrasse, C., 2008. Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70, 543–553.
- Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., Gronemeyer, H., 2001. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat. Med.* 7, 680–686.
- Amberg, R., Beyerlein, P., Tillich, A., Pallarz, S., Hammer P., Schmidt S., Krumbiegel C., Adelt S., Auner A., 2010. WIOS - Wildau In-Silico Sequence Analysis Pipeline.
- Ambroziak, W., Pietruszko, R., 1991. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *J. Biol. Chem.* 266, 13011–13018.
- Amerongen, A.V., Bolscher, J.G., Veerman, E.C., 1995. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* 5, 733–740.
- Ameyar, M., Wisniewska, M., Weitzman, J.B., 2003. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85, 747–752.
- Amundson, S.A., 2008. Functional genomics in radiation biology: a gateway to cellular systems-level studies. *Radiat Environ Biophys* 47, 25–31.
- Amundson, S.A., Bittner, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P., Fornace, A.J., Jr, 1999. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18, 3666–3672.
- Amundson, S.A., Bittner, M., Fornace, A.J., 2003. Functional genomics as a window on radiation stress signaling. *Oncogene* 22, 5828–5833.
- Amundson, S.A., Smilenov, L.B., 2011. Integration of biological knowledge and gene expression data for biomarker selection: FN1 as a potential predictor of radiation resistance in head and neck cancer. *Cancer Biol. Ther.* 10, 1252–1255.
- An, H.J., Lebrilla, C.B., 2010. A glycomics approach to the discovery of potential cancer biomarkers. *Methods Mol. Biol.* 600, 199–213.
- Anai, S., Shiverick, K., Medrano, T., Nakamura, K., Goodison, S., Brown, B.D., Rosser, C.J., 2007. Downregulation of BCL-2 induces downregulation of carbonic anhydrase IX, vascular endothelial growth factor, and pAkt and induces radiation sensitization. *Urology* 70, 832–837.
- Applied Biosystems, 2010. SOLiD™ 4 System SETS Software.
- Aquilina, G., Bignami, M., 2001. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *J. Cell. Physiol* 187, 145–154.
- Arenz, A., 2007. Entwicklung und Validierung eines Bioassays zum Nachweis induzierter Genaktivität für den Einsatz auf der Internationalen Raumstation.

- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25–29.
- Aung, C.S., Hill, M.M., Bastiani, M., Parton, R.G., Parat, M.-O., 2011. PTRF-cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: role of matrix metalloprotease 9. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 136–142.
- Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S., 2004. Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell* 14, 801–811.
- Bello, D., Webber, M.M., Kleinman, H.K., Waringer, D.D., Rhim, J.S., 1997. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* 18, 1215–1223.
- Benbrook, D.M., Shen-Gunther, J., Nuñez, E.R., Dynlacht, J.R., 1997. Differential retinoic acid radiosensitization of cervical carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 3, 939–945.
- Bennett, C.B., Westmoreland, T.J., Snipe, J.R., Resnick, M.A., 1996. A double-strand break within a yeast artificial chromosome (YAC) containing human DNA can result in YAC loss, deletion or cell lethality. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4414–4425.
- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R., 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts.
- Berthier-Vergnes, O., Kharbili, M.E., de la Fouchardière, A., Pointecouteau, T., Verrando, P., Wierinckx, A., Lachuer, J., Le Naour, F., Lamartine, J., 2011. Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion. *Br. J. Cancer* 104, 155–165.
- Bhat, P.V., Labrecque, J., Boutin, J.M., Lacroix, A., Yoshida, A., 1995. Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation. *Gene* 166, 303–306.
- Bhavani, V., Srinivasulu, M., Ahuja, Y.R., Hasan, Q., 2009. Role of BRCA1, HSD17B1 and HSD17B2 methylation in breast cancer tissue. *Cancer Biomark* 5, 207–213.
- Bhingre, A.A., Kim, J., Euskirchen, G.M., Snyder, M., Iyer, V.R., 2007. Mapping the chromosomal targets of STAT1 by Sequence Tag Analysis of Genomic Enrichment (STAGE). *Genome Res.* 17, 910–916.
- Blanvillain, R., Wei, S., Wei, P., Kim, J.H., Ow, D.W., 2011. Stress tolerance to stress escape in plants: role of the OXS2 zinc-finger transcription factor family. *EMBO J.* 30, 3812–3822.
- Boer, J., Hoeijmakers, J.H., 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453–460.
- van Bokhoven, A., Caires, A., Maria, M.D., Schulte, A.P., Lucia, M.S., Nordeen, S.K., Miller, G.J., Varella-Garcia, M., 2003. Spectral karyotype (SKY) analysis of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57, 226–244.
- Bottke, D., Koychev, D., Busse, A., Heufelder, K., Wiegel, T., Thiel, E., Hinkelbein, W., Keilholz, U., 2008. Fractionated irradiation can induce functionally relevant multidrug resistance gene and protein expression in human tumor cell lines. *Radiat. Res.* 170, 41–48.
- Boudny, V., Kovarik, J., 2002. JAK/STAT signaling pathways and cancer. *Janus kinases/signal transducers and activators of transcription.* *Neoplasma* 49, 349–355.
- Bowen, C., Spiegel, S., Gelmann, E.P., 1998. Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. *Cancer Res.* 58, 3275–3281.
- Brahme, A., 2004. Recent advances in light ion radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 603–616.
- Brahme, A., Lind, B.K., 2010. A systems biology approach to radiation therapy optimization. *Radiat Environ Biophys* 49, 111–124.
- Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W., Newman, S.M., 1997. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 214, 248–257.
- Brockhausen, I., 1999. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 67–95.
- Brockhausen, I., 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* 7, 599–604.
- von Bubnoff, A., 2008. Next-generation sequencing: the race is on. *Cell* 132, 721–723.
- Carlson, M., Falcon, S., Pages, H., Li, N., 2010. KEGG.db: A set of annotation maps for KEGG.
- Carroll, A.G., Voeller, H.J., Sugars, L., Gelmann, E.P., 1993. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate* 23, 123–134.
- Caspari, T., 2000. How to activate p53. *Curr. Biol.* 10, R315–317.
- Chang-Liu, C.M., Woloschak, G.E., 1997. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett.* 113, 77–86.

- Chapman, J.R., Tazaki, H., Mallouh, C., Konno, S., 1999. Brefeldin A-induced apoptosis in prostatic cancer DU-145 cells: a possible p53-independent death pathway. *BJU Int.* 83, 703–708.
- Chen, W., Luo, J.-H., Hua, W.-F., Zhou, F.-J., Lin, M.C., Kung, H.-F., Zeng, Y.-X., Guan, X.-Y., Xie, D., 2009. Overexpression of EIF-5A2 is an independent predictor of outcome in patients of urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 400–408.
- Chen, Y., Orlicky, D.J., Matsumoto, A., Singh, S., Thompson, D.C., Vasiliou, V., 2011. Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 173–179.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3–34.
- Costa, I.G., Schönhuth, A., Schliep, A., 2005. The Graphical Query Language: a tool for analysis of gene expression time-courses. *Bioinformatics* 21, 2544–2545.
- Costa, R.M.A., Chiganças, V., Galhardo, R. da S., Carvalho, H., Menck, C.F.M., 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85, 1083–1099.
- Dahm-Daphi, J., Dikomey, E., Brammer, I., 1998. DNA-repair, cell killing and normal tissue damage. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 3, 8–11.
- Dai, Y., Desano, J., Qu, Y., Tang, W., Meng, Y., Lawrence, T.S., Xu, L., 2011. Natural IAP inhibitor Embelin enhances therapeutic efficacy of ionizing radiation in prostate cancer. *Am J Cancer Res* 1, 128–143.
- Deng, X., Elzey, B.D., Poulson, J.M., Morrison, W.B., Ko, S.-C., Hahn, N.M., Ratliff, T.L., Hu, C.-D., 2011. Ionizing radiation induces neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells in vitro, in vivo and in prostate cancer patients. *Am J Cancer Res* 1, 834–844.
- Derheimer, F.A., Hicks, J.K., Paulsen, M.T., Canman, C.E., Ljungman, M., 2009. Psoralen-induced DNA interstrand cross-links block transcription and induce p53 in an ataxia-telangiectasia and rad3-related-dependent manner. *Mol. Pharmacol* 75, 599–607.
- Deutsche Krebshilfe, 2010. Strahlentherapie - Antworten. Hilfen. Perspektiven.
- DKFZ, K., 2009. Strahlentherapie und Nuklearmedizin: Biologische Grundlagen.
- Donna, L.D., Lagadec, C., Pajonk, F., 2011. Radioresistance of prostate cancer cells with low proteasome activity. *The Prostate*.
- Ernst, J., Bar-Joseph, Z., 2006. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinformatics* 7, 191.
- Ernst, J., Nau, G.J., Bar-Joseph, Z., 2005. Clustering short time series gene expression data. *Bioinformatics* 21, i159–i168.
- Esquenet, M., Swinnen, J.V., Heyns, W., Verhoeven, G., 1997. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 391–399.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., Hancock, D.C., 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119–128.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185.
- Fan, J., Chu, P.K., 2010. Group IV nanoparticles: synthesis, properties, and biological applications. *Small* 6, 2080–2098.
- Fan, M., Ahmed, K.M., Coleman, M.C., Spitz, D.R., Li, J.J., 2007. Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res* 67, 3220–3228.
- Fan, Z., Chakravarty, P., Alfieri, A., Pandita, T.K., Vikram, B., Guha, C., 2000. Adenovirus-mediated antisense ATM gene transfer sensitizes prostate cancer cells to radiation. *Cancer Gene Ther.* 7, 1307–1314.
- Fei, P., El-Deiry, W.S., 2003. P53 and radiation responses. *Oncogene* 22, 5774–5783.
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N., Ullrich, A., 2004. Oxidative and Osmotic Stress Signaling in Tumor Cells Is Mediated by ADAM Proteases and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5172–5183.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., 1995. DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.
- Friesen, C., Hormann, I., Roscher, M., Bacher, S., Miltner, E., 2010. [Overcoming of radiation resistances]. *Nuklearmedizin* 49 Suppl 1, S31–36.
- Fukuda, K., Sakakura, C., Miyagawa, K., Kuriu, Y., Kin, S., Nakase, Y., Hagiwara, A., Mitsufuji, S., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Yamagishi, H., 2004. Differential gene expression profiles of

- radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br. J. Cancer* 91, 1543–1550.
- Furukawa-Hibi, Y., 2002. FOXO Forkhead Transcription Factors Induce G2-M Checkpoint in Response to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26729–26732.
- Fyles, A.W., Milosevic, M., Wong, R., Kavanagh, M.C., Pintilie, M., Sun, A., Chapman, W., Levin, W., Manchul, L., Keane, T.J., Hill, R.P., 1998. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 48, 149–156.
- Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K., 2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* 65, 3980–3985.
- Gatenby, R.A., Kessler, H.B., Rosenblum, J.S., Coia, L.R., Moldofsky, P.J., Hartz, W.H., Broder, G.J., 1988. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 14, 831–838.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet* 2, 196–206.
- Gerspach, J., Pfizenmaier, K., Wajant, H., 2011. Therapeutic targeting of CD95 and the TRAIL death receptors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6, 294–310.
- Ghadimi, B.M., Grade, M., Difilippantonio, M.J., Varma, S., Simon, R., Montagna, C., Füzesi, L., Langer, C., Becker, H., Liersch, T., Ried, T., 2005. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 23, 1826–1838.
- Ghandhi, S.A., Sinha, A., Markatou, M., Amundson, S.A., 2011. Time-series clustering of gene expression in irradiated and bystander fibroblasts: an application of FBPA clustering. *BMC Genomics* 12, 2.
- Grandclement, C., Borg, C., 2011. Neuropilins: A New Target for Cancer Therapy. *Cancers* 3, 1899–1928.
- Gray, M.J., Van Buren, G., Dallas, N.A., Xia, L., Wang, X., Yang, A.D., Somcio, R.J., Lin, Y.G., Lim, S., Fan, F., Mangala, L.S., Arumugam, T., Logsdon, C.D., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., Ellis, L.M., 2008. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 109–120.
- Gudkov, A.V., Komarova, E.A., 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 117–129.
- Guillouf, C., Rosselli, F., Krishnaraju, K., Moustacchi, E., Hoffman, B., Liebermann, D.A., 1995. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 10, 2263–2270.
- Guo, G., Yan-Sanders, Y., Lyn-Cook, B.D., Wang, T., Tamae, D., Ogi, J., Khaletskiy, A., Li, Z., Weydert, C., Longmate, J.A., Huang, T.-T., Spitz, D.R., Oberley, L.W., Li, J.J., 2003. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol. Cell. Biol* 23, 2362–2378.
- Guo, W.-F., Lin, R.-X., Huang, J., Zhou, Z., Yang, J., Guo, G.-Z., Wang, S.-Q., 2005. Identification of differentially expressed genes contributing to radioresistance in lung cancer cells using microarray analysis. *Radiat. Res.* 164, 27–35.
- Haber, J.E., 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16, 259–264.
- Hammer, P., Banck, M.S., Amberg, R., Wang, C., Petznick, G., Luo, S., Khrebtukova, I., Schroth, G.P., Beyerlein, P., Beutler, A.S., 2010. mRNA-seq with agnostic splice site discovery for nervous system transcriptomics tested in chronic pain. *Genome Res* 20, 847–860.
- Han, E.-S., Muller, F.L., Pérez, V.I., Qi, W., Liang, H., Xi, L., Fu, C., Doyle, E., Hickey, M., Cornell, J., Epstein, C.J., Roberts, L.J., Van Remmen, H., Richardson, A., 2008. The in vivo gene expression signature of oxidative stress. *Physiol. Genomics* 34, 112–126.
- Hanna, E., Shrieve, D.C., Ratanatharathorn, V., Xia, X., Breau, R., Suen, J., Li, S., 2001. A novel alternative approach for prediction of radiation response of squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Res.* 61, 2376–2380.
- Harima, Y., Togashi, A., Horikoshi, K., Imamura, M., Sogawa, M., Sawada, S., Tsunoda, T., Nakamura, Y., Katagiri, T., 2004. Prediction of outcome of advanced cervical cancer to thermoradiotherapy according to expression profiles of 35 genes selected by cDNA microarray analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 60, 237–248.
- Hasan, Y., Schoenherr, D., Martinez, A.A., Wilson, G.D., Marples, B., 2010. Prostate-specific natural health products (dietary supplements) radiosensitize normal prostate cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 76, 896–904.
- He, L.-R., Zhao, H.-Y., Li, B.-K., Liu, Y.-H., Liu, M.-Z., Guan, X.-Y., Bian, X.-W., Zeng, Y.-X., Xie, D., 2011. Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *International Journal of Cancer* 129, 143–150.

- Helland, A., Johnsen, H., Frøyland, C., Landmark, H.B.K., Saetersdal, A.B., Holmen, M.M., Gjertsen, T., Nesland, J.M., Ottestad, W., Jeffrey, S.S., Ottestad, L.O., Rodningen, O.K., Sherlock, G., Børresen-Dale, A.-L., 2006. Radiation-induced effects on gene expression: an in vivo study on breast cancer. *Radiother Oncol* 80, 230–235.
- Henríquez-Hernández, L.A., Lloret, M., Pinar, B., Bordón, E., Rey, A., Lubrano, A., Lara, P.C., 2011. BCL-2, in combination with MVP and IGF-1R expression, improves prediction of clinical outcome in complete response cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. *Gynecol. Oncol.* 122, 585–589.
- Herrmann, J.L., Briones, F., Jr, Brisbay, S., Logothetis, C.J., McDonnell, T.J., 1998. Prostate carcinoma cell death resulting from inhibition of proteasome activity is independent of functional Bcl-2 and p53. *Oncogene* 17, 2889–2899.
- Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M., 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* 117, 5965–5973.
- Higo, M., Uzawa, K., Kouzu, Y., Bukawa, H., Nimura, Y., Seki, N., Tanzawa, H., 2005. Identification of candidate radioresistant genes in human squamous cell carcinoma cells through gene expression analysis using DNA microarrays. *Oncol. Rep.* 14, 1293–1298.
- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.
- van Hoffen, A., Balajee, A.S., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F., 2003. Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology* 193, 79–90.
- Hoheisel, J.D., 2009. Editorial. Zurück in die Zukunft der Sequenzierung. *Bioforum* 32, 3.
- Holley, A.K., Xu, Y., St Clair, D.K., St Clair, W.H., 2010. RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201, 129–136.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakers, J.H., Vermeulen, W., 1999. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 284, 958–961.
- Hudolin, T., Juretic, A., Spagnoli, G.C., Pasini, J., Bandic, D., Heberer, M., Kosicek, M., Cacic, M., 2006. Immunohistochemical expression of tumor antigens MAGE-A1, MAGE-A3/4, and NY-ESO-1 in cancerous and benign prostatic tissue. *Prostate* 66, 13–18.
- Hummel, R., Hussey, D.J., Haier, J., 2010. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur. J. Cancer* 46, 298–311.
- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., Chu, G., 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 424–428.
- Inayat, M.S., Chendil, D., Mohiuddin, M., Elford, H.L., Gallicchio, V.S., Ahmed, M.M., 2002. Didox (a novel ribonucleotide reductase inhibitor) overcomes Bcl-2 mediated radiation resistance in prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Biol. Ther.* 1, 539–545.
- Ingenuity, 2012. Ingenuity® Pathway Analysis, Ingenuity® Knowledge Base.
- Ishigami, T., Uzawa, K., Higo, M., Nomura, H., Saito, K., Kato, Y., Nakashima, D., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Kawata, T., Ito, H., Tanzawa, H., 2007. Genes and molecular pathways related to radioresistance of oral squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 120, 2262–2270.
- Ishihara, Y., Ito, F., Shimamoto, N., 2011. Increased expression of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase activation under sustained oxidative stress elicits BimEL upregulation and hepatocyte apoptosis. *FEBS J.* 278, 1873–1881.
- Jansa, P., 1998. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *The EMBO Journal* 17, 2855–2864.
- Janssens, M.Y., Verovski, V.N., Van den Berge, D.L., Monsaert, C., Storme, G.A., 1999. Radiosensitization of hypoxic tumour cells by S-nitroso-N-acetylpenicillamine implicates a bioreductive mechanism of nitric oxide generation. *Br. J. Cancer* 79, 1085–1089.
- Jarrard, D.F., Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Hoff, D., Meisner, L.F., Chang, C., Herman, J.G., Isaacs, W.B., Nassif, N., 1998. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 58, 5310–5314.
- Jeong, J., Hong, S.-J., Ju, Y.-J., Kim, B.-Y., Park, M.-J., Kim, T.-H., Park, C.-I., Choi, K.-Y., Cho, M.-H., Kim, S.-H., Lee, H., Lee, K.-H., 2006. Temporal cDNA microarray analysis of gene expression in human hepatocellular carcinoma upon radiation exposure. *Oncol. Rep.* 15, 33–48.
- Jiang, H., Zhao, Y., Chen, G., Wu, W., Zhang, F., Dong, Y., Wu, Y., 2006. [The method of inducing and establishing human pancreatic cancer cell sublines with radiation resistance]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 44, 1640–1643.
- Johnson, D.S., Mortazavi, A., Myers, R.M., Wold, B., 2007. Genome-Wide Mapping of in Vivo Protein-DNA Interactions. *Science* 316, 1497–1502.

- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W., 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16–23.
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30.
- Kang, K.W., Lee, S.J., Kim, S.G., 2005. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1664–1673.
- Kassis, A.I., 2008. Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Semin Nucl Med* 38, 358–366.
- Kesari, S., Advani, S.J., Lawson, J.D., Kahle, K.T., Ng, K., Carter, B., Chen, C.C., 2011. DNA damage response and repair: insights into strategies for radiation sensitization of gliomas. *Future Oncol* 7, 1335–1346.
- Khanna, K.K., Jackson, S.P., 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet* 27, 247–254.
- Kielbowicz-Matuk, A., 2012. Involvement of plant C(2)H(2)-type zinc finger transcription factors in stress responses. *Plant Sci.* 185–186, 78–85.
- Kim, K.-H., Choi, J.-S., Kim, I.-J., Ku, J.-L., Park, J.-G., 2006. Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. *World J. Gastroenterol.* 12, 5651–5657.
- Kimura, K., Bowen, C., Spiegel, S., Gelmann, E.P., 1999. Tumor necrosis factor-alpha sensitizes prostate cancer cells to gamma-irradiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 1606–1614.
- Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Meisner, L.F., Chang, C., Choon, A., Reznikoff, C.R., Bova, G.S., Friedl, A., Jarrard, D.F., 2000. Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Res.* 60, 3623–3630.
- Kis, E., Szatmári, T., Keszei, M., Farkas, R., Esik, O., Lumniczky, K., Falus, A., Sáfrány, G., 2006. Microarray analysis of radiation response genes in primary human fibroblasts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66, 1506–1514.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W., 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1–24.
- Kitahara, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Harima, Y., Nakamura, Y., 2002. Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 4, 295–303.
- Konsoula, Z., Cao, H., Velena, A., Jung, M., 2011. Adamantanyl-histone deacetylase inhibitor H6CAHA exhibits favorable pharmacokinetics and augments prostate cancer radiation sensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 79, 1541–1548.
- Krebsinformationsdienst, 2011. Prostatakarzinom - Fragen an den Arzt bei PSA-Wiederaanstieg nach primärer Strahlentherapie.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M., Slupphaug, G., 2000. Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476, 73–77.
- Kumagai, K., Nimura, Y., Mizota, A., Miyahara, N., Aoki, M., Furusawa, Y., Takiguchi, M., Yamamoto, S., Seki, N., 2006. Arpc1b gene is a candidate prediction marker for choroidal malignant melanomas sensitive to radiotherapy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2300–2304.
- Laskin, J.D., 2002. The Ribotoxic Stress Response as a Potential Mechanism for MAP Kinase Activation in Xenobiotic Toxicity. *Toxicological Sciences* 69, 289–291.
- Lee, J.U., Hosotani, R., Wada, M., Doi, R., Kosiba, T., Fujimoto, K., Miyamoto, Y., Tsuji, S., Nakajima, S., Nishimura, Y., Imamura, M., 1999. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1374–1380.
- Lee, Y.G., Korenchuk, S., Lehr, J., Whitney, S., Vessela, R., Pienta, K.J., 2001. Establishment and characterization of a new human prostatic cancer cell line: DuCaP. *In Vivo* 15, 157–162.
- Li, Z., Xia, L., Lee, L.M., Khaletskiy, A., Wang, J., Wong, J.Y., Li, J.J., 2001. Effector genes altered in MCF-7 human breast cancer cells after exposure to fractionated ionizing radiation. *Radiat. Res* 155, 543–553.
- Lin, C.-L., Wang, J.-Y., Huang, Y.-T., Kuo, Y.-H., Surendran, K., Wang, F.-S., 2006. Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2812–2820.
- Lin, M.F., Meng, T.C., Rao, P.S., Chang, C., Schonthal, A.H., Lin, F.F., 1998. Expression of human prostatic acid phosphatase correlates with androgen-stimulated cell proliferation in prostate cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 273, 5939–5947.
- Lindahl, T., Wood, R.D., 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897–1905.
- Linke, S.P., Clarkin, K.C., Wahl, G.M., 1997. p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res* 57, 1171–1179.
- Ljungman, M., 2010. The DNA damage response--repair or despair? *Environ. Mol. Mutagen* 51, 879–889.

- Ljungman, M., Zhang, F., 1996. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene* 13, 823–831.
- Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A.J., McKay, B.C., 1999. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* 18, 583–592.
- Long, X.-H., Zhao, Z.-Q., He, X.-P., Wang, H.-P., Xu, Q.-Z., An, J., Bai, B., Sui, J.-L., Zhou, P.-K., 2007. Dose-dependent expression changes of early response genes to ionizing radiation in human lymphoblastoid cells. *Int. J. Mol. Med.* 19, 607–615.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, T., 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847–849.
- MacFarlane, M., Williams, A.C., 2004. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5, 674–678.
- Maity, A., McKenna, W.G., Muschel, R.J., 1994. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol* 31, 1–13.
- Majid, S., Dar, A.A., Ahmad, A.E., Hirata, H., Kawakami, K., Shahryari, V., Saini, S., Tanaka, Y., Dahiya, A.V., Khatri, G., Dahiya, R., 2009. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer. *Carcinogenesis* 30, 662–670.
- Marmor, M.D., Skaria, K.B., Yarden, Y., 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 903–913.
- Mason, S.W., 1997. Identification of a transcript release activity acting on ternary transcription complexes containing murine RNA polymerase I. *The EMBO Journal* 16, 163–172.
- McKay, B.C., Becerril, C., Ljungman, M., 2001. P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene* 20, 6805–6808.
- McKay, B.C., Becerril, C., Spronck, J.C., Ljungman, M., 2002. Ultraviolet light-induced apoptosis is associated with S-phase in primary human fibroblasts. *DNA Repair (Amst.)* 1, 811–820.
- McKay, B.C., Chen, F., Perumalswami, C.R., Zhang, F., Ljungman, M., 2000. The tumor suppressor p53 can both stimulate and inhibit ultraviolet light-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 11, 2543–2551.
- McKay, B.C., Ljungman, M., 1999. Role for p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light. *Neoplasia* 1, 276–284.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet* 11, 31–46.
- Michel, C.I., Holley, C.L., Scruggs, B.S., Sidhu, R., Brookheart, R.T., Listenberger, L.L., Behlke, M.A., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2011. Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress. *Cell Metab.* 14, 33–44.
- Miura, K., Suzuki, S., Tanita, J., Shinkawa, H., Satoh, K., Tsuchida, S., 1997. Correlated expression of glutathione S-transferase-pi and c-Jun or other oncogene products in human squamous cell carcinomas of the head and neck: relevance to relapse after radiation therapy. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 143–151.
- Monobe, M., Arimoto-Kobayashi, S., Ando, K., 2003. Beta-pseudouridine, a beer component, reduces radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 538, 93–99.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mullenders, L.H., Berneburg, M., 2001. Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 65, 97–100.
- Nakamura, Y., 2004. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci* 95, 7–11.
- Nelson, W.G., Kastan, M.B., 1994. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol* 14, 1815–1823.
- Ni, X., Zhang, Y., Ribas, J., Chowdhury, W.H., Castanares, M., Zhang, Z., Laiho, M., DeWeese, T.L., Lupold, S.E., 2011. Prostate-targeted radiosensitization via aptamer-shRNA chimeras in human tumor xenografts. *Journal of Clinical Investigation* 121, 2383–2390.
- Nilsen, H., Krokan, H.E., 2001. Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22, 987–998.
- Ogawa, K., Murayama, S., Mori, M., 2007. Predicting the tumor response to radiotherapy using microarray analysis (Review). *Oncol. Rep.* 18, 1243–1248.
- Okazaki, R., Moon, Y., Norimura, T., Eling, T., 2006. Ionizing radiation enhances the expression of the nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG1) by increasing the expression of TP53 in human colon cancer cells. *Radiat. Res.* 165, 125–130.
- Orlowski, R.Z., Baldwin, A.S., Jr, 2002. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8, 385–389.

- Otomo, T., Hishii, M., Arai, H., Sato, K., Sasai, K., 2004. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J. Radiat. Res.* 45, 53–60.
- Ou, Y.-H., Chung, P.-H., Hsu, F.-F., Sun, T.-P., Chang, W.-Y., Shieh, S.-Y., 2007. The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1. *EMBO J.* 26, 3968–3980.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol* 10, 886–895.
- Petrini, J.H., 2000. The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr. Opin. Cell Biol* 12, 293–296.
- Pfeiffer, M.J., Smit, F.P., Sedelaar, J.P.M., Schalken, J.A., 2011. Steroidogenic enzymes and stem cell markers are upregulated during androgen deprivation in prostate cancer. *Mol. Med.* 17, 657–664.
- Polo, S.E., Jackson, S.P., 2011. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & Development* 25, 409–433.
- Rana, S., Claas, C., Kretz, C.C., Nazarenko, I., Zoeller, M., 2011. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 106–119.
- Reinhardt, H.C., Yaffe, M.B., 2009. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr. Opin. Cell Biol* 21, 245–255.
- Ren, J., Shi, M., Liu, R., Yang, Q.-H., Johnson, T., Skarnes, W.C., Du, C., 2005. The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 565–570.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med* 49, 1603–1616.
- De Ridder, M., Verellen, D., Verovski, V., Storme, G., 2008. Hypoxic tumor cell radiosensitization through nitric oxide. *Nitric Oxide* 19, 164–169.
- Robert-Koch-Institut Berlin, Husmann, G., 2010. Krebs in Deutschland 2005 2006 Häufigkeiten und Trends eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 7. Ausg. ed. Robert Koch-Inst.;GEKID, Berlin;Saarbrücken.
- Rodriguez, R., Meuth, M., 2006. Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol. Biol. Cell* 17, 402–412.
- Rotman, G., Shiloh, Y., 1998. ATM: from gene to function. *Hum. Mol. Genet* 7, 1555–1563.
- Rubbi, C.P., Milner, J., 2003. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* 22, 975–986.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kaçmaz, K., Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem* 73, 39–85.
- Sauer, R., 2010. Strahlentherapie und Onkologie, 5., völlig überarb. Aufl. ed. Elsevier Urban & Fischer, München.
- Schärer, O.D., 2003. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 42, 2946–2974.
- Schliep, A., Schonhuth, A., Steinhoff, C., 2003. Using hidden Markov models to analyze gene expression time course data. *Bioinformatics* 19, i255–i263.
- Schliep, A., Steinhoff, C., Schönhuth, A., 2004. Robust inference of groups in gene expression time-courses using mixtures of HMMs. *Bioinformatics* 20 Suppl 1, i283–289.
- Schuster, S.C., 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods* 5, 16–18.
- Shemarova, I.V., 2009. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 23–42.
- Shimura, T., 2011. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3 β /cyclin D1 overexpression cycle. *J. Radiat. Res.* 52, 539–544.
- Singh, S., Vrishni, S., Singh, B.K., Rahman, I., Kakkar, P., 2010. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic. Res.* 44, 1267–1288.
- Singh-Gupta, V., Zhang, H., Banerjee, S., Kong, D., Raffoul, J.J., Sarkar, F.H., Hillman, G.G., 2009. Radiation-induced HIF-1 α cell survival pathway is inhibited by soy isoflavones in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* 124, 1675–1684.
- Smith, M.L., Seo, Y.R., 2002. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17, 149–156.
- Sokolov, M.V., Smirnova, N.A., Camerini-Otero, R.D., Neumann, R.D., Panyutin, I.G., 2006. Microarray analysis of differentially expressed genes after exposure of normal human fibroblasts

- to ionizing radiation from an external source and from DNA-incorporated iodine-125 radionuclide. *Gene* 382, 47–56.
- Steel, G., 1993. *Basic clinical radiobiology: for radiation oncologists*. E. Arnold, London ;;Boston.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F., 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* 21, 274–281.
- Strober, W., 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol Appendix 3*, Appendix 3B.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., Hanaoka, F., 2001. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15, 507–521.
- Sultan, M., Schulz, M.H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., Schmidt, D., O’Keeffe, S., Haas, S., Vingron, M., Lehrach, H., Yaspo, M.-L., 2008. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 321, 956–960.
- Sun, X., Lawrence, M., Liu, Z., Sun, Z., 2010. BiIDMapper: A cross-referencing and managing platform for biological IDs in R. *IEEE*, pp. 2449–2451.
- Sun, Y., St Clair, D.K., Fang, F., Warren, G.W., Rangnekar, V.M., Crooks, P.A., St Clair, W.H., 2007. The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor-kappaB inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2477–2486.
- Suresh, A., Vannan, M., Kumaran, D., Gümüs, Z.H., Sivadas, P., Murugaian, E.E., Kekatpure, V., Iyer, S., Thangaraj, K., Kuriakose, M.A., 2012. Resistance/response molecular signature for oral tongue squamous cell carcinoma. *Dis. Markers* 32, 51–64.
- Svensson, H., Ringborg, U., Näslund, I., Brahme, A., 2004. Development of light ion therapy at the Karolinska Hospital and Institute. *Radiother Oncol* 73 Suppl 2, S206–210.
- Syed Khaja, A.S., Helczynski, L., Edsjö, A., Ehrnström, R., Lindgren, A., Ulmert, D., Andersson, T., Bjartell, A., 2011. Elevated Level of Wnt5a Protein in Localized Prostate Cancer Tissue Is Associated with Better Outcome. *PLoS ONE* 6, e26539.
- Szala, S., Kasai, Y., Steplewski, Z., Rodeck, U., Koprowski, H., Linnenbach, A.J., 1990. Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6833–6837.
- Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2011. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16, 123–140.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., Nakamura, Y., 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404, 42–49.
- Tang, D., Khaleque, M.A., Jones, E.L., Theriault, J.R., Li, C., Wong, W.H., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K., 2005. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones* 10, 46–58.
- Tannock, I., Guttman, P., 1981. Response of Chinese hamster ovary cells to anticancer drugs under aerobic and hypoxic conditions. *Br. J. Cancer* 43, 245–248.
- Teitz, S.B., 2006. Methodische Evaluierung von Verfahren zur Analyse des Mucin-Typ O-Glykoproteoms.
- Tewari, D., Monk, B.J., Al-Ghazi, M.S., Parker, R., Heck, J.D., Burger, R.A., Fruehauf, J.P., 2005. Gene expression profiling of in vitro radiation resistance in cervical carcinoma: a feasibility study. *Gynecol. Oncol.* 99, 84–91.
- Thaysen-Andersen, M., Thøgersen, I.B., Lademann, U., Offenberger, H., Giessing, A.M.B., Enghild, J.J., Nielsen, H.J., Brønner, N., Højrup, P., 2008. Investigating the biomarker potential of glycoproteins using comparative glycoproteomics - application to tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 455–463.
- Tornaletti, S., Hanawalt, P.C., 1999. Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81, 139–146.
- Truman, J.-P., Gueven, N., Lavin, M., Leibel, S., Kolesnick, R., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., 2005. Down-regulation of ATM protein sensitizes human prostate cancer cells to radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 23262–23272.
- Trzeciak, A.R., Nyaga, S.G., Jaruga, P., Lohani, A., Dizdaroglu, M., Evans, M.K., 2004. Cellular repair of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis* 25, 1359–1370.
- Tseng, R.-C., Lee, S.-H., Hsu, H.-S., Chen, B.-H., Tsai, W.-C., Tzao, C., Wang, Y.-C., 2010. SLIT2 Attenuation during Lung Cancer Progression Deregulates β -Catenin and E-Cadherin and Associates with Poor Prognosis. *Cancer Research* 70, 543–551.

- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G., 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5116–5121.
- Udayakumar, T.S., Hachem, P., Ahmed, M.M., Agrawal, S., Pollack, A., 2008. Antisense MDM2 enhances E2F1-induced apoptosis and the combination sensitizes androgen-sensitive [corrected] and androgen-insensitive [corrected] prostate cancer cells to radiation. *Mol. Cancer Res.* 6, 1742–1754.
- Vallat, L., Magdelénat, H., Merle-Béral, H., Masdehors, P., Potocki de Montalk, G., Davi, F., Kruhoffer, M., Sabatier, L., Orntoft, T.F., Delic, J., 2003. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood* 101, 4598–4606.
- Venugopal, R., Jaiswal, A.K., 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145–3156.
- Vucić, V., Isenović, E.R., Adzić, M., Ruzdžijić, S., Radojčić, M.B., 2006. Effects of gamma-radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU 145 human prostate cancer cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 227–236.
- Wallace, S.S., 1994. DNA damages processed by base excision repair: biological consequences. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 579–589.
- Wang, G., Dombkowski, A., Chuang, L., Xu, X.X.S., 2004. The involvement of XPC protein in the cisplatin DNA damaging treatment-mediated cellular response. *Cell Res* 14, 303–314.
- Wang, Y., Robertson, J.D., Walcheck, B., 2011. Different Signaling Pathways Stimulate a Disintegrin and Metalloprotease-17 (ADAM17) in Neutrophils during Apoptosis and Activation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 38980–38988.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.
- Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakke, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B., 2012. gplots: Various R programming tools for plotting data.
- Watanabe, T., Komuro, Y., Kiyomatsu, T., Kanazawa, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Tanaka, T., Yamamoto, Y., Shirane, M., Muto, T., Nagawa, H., 2006. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res.* 66, 3370–3374.
- Webber, M.M., Bello, D., Quader, S., 1996. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications. Part I. Cell markers and immortalized nontumorigenic cell lines. *Prostate* 29, 386–394.
- Webber, M.M., Bello, D., Quader, S., 1997. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications. Part 3. Oncogenes, suppressor genes, and applications. *Prostate* 30, 136–142.
- Webber, M.M., Quader, S.T., Kleinman, H.K., Bello-DeOcampo, D., Storto, P.D., Bice, G., DeMendonca-Calaca, W., Williams, D.E., 2001. Human cell lines as an in vitro/in vivo model for prostate carcinogenesis and progression. *Prostate* 47, 1–13.
- Wenger, S.L., Senft, J.R., Sargent, L.M., Bamezai, R., Bairwa, N., Grant, S.G., 2004. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci. Rep.* 24, 631–639.
- Wilhelm, B.T., Landry, J.-R., 2009. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 48, 249–257.
- Wong, Y.F., Sahota, D.S., Cheung, T.H., Lo, K.W.K., Yim, S.F., Chung, T.K.H., Chang, A.M.Z., Smith, D.I., 2006. Gene expression pattern associated with radiotherapy sensitivity in cervical cancer. *Cancer J* 12, 189–193.
- Wouters, B.G., Brown, J.M., 1997. Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the “hypoxic fraction” in determining tumor response to fractionated radiotherapy. *Radiat. Res* 147, 541–550.
- Wu, L., Einstein, M., Geissler, W.M., Chan, H.K., Elliston, K.O., Andersson, S., 1993. Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 268, 12964–12969.
- Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L., 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075–7083.
- Xiang, R., Davalos, A.R., Hensel, C.H., Zhou, X.-J., Tse, C., Naylor, S.L., 2002. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.* 62, 2637–2643.
- Xiao, W., Graham, P.H., Power, C.A., Hao, J., Kearsley, J.H., Li, Y., 2011. CD44 is a biomarker associated with human prostate cancer radiation sensitivity. *Clinical & Experimental Metastasis.*

- Xie, L., Song, X., Yu, J., Wei, L., Song, B., Wang, X., Lv, L., 2009. Fractionated irradiation induced radio-resistant esophageal cancer EC109 cells seem to be more sensitive to chemotherapeutic drugs. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 28, 68.
- Xu, Y., Fang, F., Sun, Y., St. Clair, D.K., St. Clair, W.H., 2010. RelB-Dependent Differential Radiosensitization Effect of STI571 on Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 9, 803–812.
- Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2008. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2758–2770.
- Yang, G.-F., Xie, D., Liu, J.-H., Luo, J.-H., Li, L.-J., Hua, W.-F., Wu, H.-M., Kung, H.-F., Zeng, Y.-X., Guan, X.-Y., 2009. Expression and amplification of eIF-5A2 in human epithelial ovarian tumors and overexpression of EIF-5A2 is a new independent predictor of outcome in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 112, 314–318.
- Yang, Z., Hancock, W.S., 2004. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *J Chromatogr A* 1053, 79–88.
- Yu, H., Cook, T.J., Sinko, P.J., 1997. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm. Res.* 14, 757–762.
- Yu, J., Zhang, Y., Qi, Z., Kurtycz, D., Vacano, G., Patterson, D., 2008. Methylation-mediated downregulation of the B-cell translocation gene 3 (BTG3) in breast cancer cells. *Gene Expr.* 14, 173–182.
- Zellweger, T., Chi, K., Miyake, H., Adomat, H., Kiyama, S., Skov, K., Gleave, M.E., 2002. Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clin. Cancer Res.* 8, 3276–3284.
- Zhang, J., Yang, Y., Wang, Y., Zhang, J., Wang, Z., Yin, M., Shen, X., 2011. Identification of Hub Genes Related to the Recovery Phase of Irradiation Injury by Microarray and Integrated Gene Network Analysis. *PLoS ONE* 6, e24680.
- Zhang, X., Zhang, L., Yang, H., Huang, X., Otu, H., Libermann, T.A., DeWolf, W.C., Khosravi-Far, R., Olumi, A.F., 2007. c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 67, 9425–9434.
- Zhou, B.B., Elledge, S.J., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.
- Zhu, Y., Kalen, A.L., Li, L., Lehmler, H.-J., Robertson, L.W., Goswami, P.C., Spitz, D.R., Aykin-Burns, N., 2009. Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1762–1771

VII ANHANG

A Kontaktdaten



Technische Hochschule Wildau
 Diagnostische Bioinformatik
 Forschungsgruppe Prof. Peter Beyerlein

TH Wildau
 Bahnhofsstraße 1
 15745 Wildau
 Germany

Tel.: 03375 / 508 945
 Mail: Paul.Hammer@th-wildau.de

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
 Monoamine signaling and disease -
 Neurochemistry Group and Mouse lab
 Forschungsgruppe Dr. Diego Walther

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
 Ihnstraße 63-73
 14195 Berlin
 Germany

Tel.: 030 / 8413 1664
 Mail: hammer_p@molgen.mpg.de



Carl-Thiem-Klinikum Cottbus gGmbH
 Institut für Radiologie
 Abt. Medizinische Strahlenphysik
 Abteilungsleiter Steffen Rochor

Carl-Thiem-Klinikum Cottbus
 Abt. Medizinische Strahlenphysik
 Thiemstr. 111
 03048 Cottbus
 Germany

Tel.: 0355 / 46 2542
 e-mail: S.Rochor@ctk.de

B Publikationen

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge:

- Hammer, P.**, Banck, M.S., Amberg, R., Wang, C., Petznick, G., Luo, S., Khrebtukova, I., Schroth, G.P., Beyerlein, P., and Beutler, A.S. (2010). mRNA-seq with agnostic splice site discovery for nervous system transcriptomics tested in chronic pain. *Genome Research* 20, 847–860.
- Grohmann, M., **Hammer, P.**, Walther, M., Paulmann, N., Büttner, A., Eisenmenger, W., Baghai, T.C., Schüle, C., Rupprecht, R., Bader, M., et al. (2010). Alternative splicing and extensive RNA editing of human TPH2 transcripts. *PLoS ONE* 5, e8956.
- Tscherneck, S., Strunk, S., Schmidt, C., **Hammer, P.**, Amberg, R., Chong Wang, Gillert, R., Krause, A., Petznick, G., and Beyerlein, P. (2009). On the mutual information between interaction perplexity and function of proteins. *IEEE GENSPS*, pp. 1–4.
- Wang, C., Beyerlein, P., **Hammer, P.**, Krause, A., Nugent, C., and Dubitzky, W. (2008). Allosteric interaction of rapid delayed rectifier protein and its role in cardiac repolarization. *IEEE Computers in Cardiology*, pp. 589–592.

Beabsichtigte Veröffentlichungen:

- Hammer P.**, Amberg R., Rochor S., Muth CP., Sultan M., Kube M., Beyerlein P. and Walther D.J. (in Bearbeitung). Time series gene expression profiling of radiation resistant PC3 cell line after exposure with 1 Gy
- Amberg R., **Hammer P.**, Rochor S., Muth CP., Pallarz S., Sultan M. Walther D.J., and Beyerlein P. (in Bearbeitung). mRNA-Seq gene expression profiling of prostate cancer cell lines DuCaP and PC3 in terms of prognostics in radiotherapy
- Stahlberg S., Vowinckel J., Krumbiegel C., **Hammer P.**, Pallarz S., Tillich A., Beyerlein P. and Walther D.J. (in Bearbeitung). Cellular regulation mechanism through monoaminylation of polyglutamine stretches
- Stahlberg S., **Hammer P.**, Karweina D., Amberg R., Pallarz S., Tillich A., Adelt S., Beyerlein P. and Walther D.J. (in Bearbeitung). mRNA-Seq gene expression profiling von TPH1 knockout and wild-type mice

Posters:

- Hammer P.**, Stahlberg S., Kalscheuer V., Beyerlein P. and Walther D. (2009). Transcriptional Regulation of THP2 by BRN2 and PQBP1. *Max-Planck-Institute Day of Science*.
- Amberg R., Auner A., **Hammer P.**, Petznick G., Wang C., Beutler A. and Beyerlein P. (2009). Agnostic RNA-seq Transcriptome Analysis for Quantification of Gene and Transcript Expression. *German Conference on Bioinformatics*.
- Pallarz S., Tillich A., Amberg R., **Hammer P.**, Petznick G., Wang C., Walther D. und Beyerlein P. (2009). HMM based Identification of Poly-Glutamine-Islands. *German Conference on Bioinformatics*.

Petznic G., Strunk S., Tschernack S., Amberg R., **Hammer P.**, Wang C. and Beyerlein P. (2009). WINTER Knowledgebase with integrated search & analysis tool using the example of an in silico cell cycle model. *Conference on Bioinformatics*.

Marquardt H., Petznick G., **Hammer P.**, Wang C., Wodke J., Klipp E. and Beyerlein P. (2008). Numerical analysis of nonlinear, kinetic ordinary differential equation systems for in-silico modeling of biochemical processes using the cell cycle. *German Conference on Bioinformatics*.

Einladungen als Vortragender:

Diagnostic Bioinformatics - "New Generation Sequencing" – Neue Informationen für das Verständnis der MS? 13. *Teupitzer MS-Symposium 2012*.

Diagnostic Bioinformatics - Bedeutung neuer diagnostischer Verfahren für den Schlaganfall – „New Generation Sequencing“ 13. *Teupitzer Schlaganfall-Kolloquium 2012*.

Diagnostic Bioinformatics - Functional Genomics of Multiple Sclerosis. 12. *Teupitzer MS-Symposium 2011*.

CNS Transcriptome Reprogramming in Chronic Pain Mapped by mRNA-seq. *Workshop on Bioanalysis, Luckenwalde 2009*.

Data Mining and Statistical Machine Learning for Molecular Diagnostics - Gene Expression Analysis using R/Bioconductor. *Poznan Summer School of Bioinformatics 2008*.

C Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit gem. § 9 Abs. 7 der Promotionsordnung vom 27. November 2003 der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam, diese Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel in Anspruch genommen zu haben. Alle Experimente und Analysen wurden von mir eigenständig durchgeführt. Ferner erkläre ich, dass ich bisher weder an der Universität Potsdam noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Im Falle einer Ablehnung werde ich meine Dissertation nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden.

Paul Hammer

Berlin, Juni 2012

Die Seiten 139 und 140 (Lebenslauf, Danksagung) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

F Abkürzungen

Abb	Abbildung
AIF	<i>apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated</i>
AHCTF1	<i>AT hook containing transcription factor 1</i>
ALDH	<i>aldehyde dehydrogenase</i>
ALDH1A3	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3</i>
AP1	<i>activator protein 1</i>
APE1	<i>APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1</i>
ARE	anti-oxidatives Antwort-Element (antioxidant response element)
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATMIN	<i>ATM interactor</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia related</i>
BAZ1B	<i>bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
BER	Basen-Exzisions-Reparatur (base excision repair)
BIRC6	<i>baculoviral IAP repeat containing 2</i>
bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer, early onset</i>
BTG3	<i>BTG family, member 3</i>
Bulky Lesions	Mehrfachsäden (locally multipy damaged sites)
CA9	<i>carbonic anhydrase IX</i>
CA12	<i>carbonic anhydrase XII</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDK	<i>Cyclin-abhängige Kinase (cyclin-dependent kinases)</i>
CDKN	<i>Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor (cyclin-dependent kinase inhibitor)</i>
CNV	<i>Kopienzahlvariationen (copy number variation)</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>
Crosslinks	DNA-Protein-Vernetzungen
CTSL1	<i>cathepsin L</i>
CYP24A1	<i>cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1</i>
DKK1	<i>dickkopf homolog 1</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DNA-PK	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DNTTIP2	<i>deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA (double strand DNA)
E2F5	<i>E2F transcription factor 5</i>
E2F7	<i>E2F transcription factor 7</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIF3J	<i>eukaryotic translation initiation factor 3</i>
EIF5A2	<i>eukaryotic translation initiation factor 5A-2</i>
ePCR	Emulsions-PCR
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCC	<i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency</i>
EZR2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
FC	Fold Change
FBS	fötales Kälberserum
FEN1	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>
FN1	<i>Fibronectin 1</i>
GADD45	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45</i>
GDF15	<i>growth/differentiation factor 15</i>

GGR	Global Genome Repair
ggNER	global genome NER
GHMM	General Hidden Markov Model library
GO	Gene Ontology
h	Stunden
<i>HBEGF</i>	<i>pro-heparin-binding EGF</i>
<i>hHR23B</i>	<i>human Rad23 homolog</i>
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia-inducible factors</i>
<i>HLF</i>	<i>hepatic leukemia factor</i>
<i>HPV-18</i>	<i>humanes Papilloma Virus 18</i>
HR	Homologe Rekombination
<i>HSBP1</i>	<i>heat shock 27kDa protein 1</i>
<i>HSD17B2</i>	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2</i>
<i>IGFBP</i>	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
<i>IKZF2</i>	<i>IKAROS family zinc finger 2</i>
<i>INO80C</i>	<i>INO80 complex subunit C</i>
IPA	Ingenuity Pathway Analysis Software
kb	Kilobasenpaare
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<i>LRR1Q3</i>	<i>leucine-rich repeats and IQ motif containing 3</i>
<i>LUZP2</i>	<i>leucine zipper protein 2</i>
<i>MAGEA3</i>	<i>melanoma antigen family A, 3</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minuten
miRNA	Mikro-RNA (micro RNA)
MMR	MisMatch Repair
<i>MnSOD</i>	<i>Mangan-Superoxid-Dismutase</i>
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MMR	Multi Matching Reads
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids
NAD ⁺	Nicotinsäureamidadenindinucleotid
NADP ⁺	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
<i>NBN</i>	<i>nibrin</i>
ncRNA	nicht kodierende RNA (non-coding RNA)
<i>NEO1</i>	<i>neogenin 1</i>
NER	Nukleotid-Exzisions-Repair oder Strang-Exzisions-Repair
<i>NFXL1</i>	<i>nuclear transcription factor, X-box binding-like 1</i>
NGS	Nächste Sequenzierungsgeneration (next-generation sequencing)
NHEJ	Nichthomologes End Joining (non homologous end joining)
<i>NIPBL</i>	<i>Nipped-B homolog</i>
<i>NKRF</i>	<i>NF-kappa-B-repressing factor</i>
NMR	Non Matching Reads
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
<i>NRF1</i>	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
<i>NRF2</i>	<i>Nuclear-factor-E2-related factor</i>
<i>NRP2</i>	<i>Neuropilin-2</i>
nt	Nukleotide
pA	zur Analyse (per analysis)
<i>PARP</i>	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>PKA</i>	<i>cAMP-abhängigen Proteinkinase A</i>
<i>PKHD1</i>	<i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
Pol	Polymerase
<i>PRKAR2B</i>	<i>cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit</i>
<i>PRKD</i>	<i>protein kinase D</i>
PSA	prostataspezifisches Antigen

PTRF	<i>polymerase I and transcript release factor</i>
QV	Qualitätswert (quality value)
RAB5C	<i>Ras-related protein Rab-5C</i>
RBP1	<i>retinol binding protein 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
RNA-Seq	RNA Sequenzierung, Bestimmung der Genexpression mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung
RNase	Ribonuklease
PNK	<i>Polynucleotide kinase</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rRNA	ribosomale RNA
RPA	<i>Replikationsprotein A (replication protein A)</i>
RPC	<i>Replikationsprotein C (replication protein C)</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	reverse Transkription
SCNN1	<i>sodium channel non-neuronal 1</i>
SEMA3F	<i>semaphorin 3F</i>
shRNA	small hairpin RNA
SIRT4	<i>sirtuin 4</i>
SIX4	<i>SIX homeobox 4</i>
SLIT2	<i>slit homolog 2</i>
snoRNA	small nucleolar RNAs
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (single nucleotide polymorphism)
SOCS3	<i>STAT induced STAT inhibitor 3</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>
SPOCK3	<i>sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3</i>
SRSF2	<i>serine/arginine-rich splicing factor 2</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (single strand DNA)
SSI	<i>STAT-induced STAT inhibitor</i>
STEM	Short Time-series Expression Miner
TCEB3	<i>transcription elongation factor B</i>
TCR	<i>transcription Coupled Repair</i>
TFIIH	<i>Transkriptionsfaktor II H (transcription factor II H)</i>
TFEC	<i>Transcription factor EC</i>
TNF	<i>Tumor-Nekrose-Faktor (tumour necrosis factor)</i>
TP53INP1	<i>Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1</i>
tRNA	totale RNA
TSPAN8	<i>tetraspanin 8</i>
TXNL1	<i>Thioredoxin-like 1</i>
UMR	Unique Matching Reads
UV	Ultraviolett
WIOS	Wildau In-Silico Sequence Analysis Pipeline
wt	Wildtyp
WNT5A	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XRCC	<i>X-ray Repair Cross Complementing Group</i>
ZNF	<i>zinc finger protein</i>
ZPLD1	<i>zona pellucida-like domain containing 1</i>