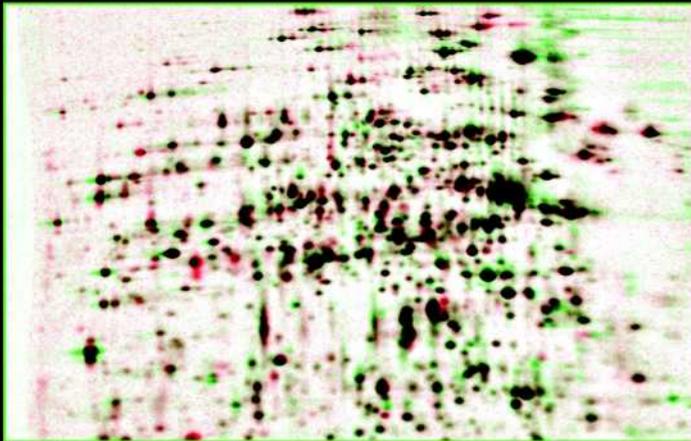




**Untersuchung frühzeitiger Reaktionen
lymphozytärer Proteine auf γ -Bestrahlung
humanen Vollbluts und deren Dosis-
abhängigkeit – Voraussetzung für die Entwicklung
eines individuellen strahlenbiologischen Dosimeters**

Andrei Turtoi



Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 40

Forschungszentrum Jülich GmbH
Sicherheit und Strahlenschutz (S)

**Untersuchung frühzeitiger Reaktionen
lymphozytärer Proteine auf γ -Bestrahlung
humanen Vollbluts und deren Dosis-
abhängigkeit – Voraussetzung für die Entwicklung
eines individuellen strahlenbiologischen Dosimeters**

Andrei Turtoi

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 40

ISSN 1433-5549

ISBN 978-3-89336-502-9

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2007

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 40

D 520 (Diss., Dresden, TU, 2007)

ISSN 1433-5549
ISBN: 978-3-89336-502-9

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	6
1 Einleitung	7
1.1 Physikalische Aspekte der γ -Strahlung	7
1.2 DNA-Schäden und deren Reparatur	8
1.3 Lymphozyten als geeignetes strahlenbiodosimetrisches Target	13
1.4 Strahlenempfindliche zelluläre Proteine für die Strahlenbiodosimetrie	14
1.4.1 Proteine der DNA-Reparatur	16
1.4.2 Proteine der Apoptose und Signaltransduktion	18
1.4.3 Strukturproteine	21
1.4.4 Proteine nach oxidativen Stress	23
1.4.5 Glycolyseproteine	23
1.4.6 Proteomuntersuchungen	24
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 <i>In-Vitro</i> -Bestrahlung menschlichen Vollbluts und Separation der Lymphozyten	27
2.2 Trennung der lymphozytären Proteine mittels 2D- Gelelektrophorese	28
2.2.1 Lyse der Lymphozyten	28
2.2.2 Proteinreinigung	29
2.2.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	29
2.2.4 SDS-PAGE (2. Dimension)	29
2.2.5 Färbung und Auswertung der 2D-Gele	30
2.3 Enzymatischer Aufschluss der Proteine und Identifikation mit Nano-HPLC-MS/MS	31
2.3.1 Aufschluss der Proteine mit Trypsin	32
2.3.2 Analyse der Proteine mittels Nano-HPLC-MS/MS	33

2.4 Überprüfung der gelelektrophoretisch analysierten Proteine durch Bestimmung ihrer Genexpressionsveränderungen	35
2.4.1 Isolierung der mRNA aus Lymphozyten	35
2.4.2 Synthese von cDNA aus mRNA	37
2.4.3 Taq Man TM - Genexpressionsanalysen und Real-Time-PCR	38
3 Ergebnisse	41
3.1 Analyse strahlenempfindlicher lymphozytärer Proteine	42
3.2 Massenspektrometrische Identifizierung strahlenempfindlicher Proteine	45
3.3 Genexpressionanalyse mittels RT-qPCR Methode	52
4 Diskussion	59
5 Literatur	69
6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	85
7 Abkürzungsverzeichnis	89
8 Anhang	93

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Problematik, vertrauenswürdige Daten experimentell zu erhalten, die es erlauben, retrospektiv Aussagen über strahleninduzierte Dosen zum Zeitpunkt der Applikation bzw. der Kontamination zu machen.

Die möglichst schnell einsetzende medizinische Behandlung von Personen nach Unfällen mit ionisierender Strahlung benötigt frühzeitige und schnell durchführbare biologische Verfahren sowohl zur Bestimmung der ursprünglich erhaltenen Strahlendosis als auch zur Beurteilung der dosisabhängigen biologischen Reaktionsverläufe, basierend auf der individuellen Strahlenempfindlichkeit.

Dafür wurden in dieser Arbeit die lymphozytären Proteine (Phospho- und Gesamtproteine) aus γ -bestrahltem Probandenblut (applizierte Dosis: 0-4 Gy) bereits 15 Minuten nach Bestrahlungsende mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert. Nur diejenigen „Early-Response-Proteine“ (ERPRO), die eine signifikante strahleninduzierte Veränderung zeigten, wurden mittels Nano-HPLC-MS/MS identifiziert. Zur Validierung wurde von einigen von ihnen deren dosisabhängige Genexpression mit RT-qPCR bestimmt. Folgende ERPRO zeigten ausgeprägte frühzeitige Reaktionen in Form von Konzentrationsänderungen im Vergleich zu nicht-bestrahlten Kontrollproben: Talin-1, Talin-2, β -Actin, Mutant β -Actin, Peroxin-1 sowie die Phosphoproteine Annexin-A6, MHC-bindendes Protein-2, Zyxin-2, Interleukin-17E und Phosphoglyceratkinase-1. Den überwiegenden Teil der lymphozytären ERPRO repräsentieren Proteine, die für Veränderungen des Zytoskeletts, Proliferation und Zellzyklus, Modulation von Immunreaktionen sowie Proteindegradation und Energiegewinnung verantwortlich sind. Weitere zelluläre Prozesse, die hier aus Empfindlichkeitseinschränkungen von 2D-PAGE und MS-Methode möglicherweise nicht erfasst wurden, sind nicht auszuschließen. Die Genexpressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass eine Methodenkombination aus RT-qPCR und 2D-PAGE bzw. DNA-Microarray und Western-Blot diese Einschränkung in Zukunft überwinden könnte.

Die Steigungen der Kurven aus den Konzentrationsmessungen verschiedener Early-Response-Proteine nach applizierter Dosis im Bereich zwischen 0 und 4 Gy ergeben eine charakteristische Zusammenstellung bzw. ein Muster, das repräsentativ für ein Individuum ist. Dieses *ex-vivo* angefertigte Muster dient im Kontaminationsfall als Referenz für das Auffinden der ursprünglich unbekanntes Dosis, womit die Voraussetzung für die Anwendung eines individuellen Strahlenbiodosimeters gegeben ist. Hiermit wurde erstmalig eine experimentelle Möglichkeit angeboten, retrospektiv radioaktive Dosen im Bereich zwischen 0 und 4 Gy nach relativ kurzer Zeit biologisch zu quantifizieren.

Abstract

The present thesis is concerned with the issues involved in obtaining reliable experimental data permitting a retrospective assessment of radiation-induced doses at the time of application or contamination.

In order to provide prompt medical treatment of those injured in accidents with ionizing radiation, biological procedures that can be implemented swiftly and at an early stage are required both to determine the radiation dose originally received as well as to assess the course of the dose-dependent biological reactions on the basis of individual sensitivity to radiation.

To this end, in the present thesis the lymphocyte proteins (phosphoproteins and total proteins) in blood taken from test subjects who had been exposed to γ -radiation (applied dose: 0-4 Gy) were analysed just 15 minutes after completing irradiation by means of 2D gel electrophoresis. Only those early-response proteins (ERPROs) that displayed a significant radiation-induced change were identified by nano-HPLC-MS/MS. For validation purposes, the dose-dependent gene expression of some of these proteins was determined by RT-qPCR. The following ERPROs displayed pronounced early reactions in the form of changes of concentration in comparison to unirradiated control samples: talin-1, talin-2, β -actin, mutant β -actin, peroxin-1 and also the phosphoproteins annexin-A6, MHC-binding protein-2, zyxin-2, interleukin-17E and phosphoglycerate kinase-1. The majority of the lymphocyte ERPROs represent proteins responsible for changes to the cytoskeleton, proliferation and cell cycle, modulation of immunoreactions as well as protein degradation and energy production. Other cellular processes may not have been determined due to the sensitivity restrictions of the 2D-PAGE and MS methods, but cannot be excluded. Gene expression studies revealed that a combination of methods, comprising RT-qPCR and 2D-PAGE as well as DNA microarray and Western blot, may in future be able to overcome these restrictions.

The slopes of the curves from concentration measurements of various early response proteins after doses had been applied in the 0 and 4 Gy range yielded a characteristic arrangement or pattern representative of an individual. In case of contamination, this pattern prepared *ex vivo* serves as a reference for identifying the originally unknown dose, thus creating the necessary condition for applying an individual radiation biodosimeter. This thus provides for the first time an experimental means of biologically quantifying in retrospect radioactive doses in the 0 and 4 Gy range after a relatively short time.

1 Einleitung

1.1 Physikalische Aspekte der γ -Strahlung

Gamma-Strahlen gehören zur ionisierenden Strahlung, deren Energieabsorption in biologischem Gewebe durch die Dosiseneinheit Gy (Gray) quantifiziert wird. 1 Gy entspricht der Energiedeposition von 1 Joule (0,239 cal) pro 1 kg Masse. Diese hängt von der Intensität der Ionisation und damit von der Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung mit dem biologischen Gewebe ab, was durch den LET (linearer Energietransfer), gemessen in keV / μm , verdeutlicht wird. Im Falle der γ -Strahlen (Low-LET) kommt es hauptsächlich zur indirekten Reaktion, und zwar vorwiegend über Bildung von Wasserradikalen. In dieser Arbeit werden ausschließlich die von einer ^{137}Cs -Quelle emittierten β - bzw. γ -Strahlen für die Experimente benutzt.

In dem ersten Schritt der Wechselwirkung von γ -Strahlung mit Wasser entstehen angeregte und ionisierte Wassermoleküle, die in Wasserstoff- und OH-Radikale zerfallen (Linz, 1983). Diese können eine Vielzahl an Reaktionen eingehen. Die Anzahl der Moleküle, die pro 100 eV absorbiertes Energie (250 KVp – X-Strahlen) entstehen, werden durch den G-Wert repräsentiert. In der Tabelle 1 sind die G-Werte der primären Radiolyseprodukte des Wassers (für γ -Quanten) dargestellt (Draganič et al. 1971).

<i>Radiolyseprodukt</i>	<i>G-Wert</i>
HO \cdot	2,70
Hydrat. Elektronen [$e^-_{(\text{aq})}$]	2,65
H \cdot	0,55
H ₂ O ₂	0,70
H ₂	0,45

Tabelle 1: G-Werte der primären γ -Radiolyseprodukte des Wassers.

Die Anwesenheit weiterer chemischer Verbindungen kann die Ausbeute an Radikalen nachhaltig verändern. So erhöht Sauerstoff im Wasser infolge Bestrahlung die Radikalausbeute. Im Wesentlichen entstehen reaktive Spezies (ROS), wie z.B. O₂ $^-$ (O₂ + e $^-_{(\text{aq})}$ \rightarrow O₂ $^-$).

Die Untersuchungen (Streffler, 1969) zeigten, dass in N₂-Atmosphäre eine um den Faktor 3 höhere Strahlendosis für den gleichen Effekt (zur Abtötung von *E. coli*) als in Sauerstoffatmosphäre benötigt wurde. Gerade diese Prozesse sind von größter Bedeutung für die klinische Strahlentherapie, wo überwiegend hypoxische Tumoren zu behandeln sind.

Eines der wichtigsten Targets für die strahleninduzierten Radikale ist die zelluläre DNA, an deren Bestandteilen (Basen, Zucker und Phosphate) viele verschiedene Schäden vorkommen können. Trotz großer Radiosensitivität ist die DNA ein relativ gut geschütztes Molekül. Dafür sorgt die antiparallele Helix-Struktur, verstärkt mit Histonen als „Packungsproteine“ und unterstützt durch hydrophil-hydrophobe Wechselwirkungen. Wenn es trotzdem zu strahleninduzierten Schäden kommt, hat die Zelle die Möglichkeit, entsprechende Reparaturen durchzuführen.

1.2 DNA-Schäden und deren Reparatur

Jede humane Zelle wird im Normalfall mit etwa 100.000 DNA-Schäden pro Tag belastet (Hall, 2006). Diese können aufgrund von Replikationsfehlern und nicht zuletzt durch die natürliche Hintergrundstrahlung auftreten. Um diese Schäden an der DNA möglichst fehlerfrei zu beheben, bedienen sich die Zellen ihres vorhandenen komplexen Netzwerkes von Abwehr- und Reparaturmechanismen, deren wichtigste Aufgaben u.a. die Koordination des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose sind. Die strahlenbedingten Veränderungen der zellulären Prozesse sind mit den DNA-Reparaturvorgängen eng verbunden. Diese beinhalten eine Vielzahl an Genen und deren Proteinprodukte, die spezifisch auf ionisierende Strahlung reagieren. Aus diesem Grund ist es wichtig, die enzymatisch gesteuerten Abläufe der DNA-Reparatur sehr genau zu betrachten.

Grundsätzlich können die DNA-Schäden und deren entsprechenden Reparaturmechanismen folgendermaßen eingeteilt werden (s. Abb. 1):

1. Einzelstrangbrüche (ESB's) sind Brüche, die nur an einem DNA-Strang erfolgen. Sie ergeben relativ geringe biologische Konsequenzen, da sie sehr effizient repariert werden können. Der nicht-geschädigte DNA-Strang dient den Reparaturenzymen als Matrix zur Exzisionsreparatur; die betroffene Stelle kann durch „Rejoining“ wiederhergestellt werden (Schneeweiss et al. 1987).

2. Doppelstrangbrüche (DSB's) sind zwei direkt oder nur wenige Basenabstände (~10) entfernt gegenüberliegende Einzelstrangbrüche, die durch homologe oder nicht-homologe Rekombination (Frankenberg-Schwager, 2001) repariert werden können.
3. Basenschäden sind Schädigungen der DNA-Basen (A, T, C und G), die häufig zu ESB's führen und reparabel sind (s.o.).
4. Lokalmultiple Schäden sind gehäufte Läsionen, bestehend aus einer Kombination mehrerer ESB's und DSB's, und sind - wenn überhaupt - schwer reparabel.

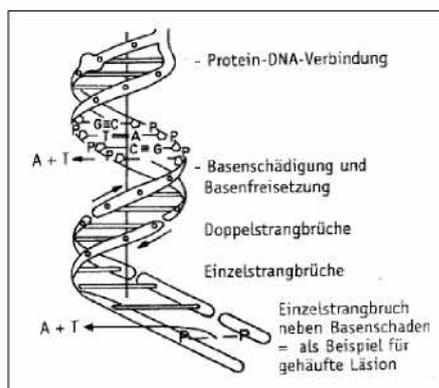


Abb. 1: Radiogene Schäden an der DNA (schematisch) (aus Herrmann und Baumann, 1997)

Hinsichtlich der Komplexität der Reparatur verursachen DSB's der DNA beträchtliche biologische Konsequenzen. Generell beinhaltet der Reparaturmechanismus eines DSB's Proteine, die die Schäden detektieren, Signalproteine, die ein entsprechendes Signal auslösen und verstärken, und schließlich sog. „Effector“-Proteine, die u.a. den Zellzyklus anhalten und die Apoptose (programmierte Zelltod) induzieren können. An der Schlüsselstelle dieser Signalkaskaden befindet sich das zu den Proteinkinasen gehörende ATM-Protein (Ataxia Telangiectasia Mutated), das weitere Signalproteine phosphorylieren und somit eine Signalkette auslösen kann. Andere Proteine, wie die DNA-PK (DNA-Dependent Protein Kinase), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related), mTOR (FK506 Binding Protein-12 Rapamycin Associated Protein-1) und hSMG-1 (PI-3 Kinase Related Kinase SMG-1) beteiligen sich an Signalprozessen, die in Verbindung mit bestimmten DNA-Schäden auftreten. So reagieren ATM und DNA-PK bevorzugt auf DSB's, während ATR auf UV-induzierte Schäden anspricht (Abraham, 2004).

Das ATM-Protein wurde erstmals 1995 von Savitsky et al. beschrieben, die eine neue PI3K-ähnliche Proteinkinase (PIKK) entdeckten. Der Verlust der ATM-Funktion führt u.a. zu einer ausgesprochenen chromosomalen Instabilität und extremen Radiosensitivität. Die Rolle des ATM's während der DNA-Reparatur betrifft im Wesentlichen die Kontrolle des Zellzyklus und der dort enthaltenen „Check-Points“. Nach einem DNA-DSB wird ATM durch Autophosphorylierung aktiviert (Bakkenist & Kastan, 2003). Dieses wird durch die Proteinphosphatasen PP2A und PP5 gesteuert, die die an den Stellen 1981, 1893 und 367 befindlichen Serinreste phosphorylieren. Aktiviertes ATM bewirkt mit Hilfe des ATR durch Phosphorylierung des p53-Proteins ein Anhalten des Zellzyklus in der G₁-Phase. Dabei trennt sich p53 von seinem Inhibitor MDM2 (Mouse Double Minute-2) und aktiviert nun das CDKN1A- (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor-1A) Protein, das für eine Herunterregulierung der Aktivitäten des Cyclin-E / Cyclin-A / CDK2 (Cyclin Dependent Kinase) – Proteinkomplexes sorgt. Die Zellen, die sich in diesem Falle in der G₁-Phase befinden, gehen nicht in die S-Phase über. Die Zellen, die sich bereits in der S-Phase befanden, werden durch ATM in der S-Phase blockiert. Zusammen mit den Proteinen MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint-1), MRN (MRE11-RAD50-NBS1-Protein Komplex), BRCA1 (Breast Cancer Protein-1) und 53BP1 (Tumor Protein p53 Binding Protein-1) bewirkt das ATM einen Abbau des CDC25A (Cell Division Cycle-25 Homologue-A)-Proteins. Das geschieht durch Phosphorylierung von Serin an der Stelle 123. Normalerweise aktiviert das CDC25A-Protein den Cyclin-A / CDK2-Proteinkomplex und fördert somit den Übergang der Zellen aus der G₁- in die S-Phase. Das bedeutet, dass eine Abnahme des CDC25A-Proteins eine Deaktivierung des Cyclin-A / CDK2-Proteinkomplexes und eine Blockierung der Zellen in der frühen S-Phase bewirkt (Donaldson & Blow, 1999). Eine andere Barriere, die den Zellzyklus noch anhalten kann, stellt der sog. G₂-Check-Point dar. Dort werden die geschädigten Zellen gehindert, in die Mitose zu gehen. Um einen G₂-Block zu erreichen, aktivieren die Zellen ATM und ATR, was wiederum zur Aktivierung von CHK1 und CHK2 (Checkpoint Homolog) führt. Als nächstes erfolgt die Phosphorylierung von CDC25C durch CHK1, wodurch es zu Inhibierung von CDC25C kommt, das nun nicht mehr in der Lage ist, den Cyclin-B / CDC2 – Proteinkomplex zu aktivieren (Dèry & Masson, 2007).

Für den DNA-DSB ist einer der wichtigsten Reparaturmechanismen die sog. Homologe Rekombination (HR), die als Syntheseinformation den gegenüberliegenden intakten Schwester-Chromatid-DNA-Strang benutzt. Dieser bietet die Möglichkeit, einen schwerwiegenden

Schaden meistens fehlerfrei zu reparieren (Lundin et al. 2002). Zu einem der ersten Schritte bei der DNA-Reparatur gehört die Aktivierung von ATM durch BRCA1 und die Phosphorylierung des γ H2AX-Histons. Phosphoryliertes γ H2AX stabilisiert die Bindung vieler Reparaturproteine unmittelbar an den Stellen des DNA-Schadens (Peterson & Côté, 2007). In menschlichen Zellen wird die HR von dem MRN-Proteinkomplex (s. S. 90) initiiert, der Doppelstrangbrüche in der DNA aufspürt, dort die geschädigten DNA-Basen herausschneidet und somit DNA-Einzelstrangstücke erzeugt. Diese einzelsträngigen DNA-Partien werden u.a. vom Replication Protein-A (RPA) erkannt, das schnell an Stellen des DNA-Schadens bindet. RPA wird mit Hilfe von RAD52 durch RAD51 ersetzt, das die Herstellung der sog. Nucleoproteinfilamente ermöglicht. Diese werden mit dem DNA-Strang des Schwesterchromatids verbunden. Es entsteht eine sog. Holliday-Struktur (Masson et al. 2001), die durch einen sog. Resolvase-Proteinkomplex in zwei intakte DNA-Duplexmoleküle aufgelöst wird. Die homologe Rekombination ist ein eher langsamer Prozess, der stark davon abhängig ist, wie schnell die homologen Sequenzen für die Rekombinationsreparatur gefunden werden. Die Schwesterchromatiden dienen bevorzugt der HR; allerdings werden sie erst in der S-Phase gebildet und stehen dann in der späten S- und G₂-Phase zur Verfügung. Die Geschwindigkeit der HR ist somit zellzyklusabhängig (Tamulevicius et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger DSB-Reparaturmechanismus ist das sog. NHEJ (Non Homologous End Joining), das relativ zellzyklusunabhängig abläuft (Tamulevicius et al. 2007). Es ist ein schnelles Verfahren, das innerhalb von 10 Minuten abgeschlossen werden kann; jedoch verläuft es im Gegensatz zum HR häufiger fehlerhaft. Um die durch DNA-Doppelstrangbrüche entstandenen Strangenden während des NHEJ miteinander zu verbinden, docken die Proteine KU70 und KU80 gemeinsam mit der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) an der DNA-Strangbruchsstelle an. Dieser Vorgang bewirkt eine Autophosphorylierung der DNA-PKcs, die anschliessend das Artemis-Protein bindet und phosphoryliert. Artemis wirkt als Endonuklease und sorgt dafür, dass die DNA-Enden von eventuell beschädigten Basen oder sog. „Hairpin“-Strukturen befreit werden. Nun sind die Voraussetzungen geschaffen, um die DNA-Stränge miteinander zu verbinden. Diese Aufgabe wird von XRCC4- (X-Ray Repair Cross Complementing Protein-4), Ligase IV- und XLF-Protein (Nonhomologous End-Joining Factor 1) übernommen, die an der Stelle des Doppelstrangbruchs gemeinsam ein Proteinkomplex bilden, dort die fehlende

Nukleotide ersetzen und die DNA-Stränge miteinander verbinden. Nach erfolgter DNA-Reparatur wird die DNA-PKcs durch die PP2A-Phosphatase dephosphoryliert, was die Ablösung von KU70, KU80 und des DNA-PKcs-Komplexes zur Folge hat (Dèry & Masson, 2007).

Die Reparatur von geschädigten Basen erfolgt über den Basen-Exzisions-Mechanismus (BER). Hier wird zwischen einem kürzeren und längeren Reparaturweg unterschieden. Während bei dem kürzeren Reparaturweg nur ein geschädigtes Nukleotid ausgetauscht wird, erfolgt bei dem längeren Weg ein Austausch von 2 bis 13 Nukleotiden (Almeida & Sobol, 2007). Für beide Wege ist die Art und Weise des Austauschs der betroffenen DNA-Basen durch DNA-Glycosylase und APE1- (Apurinic/Apyrimidinic-Endonuclease) Endonuklease charakteristisch. Der kürzere Reparaturweg verläuft nur über die Einbindung von DNA-Polymerase- β , die nicht den geschädigten DNA-Strang als Matrize nutzt. Die einzelnen Nukleotide werden durch XRCC1 und DNA-Ligase-I verbunden. Im Gegensatz dazu werden bei dem längeren Reparaturweg zusätzlich zur DNA-Polymerase noch weitere Proteine benötigt: PARP1 (Poly-ADP-Ribose Polymerase Family Member-1), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und FEN1 (Flap Endonuclease). DNA-Einzelstrangbrüche, die durch Strahlung verursacht worden sind, werden auf einem etwas abweichenden Weg repariert: So werden hier die ESB's überwiegend von PARP1 erkannt und entfernt. Dieses löst ein Signal aus, wobei XRCC1 und andere bereits beim BER erwähnten Proteine zur der Einzelstrangbruchstelle gebracht werden (Caldecott et al. 1996); anschließend verläuft die Reparatur nach einem dem BER ähnlichen Weg.

Je nach Bestrahlungsdosis und Erfolg der DNA-Reparatur ergeben sich biologische Konsequenzen, die die Zelle als Ganzes betreffen. Bestrahlungen mit relativ niedrigen Dosen rufen hauptsächlich Veränderungen des zellulären Metabolismus sowie DNA-Schädigungen hervor, deren Reparatur vorwiegend korrekt verläuft. Diejenigen Zellen, die trotz aller Abwehrreaktionen die Schäden nicht reparieren können, erleiden Apoptose und werden von T-Zellen des Immunsystems beseitigt. Allerdings ist es auch möglich, dass Zellen eine gewisse Adaptation gegenüber Bestrahlung eingehen können. So zeigten humane Lymphozyten nach einer Vorexposition mit 5 mGy weniger Chromosomenaberrationen als nicht-vorexponierte Zellen, wenn sie später relativ hohen Bestrahlungsdosen (z.B. 4 Gy) ausgesetzt wurden (Feinendegen et al. 1998). Anders als bei einer Bestrahlung im Niedrig-Dosis-Bereich bewirken hohe Dosen eine ausgesprochene genomische oder chromosomale

Instabilität und eine Schädigung der gesamten Zellstruktur. Die betroffenen Zellen können unterschiedliche Reaktionen eingehen: entweder relativ schnelles, nicht selten nekrotisches Absterben oder über mehrere Generationen andauernde Chromosomenaberrationen. Zusätzlich werden sog. Bystander-Effekte betrachtet, die darin bestehen, dass sie benachbarte unbestrahlte Zellen in Mitleidenschaft ziehen. So setzen bestrahlte Zellen u.a. Cytokine in deren Umgebung frei, die benachbarte Zellen z.B. zur Apoptose oder Proliferation anregen können.

1.3 Lymphozyten als geeignetes strahlenbiodosimetrisches Target

Die biologische Strahlendosimetrie ist ein wichtiges Verfahren, um unbekannte Dosen nach Applikation radioaktiver Strahlung, unabhängig von der physikalischen Dosimetrie, zu ermitteln. Dieses kommt vor allem im Strahlenschutz zur Geltung, wo nach einem Strahlenunfall physikalische Dosimeter (z.B. Filmdosimeter) entweder nicht vorhanden sind (z.B. Goiânia- und Chernobyl-Unfall) oder deren Funktionsbereich überschritten ist (Dosen $\gg 1$ Gy). Eine Ausnahme stellt die Elektron-Spin-Resonanz-Methode dar, die auf physikalischen Veränderungen im Zahnschmelz basiert, wobei allerdings eine Extraktion des Zahns unumgänglich ist (Lloyd et al. 1998). Als eine relativ einfache und genaue Methode erwies sich dagegen die Untersuchung von Lymphozyten aus dem peripheren Blutkreislauf. Da die Lymphozyten sehr strahlensensibel und außerdem einfach zu isolieren und aufzureinigen sind, erfüllen sie die Voraussetzung für ein nahezu ideales biodosimetrisches Werkzeug.

Ihren ersten Einsatz als biodosimetrischer Indikator fanden die peripheren Blutlymphozyten nach dem Recuplex-Unfall 1962 in Hanford, USA. Dabei wurden erstmals die Schädigungen an deren Chromosomen zur Dosimetrie herangezogen (Kanda 2000). Diese Technik gewann immer mehr an Bedeutung und wurde 1986 von der IAEA (International Atomic Energy Agency) als Standardmethode anerkannt. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um die Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen, wie z.B. dizentrischer Chromosomen und Translokationen. Dabei werden Lymphozyten aus dem Blut entnommen, in Kultur überführt und zur Teilung mit Phytohemagglutinin angeregt. Nach etwa 48 Stunden folgt die chemische Unterbindung der Mitose durch Colcemidzugabe. Die in der Metaphase befindlichen Chromosomen werden angefärbt und z.B. die dizentrischen Chromosomen

ausgezählt. Eine weitere Verbesserung stellt die FISH-Technik (Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung) dar, die sich hauptsächlich auf stabile Translokationen stützt (Kanda 2000). Der wichtigste Unterschied zwischen diesen zwei Methoden besteht in der länger andauernden Stabilität der Translokationen gegenüber der von dizentrischen Chromosomen. Nach der FISH-Methode lässt sich die Dosis noch nach mehreren Jahren zuverlässig rekonstruieren (Lloyd et al. 1998). Jedoch ist ihre komplizierte und zeitraubende Auswertung (3 - 4 Tagen) sehr problematisch, v.a. wenn es darum geht, die Unfallopfer einer schnellen ärztlichen Behandlung zuzuführen, da z.B. eine Behandlung durch Knochenmarktransplantation und mit Wachstumsfaktoren in den ersten 24 Stunden nach dem Unfall am wirkungsvollsten ist (Kanda 2000). Ein weiteres wichtiges Problem ist die Berücksichtigung der Individualität eines jeden betroffenen Menschen, zumal der Erfolg einer medizinischen Therapie gerade von dieser individuellen Diagnose abhängig ist.

Ein Dosimeter, das sich mehrerer Marker gleichzeitig bedient, könnte die Individualität jedes Menschen besser berücksichtigen. Dazu sollten diese Marker nach dem Kontaminationsereignis schneller detektier- und auswertbar sein. Das ermöglichen die strahlenempfindlichen lymphozytären Proteine, von denen kurze Zeit nach der Bestrahlung ein charakteristisches Muster für die biodosimetrische Anwendung erstellt werden kann. Dieses Proteinhinmuster soll dazu dienen, individuelle Referenzkurven für einen relevanten Dosisbereich (z.B. 1 - 4 Gy) *ex-vivo* zu erstellen, die später - nach einem eventuellen Unfall - der unmittelbaren Auswertung dienen.

1.4 Strahlenempfindliche zelluläre Proteine für Strahlenbiodosimetrie

Die neusten Entwicklungen der zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden bieten zunehmend die Möglichkeit, nach geeigneten Markern für die Strahlenbiodosimetrie zu suchen. Unter anderem stehen hierfür zwei Methoden zur Verfügung: die Proteomics- (2D-Gelelektrophorese in Kombination mit massenspektrometrischen Analysen) und die Genomics-Methode (DNA-Microarrays und RT-qPCR). Bei der Anwendung beider Methoden ist zu beachten, dass nicht jede veränderte Genexpression eine Veränderung des Expressionsproduktes, hier des Proteins, zur Folge hat. Gegenwärtig sind etwa 33.000 menschliche Gene bekannt, die durch alternatives Splicen weit über 50.000 Proteine und Proteinvarianten ergeben. Eine Begrenzung auf die für die Strahlenbiodosimetrie geeigneten

Protein-Kandidaten ist deshalb notwendig. Ausserdem bietet die Kombination beider Methoden die Möglichkeit, innerhalb der relevanten biologischen Prozesse die strahlensensibelsten Marker zu finden und zu identifizieren. Relevante Prozesse stellen v.a. die DNA-Reparatur und die Apoptose dar, wo eine Vielzahl an Daten bereits vorhanden ist, wie zum Beispiel über posttranslationale Modifikationen und zelluläre Strukturveränderungen nach γ -Bestrahlung.

Von den zahlreichen strahlenempfindlichen zellulären Reaktionen werden anhand der involvierten Proteine die wichtigsten im Folgenden schematisch dargestellt:

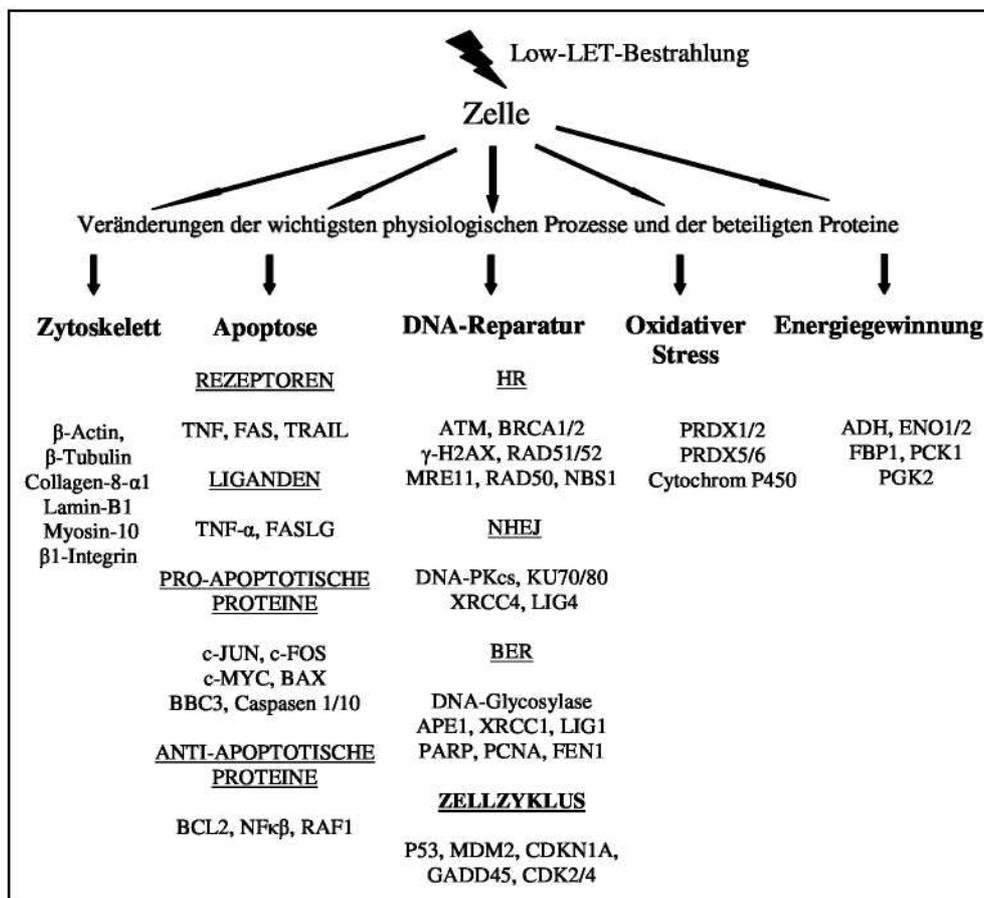


Abb. 2: Schematischer Überblick der wichtigsten strahlenempfindlichen physiologischen Prozesse und der Proteine, die in ihnen involviert sind.

Im folgenden Kapitel werden die in der Abb. 2 dargestellten Proteine und die jeweiligen biologischen Prozesse bezüglich ihrer strahlenbiologischen Relevanz betrachtet.

1.4.1 Proteine der DNA-Reparatur

Eine wichtige Rolle während der DNA-Reparatur spielen u.a. die RAD-Proteine (RADiation Sensitivity), RAD17 und RAD6. Nach γ -Bestrahlung und im Dosisbereich von 10-20 Gy wurden sowohl bei Mäusen als auch in menschlichen Zelllinien (HeLa, Fibroblasten und Lymphoblasten) gesteigerte Phosphorylierung von RAD17 gefunden (Bao et al. 2001, Foray et al. 2003, Dang et al. 2005 und Peng und Chen 2005). Im Falle der DNA-Schädigung werden zuerst RAD1, RAD9 und HUS1 durch ATR phosphoryliert, und RAD17 bewirkt das Anhalten des Zellzyklus in der G₂-Phase. So stellten Volkmer & Karnitz (1999), Chen et al. (2001), St Onge et al. (2001) und Foray et al. (2003) in verschiedenen humanen Zellkulturen (u.a. HeLa und Fibroblasten) eine Zunahme der Phosphorylierung von RAD9-Proteinen fest. Diese Beobachtungen wurden in einem Dosisbereich von 5 – 50 Gy und 0,5 – 6,5 Stunden nach Bestrahlung gemacht. RAD6 in Verbindung mit ubiquitinierten PCNA beteiligt sich ebenfalls an der DNA-Reparatur. Shan et al. (2003) haben eine Erhöhung der PCNA-Proteinkonzentration im Bereich von 0,5 - 20 Gy in Knochen-markmakrophagen und Fibroblasten festgestellt.

In Studien von Powell (2005) werden die Proteine BRCA1 und v.a. BRCA2 als notwendige Faktoren für den Aufbau der RAD51-Filamente betrachtet. Dieses ist der erste Schritt, der zur homologen Rekombination (HR) führt und somit in direkter Verbindung zur DNA-Reparatur steht. Die ATM-verbundene Phosphorylierung von BRCA1 nimmt direkten Einfluss auf die Zellzyklussteuerung, insbesondere auf die S- und G₂/M-Check-Points. In Verbindung mit CHK2 wird BRCA1 modifiziert und sorgt mit BRCA2 für eine fehlerfreie HR. Zhang et al. (2004a) haben eine Verbindung zwischen der Phosphorylierung von CHK2 und BRCA1 gefunden. In deren Untersuchungen wurde die Phosphorylierung von CHK2 an Serin 988 als entscheidend für die Unterstützung von HR bei gleichzeitiger Unterbindung von NHEJ festgestellt. Diese Eigenschaften weisen auf CHK2, BRCA1 und BRCA2 als geeignete Kandidaten für Biomarker nach γ -Bestrahlung hin. Die Literaturdaten bestätigen die Steigerung der Phosphorylierung des BRCA1- Proteins (Scully et al. 1997, Cortez et al. 1999, Li et al. 1999, Gatei et al. 2000a, Gatei et al. 2000b, Lee et al. 2000, Tibbetts et al.

2000, Gatei et al. 2001, Foray et al. 2002, Yazdi et al. 2002, Wang et al. 2002, Lou et al. 2003a, Kitagawa et al. 2004 und Xu & Stern 2004) bereits 0,25 – 8 Stunden nach Bestrahlung in einem weiten Dosisbereich (0,5 – 50 Gy). Bisherige Veränderungen des BRCA1 wurden in Zelllinien (HeLa und verschiedene Lymphoblasten) sowie Brust- und Colontumoren festgestellt. In Studien an menschlichen Lymphozyten (sowohl Protein- als auch Genexpression) wurde BRCA1 bislang nicht erwähnt. Die Proteine CHK2 und ATM, die ebenfalls in Verbindung mit BRCA1 und BRCA2 stehen, wurden hingegen nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten und Thymozyten sowie verschiedenen Zelllinien und Tumoren verändert gefunden (Hirao et al. 2000, Fernandez-Capetillo et al. 2002, Cerosaletti und Concannon 2004, Bhoumik et al. 2005 und Kang et al. 2005). In diesen Studien wurde eine Zunahme der Phosphorylierung von CHK2, der Proteinkonzentration und der Phosphorylierung von ATM innerhalb der ersten 24 Stunden und nach Applikation einer γ -Dosis von 0,3 bis 100 Gy festgestellt. Diese Proteine deuten auf die hervorgehobene Rolle des Zellzyklus in der zellulären Antwort auf γ -Strahlung hin. ATM wird durch Bestrahlung aktiviert und phosphoryliert danach p53 (Siliciano et al. 1997, Khanna et al. 1998 und Waterman et al. 1998). Sensitive Veränderungen der Proteinkonzentration und der Genexpression des CDKN1A (u.a. Ababou et al. 2000, Amundson et al. 2000, Wang et al. 2000, Gajdusek et al. 2001, Kim et al. 2001, Cariveau et al. 2005 und Sun et al. 2005), CDK2 und CDK4 (Zhou et al. 2002, Ju et al. 2003) wurden in Abhängigkeit der applizierten γ -Dosis registriert. Ein ausgedehnter Dosis- (0,1 – 50 Gy) und Zeitbereich (1 – 240 h) sprechen für eine besondere Eignung des CDKN1A als sensitiver Marker für γ -Bestrahlung. Der Nachteil liegt in der relativ mangelhaften Spezifität gegenüber anderen zytotoxischen Einflüssen, wie z.B. UV-Strahlung (Rieger et al. 2004). Ein weiteres Protein, das eng in Verbindung mit CDKN1A, Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur steht, ist GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage Inducible Protein-45). Es wird von p53 reguliert (Grace et al. 2002) und wirkt hemmend auf den Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. Grace et al. (2002) konnten im RNA-Extrakt des Vollblutes eine γ -dosisabhängige Regulation des GADD45-Gens feststellen. Bislang wurden nur wenige Arbeiten vorgestellt, aus denen sich ein Nachweis der GADD45-Proteinveränderung nach Bestrahlung ergab (Li et al. 2000 und Gajdusek et al. 2001). In beiden Arbeiten wurden nach 2-4 Stunden und relativ hohen Dosen (6 – 30 Gy) in Endotheliumzellen der Aorta bzw. in Osteosarkom-Zellen Konzentrationssteigerungen des GADD45 mittels Western-Blot beschrieben. Wegen der wichtigen Rolle

des p53-Proteins und dessen Steuerung von GADD45 ergibt sich die Frage nach der Regulierung von p53. Das in der Literatur (Bae et al. 1995) für strahlenempfindlich befundene Protein MDM2 beeinflusst sowohl die Genexpression als auch die Degradation von p53. Bereits nach einer Dosis von 2 Gy wurden sowohl eine Zunahme der Proteinkonzentration als auch eine Verringerung des Phosphorylierungsstatus von MDM2 in verschiedenen Tumor-Zelllinien sowie humanen Lymphozyten gefunden (Siliciano et al. 1997, Blattner et al. 1999 und Ghosh et al. 2000).

Ein weiterer wichtiger Schritt während der DNA-Reparatur besteht in der Auflockerung der Chromatinstruktur. Die DNA Strangbrüche müssen für die Reparaturenzyme zugänglich gemacht werden. Dieses wird in der Zelle durch die Poly-ADP-Ribosylierung der Histone erreicht (Schneeweiss et al. 1998). Rogakou et al. (1998) fanden, dass nach Bestrahlung eine Phosphorylierung von γ H2AX in der Nähe der Doppelstrangbrüche erfolgte. Diese Veränderung der γ H2AX wurde mehrfach für einen Dosisbereich von 0,3 bis 30 Gy und an unterschiedlichen Zelllinien einschliesslich Lymphozyten bestätigt (Stewart et al. 2003, Brumbaugh et al. 2004, Kitagawa et al. 2004 und Zhang et al. 2004). Gupta et al. (2005) gelang es, die Acetylierung von Histon H4 in Fibroblasten 1 Stunde nach Bestrahlung zu messen. Allerdings erfolgte diese Messung nach Applikation von 50 Gy, was für eine strahlenbiodosimetrische Verwendung problematisch ist.

1.4.2 Proteine der Apoptose und Signaltransduktion

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein hochkonservierter Vorgang, der zur Embryogenese, Homeostase und Entfernung geschädigter Zellen führen kann (Alberts et al. 2004). Eine andere Form des Zelltodes ist die Nekrose, die einen unkontrollierten Zelltod repräsentiert. Apoptose wird in der Regel nach nicht gelungener Reparatur durch mehrere Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, nicht selten unter Beteiligung von Mitochondrien. Diese Signalketten resultieren in der Aktivierung von Caspasen (Proteasen), die zahlreiche Struktur-, DNA-Reparatur-, Transkription- und Translationsproteine als Substrat haben. Bislang wurden bereits nach applizierten Dosen von 4 – 10 Gy und 4 Stunden nach Bestrahlung vermehrte Aktivitäten von Caspase-1 und Caspase-8 in T-Lymphoma- (Kondo et al. 1998 und Belka et al. 1999) und Retinoblastom-Zellen registriert. Weitere radiosensitive pro-apoptotische Proteine wurden ebenfalls detektiert: BAX (BCL2-

Associated X-Protein) (Bouvard et al. 2000, Hirao et al. 2000, Wang et al. 2000 und Gajdusek et al. 2001) und BBC3 (BCL2-Binding Component-3), das in Verbindung mit p53 die Dissoziation des BAX von BCL2 (B-Cell Leukemia/Lymphoma-2-Protein) unterstützt und somit die Apoptoseinduktion ermöglicht (Chen et al. 2005d, Sun et al. 2005). Beide Proteine wurden nach γ -Bestrahlung in Zellkultursystemen (Thymozyten, Melanom-, und Mamakarzinom-Zellen) in erhöhter Konzentration vorgefunden. Eine zweite wichtige Gruppe der pro-apoptotischen Proteine sind die TNF-Rezeptoren (Tumor Necrosis Factor) mit zahlreichen Untergruppen, wie z.B. TNFRSF10B und TNFRSF10C sowie FAS-Rezeptoren (TNF-Receptor Superfamily Member-6). Nach Bindung geeigneter Liganden (z.B. TNF- α und FASLG (FAS-Ligand)) lösen diese Rezeptoren in Kombination mit Caspase-8 die Apoptose aus. Untersuchungen mit Vollblut, Lymphozyten und lymphoblastoiden Zellen zeigten steigende Konzentrationen sowohl von TNF- α als auch FASLG bereits nach einer Dosis von 2 Gy (TNF- α : Girinsky et al. 1994 und Fedorocko et al. 2002; FASLG: Belka et al. 1998). Auch die beiden Oncogene c-JUN (Avian Sarcoma Virus) und c-FOS (c-FOS Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homologue) erwiesen sich als strahlenempfindlich, wobei c-JUN in Verbindung mit c-FOS die Transkription zahlreicher pro-apoptotischer Proteine bewirkte. Untersuchungen an Fibroblasten zeigten 2 bzw. 4 Stunden nach γ -Bestrahlung (Dosis: 2 – 64 Gy) eine Steigerung der c-FOS Proteinkonzentration (Martin et al. 1997 und Al-Assar et al. 2000). In einem vergleichbaren Zeit- und Dosisrahmen erfolgte auch eine Zunahme der Proteinkonzentration und des Phosphorylierungsgrades von c-JUN (Martin et al. 1997, Lee et al. 2001, Foray et al. 2003, Kool et al. 2003 und Weizman et al. 2003).

Zahlreiche anti-apoptotische Proteine spielen wie pro-apoptotische eine wichtige Rolle bei den zellulären Reaktionen nach ionisierender Strahlung. Eine der wichtigsten Gruppe anti-apoptotischer Proteine ist die, die Bestandteile des NF κ B-Signalwegs (Nuclear-Factor- κ B) darstellen. Dieser Signalweg wird extrinsisch durch TNF-Rezeptoren unter Bindung geeigneter Liganden ausgelöst. Daraus ist ersichtlich, dass TNF-Rezeptoren je nach Liganden pro- oder anti-apoptotisch wirken können. Im Allgemeinen bewirkt der NF κ B-Signalweg z.B. durch Aktivierung des FLIP-Proteins (CASP8 FADD-Like Apoptosis Regulator Protein) ein Überleben der Zelle. FLIP ist in der Lage, die durch TNF- und TNFRSF10 (TRAIL)-Rezeptoren ausgelösten pro-apoptotischen Signalkaskaden zu inhibieren und somit direkt die Bildung von Caspase-8 zu unterbinden. So stellten Sreekumar et al. (2001) eine Erhöhung

der FLIP-Proteinkonzentration 4 Stunden nach Applikation von 4 Gy in Colonkarzinom-Zellen fest. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des NF κ B-Signalweges ist neben dem NF κ B das Protein I κ B α . Beide wurden in veränderten Konzentrationen (hoch- oder herabreguliert) gewebespezifisch nach γ -Bestrahlung menschlicher Zellen gemessen (Brach et al. 1991, Lee et al. 1998b, Haase et al. 2003 und Kim et al. 2004). Parallel zu NF κ B gibt es den anderen anti-apoptotischen Signalweg über RAS / RAF (Rat Sarcoma Viral Oncogene und v-RAF-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homologue-1). Kasid et al. (1996) fanden in Laryngeal-Squamous-Karzinom-Zellen bereits 15 min nach Applikation von 15 Gy eine gesteigerte Phosphorylierung des RAF1-Proteins.

Eine wichtige Kategorie der Signal-Transduktionsproteine bilden Cytokine und verschiedene Zellwachstumsfaktoren. Diese Proteine steuern direkt die Proliferation der Zelle und dienen als Botenstoffe. Interleukine, zu den Cytokinen gehörend, spielen in Immun- und Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle. So wurden IL1A, IL1B (Amundson et al. 2000), IL6 (Hayashi et al. 2003, Menard et al. 2006), IL8 (Amundson et al. 1999), IL10 (Park et al. 2006) sowie IL4R (Interleukin-4-receptor) (Kim et al. 2003) für strahlensensitiv befunden. Die meisten der Interleukine reagierten empfindlich bereits nach einer Dosis von 1 Gy, gemessen 6 – 9 Stunden nach Beendigung der Bestrahlung. Alle außer dem IL4R zeigten dosisabhängige Konzentrationsanstiege. Eine weitere wichtige Gruppe der Signaltransduktionsproteine stellen Wachstumsfaktoren, wie z.B. das EGF-Protein (Epidermal Growth Factor), dar. EGF beeinflusst die Proliferation und Differentiation der Zellen. Um seine Wirkung zu entfalten, muss EGF an einen geeigneten Rezeptor (EGFR) auf der Zelloberfläche binden. Untersuchungen an verschiedenen Tumorzellen zeigten, dass bereits wenige Minuten nach Applikation einer Dosis von 0.5 – 5 Gy eine Zunahme der Phosphorylierung des EGFR-Proteins nachzuweisen war (Bowers et al. 2001, Dittmann et al. 2005 und Sturla et al. 2005). Christensen et al. (1996) stellten eine Abnahme des Proteins EGF in menschlicher Speichelflüssigkeit noch Wochen nach Abschluss der Radiotherapie fest. Zusätzlich zu ERF und EGFR wurden strahlenbedingte Veränderungen an weiteren Wachstumsrezeptoren gefunden. So beobachteten Bowers et al. (2001), Todd et al. (1999) und Chen et al. (1996) mittels Western-Blot eine Zunahme der Phosphorylierung von ERBB2, ERBB3 und ERBB4 (v-ERB-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homologue) 1 – 2 Minuten nach γ -Exposition (Dosis: 0,5 – 5 Gy) von Mamakarzinom-

Zellen. Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Wachstums- und Proliferationsfaktoren bei der frühen Antwort menschlicher Zellen auf γ -Bestrahlung hin.

In engem Zusammenhang mit den Interleukinen und Wachstumsfaktoren befindet sich die Gruppe der Annexin-Proteine, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Differentiation spielen. Annexine sind Calcium-bindende Proteine, die an Phospholipiden der Zellmembran andocken. In zwei Proteomstudien an Ratten-Leberzellen bzw. Mäuse- Darmepithelzellen waren nach γ -Bestrahlung (*in-vivo*) Annexin III bzw. Annexin IV in ihrer Konzentration verändert. So berichteten Park et al. (2006) über eine Zunahme des Annexin III in Leberzellen der Ratten 3 Stunden nach einer Ganzkörperbestrahlung mit einer erhaltenen Dosis von 25 Gy. Zuvor fanden Zhang et al. (2003) Annexin IV in erhöhter Konzentration in Darmepithelzellen 3 Stunden nach Ganzkörperbestrahlung der Mäuse und einer applizierten Dosis von 9 Gy. Beide Proteine beteiligen sich an Antikoagulationsprozessen und wirken hemmend auf die Phospholipase A2. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Annexin IV sich an der Exocytose beteiligt (Piljic & Schultz 2006). Park et al. (2005) betonten, dass Annexin III eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt. Annexin III aktiviert HIF1 (Hypoxia Inducible Factor-1), das für eine gesteigerte Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), einer der wichtigsten Komponenten der Angiogenese, sorgt. Obwohl diese Studien einen gewissen Einblick in die Funktion dieser bislang eher unbekannt Proteine gewähren, bleibt deren genaue Rolle in der zellulären Strahlenantwort unklar.

1.4.3 Strukturproteine

In der Molekularbiologie gelten Strukturproteine als besonderes stabil und werden häufig als endogene Kontrolle für Genexpressionsmessungen benutzt. Allerdings stellt das Zytoskelett auch eine sehr dynamische Struktur dar, das u.a. an den chemischen Reaktionen in der Zelle und deren Interaktion mit der Umgebung beteiligt ist. Bislang wurden zahlreiche Strukturproteine als besonderes strahlenempfindlich erkannt. Zhang et al. (2003) stuften β -Actin als strahlenempfindlich ein, nachdem sie Mäuse mit einer γ -Dosis von 9 Gy versehen und deren Darmepithelzellen mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert hatten. Aus den dort vorgestellten Ergebnissen ergab sich, dass die Konzentration des β -Actins 3 Stunden nach γ -Bestrahlung zuerst anstieg und nach 72 Stunden wieder absank. Spät-apoptotische Vorgänge, die in der Regel nach etwa 24 – 72 Stunden in den bestrahlten Zellen auftreten, könnten für

die verringerte Menge an β -Actin verantwortlich sein. Chen et al. (2005b) bestätigten die Strahlenempfindlichkeit des β -Actins in Knochenmarkmakrophagen. Die Autoren verglichen zwei unterschiedliche Makrophagenpopulationen aus zwei Mäusestämmen (C57Bl/6 und CBA/Ca) und deren Reaktion 24 Stunden nach einer *in-vivo* γ -Bestrahlung (0,5 Gy). In beiden Makrophagenpopulationen wurde nach Bestrahlung eine um den Faktor 3,1 gesteigerte Proteinkonzentration des β -Actins festgestellt. Auffällig war das niedrige Molekulargewicht von 30 kDa des β -Actins, bestimmt im 2D-Gel. Eine eindeutige Erklärung wurde hierfür nicht gegeben; apoptotische Vorgänge und Zytoskeletumbau könnten Gründe dafür sein. Zhang et al. (2005) führten weitere Untersuchungen mit IEC-6 Rattenepithelzellen durch, wobei sie Vimentin und β -Tubulin als strahlenempfindlich feststellten. Beide Proteine nahmen in ihrer Konzentration 24 Stunden nach Applikation einer relativ hohen Dosis (25 Gy) ab. In beiden Fällen wurde die 2D-Gelelektrophorese in Verbindung mit Massenspektrometrie zur Analyse benutzt. Auf der Genexpressionsebene wurden Untersuchungen mit Lymphozyten durchgeführt, die ein Indiz gaben, dass bezüglich der Strahlenempfindlichkeit von Strukturproteinen gewisse Parallelen zu den zuvor benutzten Zellsystemen existierten. So z.B. untersuchten Kang et al. (2003) 2400 Gene in humanen Lymphozyten 12 Stunden nach einer applizierten γ -Dosis von 1 Gy und stellten eine Hochregulation des α -Actinins fest. Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Strukturprotein, dessen Funktion z.Zt. noch unklar ist. Jen und Cheung (2007) haben in 10 verschiedenen lymphoblastoiden Zelllinien nach 3 und 10 Gy, appliziert durch γ -Bestrahlung, eine bis zu 2,5-fache Genexpressionssteigerung von α -Actin-2 gegenüber unbestrahlten Kontrollen festgestellt. Diese Studie zeigte ebenfalls einen ähnlichen Trend wie den für die Strukturproteine Collagen-XIII- α 1, Lamin-B1 und Myosin-10.

Obwohl die Integrine den Strukturproteinen nicht unmittelbar zugeordnet werden können, so stellen sie doch eine Verbindung der intrazellulären Matrix mit der Umgebung der Zelle dar. Diese Interaktionen sind entscheidend für Überleben, Proliferation, Adhäsion und Migration der Zelle. Aufgrund des deutlichen Hinweises auf die Strahlenempfindlichkeit von Integrinen sollen hier zwei Vertreter dieser Proteinklasse erwähnt werden. Cordes et al. (2002) gelang es, die Zunahme der Proteinkonzentration von β 1-Integrin und ILK (Integrin Linked Kinase) 48 Stunden nach Applikation einer Dosis von 2 und 6 Gy in Lungenkarzinom-Zellen zu messen. Die Expression von Proteinen und das klonogene Überleben der Zellen wurden von der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Laminin, BSA oder Kunststoff)

stark beeinflusst, was weitreichende Konsequenzen für die individuelle Chemo- und Radiotherapie zur Folge haben kann.

1.4.4 Proteine nach oxidativen Stress

Wie in dem Kapitel 1.1 bereits erwähnt, entstehen durch Bestrahlung in den Zellen reaktive Sauerstoffradikale, die vor allem für DNA-Schädigungen verantwortlich sind. Eine der wichtigsten Proteinklassen, die über antioxidative Eigenschaften verfügen, sind Peroxiredoxine (PRDX). Sie sind in der Lage, Wasserstoffperoxid und Alkylhydroperoxide (z.B. Fettsäureperoxide) zu reduzieren. So fanden Zhang et al. (2003 und 2005) und Park et al. (2006) eine Zunahme von PRDX1 sowohl in Darmepithelzellen von Mäusen als auch in Leberzellen von Ratten wenige Stunden nach γ -Bestrahlung. Beide Autorengruppen stellten zusätzlich eine gewebespezifische Veränderung von PRDX6 nach γ -Bestrahlung fest. Park et al. (2006) untersuchten Leberzellen von Ratten und fanden eine Hochregulation des PRDX6 6 Stunden nach γ -Bestrahlung (Dosis 25 Gy). Zhang et al. (2003) beobachteten hingegen eine Abnahme der PRDX6-Konzentration in Darmepithelzellen 3 bzw. 72 Stunden nach γ -Exposition (9 Gy) von Mäusen. Die Abnahme konnte nicht erklärt werden. Chen et al. (2005b und 2005c) fanden eine um den Faktor 0,6 reduzierte Konzentration des PRDX5-Proteins in Makrophagen 24 Stunden nach γ -Bestrahlung (0,5 Gy) von Mäusen. Die Autoren haben in einer weiteren Studie eine 30 %-ige Abnahme des PRDX2 in Knochenmark-extrakten 24 Stunden nach Ende der Ganzkörperbestrahlung (4 Gy) zeigen können. Eine weitere Proteinklasse mit antioxidativen Eigenschaften sind die Proteine der Cytochrom-P450-Gruppe. Sie sind u.a. an Stoffwechselprozessen von Steroiden und Lipiden beteiligt. Park et al. (2006) identifizierten Cytochrom P450e-L in gesteigerter Konzentration 6 Stunden nach γ -Bestrahlung von Rattenleber (25 Gy).

1.4.5 Glycolyseproteine

Mehr als die allgemeine Strahlenempfindlichkeit des zellulären Metabolismus (Marchetti et al. 2006) erwiesen sich der Glycolyseprozess und dessen Enzyme als besonders strahlenempfindlich. So fanden Park et al. (2006) eine Erhöhung der Proteinkonzentration von PCK1 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-1) und FBP1 (Fructose-1,6-Bisphos-

phatase-1) in den hier bereits erwähnten Mäuseexperimenten. Zhang et al. (2003) bemerkten ebenfalls eine Zunahme der PGK2- (Phosphoglycerate Kinase-2) und ENO1- (Enolase) Enzyme. Allerdings wurden auch Konzentrationsabnahmen an Glycolyseenzymen nach γ -Bestrahlung gemessen. Lu et al. (2006) stellten eine Verringerung der ENO1- und ENO2-Konzentrationen 24 Stunden nach γ -Bestrahlung (7 Gy) der menschlichen Glioblastom-Zellen fest. Chen et al. (2005b) konnten mittels 2D-PAGE ebenfalls eine Abnahme der ADH- (Alcohol Dehydrogenase) Konzentration in Mäuse-Makrophagen nach γ -Exposition messen.

1.4.6 Proteomuntersuchungen

In den vergangenen Jahren wurden zunehmend Gesamtproteinuntersuchungen mittels 2D-PAGE durchgeführt, die verschiedene Ziele im Bereich der Strahlenforschung anstrebten. Der größte Teil der Untersuchungen beschäftigte sich mit der Aufklärung der zellulären Mechanismen, die nach γ -Bestrahlung aktiviert wurden. Eine der wenigen Untersuchungen, die gezielt nach Proteinbiomarkern suchten und die Hinweise auf die erhaltene Strahlungs-dosis liefern könnten, ist die Arbeit von Szkanderova et al. (2005). Die Tabelle 2 bietet eine Übersicht bisheriger Arbeiten auf diesem Gebiet.

Die Beurteilung strahleninduzierter Schäden im menschlichen Körper und der daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen setzen eine möglichst genaue Kenntnis der erhaltenen Strahlendosis voraus. So sollte die physikalische Dosimetrie durch die mehr individuelle biologische Dosimetrie ergänzt werden. Die bislang benutzten Bestimmungsmethoden bezogen sich auf biologische Endpunkte (u.a. Chromosomenaberrationen), die relativ zeitaufwendige Analysen von genetischen Veränderungen darstellten, unabhängig von der individuellen Strahlenempfindlichkeit. Das ergab für das einzelne Individuum eine relativ ungenaue Aussage, da der erforderliche Bezug zum unbestrahlten Normalfall nur auf einem Mittelwert beruhte, der aus vielen Einzelwerten unterschiedlicher Individuen resultierte. Neuere Protein- und Genexpressionsstudien bieten eine Alternative, diese Nachteile zu umgehen. Muster aus vielen verschiedenen strahlenempfindlichen Proteinkonzentrations- und Genexpressionsveränderungen lassen sich individueller dann anwenden, wenn die Strahlenempfindlichkeit jedes Menschen durch entsprechende Voruntersuchungen (z.B. *ex vivo* Aufnahme von Dosis-effekt-kurven) Berücksichtigung findet. Im Gegensatz zu umfang-

reichen Genexpressionsstudien (Amundson et al. 1999, Amundson et al. 2000, Kang et al. 2003, Amundson et al. 2004 und Dressman et al. 2007), die auf Lymphozyten basieren, stellen die bisherigen Proteinstudien keine entsprechenden Ergebnisse für Lymphozyten zur Verfügung. Die bislang gefundenen Biomarker wurden nicht auf Dosisabhängigkeit untersucht.

Autoren	Zelllinie / Organismus	Dosis (Gy)	Zeit (h) ^(a)	Anzahl Biomarker
Ma et al. 2007	QXMSC1 / Maus (<i>in-vitro</i>)	20	24	18
Ménard et al. 2006	Serum / Mensch (<i>in-vivo</i>)	48,6 *	2,5	82
Park et al. 2006	Leberzellen / Ratte (<i>in-vivo</i>)	25	6	45
Tapio et al. 2005	TK6 / Mensch (<i>in-vitro</i>)	1	0,25	6
Szkanderova et al. 2005	MOLT- 4 / Mensch (<i>in-vitro</i>)	7,5	2; 5; 12	14
Zhang et al. 2005	IEC- 6 / Ratte (<i>in-vitro</i>)	25	24	11
Chen et al. 2005a	Knochenmark / Maus (<i>in-vivo</i>)	4	24	9
Chen et al. 2005b	Makrophagen / Maus (<i>in-vivo</i>)	0,5	24	11
Zhang et al. 2003	Darm / Maus (<i>in-vivo</i>)	9	3; 72	19

Tabelle 2: Gesamtproteinuntersuchungen auf strahlenempfindliche Proteine – Übersicht der bisherigen Arbeiten

^(a) Anzahl der Stunden, die zwischen Bestrahlungs- und Analysenbeginn verstrichen sind.

* Im Durchschnitt erhaltene Gesamtdosis (nach entsprechender Fraktionierung) von 68 Patienten mit 18 verschiedenen Tumoren

Die zu lösende Problematik liegt in der Auswahl des geeigneten Betrachtungszeitrahmens nach der erlittenen Kontamination bzw. dem radioaktiven Unfall und der Anwendung geeigneter individueller Referenzdaten. Eine möglichst schnelle und genaue Auskunft über die erhaltene Strahlendosis ist vor allem aus medizinisch-therapeutischer Sicht erforderlich. Gegenüber einer größeren Gruppe von Strahlengeschädigten ist die Situation für ein kleines Kollektiv günstiger, da in diesem Falle schneller individuell diagnostiziert und ausgewertet werden kann. Für solch eine Zielgruppe, wie es z.B. Arbeiter in einem Kernkraftwerk oder

Angestellte in einem radioaktiven Kontrollbereich darstellen, ist es organisatorisch möglich, das Zeitfenster zwischen Unfall und Blutentnahme zu minimieren. Wenn dann die entsprechenden individuellen Referenzwerte in Form von Dosiseffektkurven verschiedener Early-Response-Marker den zu der verunfallten Risikogruppe gehörenden Person zur Verfügung stehen, wird es möglich sein, eine retrospektive Dosisbestimmung mit genügender Genauigkeit innerhalb eines Tages abzuschließen.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit möchte dazu beitragen, die oben erwähnte retrospektive Dosisermittlung durch geeignete Maßnahmen zu realisieren. Die hier aufgezeigten Untersuchungen stellen eine Möglichkeit dar, die im Kontaminationsfall aufgenommene Strahlendosis durch Vergleich mit individuell gespeicherten *ex-vivo*-Daten, bestehend aus einem Kontroll- und drei Bestrahlungswerten (Referenzkurve), zu bestimmen. Dabei werden die in den Lymphozyten enthaltenen strahlenempfindlichen Proteine und deren Konzentration elektrophoretisch gemessen. Zusätzlich zu dieser Proteinanalyse werden die entsprechenden genetischen Expressionsveränderungen mittels der Taq-Man™-RT-PCR Methode für Validierung der durch die Proteindaten erfolgten Aussagen bestimmt.

Detailliertes Ziel dieser Arbeit ist es, eine Gruppe besonders strahlenempfindlicher Proteine auszuwählen, die gemeinsam ein für das Individuum charakteristisches Proteinreferenzmuster im γ -Dosisbereich zwischen 0 und 4 Gy darstellen. Darüber hinaus wird hypothetisiert, auf der Basis von diesem Referenzmuster, bestehend aus möglichst wenigen aber hoch signifikanten γ -dosisabhängigen Proteinen, eine γ -Biodosimetrie zu kreieren, die vertrauenswürdige individuelle Dosisdaten innerhalb relativ kurzer Zeit nach Ende der ionisierenden Bestrahlung zur Verfügung stellt.

2 Material und Methoden

Die folgenden Versuche sollten dazu dienen, lymphozytäre Proteine einschließlich der phosphorhaltigen nach γ -Bestrahlung (Dosis: 1, 2 und 4 Gy) auf möglichst frühzeitige Strahlenreaktion zu überprüfen. Nach Bestrahlungsende erfolgte eine transportbedingte 15-minütige Inkubationszeit des peripheren Vollblutes.

Zur genauen analytischen Auflösung der lymphozytären Proteine wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese angewandt. Diesem Verfahren liegt eine Trennung der Proteine sowohl nach deren isoelektrischen (pI)-Wert als auch nach deren Molekularmasse zugrunde. Dafür war es notwendig, die Lymphozyten aus dem *ex-vivo* bestrahlten Vollblut zu isolieren und deren Proteine aufzureinigen. Danach wurden die Proteine auf einen IPG-Streifen (immobilisierter pH-Gradient) isoelektrisch fokussiert. Anschließend erfolgte die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Die so erhaltenen 2D-Gele wurden zuerst mit dem Phosphoprotein-spezifischen Farbstoff Pro-Q-Diamond™ (Invitrogen) und dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby™ (Invitrogen) gefärbt, um die gesamten Proteine darstellen zu können.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die von der Fa. Sigma-Aldrich hergestellten Reagenzien verwendet.

2.1 *In-vitro*-Bestrahlung menschlichen Vollbluts und Separation der Lymphozyten

In vier 15-mL-Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson) wurde je 4 mL Vollblut mit 40 μ L Heparin (Roche) versehen und davon drei in der ^{137}Cs - γ -Quelle (Atomic Energy Canada) für 1,25, 2,5 bzw. 5,0 min bei 37 °C bestrahlt (1, 2 bzw. 4 Gy). Die Inkubationszeit wurde ab Beendigung der Bestrahlung gerechnet und betrug jeweils 15 min. Anschließend erfolgte die Separation der Lymphozyten.

Kontroll- und bestrahlte Proben wurden je mit 4 mL Iscove's Medium (Biochrom) verdünnt, vorsichtig auf je 4 mL Ficoll Paque PLUS™ (Amersham) überschichtet und dann für 40 min bei 20 °C und 400 x g (Multifuge 1-R, Heraeus) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren waren 4 Schichten zu erkennen. Lymphozyten befanden sich in der mittleren

dünnen, weißlich-opaken Schicht. Zuerst wurde die obere rötliche Schicht entfernt. Die weiße Schicht, in der sich die Lymphozyten befanden, wurde vorsichtig mit einer 1000- μ L-Mikropipette aufgesaugt, in ein separates Röhrchen überführt und auf 4 mL mit Tris-Sucrose-Puffer (Sucrose 10 mmol/L und Tris-Base 250 mmol/L) aufgefüllt. Zwecks Reinigung wurde diese verdünnte Lymphozytenschicht nochmals auf 4 mL Ficoll Paque PLUS™ überschichtet und, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Erneut wurden die Lymphozyten aus der mittleren Schicht entnommen, in 4 ml Tris-Sucrose- Puffer suspendiert und für 10 min bei 20 °C und 400 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Tris-Sucrose-Puffer aufgenommen und deren Zellzahl und ihre Lebensfähigkeit mit dem CASY™ Counter (Schärfe System) gemessen (bimodale Größenverteilung zwischen 6,25 und 8,25 μ m). Nach der Zählung wurden die Lymphozyten per Zentrifugation (200 x g, 5 min) in ein Pellet überführt.

2.2 Trennung der lymphozytären Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese

2.2.1 Lyse der Lymphozyten

Das Pellet, bestehend aus ca. 3×10^6 Lymphozyten, wurde mit 1 mL Lysispuffer (30 mM Tris-HCl, 2 M Thioharnstoff, 7 M Harnstoff, 4 %-ige 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan sulfonat-Lösung (CHAPS), pH 8,0) und 20 μ L Proteaseinhibitor-Lösung versehen. Diese enthielt 1 Tablette Proteaseinhibitor (Fa. Roche), gelöst in 1 mL Lysispuffer. Zu dem Lysat wurde ebenfalls ein Phosphataseinhibitor in einer 1:100 Verdünnung gegeben (Inhibitor-Cocktail-II, Novagen). Gut suspendierte Lymphozyten wurden für 20 min auf Eis inkubiert, für 2 min im Ultraschallbad (Branson, Typ 2510: 100 W, 42 KHz) bei 4 °C behandelt, wodurch sich die Proteinausbeute verbesserte. Eine direkte Beschallung erfolgte nicht, da die Gefahr einer Zerkleinerung der DNA und somit einer Proteinkontamination bestand. Nach Zentrifugation von 16.000 x g bei 4 °C für 20 min (5415 R, Eppendorf) befanden sich die gelösten Proteine im Überstand. Schwerlösliche Membranproteine und DNA-Reste blieben im Pellet zurück. Da für folgende Schritte eine genaue Proteinbestimmung erforderlich war, kam der EZQ-Protein-Quantitation-Kit™ (Invitrogen) zum Einsatz, der auf der Anfärbung der zuvor auf einem Papierfilter aufgetragenen Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro-Ruby™ bestand.

2.2.2 Reinigung der lymphozytären Proteine

Von der Proteinfraktion wurden 130 µg mit dem 2D-Clean-Up-Kit™ (Amersham) behandelt, wobei Salze, Detergenzien und andere die Elektrophorese störende Agenzien aus der Probe entfernt wurden. Das Wesentliche dieser Aufreinigungsmethode bestand in der Proteinpräzipitation mit etwa 10 % Trichloressigsäure (TCA), verbunden mit einem Aceton-Waschschritt.

2.2.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Das vorliegende Pellet wurde mit 300 µL Rehydrierungspuffer (7 M Harnstoff, 2 %-ige CHAPS-Lsg., 0,5 % Ampholyte pH 3-10 (Invitrogen), 0,05 % Bromphenolblau und 20 mM 1,4-Dithio-DL-Threitol-Lsg. (DTT)) aufgenommen, in das Sample-Rehydration-Tray™ (Biorad) überführt und auf diese Proben jeweils 17 cm lange IPG-Streifen (pH 3-10, Biorad) gelegt. Die Streifen wurden mit ca. 3 mL Mineral Oil (Biorad) überschichtet und für 16 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Bei der anschließenden IEF (isoelektrische Fokussierung) war es notwendig, beide Pole des IEF-Focusing-Tray (Biorad) mit sog. Wicks (Biorad) zu bestücken und mit 8 µL dest. Wasser anzufeuchten. Danach wurden die IPG-Streifen aus dem Rehydration-Tray entnommen, zum Abtropfen des anhaftenden Öls für ca. 10 s senkrecht über dem Rehydration-Tray gehalten, in das IEF-Focussing-Tray überführt und mit je 3 mL frischem Mineralöl überschichtet. Die Fokussierung erfolgte bei 20 °C in einer PROTEAN-IEF-Cell (Biorad) unter folgenden Bedingungen: 20 min bei 250 V, 2,5 h bei 250 V bis 10.000 V (linearer Gradient) und abschließend bei 10.000 V bis zum Erreichen von 40.000 Vh. So konnte sich jedes Protein aufgrund seiner basischen und sauren Gruppen in dem bereits immobilisierten pH-Gradienten bis zu einem für das jeweilige Protein charakteristischen pI-Wert, wo dessen Gesamtladung gleich null war, bewegen.

2.2.4 SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach erfolgter IEF wurden die IPG-Streifen erneut in das Sample-Rehydration-Tray™ gelegt, mit Puffer 1 (50 mM DTT in 5 mL 1X NuPage LDS Sample-Buffer™ der Fa. Invitrogen) und anschließend mit Puffer 2 (125 mM Iodacetamid in 5 mL 1X NuPage LDS-

Sample-Buffer™) für je 15 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Während dieser Prozedur wurden die Schwefelbrücken (S-S) der Proteine mit dem Puffer 1 reduziert und die so entstandenen –SH-Gruppen mit dem Puffer 2 alkyliert, um die Schwefelbrücken, die für die Proteinfaltung u.a. verantwortlich sind, vor der weiteren Analyse zu maskieren (nähere Erläuterung s. 2.3.2).

Unmittelbar vor der SDS-PAGE wurden die IPG-Steifen im Tris-Glycin-Puffer (6,6 g Tris-Base, 28,8 g Glycin und 2,0 g SDS, gelöst in 2 L bidest. Wasser) gewaschen, auf die 12 %-Tris-HCl-Gele (40 mL 30%-ige Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lsg., 25 mL 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 1 mL 10%-ige SDS-Lsg., 500 µL 10%-ige Ammoniumpersulfat-Lsg., 50 µL TEMED und auf 100 mL Gesamtvolumen mit bidest. Wasser aufgefüllt) gelegt, mit 1 % Agaroselösung übergossen und der Elektrophorese unterworfen (19 °C, 16 mA/Gel für 30 min, gefolgt von 24 mA/Gel für ca. 5 h).

2.2.5 Färbung und Auswertung der 2D-Gele

Die Tris-HCl-Gele wurden zuerst über Nacht in dem Dodeca-Stainer™ (Biorad) fixiert (50 % Methanol und 10 % Essigsäure), dann mit Pro-Q-Diamond™-Farbstoff (Invitrogen) versetzt, der die Phosphoproteine färbte. Dieser Färbvorgang geschah in folgenden Schritten:

- i) 3 x 10 min Waschen mit dest. Wasser,
- ii) Färben in Pro-Q-Diamond-Lösung für 2 h,
- iii) anschließend 3 x 30 min Entfärben (Entfärbelösung: 50 mL 1M Natriumacetat-Lsg. (pH 4,0), 200 mL Acetonitril und 750 mL Wasser) und
- iv) erneutes Waschen der Gele für 2 x 5 min in Wasser.

Die so vorbereiteten Gele wurden in dem Fluoreszenzscanner FLA 5000™ (Fuji) mit dem grünen Laser (535 nm) und Filter (575 nm LP) analysiert. Zur Darstellung der Gesamtproteine wurden die Gele über Nacht in dem Dodeca-Stainer™ mit Sypro-Ruby™-Farbstoff (Invitrogen) gefärbt und mit 10 % Methanol und 7 % Essigsäure für 30 min gewaschen, bevor der zweite Abtastvorgang mit dem blauen Laser (473 nm) und dazugehörigem Filter (530 nm DP 20) erfolgte.

Die auf diese Weise erzeugten Bilder (Auflösung 100 μm) wurden mit der Software Delta-2D™ (Decodon) analysiert, und zwar in zwei Teilen: zuerst die Gesamtproteine und dann die Phosphoproteine. Hierfür war es notwendig, alle Gele innerhalb einer Auswertung zur Deckung zu bringen, so dass jeder Proteinspot seinem entsprechenden Spot auf den anderen Gelen zugeordnet werden konnte. Durch Überlagern der Gelbilder ergab sich ein sog. Fusionsbild, das alle Proteinspots beinhaltet. Im „Fusionsbild“ wurden alle Spots markiert und deren Umrisse mittels Software festgelegt. Als nächstes erfolgte die Übertragung dieser Umrisse auf alle im Analysenverfahren befindlichen Gele. Die Auswertung erfolgte densitometrisch, wobei jeder Spot automatisch in Bezug zur Gesamtintensität normalisiert wurde. Nur die Proteinspots, die eine signifikante Veränderung im Verhältnis zur Kontrolle zeigten, wurden für die weitere Auswertung herangezogen. Die Signifikanz war wie folgt festgelegt: Eine mehr als doppelte Zunahme ($>$ Faktor 2) der mindestens 2 von 3 bestrahlten Proben sowie ein Ergebnis, das $\geq 95\%$ (zweiseitiger, ungepaarter Student t-Test) Zuverlässigkeit für beide Proben ergab. Die Spots, die diese Voraussetzungen erfüllten, wurden mit der Delta- 2D™-Software markiert und die jeweiligen Positionen an das automatische Gelstanzsystem Proteiner-SPII™ (Bruker) weitergegeben. Dieser Roboter war in der Lage, die markierten Spots aus dem Gel mit hoher Präzision auszustanzen und in einer Mikrotiterplatte abzulegen. In den weiteren Schritten erfolgte die Identifizierung der ausgewählten Proteine.

2.3 Enzymatischer Aufschluss der Proteine und Identifizierung mit Nano-HPLC-MS/MS

Eines der genauesten Verfahren, unbekannte Proteine zu identifizieren, ist die massenspektrometrische Analyse (MS-Analyse). Da jedes Protein durch seine Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) charakterisiert ist, genügt die Kenntnis von 10-15 aufeinander folgenden Aminosäuren innerhalb eines Proteins, um eindeutig seine Identifizierung zu erreichen. Dieses ist dank spezieller Datenbanken möglich, die über Sequenzinformationen der Proteine vieler Spezies verfügen. Die am häufigsten angewandte Vorgehensweise ist die, die unbekannte Proteine mittels Enzyme (z.B. Trypsin) in die Peptide überführt, die mit einer Nano-HPLC (High-Precision-Liquid-Chromatography) separiert und mit dem MS analysiert werden. Da jedes Protein durch die Reaktion mit einem bestimmten Enzym ein typisches

Muster an Peptiden ergibt, kann schon ohne Kenntnis der genauen AS-Sequenz eine Identifizierung erreicht werden. Ferner können die Peptide in dem MS systematisch in Aminosäuren (AS) zerlegt werden (MS/MS-Analyse). Anhand der unterschiedlichen Massen der AS ist es möglich, die AS-Sequenz eines Peptids festzustellen.

2.3.1 Aufschluss der Proteine mit Trypsin

Die isolierten Gelstücke wurden zwecks enzymatischen Verdaus in den JANUS™-Pipettierroboter (Perkin Elmer) überführt, der mit speziell programmierten Pipettier- und Waschschritten die in den Gelstücken befindlichen Proteine in Peptide überführte. Es wurden ausschließlich Reagenzien verwendet, die sog. HPLC/MS- oder bessere Qualitäten besaßen. Das Programm enthielt für das Waschen und Entfärben der Gele folgende Schritte:

- i) 50 µL der Lösung A (50 mM Natriumbicarbonat) wurden auf die ausgestanzten Gelspots gegeben und für 30 min unter leichtem Schütteln (Teleshake, Inheco) inkubiert; danach wurde die Waschlösung verworfen.
- ii) Es wurden 50 µL Lösung B (25 µL 50 mM Natriumbicarbonat und 25 µL Acetonitril) hinzugefügt und wie unter i) verfahren.
- iii) Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µL Lösung C (100 % Acetonitril), die nach Inkubation von 10 min wieder entfernt wurde. Die verbliebenen Gelstücke wurden für 5 min in dem Concentrator™ (Modell 5301, Eppendorf) getrocknet. Die Schritte ii) und iii) wurden noch einmal wiederholt.
- iv) Zu den getrockneten Gelstücken wurden 50 µL Alkylierlösung (50 mM DTT) gegeben und für 1 h bei 60 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde danach verworfen und die Gelstücke mit Lösung A kurzzeitig gewaschen.
- v) Die Reduzierung der alkylierten Schwefelbrücken erfolgte mit 50 µL einer 100 mM Iodacetamid-Lösung für 30 min bei RT und in Dunkelheit.
- vi) Der Überstand wurde verworfen und die Schritte ii) und iii) zweimal wiederholt.

Obwohl die Proteine bereits vor der 2D-SDS-PAGE reduziert und alkyliert wurden, erfolgten die Schritte iv) – vi) erneut, da nur das vollständiges Aufbrechen der Schwefelbrücken eine einwandfreie MS-Identifizierung der Proteine über Datenbanken ermöglichte.

- vii) Zu den reduzierten und alkylierten Proben wurden je 10 μL Trypsin-Lösung (0,015 μg Trypsin (MS-Gold, Promega) in 9 μL Lösung A und 1 μL Acetonitril) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Gelstücke mit je 25 μL einer 25 mM Natriumbicarbonat-Lösung versetzt und verblieben über Nacht bei 37 °C. Danach wurden 25 μL Reinstwasser hinzugefügt, der Überstand entnommen und aufbewahrt.
- viii) Die Extraktion der in den Gelstücken befindlichen Peptide erfolgte durch die Zugabe von 50 μL einer Lösung, bestehend aus 20 % Acetonitril und 0,5 % wässriger Ameisensäure-Lösung, sowie durch 10-minütiges intensives Schütteln. Der Überstand wurde zu den in vii) aufbewahrten Überständen gegeben. Dieser Extraktionsschritt wurde insgesamt viermal wiederholt.
- ix) Etwa 250 μL des Überstands aus vii) und viii) wurden bis auf 20 μL in dem Concentrator™ (Eppendorf) eingeeengt und auf 40 μL mit Nano-HPLC-Laufmittel A (98 % Wasser, 2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure) aufgefüllt.

Der Überstand enthielt ein für das betreffende Protein peptidspezifisches Gemisch, das entscheidend für die Identifizierung des Proteins war.

2.3.2 Analyse der Proteine mittels Nano-HPLC-MS/MS

Die unter 2.4.1 vorbereiteten peptidhaltigen Proben wurden einzeln in die Nano-HPLC (Eksigent) injiziert (Probenschleife: 50 μL) und auf die C18-Vorsäule (300 μm x 1 mm, PepMap, Dionex) gebracht, um die Peptide zu entsalzen und andere störende Substanzen (z.B. Chemikalienreste aus dem enzymatischen Verdau) zu entfernen. Diese Reinigung erfolgte für 5 min mit dem Laufmittel A (s.o. Punkt ix) bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Danach wurden die Proben über einen Gradienten, bestehend aus Laufmitteln B (95 % Wasser, 4,9 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure) und C (95 % Acetonitril, 4,9 % Wasser und 0,1 % Ameisensäure), in einer C18- Trennsäule (75 μm x 150 mm, PepMap, Dionex) mit einer Flussrate von 200 nL/min direkt in das MS injiziert. Der Gradient blieb für insgesamt 45 min konstant. Seine Anfangskonzentration an B betrug 100 % und seine Endkonzentration 60 %. Abschließend wurde die Säule für 5 min mit 90 % Laufmittel C gereinigt und dann für

10 min mit 90 % Laufmittel B für den nächsten HPLC-Lauf konditioniert. Die Probe wurde über eine spezielle Nadel (360-25-15, New Objectives), die unter 2000 V Spannung stand, in das MS hinein gesprüht.

Das für diese Arbeit verwendete MS-Gerät QTrap-2000™ (Applied Biosystems) ist ein ESI- (Electro Spray Ionisation) Triple-Quadrupol-System. Dem MS-Analysator liegt ein Quadrupol zugrunde, das durch geeignete Spannung nur Peptide mit einer bestimmten Masse zu dem Detektor durchlässt. In diesem Triple-Quadrupol-System befinden sich drei Quadrupole (Q1-Q3), die folgende Funktionen in der angegebenen Reihenfolge repräsentieren:

- i) Q1 zur Selektion eines Peptids mit bestimmter Masse,
- ii) Q2 als eine sog. „Stoßzelle“, die durch Einführen von N₂ das von Q1 selektierte Peptid in dessen Aminosäuren fragmentiert und
- iii) Q3 als Analysator für die molekulare Masse dieser AS-Fragmente.

Dieser Vorgang wurde durch Benutzung des IDA (Information Dependent Data Acquisition) Modus automatisiert, wodurch dem MS innerhalb eines HPLC-Laufes zyklische Operationen einschließlich oben beschriebener Messungen ermöglicht wurden. Da Peptide von der HPLC nur zwischen der 15. und 45. Minute eluierten, war es erforderlich, sowohl die Fragmentierung als auch die Massenbestimmung der Peptide und deren Fragmente in diesem Zeitrahmen durchzuführen.

Folgende Einstellungen wurden am MS vorgenommen:

- i) Alle 4 s sollten im EMS (Enhanced Mass Scann)-Modus nur die 3 intensivsten Peaks oberhalb einer Intensität von 50000 (relative Einheiten) berücksichtigt und
- ii) deren genaue Masse im ER (Enhanced Resolution)-Modus bestimmt und anschließend die Peptide im MS/MS-Modus fragmentiert werden.

Die so erzeugten MS/MS-Peptidmassenspektren wurden zwecks Identifizierung in die MASCOT (Matrix Science) Datenbank eingespeist (Einstellungen: Spezies-*Homo sapiens*; MS-Toleranz $\pm 0,5$ Da; MS/MS-Toleranz $\pm 0,3$ Da; Ladung 2+, 3+).

2.4 Überprüfung der gelelektrophoretisch analysierten Proteine durch Bestimmung der Genexpressionsveränderungen

Vier von elf der mit dem MS identifizierten Proteine, die deutliche Konzentrationsunterschiede mit der 2D-SDS-PAGE ergaben, wurden mittels TaqMan™-RT-qPCR (Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction) auf die eventuellen Genexpressionsveränderungen überprüft. Diese Untersuchungen waren insofern notwendig, als auf diese Weise die Konzentrationsveränderungen der Proteine bestätigt werden konnten. Zusätzlich wurden auch diejenigen Gene mit der RT-qPCR-Methode analysiert, die im engen biologischen Zusammenhang mit den gefundenen ERPRO standen. Hinweise auf solche Zusammenhänge kamen aus umfangreichen Genexpressionsuntersuchungen, die mittels DNA-Microarray-Methode von humanen Lymphozyten nach γ -Bestrahlung durchgeführt worden sind. Diese DNA-Microarray-Methode und die dazugehörige Ergebnisse wurden in dieser Arbeit nicht beschrieben und erwähnt (Turtoi et al. 2008).

Um Genexpression messen zu können, war es notwendig, mRNA aus den Lymphozyten zu isolieren und in cDNA zu überführen. Die mRNA ist zu etwa 3 % in der gesamten RNA vertreten und wurde mit der gesamten RNA mittels Reverse Transkriptase in cDNA (*in-vitro*) umgeschrieben. Die Poly-A-Sequenz, die am 3' Ende des mRNA-Stranges vorhanden war, diente als spezifischer Ausgangspunkt für die Bindung eines oligo-dT Primers, um die mRNA gezielt in cDNA zu überführen. Zusätzlich wurden auch die sog. Random-Hexamere benutzt, die unspezifisch an der gesamten RNA binden und somit für erhöhte Ausbeute und Umschreibung der gesamten mRNA-Sequenz sorgten. Somit wurden nicht nur mRNA, sondern auch andere RNA-Sequenzen in die cDNA umgeschrieben. Die Überführung der RNA in die cDNA war für die Konservierung des RNA-Gehaltes wichtig, da die cDNA eine erhöhte Stabilität gegenüber der RNase-empfindlichen RNA besaß.

2.4.1 Isolierung der mRNA aus Lymphozyten

Nach Bestrahlung der Lymphozyten und deren Präparation aus dem Vollblut (s. 2.1) erfolgte die Isolierung der gesamten RNA aus Lymphozyten durch selektive Extraktion mit Phenol/Guanidinisothiocyanat-Lösung (TRIzol™-Reagenz, Invitrogen). Die Vorversuche

zeigten, dass diese Methode gegenüber der selektiven Bindung der RNA an Silica-Material die höhere Ausbeute mit besserer Reinheit erzielte.

Folgende Schritte wurden zur Isolierung der RNA durchgeführt:

- i) Zu dem lymphozytären Pellet wurde 1 mL TRIzol-Reagenz hinzugegeben und wiederholt resuspendiert.
- ii) Nach anschließender Zentrifugation (12.000 x g) für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand separiert.
- iii) Dieser Überstand wurde für 5 min bei RT belassen, danach mit 200 µL Chloroform versetzt und für 15 s energisch geschüttelt (Vortex, IKA), bevor die Probe für 3 min bei RT inkubierte.
- iv) Als nächstes erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g, wonach sich die Lösung in eine untere rote Chloroformphase, eine Interphase und eine farblose wässrige obere Phase teilte. Die RNA befand sich in der wässrigen Phase, während sich Proteine und DNA in den darunter liegenden Phasen sammelten.
- v) Die wässrige Phase wurde mit 500 µL Isopropanol gemischt und geschüttelt (Vortex). Nach 10 min Inkubationszeit bei RT und Zentrifugation (10 min und 12.000 x g bei 4 °C) bildete die RNA am Boden des Zentrifugengefäßes ein gelähnliches Pellet.
- vi) Dieses RNA-Pellet wurde mit 2 mL 75%-igem Ethanol gewaschen und nach heftigem Schütteln (Vortex) für 5 min bei 4 °C zentrifugiert (7.500 x g). Ethanol wurde entfernt und die Probe für 3 min bei RT an der Luft getrocknet.
- vii) Die getrocknete RNA-Probe wurde in 50 µL Reinstwasser aufgenommen und für 10 min auf 60 °C erhitzt.
- viii) In 1,2 µL der in vii) erhaltenen Lösung wurden mittels des NanoDrop™-Photometers (PerqLab) die Konzentration und die Reinheit der RNA bei 260/280

nm (Proteinkontamination) bzw. 260/230 nm (Zuckerkontamination) gemessen. Beide Quotienten mussten einen Wert von 2.0 ± 0.1 aufweisen, um als „kontaminationsfrei“ für weitere Versuche berücksichtigt zu werden.

- ix) Anschließend wurde die Qualität der RNA mittels Bioanalyzer™ (Agilent Technologies) im Detail überprüft, wobei die RNA-Elektrophorese die 18s- und 28s-Peaks der rRNA deutlich zu erkennen gab. Aus dem Verhältnis und Form beider Peaks konnte mit besonderen Algorithmen (Agilent) der RIN-Wert (RNA Integrity Number) errechnet werden. Jeweils 1 µL der Proben wurden auf den RNA-6000-NanoChip™ (Agilent) gegeben und der Elektrophorese unterworfen. Die Qualitätskontrolle erfolgte anhand der RIN-Skala, die von 1 bis 10 verlief, wobei der Wert von 1 eine komplett degradierte und der von 10 eine intakte RNA bedeutete. Nur RNA-Proben mit einem Wert von mindestens 8,5 wurden für die Synthese von cDNA verwendet.

2.4.2 Synthese von cDNA aus mRNA

Die Synthese der cDNA aus mRNA war erforderlich, um die mRNA aus der gesamten RNA zu isolieren und zu konservieren. Dafür wurde der High-Capacity-cDNA-Archive-Kit™ (Applied Biosystems) benutzt, der alle Primer, Oligonukleotide und die Reverse Transkriptase, die für die cDNA-Herstellung notwendig war, beinhaltete. Aus den Einzelkomponenten des Kits wurde ein Gemisch (sog. Mastermix) hergestellt, das für alle Proben verwendet wurde.

Zusammensetzung von 100 µL des „Mastermix“:

20 µL 10 X RT-Puffer

8 µL dNTP-Mix

10 µL Reverse Transkriptase – MultiScribe (50 U/µL)

20 µL 10 X Random Hexamers

42 µL Wasser

Von der extrahierten RNA wurden jeweils 5 µg entnommen, mit Reinstwasser auf 50 µL verdünnt, 50 µL des cDNA-Mastermix hinzugegeben, geschüttelt (Vortex) und zur Entfernung der gebildeten Blasen kurz zentrifugiert. Anschließend wurden alle Proben für 10 min bei RT und unmittelbar danach für 2 h bei 37 °C inkubiert. Bis zu ihrem Einsatz in der Real-Time-PCR (Polymerase Chain Reaktion) erfolgte die Lagerung der Proben bei -80 °C.

2.4.3 Taq Man™ Genexpressionsanalysen und Real-Time-PCR

Die Genexpressionsuntersuchungen wurden mittels TaqMan™-Sonden (Applied Biosystems) durchgeführt. Für jedes zu untersuchende Gen wurde eine entsprechende Sonde eingesetzt, die selektiv an die cDNA des Transkripts dieses Gens band und so während der PCR ein Signal, proportional zum Produkt, erzeugte. Die TaqMan™-Sonde enthielt an einem ihrer Enden ein Fluorochrom, das für das Signal verantwortlich war, während sich am anderen Ende ein sog. Quencher-Farbstoff befand. Eine intakte TaqMan™-Sonde fluoresziert nach entsprechender Anregung nicht, da die Emissionen des Fluorochroms und Quencher-Farbstoffs sich gegenseitig aufheben. Bindet dagegen eine TaqMan™-Sonde an einem cDNA-Target und wird durch die DNA-Polymerase während der PCR abgebaut, so werden das Fluorochrom und der Quencher-Farbstoff getrennt, und das Signal wird erzeugt. Folgende vier Gene wurden mit entsprechenden Sonden untersucht: β-Actin, Phosphoglyceratkinase-1 (PGK1), Talin-2 und Annexin-A6. Weitere sieben Gene wurden aufgrund ihrer biologischen Zusammenhänge mit den gefundenen ERPRO ebenfalls mit TaqMan™-Sonden untersucht: Rho-family GTPase 1 (RND1), CDKN1A, Dual Specificity Phosphatase 8 (DUSP8), Occludin (OCLN), Interferon-γ (IFNG), Interferon-Stimulated Exonuclease Gene 20kDa – like 1 (ISG20L1) und Serine Hydrolase-like 2 (SERHL2). Die genauen Bezeichnungen der TaqMan™-Sonden sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Für die hier aufgezeigten Untersuchungen wurden je Gen 10 ng der gesamten vorhandenen cDNA verwendet. Die Analyse wurde auf dem AB7500 RT-PCR-Gerät (Applied Biosystems) in speziellen PCR-Platten mit folgenden Reagenzien pro Reaktion durchgeführt: 5 µL (10 ng) cDNA, 10 µL TaqMan™-RT-PCR-Mastermix (AB, Nr.: 4324018) und 5 µL Reinstwasser. Nachdem die Platte mit einer optischen Folie versiegelt und kurzzeitig zwecks Blasenentfernung bei 300 x g zentrifugiert worden war, wurden die Proben in dem AB7500 RT-PCR-Gerät nachstehenden Bedingungen unterzogen: i) 10-

minütige Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C, gefolgt von ii) 15 s Inkubation bei 95 °C (Denaturierung der DNA) und von iii) 1 min bei 60 °C (Elongation des DNA-Fragmentes). Die Schritte ii) und iii) wurden 50-mal innerhalb eines PCR-Laufes wiederholt.

Die Auswertung erfolgte mit der SDS-Software 1.3 (Applied Biosystems), wobei das von der TaqMan™-Sonde ausgelöste Signal in Bezug zur passiven Farbstoffreferenz (ROX) korrigiert und in Relation zur endogenen Kontrolle gestellt wurde. Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA, die mit der zugehörigen TaqMan™-Sonde Hs99999901_s1 (AB) detektiert wurde. Deren Genexpression änderte sich durch die γ -Bestrahlung nicht. Auf diese Weise normalisierte Signalwerte konnten nun auf deren γ -Dosisabhängigkeit untersucht werden.

Gen	Nr. der TaqMan™-Sonde
Annexin-A6	Hs00241765_m1
β -Actin	Hs99999903_m1
CDKN1A	Hs00355782_m1
DUSP8	Hs01014943_m1
IFNG	Hs00174143_m1
ISG20L1	Hs00224322_m1
OCLN	Hs00170162_m1
PGK1	Hs99999906_m1
RND1	Hs01109197_m1
SERHL2	Hs00538270_m1
Talin-2	Hs00322257_m1

Tabelle 3: Bezeichnungen der TaqMan™-Sonden (AB), die in den Genexpressionsuntersuchungen mittels RT-qPCR verwendet worden sind. Für genaue Angaben zur jeweiligen Gen-Splice-Variante und den zugehörigen cDNA-Sequenzen siehe: www.appliedbiosystems.com.

3 Ergebnisse

Unter Verwendung der Ficoll Paque™ -Lösung und der Gradientenzentrifugation war es möglich, Lymphozyten mit einer Reinheit von über 90 % zu isolieren (siehe Abb. 3). Die geringfügigen Kontaminationen waren hauptsächlich durch Lymphozytenbruchstücke und Thrombozyten verursacht, die sich nur sehr schwer von intakten Lymphozyten trennen ließen. Obwohl eine möglichst zügige Isolation der Lymphozyten aus den Blutproben angestrebt wurde, war eine 2-stündige Separation unumgänglich. Während dieser Zeit waren zelluläre metabolische Abläufe nicht stillgelegt; dieses geschah erst nach der Lymphozytenisolation und der Zugabe von Lysispuffer. Dieser relativ begrenzte Zeitrahmen sollte bei der Betrachtung der nachstehenden Ergebnisse berücksichtigt werden.

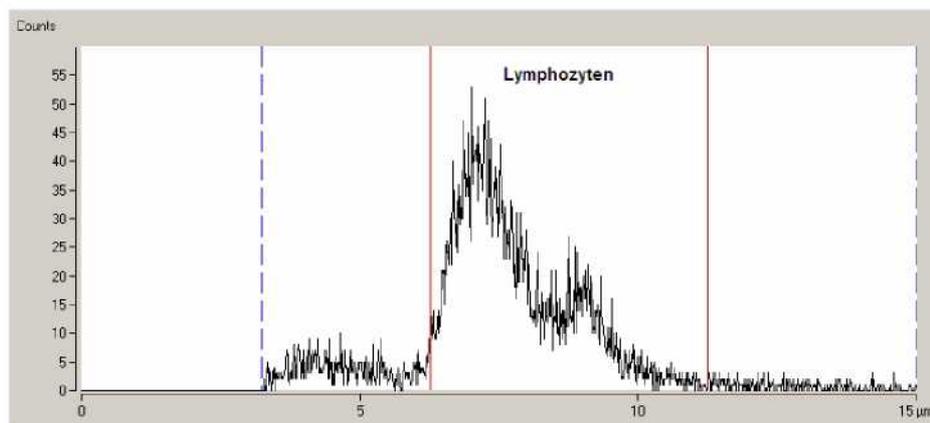


Abb. 3: Größenverteilung der isolierten Lymphozyten, gemessen mit dem CASY®-Counter; die Lymphozytenfraktion war durch zwei Hauptpeaks, die zwischen 6 und 10 µm im Durchmesser lagen, charakterisiert.

Der Subpeak, der sich zwischen 4 und 5 µm befand, beinhaltete geschädigte Lymphozyten sowie Zellbruchstücke. Thrombozyten ergaben je nach Fraktionsreinheit Signale, die um 2,5 µm lagen.

3.1 Analyse strahlenempfindlicher lymphozytärer Proteine

Isolierte Lymphozyten wurden zunächst lysiert, um die Gesamtproteine extrahieren zu können. Die Zugabe von Proteasen- und Phosphataseinhibitoren schützte die Proteine vor Degradation und Dephosphorylierung. Die Behandlung des Lysats im Ultraschallbad erbrachte eine bis zu 50 % erhöhte Proteinausbeute. Das Zell-Lysat wurde nach der indirekten Beschallung zentrifugiert, wobei sich ein winziges Pellet am Boden des Gefäßes ansammelte. Dieses setzte sich aus Lipidmembran- und Proteinbestandteilen zusammen. Die Proteinbestimmung im Überstand erfolgte mittels EZQ-Protein-Quantitation-Kit™, da sich der hier benutzte Lysispuffer als ungeeignet für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) herausstellte. Die Proteinreinigung wurde mit dem 2D-Clean-Up-Kit™ durchgeführt, wobei v.a. die für die IEF störenden Salzen entfernt wurden. Obwohl es sich bei dieser Reinigungsmethode um eine TCA-Fällung der Proteine handelte, ermöglichten erst zusätzliche Komponenten des Kits (Amersham) eine verbesserte Löslichkeit des aufgereinigten Proteinpellets, verglichen mit der herkömmlichen TCA / Aceton-Proteinfällung. Das lag vor allem an einer milden Neutralisierung des Pellets, das nach der Fällung einen niedrigen pH-Wert ergab. Ähnliche Ergebnisse, wie die mit dem 2D-Clean-Up-Kit™ erzielten, erreichte man durch Zugabe von 10 µL 25 mM NaOH-Lösung zu dem mit 10 % TCA gefällten Pellet. Höhere Konzentrationen an NaOH führten teilweise zur Hydrolyse der Peptidbindung der Proteine. Dieses wurde anhand von separaten MS-Untersuchungen bestätigt. Nach der Reinigung der löslichen Proteinfraktion wurden die Proteine mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Insgesamt wurden 12 Gele vorbereitet, die mit jeweils 3 biologischen Replikaten von je drei Bestrahlungs- und einer Kontrollprobe beschickt wurden. Die biologischen Replikate stammten von Blutproben, die von ein und demselben Individuum an drei verschiedenen Tagen entnommen und bestrahlt worden waren.

Als erstes wurden die Phosphoproteine in dem 2D-Gel mit dem Pro-Q-Diamond™ Farbstoff angefärbt und mit dem FLA5000-Scanner abgebildet. Horizontal wurden die Proteine nach ihrem pI-Wert und vertikal nach ihrer Molmasse (kDa) getrennt. Die Abb. 4 zeigt zwei Beispiele der angefärbten Gele und der darin enthaltenen Phosphoproteine;

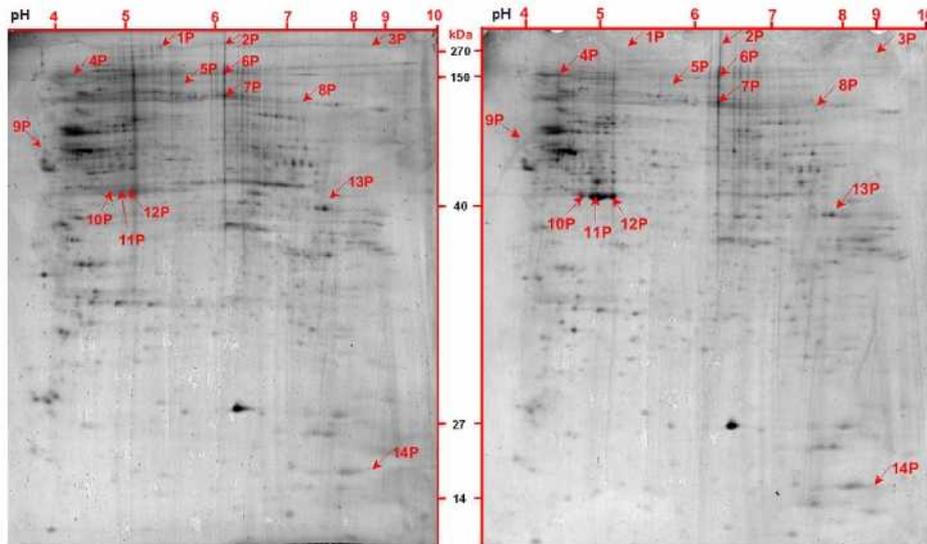


Abb. 4: Lymphozytäre Phosphoproteine, aufgetrennt in einem 12 %-igen 2D-PAGE-Gel mit pH-Bereich 3-10: Links befindet sich die unbestrahlte Kontrolle und rechts die bestrahlte Probe (2 Gy). 1P-14P deuten auf die Proteinspots, die eine mindestens 2-fache Konzentrationsänderung in der bestrahlten Probe gegenüber der unbestrahlten Kontrolle zeigten ($P \leq 0,05$).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Färbemethode mittels Pro-Q-Diamond™ einen ausgeprägten Hintergrund erzeugte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Gele unmittelbar vor dem Scannen gründlich mit Reinstwasser gewaschen. Nachdem die Gele gescannt worden waren, wurden sie zur Anfärbung der Gesamtproteine mit Sypro-Ruby™ über Nacht gefärbt, da dieser Farbstoff wenig Hintergrund erzeugt und sehr proteinspezifisch reagierte. Eine Entfärbung der zuvor mit Pro-Q-Diamond™ gefärbten Gele war nicht notwendig. In Abb. 5 sind zwei 2D-PAGE-Gele dargestellt, und zwar die Gesamtproteine der unbestrahlten (links) und bestrahlten (rechts) Lymphozyten.

Die erzeugten Gelbilder wurden separat (Gesamt- und Phosphoproteine) mit der Delta-2D®-Software analysiert. Alle Gele wurden auf die jeweilige Gesamtintensität normalisiert und mit Gelen, die dem gleichen elektrophoretischen Lauf angehörten, zur Deckung gebracht. Für die Auswertung erzeugte die Software ein sog. Fusionsgel, das sich aus allen zu analysierenden Gelen zusammensetzte.

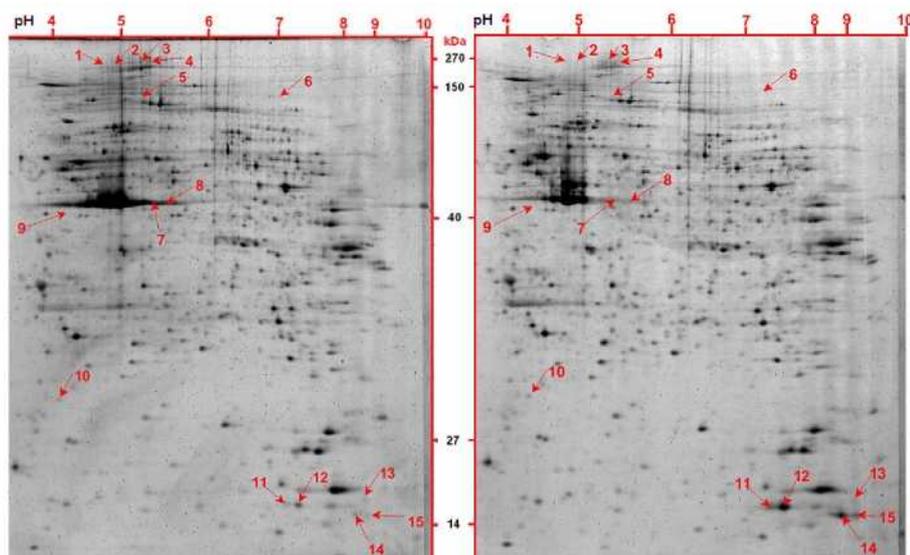


Abb. 5: Lymphozytäre Gesamtproteine, elektrophoretisch aufgetrennt in einem 12 %-igen 2D-PAGE-Gel (pH 3-10): Unbestrahlte Kontrolle links, bestrahlte Probe (2 Gy) rechts. Nr. 1-15 weisen auf die Proteinspots hin, die eine mindestens 2-fache Konzentrationsänderung in der bestrahlten gegenüber der unbestrahlten Kontrolle aufwiesen ($P \leq 0,05$).

So wurde jeder Proteinspot, der auf mindestens einem Gel vorhanden war, entsprechend seiner Intensität auf dem Fusionsbild dargestellt. In dem Fusionsbild wurden Spotumrisse definiert und die durch Anfärben verursachten Artefakte von weiterer Auswertung ausgeschlossen. Die Artefakte unterschieden sich von den eigentlichen Proteinspots insofern, als sie hauptsächlich in Randbereichen und in Zonen mit hohem Hintergrund zu finden waren. Die Spotumrisse wurden nun auf alle Gelbilder übertragen und densitometrisch ausgewertet. In dem letzten Schritt wurde aus den optischen Intensitäten der bestrahlten und nicht-bestrahlten Proben ein relatives Verhältnis gebildet (bestrahlt / nicht-bestrahlt). Dieses Verhältnis wurde in der weiteren Auswertung als „relative Proteinkonzentration“ (RP) bezeichnet. Nur die Proteinspots, die in mindestens 2 von 3 bestrahlten Proben sowohl einen RP-Wert ≥ 2 oder $\leq 0,5$ als auch einen P-Wert $\leq 0,05$ (Student's t-Test, zweiseitig, ungepaart mit gleich hoher Varianz) hatten, wurden für die nachfolgende MS-Proteinidentifikation berücksichtigt.

Betrachtet man nun die RP von 2 Gy-Proben mit den unbestrahlten Kontrollen, so ergibt sich ein entsprechendes 2D-Phosphoproteinmuster der oben aufgeführten Signifikanz. In Abb. 4 sind die zugehörigen Phosphoproteinspots wiedergegeben. Von den 14 Spots zeigten 12 einen Anstieg in der relativen Proteinkonzentration (RP = 2 – 62) und nur 2 (Spot Nr. 1 und 13) einen Abfall (RP = 0,3). In Abb. 5 sind 15 Spots im pH-Bereich 3-10 gekennzeichnet, die signifikante strahleninduzierte Änderungen aufwiesen. Die mit 1 - 9 nummerierten Spots zeigen einen Abfall in der Proteinkonzentration (RP = 0,1 – 0,5) und die mit 10 - 15 einen Anstieg (RP = 2,8 – 9,6). Im nachstehenden Kapitel werden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse dieser Spots dargestellt. Identifizierte Proteine sowie deren zugehörigen RP-Werte sind in Tabelle 4 (s. S. 51) zusammengefasst. Die Einzeldaten einschließlich der P-Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt (Anhang, s. S. 93).

3.2 Massenspektrometrische Identifizierung strahlenempfindlicher Proteine

Um genügend Proteinmaterial für eine vertrauenswürdige MS-Identifizierung der Proteinspots zur Verfügung zu haben, wurden die präparativen 2D-PAGE-Gele mit je 300 – 500 µg Proteinlysate beladen, mit Pro-Q-Diamond® und Sypro-Ruby® gefärbt, mit Delta 2D-Software® deckungsgleich zu den analytischen Gelen gebracht und die entsprechenden Spotkoordinaten dem Spot-Picker (Proteiner SP II®, Bruker) übermittelt. Die ausgewählten Spots wurden aus den Gelen herausgestanzt, tryptisch verdaut und über Nano-HPLC mit Qtrap 2000®-MS analysiert.

Der entscheidende Schritt bei der Protein-MS-Analytik war die enzymatische Überführung der Proteine in Peptidbruchstücke unter optimierten Bedingungen. In dieser Arbeit wurde das Enzym Trypsin zur Verdauung der Proteine eingesetzt. Während der Durchführung der Versuche wurde deutlich, dass die Gelstücke idealerweise nur 30 min mit der Enzymlösung bei RT reagieren sollten. Danach wurde die Lösung entfernt, und die Übernacht-Inkubation bei 37 °C erfolgte nur durch die von den Gelstücken absorbierte Enzymlösung. Mehr Enzymlösung führte zur Erzeugung unspezifischer Fragmente, die von der Protein-Datenbank (SwissProt®) nicht identifiziert und zugeordnet werden konnten. Als weiterer wichtiger Faktor stellte sich die Berücksichtigung der Hydrophobizität des zu verdauenden Proteins heraus. Während hydrophile Proteine in der wässrigen Bicarbonat-Lösung eher entfaltet vorliegen, falten sich die hydrophoben Proteine stark zusammen.

Dieses machte sich an der Effizienz des Enzyms bemerkbar, da der Zugang zu den vorgesehenen Enzym-Schneidestellen im Falle des hydrophoben Proteins wesentlich vermindert war. Um diesem Effekt entgegen zu wirken, wurde die Enzymlösung nicht in reinem Bicarbonatpuffer hergestellt, sondern mit etwa 10 % Acetonitril zusätzlich versetzt, was zu einer größeren Empfindlichkeit der MS-Analyse führte. Dieser Effekt wurde ebenfalls bei der Peptidextraktion aus der Gelmatrix bemerkt. Deshalb wurde die Extraktionslösung zu 20 % mit Acetonitril versetzt. Die Extraktion der Peptidbruchstücke aus dem Gelspots wurde durch Ultraschallbehandlung im Wasserbad effizienter. Nach der Peptidextraktion erfolgte eine Volumenreduzierung der peptidhaltigen Proben auf etwa 10 μ L, bevor die eigentliche Nano-HPLC-MS Analyse zur Anwendung kam.

Wie zuvor erwähnt, diente die Nano-HPLC einer Trennung der Peptide mit der C-18 Säule. Der HPLC-Lauf beinhaltete zwei Schritte. In dem ersten Schritt wurden die Peptidproben über eine 5 mm C-18-Vorsäule mit 40 – 80 μ L einer wässrigen Acetonitril-Lösung (2 % Acetonitril u. 0.5% Ameisensäure) entsalzt. Die Zugabe des Acetonitrils verhinderte einen signifikanten Verlust der hydrophilen Peptide, der sich ohne Acetonitril bemerkbar machte. Der zweite Schritt ist der eigentlich analytische, der die entsalzten Peptide mittels eine 150 mm langen C-18-Säule und einem Wasser / Acetonitril-Gradienten (pH ~ 2) trennte. Mit dem Peptideluat wurde nun das Massenspektrometer beschickt. Abb. 6 präsentiert ein Beispiel des erzeugten Chromatogramms für den Spot 13P (Abb. 4).

Das Massenspektrometer erstellte während eines HPLC-Laufes etwa alle 4 Sekunden ein Übersichtsspektrum. Dieses beinhaltete alle zum gegebenen Zeitpunkt ankommenden Peptide und deren genaue Molmassen. So z.B. ergab der in Abb. 6 markierte Peak (Retentionszeit 29,58 min) ein MS-Spektrum, das in Abb. 7 dargestellt ist. In der Regel besteht ein chromatographischer Peak aus einem Peptid. Allerdings werden infolge der Empfindlichkeit des MS-Gerätes in einem Spektrum teilweise auch die zuvor eluierten Peptide detektiert. Das ist an dem vorhandenen Beispiel (Abb. 7) ersichtlich, wo mehrere Signale neben einem prominenten Peak erkennbar sind.

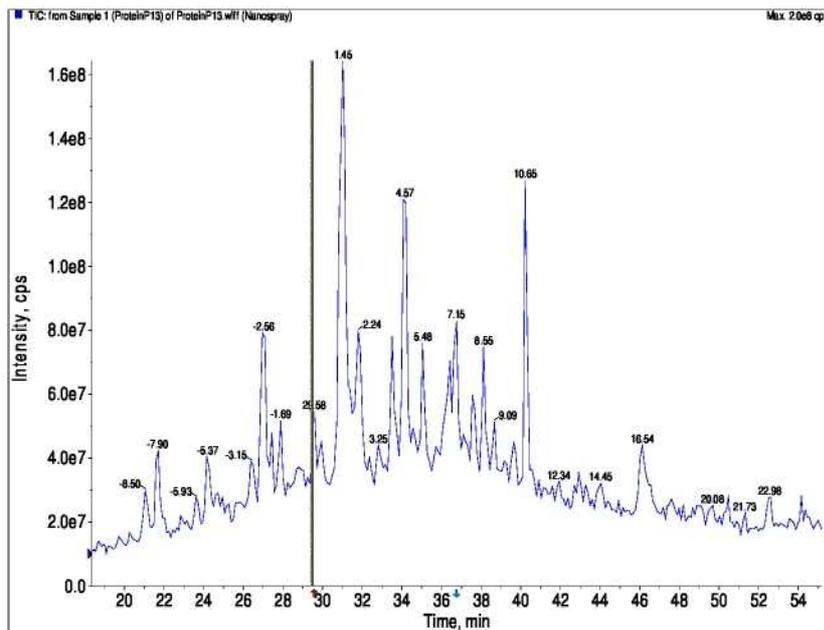


Abb. 6: Das Nano-HPLC-Chromatogramm des Proteinspots 13P aus Abb. 4, erfasst mit dem Massenspektrometer QTrap 2000® (AB) und ausgewertet mit Analyst-1.4® Software (AB). Die Ordinate repräsentiert die relative Intensität, während die Abszisse die Zeit (min) darstellt. Einzelne Peaks sind mit der jeweiligen genauen Retentionszeit gekennzeichnet.

Eine größere Komplexität des Spektrums wurde zusätzlich durch mehrfach geladene Peptide verursacht. Da die Abszisse in dem MS-Spektrum ein Masse / Ladungsverhältnis darstellt (m/z), haben z.B. die doppelt geladenen Peptide nur einen halb so großes m/z -Verhältnis im Gegensatz zum einfach geladenen. So stellte der Peak mit dem m/z -Verhältnis 566,5 (siehe Abb. 7) ein zweifach geladenes Peptid dar, dessen tatsächliche Masse etwa 1133 Da betrug. Die genaue Ladung des Peptids wurde anhand des Isotopenverteilungsmusters (Abb. 8) in einem gesonderten „Enhanced-Resolution“-Spektrum festgestellt.

Die vier Peaks in dem Spektrum (Abb. 8) repräsentieren das Peptid, das 0, 1, 2 bzw. 3 ^{13}C -Atome beinhaltet. Die relative Intensität, die auf der Ordinate dargestellt ist, deutet auf die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von ^{13}C im Gesamtmolekül hin. Der Unterschied zwischen 2 Isotopenpeaks muss demzufolge 1 Da ergeben (Unterschied von ^{12}C zu ^{13}C).

Allerdings beträgt der Massenshift in der Abb. 8 nur 0,5 Da, was auf eine 2-fache Ladung des Peptids hindeutet.

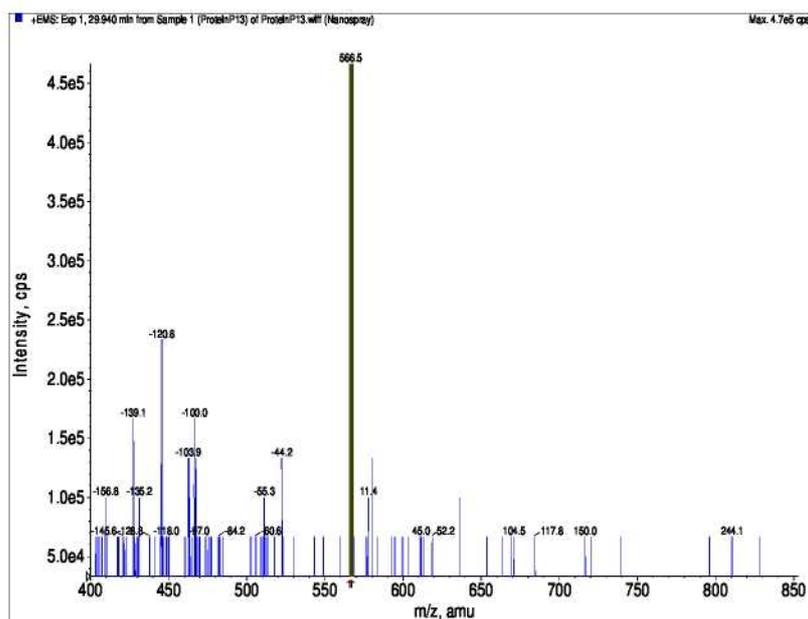


Abb. 7: MS-Spektrum des in Chromatogramm (Abb. 6) markierten Bereichs; auf der Abszisse ist das Masse / Ladungsverhältnis (m/z) und amu (Atomic Mass Unit) abgebildet.

Die vorhandenen Informationen reichten für eine eindeutige Proteinzuzuordnung des in Abb. 7 und 8 dargestellten Peptids nicht aus. Deshalb wurden aus dem Peptid sogenannte MS/MS-Spektren erstellt, die zur Strukturaufklärung und eindeutigen Identifizierung erforderlich waren (Abb. 9). Dafür wurde das Massenspektrometer so eingestellt, dass die drei intensivsten Peaks aus dem MS-Übersichtsspektrum ausgewählt und in einem separaten Analyselauf (etwa 4-5 s nach dem MS-Spektrum) mit der MS/MS-Funktion fragmentiert wurden. Die Fragmentierung erfolgte in dem Quadropol 2 in N₂-Atmosphäre.

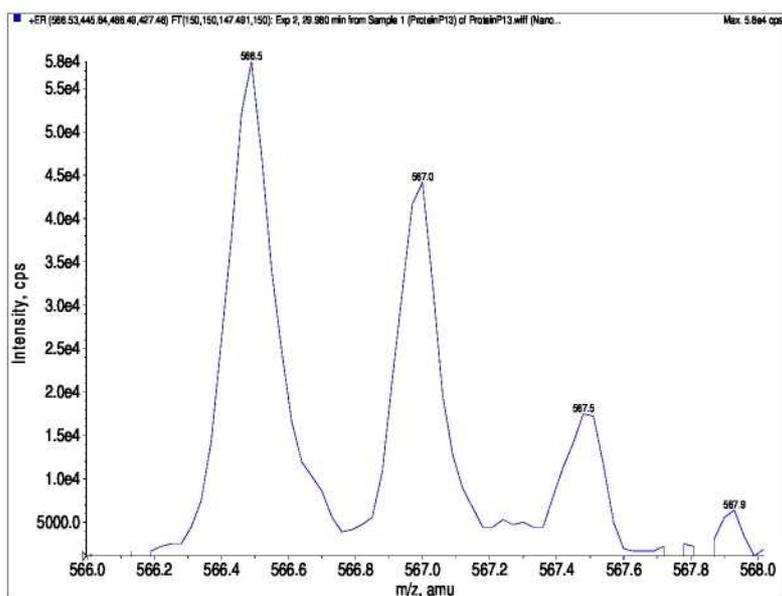


Abb. 8: „Enhanced-Resolution“-Spektrum des Isotopenverteilungsmusters des in Abb. 7 markierten Peptids ($m/z = 566,5$)

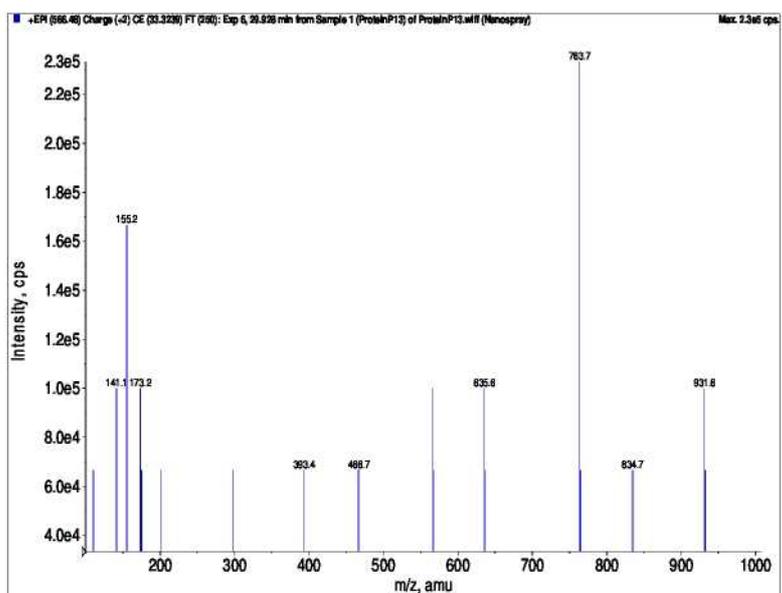


Abb. 9: MS/MS-Spektrum des in der Abb. 7 markierten Peptids

Die Abstände zwischen zwei MS-Peaks (Abb. 9) entsprechen der Masse einer bestimmten Aminosäure (AS). Aus diesen Informationen wurde folgende AS-Sequenz des fragmentierten Peptids ermittelt: **AEPAKIEAFR**

Die erzeugten MS/MS-Spektren eines Nano-HPLC-MS-Laufes wurden unter Verwendung der MASCOT®-Software mit der SwissProt®-Datenbank abgeglichen, was zu einer Identifizierung des unbekanntes Proteins führte. Abb. 10 zeigt die AS-Sequenz des aus dem Spot Nr. 13P identifizierten Proteins Phosphoglyceratkinase-1.

```
1 SLSNKLTLDK LDVKGKRVVM RVDFNVPMKN NQITNNQRIK AAVPSIKFCL  
51 DNGAKSVVLM SHLGRPDGVP MPDKYSLEPV AVELKSLGK DVLFLKDCVG  
101 PEVEKKACANP AAGSVILLEN LRFHVVEEGK GKDASGNKVK AEPAKIEAFR  
151 ASLSKLGDVY VNDAFGTAHR AHSSMVGVNL PQKAGGFLMK KELNYFAKAL  
201 ESPERPLAI LGGAKVADKI QLINNMLDKV NEMIIGGGMA FTFLKVLNNM  
251 EIGTSLFDEE GAKIVKDLMS KAEKNGVKIT LPVDFVTADK FDENAKTGQA  
301 TVASGIPAGW MGLDCGPSS KKYAEAVTRA KQIVWNGPVG VFEWEAFARG  
351 TKALMDEVVK ATSRGCITII GGGDTATCCA KWNTEDKVSH VSTGGGASLE  
401 LLEGKVLPGV DALSN
```

Abb. 10: Die Aminosäuresequenz der Phosphoglyceratkinase-1 (Protein Spot Nr. 13P in Abb. 4), die mit einer MS/MS-Sequenzwiederfindung von 28 % identifiziert wurde. Das rot markierte Peptid entspricht dem in Abb. 9 dargestellten MS/MS-Spektrum. Die blau markierten Peptide sind ebenfalls mit MS/MS identifiziert worden (hier nicht gezeigt).

Die weiteren mit Nano-HPLC-MS/MS identifizierten Proteine sowie deren γ -Dosisabhängigkeit (erhaltene Dosis: 1, 2 und 4 Gy) sind in Tabelle 4 (Molmasse und pI-Wert, berechnet auf der Grundlage der Swissprot-Datenbank) aufgeführt. Dargestellt wurden die Konzentrationsänderungen in Form von Faktoren, die unter 1,0 eine Abnahme und über 1,0 eine Zunahme der Konzentrationen nach γ -Bestrahlung im Vergleich zu den Kontrollen repräsentierten. Die Daten der Proteine in Tab. 4 stammen von den Spots in Abb. 5 (Spot Nr.: 3, 4, 5, 7 und 8) und basieren auf der Auswertung der Anfärbung mit dem protein-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Sypro-Ruby™. Die verbliebenen Daten der Proteine in Tab. 4 stammen von den Spots in Abb. 4 (Spot Nr.: 2P, 6P, 7P, 10P, 11P, 12P, 13P und 14P) und beruhen auf der Anfärbung mit Pro-Q-Diamond™, das spezifisch mit den in Proteinen

gebundenen Phosphatgruppen reagiert. Während die Proteine 1. bis 5. nach der Applikation von 1 – 4 Gy eine deutliche Reduktion ihrer Konzentration, gemessen anhand von abnehmenden Fluoreszenzwerten, erkennen lassen, weisen die Proteine (Spot Nr.: 2P, 6P, 7P, 10P, 11P, 12P, 13P und 14P) mit Ausnahme von Phosphoglyceratkinase-1 auf eine Zunahme der Konzentration im gesamten Dosisbereich gegenüber den unbestrahlten Werten hin.

Spot Nr.:	Protein	MW / pI	1 Gy/K	2 Gy/K	4 Gy/K
3	Talin-1	269.599 / 5,77	0,419 ± 0,097	0,212 ± 0,017	0,407 ± 0,072
4	Talin-2	271.385 / 5,42	0,832 ± 0,189	0,451 ± 0,039	0,481 ± 0,068
5	Peroxin-1	142.778 / 5,91	0,903 ± 0,316	0,326 ± 0,127	0,671 ± 0,028
7	Mutant β -Actin	42.128 / 5,22	0,371 ± 0,130	0,271 ± 0,095	0,372 ± 0,045
8	β -Actin	42.052 / 5,29	0,791 ± 0,368	0,422 ± 0,111	0,461 ± 0,203
2P	MBP2	268.885 / 6,50	1,021 ± 0,250	1,665 ± 0,204	2,541 ± 0,268
6P	Annexin-6	75.695 / 5,42	1,961 ± 0,912	2,231 ± 0,075	2,417 ± 0,033
7P	Zyxin-2	62.436 / 6,22	1,247 ± 0,331	3,967 ± 1,078	1,862 ± 0,538
10P	β -Actin *	42.052 / 5,29	2,247 ± 0,512	2,356 ± 1,122	1,745 ± 0,067
11P			1,259 ± 0,160	4,317 ± 0,986	1,183 ± 0,286
12P			0,962 ± 0,392	3,223 ± 0,985	1,095 ± 0,133
13P	PGK-1	44.854 / 8,30	0,326 ± 0,133	0,469 ± 0,123	0,899 ± 0,395
14P	ILE-17E	20.317 / 8,73	0,936 ± 0,342	3,471 ± 0,459	2,136 ± 0,364

Tabelle 4: Identifizierte ERPRO (Early Response Protein) menschlicher Lymphozyten und deren dosisabhängige relative Proteinkonzentration (RP) nach Exposition mit γ -Strahlen (Dosis: 1, 2 und 4 Gy). Die Proteine 2P bis 14P sind Phosphoproteine. Die \pm -Schwankungen repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes aus drei unabhängigen Messungen. *Drei separate Spots sind auf Grund der massenspektrometrischen Identifizierung dem gleichen Protein zugeordnet worden (mit der gleichen Masse), wiesen aber auf dem Gel unterschiedliche pI-Werte auf.

Proteinspot 4P (Abb. 4) sowie die Spots 11, 12 und 14 (Abb. 5) wurden mit dem MS identifiziert. Diese Proteine stammten offensichtlich nicht aus Lymphozyten. So wurde Spot 4P als Integrin- α -IIb-Precursor-Protein identifiziert, einem Bestandteil der Plasmamembran der Thrombozyten. Es zeigte hier eine Zunahme der Phosphorylierung (bis Faktor 2 bei höchster Dosis) nach γ -Bestrahlung. Proteine aus den Spots 11 und 12 wurden dem β -Globin aus Erythrozyten zugeordnet. Beide zeigten nur bei einer Dosis von 2 Gy eine sehr deutliche Hochregulierung um Faktor 4 bzw. 9, während bei 1 und 4 Gy keine signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar waren. Spot Nr. 14 konnte als α -

Globin identifiziert werden. Es zeigte nach 1 und 2 Gy eine signifikante Erhöhung um den Faktor 2 bzw. 8; nach Exposition mit 4 Gy verringerte sich dessen Proteinkonzentration und glich sich dem Kontrollwert an. Da alle diese Proteine nicht unmittelbar aus Lymphozyten stammten, wurden sie nicht für weitere Auswertungen in Betracht gezogen (nicht in Tabelle 4 aufgeführt). Die verbliebenen von den in Abb. 4 und 5 markierten Proteine konnten nicht mit ausreichender Zuverlässigkeit identifiziert werden.

3.3 Genexpressionanalyse mittels RT-qPCR Methode

Ein Teil der in Tab. 4 identifizierten Proteine wurden mittels RT-qPCR auf ihre dosisabhängigen Genexpressionsänderungen untersucht (s. Abb. 12). Des Weiteren wurden Gene untersucht, die im biologischen Zusammenhang mit den gefundenen Proteinen standen und die auch strahlenempfindlich zu sein schienen (s. Abb. 13-17). Diese DNA-Microarray-Daten sind hier nicht aufgelistet. Um die Genexpressionsuntersuchungen durchführen zu können, war es zunächst wichtig, RNA aus Lymphozyten in ausreichender Menge und Reinheit zu gewinnen. Dazu wurden die Lymphozyten in Trizol®-Reagenz aufgenommen und mittels Chloroform ihre DNA und Proteine von der RNA abgetrennt.

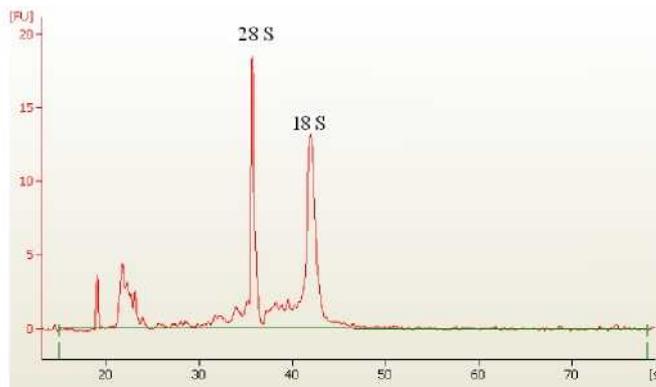


Abb. 11: Elektropherogramm einer lymphozytären RNA-Probe, aufgenommen mit dem Bioanalyzer®-System.

Die RNA wurde danach mit Isopropanol gefällt und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das daraus resultierende Pellet wurde in Wasser gelöst und mit dem Bioanalyzer® (Agilent) die RNA-Reinheit untersucht. In diesem Gerät erfolgte einerseits die Auftrennung der RNA-Proben in einer Gelmatrix und andererseits die Bewertung der Form und der Relation von 28S- zu 18S-rRNA-Peaks (Abb. 11). Für die Genexpressionsuntersuchungen war die Qualität der mRNA-Fraktion wichtig. Da im gesamten RNA-Extrakt die mRNA nur zu ca. 3 % vertreten war, konnte diese nicht mit herkömmlichen Elektrophoreseverfahren detektiert werden. Deshalb wurde die rRNA betrachtet, die sich hauptsächlich im Extrakt befand. Aus dem degradierten Zustand der rRNA konnte man indirekt schließen, dass die mRNA ebenfalls degradiert war. In einer intakten RNA Probe sollten deshalb 28S- und 18S-rRNA gut erkennbar sein. Das Bioanalyzer®-System verfügte über einen Algorithmus, der Form, Umgebung und Relation der beiden Peaks bewertet und daraus einen Qualitätsfaktor (sog. RIN) errechnete. Die RIN-Werte können zwischen 1 und 10 variieren, wobei Werte, die unter 7 lagen, bereits ein Marker für Degradation waren. Alle Proben, die für die Genexpressionsversuche verwendet worden waren, hatten einen RIN-Wert, der zwischen 8,5 und 9,9 lag. Beispielsweise wies die in der Abb. 11 dargestellte Probe einen RIN-Wert von 8,8 auf.

Die auf diese Weise isolierte RNA wurde in die cDNA mit dem cDNA-Archive-Kit® umgeschrieben. Mit Hilfe der genspezifischen TaqMan®-Sonden wurden die Quantitäten der cDNA von den bestrahlten in Relation zu den unbestrahlten Proben gebracht. Dieses Verhältnis bildete die sog. „relative Genexpression“. In Abb. 12 sind Expressionsveränderungen von vier der insgesamt elf identifizierten Gene dargestellt, deren Expressionsprodukte (ERPRO) in Tab. 4 (s. S. 51) aufgelistet sind. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, zeigte Annexin-A6 eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression in allen bestrahlten Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Ein Trend schien zwischen 0 und 2 Gy zu existieren, der nach 4 Gy nicht mehr sichtbar war. Die Genexpression des β -Actins war am stärksten nach 1 Gy verändert und wies auf eine Abnahme gegenüber der Kontrolle um den Faktor 0,6 hin. Mit der Erhöhung der Bestrahlungsdosis (2 und 4 Gy) nahm die Abnahme der Genexpression des β -Actins weiter ab und blieb bei 0,8 konstant. Die Veränderung der Genexpression des Talin-2 infolge γ -Bestrahlung war nicht signifikant unterschiedlich zu den unbestrahlten Proben. Die Phosphoglyceratkinase-1 zeigte eine Abnahme der Genexpression nach γ -Bestrahlung. Die

höchste Abnahme stellte der 2-Gy- Wert dar (Faktor 0,7), der allerdings mit einer großen Standardabweichung behaftet war. Die Genexpressionen nach jeweils 1 und 4 Gy waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Kontrollen.

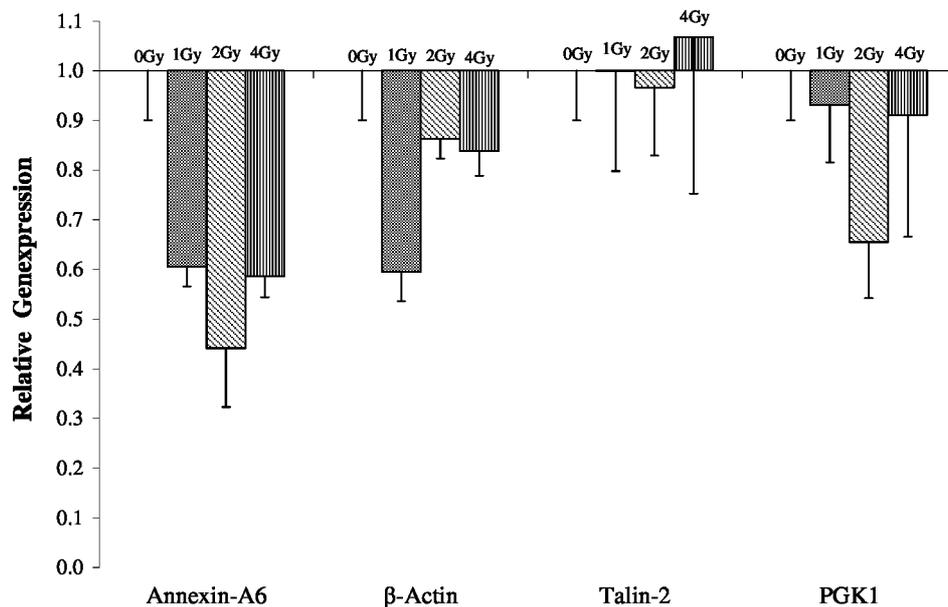


Abbildung 12: Relative Genexpressionen (bezogen auf unbestrahlte Kontrollen, deren Wert auf 1.0 gesetzt wurde) von Annexin-A6, β -Actin, Talin-2 und PGK1, gemessen mit der RT-qPCR-Methode unter Verwendung von Taq-Man®-Sonden, als Funktion steigender γ -Strahlendosen (1, 2 und 4 Gy). Die Standardabweichung der Mittelwerte ergaben sich aus jeweils drei Einzelwerten.

Hinweise aus zusätzlichen DNA-Microarray-Versuchen mit bestrahlten Lymphozyten vervollständigten die Informationen zu den frühzeitig erfolgten komplexen strahlenbiologischen Antworten. Deshalb wurden weitere Gene gezielt untersucht, die potentiell in Zusammenhang mit den gefundenen ERPRO stehen könnten. Die Abbildungen 13 – 17 zeigen die Ergebnisse der Taq-Man® RT-qPCR-Expressionsmessungen, die mit folgenden

Genen durchgeführt worden sind: RND1, DUSP8, CDKN1A, OCLN, IFNG, ISG20L1 und SERHL2.

Die Genexpression von RND1 (Abb. 13) nahm mit steigender γ -Dosis zu. Die maximale Expression wurde (Dosisbereich: 1-4 Gy) nach 4 Gy erreicht und war um den Faktor 7,9 größer als die Genexpression der unbestrahlten Proben. Die Expressionswerte nach 1 bzw. 2 Gy waren nicht signifikant unterschiedlich, jedoch waren beide Werte etwa um den Faktor 4,0 größer als die unbestrahlten Kontrollen.

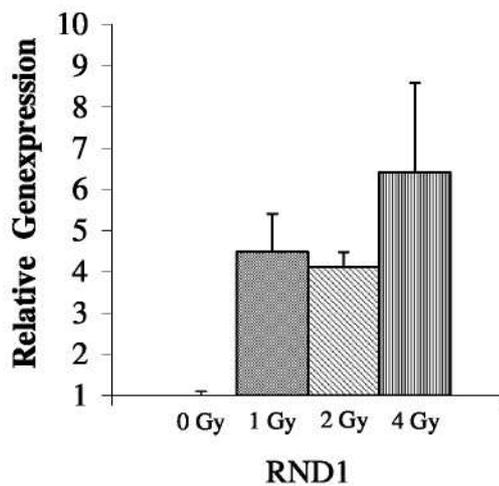


Abbildung 13:

Relative Genexpression (siehe Legende zu Abb. 12) von RND1 und dessen Dosisabhängigkeit nach Exposition mit γ -Strahlen (Dosis: 1, 2 und 4 Gy)

Die Gene DUSP8 und CDKN1A (Abb. 14) waren nach γ -Bestrahlung in menschlichen Lymphozyten hochreguliert. Beide Gene zeigten einen dosisabhängigen Trend, der für CDKN1A signifikant war ($p \leq 0,05$).

Die Abb. 15 stellt die dosisabhängige Veränderung der Genexpression von OCLN dar. Eine generelle Abnahme der Genexpression wurde nach γ -Bestrahlung detektiert. Die größte Verringerung (Faktor 0,5 im Vergleich zu den Kontrollen) wurde nach 1 Gy gemessen. Mit steigender Dosis nahm die Intensität der Herunterregulierung.

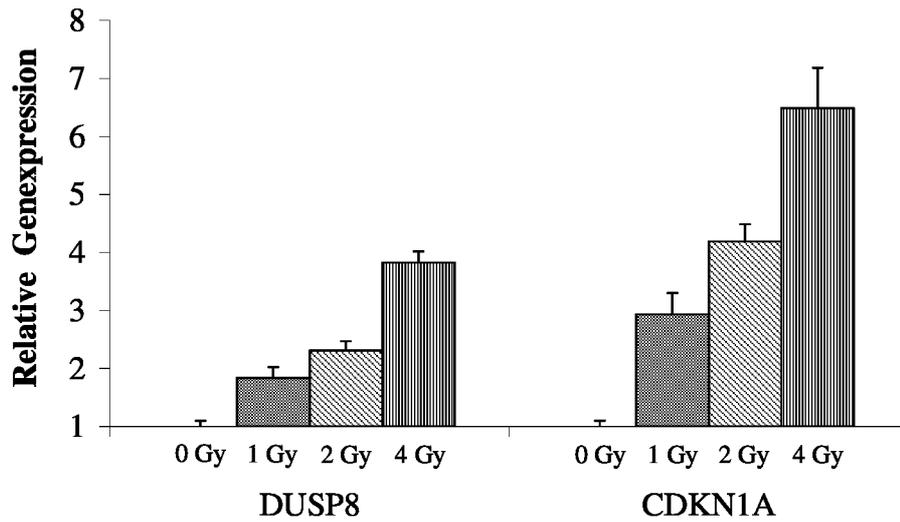


Abbildung 14:

Relative Genexpressionen (siehe Legende zu Abb. 12) von DUSP8 und CDKN1A und deren dosisabhängigen Veränderungen nach Exposition mit γ -Strahlen (Dosis: 1, 2 und 4 Gy)

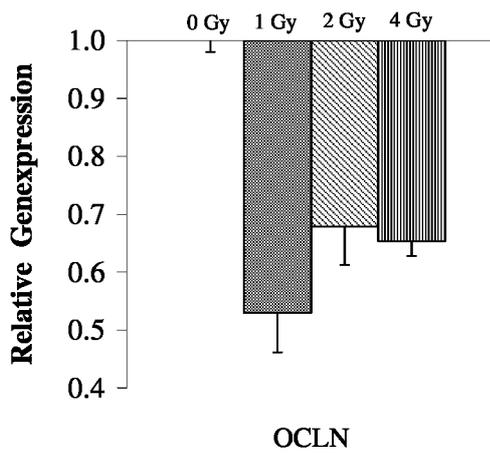


Abbildung 15:

Relative Genexpression (siehe Legende zu Abb. 12) von OCLN in Abhängigkeit steigender γ -Dosen

In weiteren RT-qPCR-Untersuchungen konnten die Hochregulation der Expressionen von IFNG und ISG20L1 festgestellt werden (Abb. 16). Die Genexpression von IFNG zeigte einen signifikanten ($p \leq 0,05$) dosisabhängigen Verlauf, während die Genexpression von ISG20L1 nach γ -Bestrahlung, unabhängig von der applizierten Dosis, unverändert bei etwa 4,5 blieb.

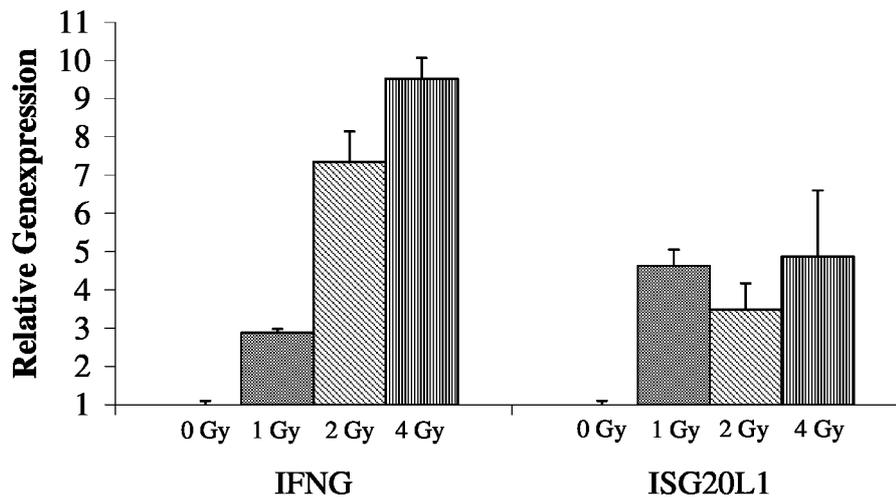


Abbildung 16:

Relative Genexpressionen (siehe Legende zu Abb. 12) von IFNG und ISG20L1 nach Applikation steigender γ -Dosen (1, 2 und 4 Gy)

Abschließend wurde die relative Konzentration des SERHL2-Transkripts in humanen Lymphozyten nach γ -Bestrahlung bestimmt (Abb. 17). Der mRNA-Gehalt dieses Gens wurde in allen bestrahlten Proben, relativ zu den Kontrollen, in verringerter Menge vorgefunden. Allerdings lag eine Dosisabhängigkeit nicht vor. Die Messungen wiesen erhebliche Schwankungen auf, so dass kein signifikanter Unterschied der Genexpression zwischen einzelnen Bestrahlungsdosen festgestellt werden konnte. Die niedrigste Konzentration an mRNA gegenüber den Kontrollen (Faktor 0,6) wurde nach der Applikation von 2 Gy gemessen.

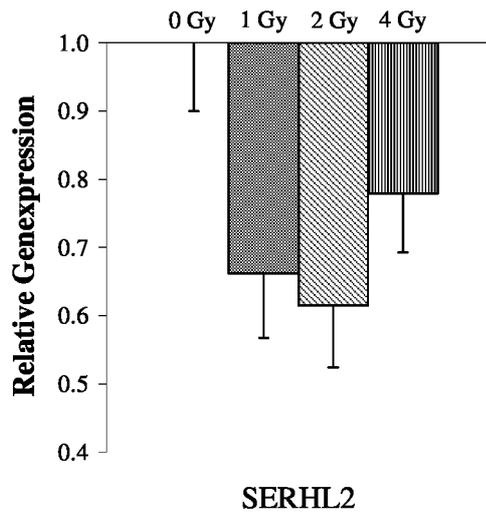


Abbildung 17:
Relative Genexpression (siehe
Legende zu Abb. 12) von
SERHL2 in Abhängigkeit
steigender γ -Dosen, gemessen
mit der RT-qPCR

4 Diskussion

Elektrophoretische Untersuchungen ergaben nach γ -Bestrahlung menschlichen Bluts mehr als 20 lymphozytäre Proteine mit veränderten Konzentrationen. Davon konnten 11 strahlenempfindliche Proteine mittels MS namentlich identifiziert werden. Das erfolgte jedoch nicht mit analytischen Gelen, da die verfügbare Proteinmenge unter der Empfindlichkeitsgrenze des hier verwendeten Nano-HPLC-MS/MS-Systems lag. Für die MS-Identifizierung wurden präparative Gele hergestellt, die mit einer Gesamtproteinmenge von 300 bis 500 μg beladen werden konnten. Somit wurde die Nachweisgrenze bis auf 50 fmol (Konzentration des Peptids nach dem enzymatischen Verdau) gesenkt. Aus DNA-Microarray-Untersuchungen (hier nicht dargestellt) ist deutlich geworden, dass der größte Teil der ERPRO im Bereich der Zytokine zu erwarten war. Da diese Proteine in der Zelle nur in geringfügigen Konzentrationen vorhanden waren, gelang es mit der 2D-PAGE Methode nicht, eine größere Anzahl verschiedener Proteine zu identifizieren. Zukünftige Arbeiten sollten daher die Anwendung monoklonaler Antikörper (entwickelt gegen ausgewählte Proteine) in Verbindung mit der Western-Blot Methode in Betracht ziehen.

Hier gemessene Proteinkonzentrationsveränderungen stellen einen Gesamteffekt der γ -bestrahlten Lymphozyten und deren Proteine dar. So kann die Intensitätsveränderung eines Proteinspots in dem 2D-Gel im Falle einer Verringerung nicht nur auf reduzierter Genexpression, sondern auch auf einer Verkürzung der Halbwertszeit (HWZ) des Proteins selbst sowie auf einem veränderten Laufverhalten z.B. durch ROS verursachte Oxidationsschäden beruhen. Die erwähnten ROS, die u.a. durch γ -Bestrahlung entstehen, können zu DNA-, Fettsäure- und Zucker-Protein-Quervernetzungen sowie zahlreichen Aminosäureveränderungen führen (Stadtman und Levine, 2003). Einige der häufigsten Proteinveränderungen sind Hydroxylierungen bzw. Nitrierungen von aromatischen Aminosäuren, Carbonylierungen, die oft an Prolin, Arginin, Lysin und Theronin auftreten, sowie Cystein-Oxidationen und Methionin-Sulfoxidationen (Nyström, 2005). Insbesondere Carbonylierungen reduzieren die HWZ der Proteine. Diese Modifikation ist im Gegensatz zu anderen irreversibel, was dazu führt, dass sich die Zellen bevorzugt von solch veränderten Proteinen durch deren Abbau befreien müssen. Eine Akkumulation dieser geschädigten Proteine führt zur Ausbildung hochmolekularer Komplexe, die toxisch für die Zellen sind (Nyström, 2005).

Nicht nur Oxidationsprodukte, sondern auch Reaktionen mit Ubiquitin unterstützen die Proteindegradation und müssen dementsprechend bei der Proteomanalyse Berücksichtigung finden. Zahlreiche Proteine (u.a. MDM2 und BRCA1) weisen RING (Really Interesting New Gene)-Strukturen auf, die diesen Ubiquitinligase-Funktionen verleihen. Die ubiquitinierten Proteine werden dann von 26S-Proteasomen abgebaut (Meyer et al. 2005). Welche Proteine und wie schnell sie abgebaut werden, entscheiden oft peptidspezifische Motive (sog. Degrons) innerhalb eines Proteins. Einige dieser Motive, wie z.B. PEST (Prolin, Glutaminsäure, Serin, Threonin)- und KEN (Lysin, Glutaminsäure, Asparagin)-Sequenzen sowie bestimmte N-terminale Aminosäuren (z.B. Asparagin), können die HWZ der Proteine signifikant verringern. In Tab. 8 (s.S. 96) sind die aus der Tab. 4 (s.S. 51) ausgewählten Proteine mit einem PEST-Motiv aufgeführt. Die spezifische PEST-Sequenz dieser Proteine wurde mit einem sog. „Score“ bewertet, der *in-silico* durch die auf der Webseite von EMBnet befindliche Software errechnet worden ist (für Details siehe Legende von Tab. 8, S. 96). Je höher das „Score“, desto wahrscheinlicher handelt es sich um eine biologisch relevante PEST-Sequenz (Rechsteiner & Rogers, 1996).

Sowohl Proteinoxidation als auch Proteindegradation stellen komplexe Situationen dar, die von γ -Strahlung, ROS, Antioxidationsmitteln (z.B. Mn oder Fe) sowie genetischen Faktoren abhängen. In dieser Arbeit wurden Messungen auf Ubiquitinierung und Oxidationsschäden nicht durchgeführt. Allerdings konnten durch den unmittelbaren Vergleich der bestrahlten mit den unbestrahlten Proben (Kontrollen) nur die durch γ -Strahlung induzierten Veränderungen bestimmt werden. Es war jedoch nicht auszuschließen, dass diese Veränderungen auch als synergistische Effekte der Bestrahlung mit den anderen oben erwähnten Prozessen auftraten. Um den genauen Mechanismus dieser Veränderungen zu erkennen, sind weiterführende Arbeiten notwendig. Dabei sollten besonders die Proteine in Augenschein genommen werden, deren Konzentrationsabnahme hier durch Genexpressionsuntersuchungen nicht erklärt wurden.

Obwohl nur etwa die Hälfte der strahlenveränderten Proteine identifiziert werden konnte, scheint die Strahlenempfindlichkeit von Strukturproteinen offensichtlich zu sein: Von zehn identifizierten Proteinen gehören bereits fünf zu den strukturellen Proteinen. So sind die hier gefundenen Talin-1 und Talin-2 hochmolekulare Zytoskelettproteine, die eine wichtige Rolle bei der Bildung von Actinfilamenten spielen. Talin-1 (ebenfalls wie Talin-2) ist u.a. für die Migration der Zellen verantwortlich. In Verbindung mit den Integrinen unterstützt Talin-1

die Zelladhäsion. Die genaue Funktion des Talins, speziell nach γ -Bestrahlung, ist noch unbekannt. Bécam et al. (2005) haben auch über genregulative Eigenschaften des Talins berichtet. Um die Veränderung der Talinkonzentration zu deuten, wurden RT-qPCR-Untersuchungen durchgeführt. Wie aus Abb. 12 zu entnehmen ist, zeigte sich die relative Genexpression und somit die mRNA-Konzentration des Talin-2 von der Bestrahlung offenbar unbeeinflusst. Das zeigt, dass die Verringerung der Proteinkonzentration des Talin-2 (siehe Tabelle 4, s. S. 51) weitgehend unabhängig von der Genexpression ist. Eine mögliche Erklärung kann in dem gezielten Abbau von Talin-2 liegen. Dieses Protein besitzt eine PEST-Sequenz (Tab. 8), was für Strukturproteine ungewöhnlich ist. Wenn diese Annahme richtig ist, würde alles dafür sprechen, dass Talin-2 in bestrahlten Lymphozyten nicht allein die Rolle eines Strukturproteins spielt, sondern sich vielleicht, wie Bécam et al. (2005) vermuteten, an anderen möglicherweise regulatorischen Prozessen in den Zellen beteiligt.

β -Actin und seine modifizierte Form (Mutant β -Actin) gehören auch zu den Strukturproteinen, die durch ionisierende Bestrahlung verändert werden. Mehrere Autoren (u.a. Li et al. 2004) berichteten über den Einfluss des Zytoskeletts auf die zelluläre Apoptose und Nekrose. Während die Spaltung von β -Actin in 15- und 31-kDa-Fragmente die Apoptose induzierte, bewirkte Mutant β -Actin das Gegenteil – es verhinderte die Apoptose. Hier werden ein Abfall der Konzentration sowohl des normalen und des mutierten β -Actins als auch ein Anstieg der phosphorylierten Form des β -Actins gleichzeitig beobachtet. Eine einfache Erklärung hierfür liegt bislang nicht vor, da die Spaltung von β -Actin in 15- und 31-kDa-Fragmente, die ja auf die Apoptose hindeuten, hier nicht vorkommt. Die mittels RT-qPCR gefundene Abnahme der Genexpression des β -Actins (Abb. 12) zeigt, bezogen auf die Veränderung der Proteinkonzentration, einen Trend in die gleiche Richtung. Allerdings kann dieser Abfall ohne einen aktiven Abbau des β -Actins nicht erklärt werden. Mit der Genexpressionsuntersuchung zeigte sich lediglich, dass die Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt kein neues β -Actin synthetisierten. Dieses nach γ -Bestrahlung beobachtete Verhalten der Lymphozyten kann damit begründet werden, dass die Zelle alle Energieressourcen für die Synthese von DNA-Reparaturproteinen sowie verschiedenen Zytokinen gerade zu diesem Zeitpunkt dringend benötigt. β -Actin ist im Lymphozyt in ausreichender Menge vorhanden, sodass es, wenn bestimmte Veränderungen des Zytoskeletts notwendig wären, wahrscheinlich mittels spezieller Enzyme einen Umbau der β -Actin-Filamente durchführen

könnte. Da die Bestrahlung auf Lymphozyten als Belastung wirkt, sind auch Veränderungen des Zytoskeletts zu erwarten. Hinweise auf solche Reaktionen in Lymphozyten kamen aus Genexpressionsuntersuchungen mittels DNA-Microarrays (Turtoi et al. 2008). So zeigt das in Abb. 13 dargestellte RND1-Gen Veränderungen in seiner Expression mit steigender γ -Dosis. RND1 ist hauptsächlich für die Auflösung und Reorganisation der Actin-Filamente verantwortlich (Nobes et al. 1998). Dieses Gen wird von Wachstumsfaktoren angeregt, deren Transkription wiederum durch spezifische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-JUN (Jun-Oncogen) und EGR1 (Early Growth Response-1), beeinflusst werden (Turtoi et al. 2008). Interessant erscheint ebenfalls der veränderte Phosphorylierungsstatus des β -Actins, gemessen mit dem Pro-Q-DiamondTM-Farbstoff, da RND1 und andere Rho-GTPasen für die Phosphorylierung der Strukturproteine u.a. verantwortlich sind. Für die Biodosimetrie stellen solche frühzeitige Veränderungen der Zellstruktur ein Potential für Dosisbestimmungen dar. Marchetti et al. (2006) schrieben aufgrund von Literaturrecherchen, die die letzten 30 Jahre betrafen, dem β -Actin als potentiellm Biodosimeter einen Prioritätsfaktor von 5 (Faktor 1 = sehr signifikant; Faktor 9 = wenig signifikant) zu.

Zyxin-2, ein weiteres Zytoskelettprotein, wurde in der vorliegenden Arbeit verstärkt in seiner phosphorylierten Modifikation in bestrahlten Lymphozyten gefunden. Zyxin ist ein bekannter Regulator für die Bildung von Actinfilamenten, die vorwiegend für die Adhäsion und Wechselwirkung der Zellen miteinander verantwortlich sind. Vozenin-Brotons et al. (2004) wiesen auf erhöhte Zyxinkonzentrationen in menschlichen Patienten hin, die an den Spätfolgen einer Strahlenbehandlung litten (Enteritis).

Annexin-A6 gehört zur Familie Calcium-abhängiger und membrangebundener Proteine, die eine Verbindung zwischen Zytoskelett und Plasmamembran der Zelle ermöglichen. Annexine spielen generell eine wichtige Rolle in Calcium-abhängigen Signaltransportwegen. Aus Arbeiten von King und Sartorelli (1986) geht hervor, dass die Herunterregulierung von Annexin-A6 das Fortschreiten des Zellzyklus verstärkt. Grewal et al. (2006) zeigten, dass Annexin-A6 die Calcium-abhängige Bildung des RAS-p120GAP-Komplexes unterstützt und somit zur Inaktivierung des RAS-Proteins an der Plasmamembran führt. Ein weiteres Protein, das in direkter Verbindung zu RAS steht, ist RAF1. Dieses durch RAS-Gene aktivierte Protein steuert über Phosphorylierungsreaktionen die Proteinkinasen MEK1 und MEK2, die wiederum über das Phosphorylieren der MAP (Mitogen-Activated-Protein)-Kinasen ERK1 und ERK2 einen unmittelbaren Einfluss auf die Expression der Gene haben,

die für den Zellzyklus verantwortlich sind. Wie aus der Table 4 zu entnehmen ist, steigt mit der γ -Dosis die Konzentration des phosphorylierten Annexin-A6, das, wie bereits erwähnt, hemmend auf die Funktion von Ras wirkt. Die Genexpression des Annexin-A6 nimmt hingegen mit steigenden γ -Dosen signifikant gegenüber den Kontrollen ab (siehe Abb. 12, s. S. 54). Die Diskrepanz zwischen zunehmender Proteinkonzentration und abnehmender Genexpression ist überraschend. Es ist allerdings nicht unvernünftig anzunehmen, dass kein neues Annexin-A6 in der Zelle gebildet wird, da die Phosphorylierung nur an bereits vorhandenem Annexin-A6 durchgeführt wird. Wenn diese Annahme korrekt ist, dann könnte die Proliferation der Lymphozyten über Annexin-A6 negativ beeinflusst werden. Dies unterstützen DNA-Microarray-Untersuchungen, die eine Hochregulation des CDKN1A- und DUSP8-Gens zeigten. Beide Gene sind hauptsächlich an der Zellzyklusregulation beteiligt, und deren veränderte Genexpression wurde mit RT-qPCR bestätigt (siehe Abb. 14, s. S. 56).

CDKN1A ist für die Inhibition von CDK2- und CDK4 (Cycline Dependent Kinase 2 und 4)-Proteinkomplexe verantwortlich. Es verhindert das Fortschreiten des Zellzyklus in der G₁-Phase. DUSP8 ist an der Dephosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 beteiligt und greift so in einen entscheidenden Schritt des RAS/RAF1-Signaltransportweges zur Unterbindung des Zellzyklus ein. Alle diese Hinweise deuten daraufhin, dass die Lymphozyten nach der Bestrahlung mit einer Hemmung der Proliferation reagieren, indem die entsprechenden Gene zur Regulierung des Zellzyklus aktiviert werden. Diese Reaktion ist notwendig, da zur Reparatur der durch γ -Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden ein Anhalten des Zellzyklus erforderlich ist.

Wang et al. (2007) bringen die RAS/RAF-1-Signaltransportwege in Verbindung mit dem für Lymphozyten ungewöhnlichen Protein OCLN, das in vielen Zellen des Endotheliums und dort insbesondere in sog. Tight Junctions eine wichtige Rolle bei dem Aufbau der intrazellulären Verbindungen spielt. Weitere Autoren (z.B. Alexander et al. 2001) wiesen daraufhin, dass Proteine, wie z.B. OCLN, die peripheren Blutlymphozyten (PBL) befähigen, über microvasculares Endothelium hindurch in verschiedene Gewebe einzudringen. Die Reaktion der PBL wird besonderes dann gefördert, wenn die Körperorgane einer Entzündung ausgesetzt sind. Diese Entzündungsreaktionen werden in biologischen Systemen oft durch höhere Strahlendosen hervorgerufen. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine Konzentrationsveränderungen des OCLN festgestellt worden sind, war es möglich, im Rahmen einer Genexpressionsuntersuchung Veränderungen zu registrieren (Abb. 15, s. S. 56).

Während die Umstrukturierung des Zytoskellets und das Anhalten des Zellzyklus eine direkte Reaktion der Lymphozyten auf strahleninduzierte DNA-Schäden zu sein scheint, repräsentiert das Verhalten von MHC-bindendem Protein 2 (MBP2) und Interleukin-17E (IL17E) eine Reaktion im Zusammenhang mit strahlenbedingten Entzündungsprozessen. Beide Proteine nehmen an der Aktivierung der T-Lymphozyten und deren Immunantwort teil. So bindet MBP2 an Enhancer-DNA-Sequenzen, wodurch mehrere zelluläre Promotoren aktiviert werden. Die bisherigen Erkenntnisse weisen auf eine Interaktion des MBP2-Proteins mit den DNA-Sequenzen der MHC-I-, Interleukin-2- und Interferon-Gene hin (Van't Veer et al. 1992). Die Proteinprodukte dieser Gene sind hauptsächlich für Immunreaktionen der Lymphozyten verantwortlich. So konnte durch Genexpressionsuntersuchungen eine gesteigerte Aktivität des IFNG-Gens nach γ -Bestrahlung von Lymphozyten bestätigt werden (siehe Abb. 16). Des Weiteren wurde eine erhöhte Genexpression von ISG20L1 festgestellt. Das Proteinprodukt dieses Gens ist eine Nuklease, die während der Apoptose an der Zersetzung der DNA beteiligt ist (Abb. 16, s. S. 57).

Interleukin-17E nimmt an der Aktivierung des NF- κ B (Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Enhancer in B-Cells) teil und unterstützt die Bildung von Interleukin-8 (IL8). Diese zwei Prozesse deuten daraufhin, dass IL17E an der Apoptose und den durch Lymphozyten induzierten Entzündungsreaktionen beteiligt sein könnte.

Peroxin-1 wurde kurze Zeit nach der Applikation steigender γ -Dosen in verringerten Konzentrationen in Lymphozyten registriert. Dieses Protein gehört einer Gruppe der ATPasen an, die sich an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligen. Es ist ein zytoplasmatisches Protein, das in Membranen der Peroxisomen vorkommt. Dort reguliert es u.a. die Aufnahme der Proteine, die in den Peroxisomen abgebaut werden. Da keine Genexpressionsdaten für Peroxin-1 vorliegen, ist es noch unklar, weshalb die Konzentration dieses Proteins in Lymphozyten nach γ -Bestrahlung abnimmt. Zusätzlich weist Peroxin-1 ein PEST-Motiv auf, das sich nah an dem C-Terminus befindet. Laut Rechsteiner & Rogers (1996) sind solche C-terminale PEST-Sequenzen besonders für den Ubiquitin-vermittelten Abbau der Proteine relevant. Hier sind weitere Untersuchungen zur Klärung des biologischen Mechanismus dieser Konzentrationsabnahme notwendig. Durch DNA-Microarray-Untersuchungen wurde ein Gen identifiziert, dessen Proteinprodukt ebenfalls in Peroxisomen an der Protein-degradation beteiligt ist. Dieses Gen ist als SERHL2 bekannt. Es zeigte eine Abnahme seiner Genexpression nach γ -Bestrahlungen menschlicher Lymphozyten (Abb. 17, s. S. 58).

Die relative Konzentration an Phosphoglyceratkinase-1 (PGK1) im Vergleich zu unbestrahlten Proben reduzierte sich in menschlichen Lymphozyten nach γ -Bestrahlung (siehe Tab. 4). Der abnehmende Effekt, gemessen mit dem Pro-Q-Diamond™-Farbstoff, charakterisiert die Veränderung der Phosphorylierung besonders nach einer applizierten Dosis von 1 und 2 Gy. Nach 4 Gy war der signifikante Unterschied zur Kontrolle nicht mehr messbar. Aus Arbeiten von Chandel et al. (1998) ist bekannt, dass ROS, die nachweislich durch ionisierende Bestrahlung entstehen können, die Expression des PGK1-Gens beeinflussen. In dieser Arbeit wurden sowohl Veränderungen der Genexpression (siehe Abb.12) als auch der Phosphoproteinkonzentration aufgezeigt. Genaue Ursachen dieser Veränderung können noch nicht geklärt werden, zumal PGK1 auch an der Glykolyse und somit an der Energiegewinnung der Zelle beteiligt ist. Dieser essenzielle Prozess kann nicht nur durch ROS empfindlich gestört werden, sondern ebenfalls durch andere zelluläre Vorgänge, wie z.B. Apoptoseinduktion und γ -induzierte Entzündungsreaktionen. Auch andere Autoren berichteten, dass verschiedene Glykolyseenzyme strahlenempfindlich sind. So stellten Zhang et al. (2003) mittels 2D-PAGE die Konzentrationszunahme der Phosphoglyceratkinase-2 in den Darmepithelzellen 3 h nach Bestrahlung mit 9 Gy fest. Lu et al. (2006) fanden eine Konzentrationsabnahme der Enolase in Glioblastom-Zellen 24 h nach Bestrahlung bei einer Dosis von 7 Gy. Obwohl für eine endgültige Klärung weitere Untersuchungen notwendig sind, bieten diese Daten einen Hinweis auf die mögliche Strahlenempfindlichkeit der glykolytischen Enzyme.

Die hier aufgeführten ERPRO's und einige ausgewählte Gene zeigten Konzentrations- bzw. Genexpressionsveränderungen, die in Relation zu steigenden γ -Dosen stehen. Allerdings stagniert nach 2 Gy die Proteinkonzentration und in Einzelfällen auch die Genexpression. Dieses deutet auf eine Sättigung hin, zumal auch nach 4 Gy keine Veränderung auftrat. Da mehrere verschiedene Marker den spezifischen Dosisverlauf individuell repräsentieren, können die hier aufgeführten Proteine in ihrer Gesamtheit als Marker für ein Biodosimeter verwendet werden, wodurch u.a. die einzeln auftretenden Sättigungsphänomene relativiert werden können. Dieses Gesamtproteinmuster, das sich aus vorangegangenen individuellen *ex-vivo* Experimenten zusammensetzt, kann im Kontaminationsfall als Referenz für die Abschätzung der erhaltenen γ -Dosis herangezogen werden.

Die Problematik, die sich bei der Suche nach geeigneten Markern für die Biodosimetrie offenbart, weist immer mehr auf die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der

strahleninduzierten metabolischen Veränderungen in der menschlichen Zelle hin. So ist es wichtig, Methoden einzusetzen, mit deren Hilfe sich Erklärungen für Art und Ausmaß dieser Beeinträchtigung ergeben können. Die bevorzugte Herangehensweise hierzu stellt die 2D-PAGE von strahlensensiblen Proteinen und deren massenspektrometrischer Identifizierung dar. Diese Methode wurde auch in vorliegender Arbeit herangezogen und erbrachte eine Anzahl von lymphozytären Proteinen, die frühzeitig auf γ -Strahlung reagierten und somit als Biomarker einsetzbar sind. Nachteilig erwiesen sich apparative Aspekte, die für eine Verzögerung der erforderlichen Informationsschnelligkeit verantwortlich waren: Auswertungen auf der Basis von 2D-Elektrophoresen dauern mindestens 4 – 5 Tage. Um die strahlenbeeinflussten biologischen Vorgänge besser den unterschiedlichen radioaktiven Belastungen zuzuordnen und gleichzeitig die Auswertedauer erheblich zu reduzieren, müssen andere bzw. zusätzliche Methoden herangezogen werden. Dafür scheint eine Technik geeignet zu sein, die sich auf der Transkriptomebene mit der relativen Quantifizierung der Genexpression befasst. Dazu gehören DNA-Microarrays in Kombination mit RT-qPCR. Mit dieser Methode können sehr empfindlich (nur einige wenige Kopien sind erforderlich) etwa 30.000 bekannte Gentranskripte quantitativ und in einem relativ geringen Zeitraum untersucht werden. Die Zuverlässigkeit dieser Ergebnisse kann mit RT-qPCR-Untersuchungen ausgewählter Gene überprüft und gegebenenfalls bestätigt werden. Diese zuletzt erwähnte Methodenkombination kam hier nicht durchgängig zum Einsatz, sondern wurde zusätzlich und nur in Einzelfällen benutzt, um die gewonnenen Ergebnissen aus den ERPRO-Untersuchungen zu validieren.

4.1 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit, die sowohl Proteinkonzentrations- als auch Genexpressionsveränderungen der Lymphozyten nach akuter γ -Bestrahlung zeigt, wurden innerhalb einiger wichtiger zellulärer Prozesse geeignete Proteine und dessen verantwortliche Gene mit der Bedeutung für die Biodosimetrie identifiziert. Diese Proteine sind vor allem an Auf- und Umbau des Zytoskeletts, Proliferation und Zellzyklus, Immunantwort, Proteindegradation sowie Energiegewinnung (speziell Glycolyse) der Zelle beteiligt.

Die dosisabhängige Veränderung der Konzentration der in Tab. 4 erwähnten Proteine konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, wobei mehrere Hinweise auf die Signifikanz erwähnt wurden (s. Tab. 5, s. S. 93). Die Genexpressionsuntersuchungen haben gezeigt, dass sich diese Ergebnisse für eine eventuelle biodosimetrische Anwendung eignen.

Zukünftige Arbeiten, die biodosimetrische Probleme lösen möchten, sollten auf der Grundlage von Untersuchungen der Proteinkonzentration und Genexpression beruhen. Es wird empfohlen, die interindividuelle Variabilität, basierend auf unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeiten jedes Menschen, durch mehrere unterschiedliche Marker zu berücksichtigen und gegebenenfalls entsprechende Referenzmuster (s. S. 26) heranzuziehen. Aktuelle Untersuchungen (Turtoi et al. 2008) mit 6 Probanden haben gezeigt, dass die Individualität eines jeden Probanden in unterschiedlich starken Genexpressionen resultierte. Deshalb ist es für eine allgemein gültige Aussage erforderlich, die interindividuelle Variabilität der möglichen Biomarker anhand grösserer Probandenzahl zu untersuchen. Auf diese Weise wäre auch die in der Zielsetzung erwähnte Hypothese weitgehend realisiert.

5 Literatur

- Ababou M**, Dutertre S, Lécluse Y, Onclercq R, Chatton B, Amor-Guéret M. 2000. ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* 19 (52): 5955-59.
- Abraham RT**. 2004. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair* 3: 883-887.
- Adachi Y**, Tokuda N, Sawada T, Fukumto T. 2005. Semiquantitative detection of cytokine messages in X-irradiated and regenerating rat thymus. *Radiation Research* 163: 400-407.
- Ahmed MM**, Venkatasubbarao K, Fruitwala SM, Muthukkumar S, Wood DPJ, Sells SF, Mohiuddin M, Rangnekar VM. 1996. EGR-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (46): 29231-29237.
- Alberts B**, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2003. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH **4**. ISBN-10: 3527304924.
- Al-Assar O**, Robson T, McKeown SR, Gardin I, Wilson GD, Hirst DG. 2000. Regulation of FOS by different compartmental stresses induced by low levels of ionizing radiation. *Radiation Research* 154: 503 – 514.
- Alexander JS**, Elrod JW, Park JH. 2001. Roles of leukocyte and immune cell junction proteins. *Microcirculation* 8: 169-179.
- Almeida KH**, Sobol RW. 2007. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair* 6: 695-711.
- Amundson S**, KT Do, Fornace AJ Jr. 1999. Induction of stress genes by low doses of gamma rays. *Radiation Research* 152: 225 – 231.
- Amundson SA**, Bittner M, Chen Y, Trent J, Meltzer P, Fornace AJJ. 1999. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress. *Oncogene* 18: 3666 – 3672.
- Amundson SA**, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ. 2000. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiation Research* 154: 342-346.

- Amundson SA**, Bittner M, Meltzer P, Trent J and Fornace AJ. 2001. Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1 (2): 89-97.
- Amundson SA**, Fornace AJ. 2003. Monitoring human radiation exposure by gene expression profiling: possibilities and pitfalls. *Health Physics* 85 (1): 36-42.
- Amundson SA**, Grace MB, McLeland CB, Epperly MW, Yeager A, Zhan Q, Greenberger JS, Fornace AJ. 2004. Human *in vivo* radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. *Cancer Research* 64: 6368-6371.
- Bae I**, Fan S, Bhatia K, Kohn KW, Fornace AJ, O'Connor. 1995. Relationship between G1-arrest and stability of the p53 and p21^{Cip1/Waf1} proteins following γ -irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Research* 55: 2387-2393.
- Bao S**, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF. 2001. ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* 411: 969 – 974.
- Bakkenist CJ**, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506.
- Barenco M**, Tomescu D, Brewer D, Callard R, Stark J, Hubank M. 2006. Ranked prediction of p53 targets using hidden variable dynamic modelling. *Genome Biology* 7: 25.1-25.18.
- Bécam IE**, Tanentzapf JA, Lepesant JA, Nicholas HB and Huynh JR. 2005. Integrin-independent repression of cadherin transcription by talin during axis formation in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* 7 (5): 510-516.
- Belka C**, Marini P, Budach W, Schulze-Osthoff K, Lang F, Gulbins E, Bamberg M. 1998. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand. *Radiation Research* 149: 588 – 595.
- Belka C**, Marini P, Lepple-Wienhues A, Budach W, Jekle A, Los M, Lang F, Schulze-Osthoff K, Gulbins E, Bamberg M. 1999. The tyrosine kinase Lck is required for CD95-independent caspase-8 activation and apoptosis in response to ionizing radiation. *Oncogene* 18: 4983 – 4992.
- Bhoomik A**, Takahashi S, Breitweiser W, Shiloh Y, Jones N, Ronai Z. 2005. ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Molecular Cell* 18: 577 – 587.

- Blattner C**, Sparks A, Lane D. 1999. Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Molecular and Cellular Biology* 19: 3704 – 3713.
- Bouvard V**, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M, May E. 2000. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: Bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionizing irradiation in mice. *Oncogene* 19: 649 – 660.
- Bowers G**, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Lammering G, Amir C, Schmidt-Ullrich RK. 2001. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 20: 1388 – 1397.
- Brach MA**, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. 1991. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *Journal of Clinical Investigation* 88: 691 – 695.
- Bradford MM**. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry* 72: 248 – 254.
- Brumbaugh KM**, Otterness DM, Geisen C, Oliveira V, Brognard J, Li X, Lejeune F, Tibbetts RS, Maquat LE, Abraham RT. 2004. The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Molecular Cell* 14: 585 – 598.
- Caldecott KW**, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. 1996. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Research* 24: 4387-4394.
- Cariveau MJ**, Kovacs CJ, Allison RR, Johnke RM, Kalmus GW, Evans M. 2005. The expression of p21/WAF-1 and cyclin B1 mediate mitotic delay in x-irradiated fibroblasts. *Anticancer Research* 25: 1123 – 1129.
- Cerosaletti K**, Concannon P. 2004. Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm. *Journal of Biological Chemistry* 279: 38813 –38819.
- Chandel NS**, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 29; 95 (20): 11715-20.

- Chandel NS**, Maltepe, Goldwasser EE, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Cell Biology* 95 (20): 11715-11720.
- Chen C**, Boylan MT, Evans CA, Whetton AD, Wright EG. 2005b. Application of two-dimensional difference gel electrophoresis to studying bone marrow macrophages and their in vivo responses to ionizing radiation. *Journal of Proteome Research* 4: 1371 – 1380.
- Chen C**, Lorimore SA, Evans CA, Whetton AD, Wright EG. 2005c. A proteomic analysis of murine bone marrow and its response to ionizing radiation. *Proteomics* 5: 4254 – 4263.
- Chen C**, Shimizu S, Tsujimoto Y, Motoyama N. 2005d. Chk2 regulates transcription-independent p53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333: 427 – 431.
- Chen MJ**, Lin YT, Lieberman HB, Chen G, Lee EY. 2001. ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 16580 – 16586.
- Chen YR**, Meyer CF, Tan TH. 1996. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 631 – 634.
- Christensen ME**, Hansen HS, Poulsen SS, Bretlau P, Nexø E. 1996. Immunohistochemical and quantitative changes in salivary EGF, amylase and haptocorrin following radiotherapy for oral cancer. *Acta Otolaryngologica* 116: 137 – 143.
- Cordes N**, Blaese MA, Meineke V, Van Beuningen D. 2002. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumour cell lines in vitro. *International Journal of Radiation Biology* 78: 347 – 357.
- Cortez D**, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. 1999. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double strand breaks. *Science* 286: 1162 – 1166.
- Dahm K**. 2007. Functions and regulation of human Artemis in double strand break repair. *Journal of Cellular Biochemistry* 100: 1346-1351.
- Dang T**, Bao S, Wang XF. 2005. Human Rad9 is required for the activation of S-phase checkpoint and the maintenance of chromosomal stability. *Genes to Cells* 10: 287 – 295.
- Dèry U**, Masson JY. 2007. Twists and turns in the function of DNA damage signaling and repair proteins by post-translational modifications. *DNA Repair* 6: 561-577.

- Dittmann K**, Mayer C, Fehenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen DJ, Kehlbach R, Rodemann HP. 2005. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 31182 – 31189.
- Donaldson AD**, Blow JJ. 1999. The regulation of replication origin activation. *Current Opinion in Genetic Development* **9**: 62-68.
- Draganič IG**, Draganič ZD. 1971. The radiation chemistry of water. Academic Press N.Y.
- Dressman HK**, Muramoto GG, Chao NJ, Meadows S, Marshall D, Ginsburg GS, Nevins JR, Chute JP. 2007. Gene expression signatures that predict radiation exposure in mice and humans. *PLOS Medicine* **4** (4): 1-12.
- Fedorocko P**, Egyed A, Vacek A. 2002. Irradiation induces increased production of haemopoietic and proinflammatory cytokines in the mouse lung. *International Journal of Radiation Biology* **78**: 305 – 313.
- Feinendengen LE**, Bond VP, Sondhaus CA, Altman KI. 1998. Cell protection by low doses of ionizing radiation challenges the concept of linearity. *Recent Aspects of Cellular and Applied Radiobiology - FZJ - Bilateral Seminars of the International Bureau* **30**: 3-23.
- Fernandez-Capetillo O**, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A. 2002. DNA damage-induced G2-M check-point activation by histone H2AX and 53BP1. *Nature Cell Biology* **4**: 993 – 997.
- Foray N**, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P. 2003. A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO Journal* **22**: 2860 – 2871.
- Foray N**, Marot D, Randrianarison V, Venezia ND, Picard D, Perricaudet M, Favaudon V, Jeggo P. 2002. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Molecular and Cell Biology* **22**: 4020 – 4032.
- Franken NP**, Cate RT, Bree CV, Haveman J. 2004. Induction of the early response protein EGR-1 in human tumour cells after ionizing radiation is correlated with a reduction of repair of lethal lesions and an increase of repair of sublethal lesions. *International Journal of Oncology* **24**: 1027-1031.
- Frankenberg-Schwager M**, Ruis C, Wolf H. 2001. Double-strand breaks formed as intermediates during DNA crosslink processing are rejoined by homologous recombination.

Proceedings des 10. Symposiums, Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie, Band 10: 33-36.

Gajdusek C, Onoda K, London S, Johnson M, Morrison R, Mayberg M. 2001. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium. *Journal of Cell Physiology* 188: 8 – 23.

Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK. 2000a. Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Research* 60: 3299 – 3304.

Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K. 2000b. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nature Genetics* 25: 115 –119.

Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK. 2001. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phosphor-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 276: 17276 – 17280.

Ghosh JC, Izumida Y, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. 2000. Dose-dependent biphasic accumulation of TP53 protein in normal human embryo cells after X-irradiation. *Radiation Research* 153: 305 – 311.

Girinsky TA, Pallardy M, Comoy E, Benassi T, Roger R, Ganem G, Cosset JM, Socie G, Magdelenat H. 1994. Peripheral blood corticotropin – releasing factor, adrenocorticotrophic hormone and cytokine (interleukin beta, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha) levels after high- and low-dose total-body irradiation in humans. *Radiation Research* 139: 360 – 363.

Grace MB, McLeland CB, Blakely WF. 2002. Real-time quantitative RT-PCR assay of GADD45 gene expression changes as a biomarker for radiation biodosimetry. *International Journal of Radiation Biology* 78 (11): 1011-1021.

Grewal T, Enrich C. 2006. Molecular mechanisms involved in Ras inactivation: the annexin A6-p120GAP complex. *Bioessays* 28 (12): 1211-20.

Gupta A, Sharma GG, Young CS, Agarwal M, Smith ER, Paull TT, Lucchesi JC, Khanna KK, Ludwig T, Pandita TK. 2005. Involvement of human MOF in ATM function. *Molecular Cell Biology* 25: 5292 – 5305.

- Haase MG**, Klawitter A, Geyer P, Alheit H, Baumann M, Kriegel TM, Kasper M, Baretton GB. 2003. Sustained elevation of NF-kappaB DNA binding activity in radiation-induced lung damage in rats. *International Journal of Radiation Biology* 79: 863 – 877.
- Hall EJ**, Giaccia AJ. 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins 6. ISBN-13: 978-0-7817-4151-4.
- Hallahan DE**, Dunphy E, Virudachalam S, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR. 1995. c-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (51): 30303-30309.
- Hayashi T**, Kusunoki Y, Hakoda M, Morishita Y, Kubo Y, Maki M, Kasagi F, Kodama K, Macphee DG, Kyoizumi S. 2003. Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *International Journal of Radiation Biology* 79: 129 – 136.
- Heminger K**, Jain V, Kadakia M, Dwarakanath B, Berberich S. 2006. Altered gene expression induced by ionizing radiation and glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose in a human glioma cell line. *Cancer Biology & Therapy* 5 (7): 815-823.
- Herrmann T**, Baumann M. 1997. *Klinische Strahlenbiologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, (3).
- Hirao A**, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. 2000. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287: 1824 – 1827.
- Jen YK**, Cheung VG. 2007. Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Genome Research* 13: 2092-2100.
- Ju GZ**, Wang XM, Fu SB, Liu SZ. 2003. Effect of ionizing radiation on the expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes and splenocytes. *Biomedical and Environmental Sciences* 16: 47 – 52.
- Kanda R**. 2000. Improvement of accuracy of chromosome aberration analysis for biological radiation dosimetry. *Journal of Radiation Research* 41: 1-8.
- Kang CM**, Park KP, Song JE, Jeung DI, Cho CK, Kim TH, Sangwoo B, Lee SJ, Lee YS. 2003. Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. *Radiation Research* 159: 312-319.

- Kang J**, Ferguson D, Song H, Bassing C, Eckersdorff M, Alt FW, Xu Y. 2005. Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression. *Molecular Cell Biology* 25: 661 – 670.
- Kasid U**, Suy S, Dent P, Ray S, Whiteside TL, Sturgill TW. 1996. Activation of Raf by ionizing radiation. *Nature* 382: 813 – 816.
- Khanna KK**, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. 1998. ATM associates with and phosphorylates p53: Mapping the region of interaction. *Nature Genetics* 20: 398 – 400.
- Kim BC**, Shon BS, Ryoo YW, Kim SP, Lee KS. 2001. Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 26: 194 – 200.
- Kim KM**, Zhang Y, Kim BY, Jeong SJ, Lee SA, Kim GD, Dritschilo A, Jung M. 2004. The p65 subunit of nuclear factor-kappaB is a molecular target for radiation sensitization of human squamous carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 693 – 698.
- Kim KU**, Xiao J, Ni HT, Cho KH, Spellman SR, Low WC, Hall WA. 2003. Changes in expression of transferrin, insulin-like growth factor 1 and interleukin 4 receptors after irradiation of cells of primary malignant brain tumor cell lines. *Radiation Research* 160: 224 – 231.
- King ICL**, Sartorelli AC. 1986. The relationship between epidermal growth factor receptors and the terminal differentiation of A431 carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 140 (3): 837-843.
- Kitagawa R**, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB. 2004. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes and Development* 18: 1423 – 1438.
- Kool J**, Hamdi M, Cornelissen-Steijger P, van der Eb AJ, Terleth C, van Dam H. 2003. Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAP kinases and ATF-2. *Oncogene* 22: 4235 – 4242.
- Kulms D**, Düßmann H, Pöppelmann B, Ständer S, Schwarz A, Schwarz T. 2002. Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death and Differentiation* 9: 598-608.
- Lee JS**, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. 2000. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404: 201 – 204.

- Lee SA, Dritschilo A, Jung M.** 2001. Role of ATM in oxidative stress-mediated c-Jun phosphorylation in response to ionizing radiation and CdCl₂. *Journal of Biological Chemistry* **276**:11783 – 11790.
- Lee SJ, Dimtchev A, Lavin MF, Dritschilo A, Jung M.** 1998b. A novel ionizing radiation-induced signaling pathway that activates the transcription factor NF-kappaB. *Oncogene* **17**: 1821 – 1826.
- Li J, Li Q, Xie C, Zhou H, Wang Y, Zhang N, Shao H, Chan SC, Peng X, Lin SC, Han J.** 2004. β -Actin is required for mitochondria clustering and ROS generation in TNF-induced, caspase-independent cell death. *Journal of Cell Science* **117**: 4673-4680.
- Li S, Chen PL, Subramanian T, Chinnadurai G, Tomlinson G, Osborne CK, Sharp ZD, Lee WH.** 1999. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 11334 – 11338.
- Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH.** 2000. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* **406**: 210 – 215.
- Linz U.** 1983. Chemische und Biologische Folgen des Radioaktiven Zerfalls von Iod-125 in Plasmid-DNA. *Berichte der Kernforschungsanlage Jülich*, 1868.
- Lloyd DC.** 1998. New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiation Protection Dosimetry* **77** (1/2): 33-36.
- Lou Z, Chini CC, Minter-Dykhouse K, Chen J.** 2003a. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates BRCA1 localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 13599 – 13602.
- Louagie H, Van Eijkeren M, Philippe J, Thierens H, Ridder L.** 1999. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *International Journal of Radiation Biology* **75** (6): 767-771.
- Lu X, de la Pena L, Barker C, Camphausen K, Tofilon PJ.** 2006. Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes. *Cancer Research* **66**: 1052 – 1061.
- Lundin C, Erixon K, Arnaudeau C, Schultz N, Jenssen D, Meuth M, Helleday T.** 2002. Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 5869-5878.

- Ma ZC**, Tan HL, Xiao CR, Wang YG, Wang SQ, Gao Y. 2007. Proteomic analysis of the effects of tetramethylpyrazine on irradiated QXMSC1 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **30** (2): 397-402.
- Mahmoud-Ahmed AS**, Atkinson S, Wong CS. 2006. Early gene expression profile in mouse brain after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research* **165**: 142-154.
- Marchetti F**, Coleman MA, Jones IM, Wyrobek AJ. 2006. Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* **82** (9): 605-639.
- Martin M**, Vozenin MC, Gault N, Crechet F, Pfarr CM, Lefaix JL. 1997. Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation. *Oncogene* **15**: 981 – 989.
- Masson JY**, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC. 2001. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Development* **15**: 3296-3307.
- Meyer RJ**, Ciechanover A, Rechsteiner M. 2005. Protein degradation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN-10: 3-527-30837-7.
- Mayo MS**, Gajewski BJ, Morris JS. 2006. Some statistical issues in microarray gene expression data. *Radiation Research* **165**: 745-748.
- Menard C**, Johann D, Lowenthal M, Muanza T, Sproull M, Ross S, Gulley J, Petricoin E, Coleman CN, Whiteley G, Liotta L, Camphausen K. 2006. Discovering clinical biomarkers of ionizing radiation exposure with serum proteomic analysis. *Cancer Research* **66**:1844 – 1850.
- Mendrysa SM**, McElwee MK, Michalowski J, O'Leary KA, Young KM, Perry ME. 2003. MDM2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing radiation. *Molecular and Cellular Biology* **23** (2): 462-473.
- Nobes CD**, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. 1998. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structure and loss of cell adhesion. *The Journal of Cell Biology* **141** (1): 187-197.
- Nyström T**. 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The European Molecular Biology Organization Journal* **24**: 1311-1317.

- Park EC**, Yoon JB, Seong JS, Choi KS, Kong ES, Kim YJ, Park YM, Park EM. 2006. Effect of ionizing radiation on rat tissue: Proteomic and biochemical analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 36: 19 – 35.
- Park JE**, Lee DH, Lee JA, Park SG, Kim NS, Park BC, Cho S. 2005. Annexin A3 is a potential angiogenic mediator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 (4): 1283-1287.
- Peng A**, Chen PL. 2005. NFB1/Mdc1 mediates ATR-dependent DNA damage response. *Cancer Research* 65: 1158 – 1163.
- Peterson CL**, Côté J. 2007. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes and Development* 18: 602-616.
- Piljic A**, Schultz C. 2006. Annexin A4 self-association modulates general membrane protein mobility in living cells. *Molecular Biology of the Cell* 17 (7): 3318-28.
- Powel SN**. 2005. The roles of BRCA1 and BRCA2 in the cellular response to ionizing radiation. *Radiation Research* 163: 691-708.
- Rechsteiner M**, Rogers SW. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 267-271.
- Rieger KE**, Gilbert C. 2004. Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells. *Nucleic Acids Research* 32 (16): 4786-4803.
- Rogakou EP**, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* 273: 5858 – 5868.
- Savitsky K**, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268 (5218): 1749-53.
- Savoldi-Barbosa M**, Sakamoto-Hojo ET. 2001. Influence of interferon- γ on radiation induced apoptosis in normal and ataxia-telangiectasia fibroblast cell lines. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 21: 417-429.
- Schneeweiss FHA**, Tisljar-Lentulis G, Hausteiner K, Feinendegen LE. 1987. Periodical pattern of kinetics of DNA strand break repair following γ -irradiation of human T1-cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 52 (3): 491-493.

- Schneeweiss FHA**, Sharan RN. 1998. Poly-ADP-ribosylation of proteins responds to cellular perturbations. *Recent Aspects of Cellular and Applied Radiobiology - FZJ - Bilateral Seminars of the International Bureau* **30**: 62-73.
- Scully R**, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. 1997. Dynamic changes of BRCA1 sub-nuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* **90**: 425 – 435.
- Shan B**, Xu J, Zhuo Y, Morris CA, Morris GF. 2003. Induction of p53-dependent activation of the human proliferating cell nuclear antigen gene in chromatin by ionizing radiation. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 44009 – 44017.
- Siliciano JD**, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. 1997. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes and Development* **11**: 3471 – 3481.
- Sreekumar A**, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, Chinnaiyan AM. 2001. Profiling of cancer cells using protein microarrays: Discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Research* **61**: 7585 – 7593.
- Stadtman ER**, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25** (3-4): 207-218.
- Stewart GS**, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. 2003. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* **421**: 961 – 966.
- St Onge RP**, Besley BD, Park M, Casselman R, Davey S. 2001. DNA damage-dependent and -independent phosphorylation of the Had9 checkpoint protein. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 41898 – 41905.
- Streffler C**. 1969. *Strahlen-Biochemie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Sturla LM**, Amorino G, Alexander MS, Mikkelsen RB, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. 2005. Requirement of Tyr-992 and Tyr-1173 in phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by ionizing radiation and modulation by SHP2. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 14597 – 14604.
- Sun Y**, Tran BN, Worley LA, Delston RB, Harbour JW. 2005. Functional analysis of the p53 pathway in response to ionizing radiation in uveal melanoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **46**: 1561 – 1564.

- Szkanderova S**, Vavrova J, Hernychova L, Neubauerova V, Lenco J, Stulik J. 2005. Proteome alterations in gamma-irradiated human T-lymphocyte leukemia cells. *Radiation Research* **163**: 307-315.
- Tamulevicius P**, Minli W, Iliakis G. 2007. Homology-directed-repair is required for the development of radioresistance during S phase: interplay between double-strand break repair and checkpoint response. *Radiation Research* **167**: 1-11.
- Tapio S**, Danescu-Mayer J, Asmuss M, Posch A, Gomolka M, Hornhardt S. 2005. Combined effects of gamma radiation and arsenite on the proteome of human TK6 lymphoblastoid cells. *Mutation Research* **581**: 141 – 152.
- Tibbetts RS**, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT. 2000. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes and Development* **14**: 2989 – 3002.
- Todd DG**, Mikkelsen RB, Rorrer WK, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. 1999. Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ERBB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* **19**: 885 – 908.
- Turtoi A**, Schneeweiss FHA. 2007. Frühzeitige Reaktionen lymphozytärer Proteine nach γ -Bestrahlung und deren Dosisabhängigkeit – Modell für Biodosimetrie. *Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie* **16**: 17-21.
- Turtoi A**, Srivastava A, Sharan RN, Oskamp D, Hille R, Schneeweiss FHA. 2007. Early response of lymphocyte proteins after γ -radiation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **274** (2), 435-439.
- Turtoi A**, Brown I, Oskamp D, Schneeweiss FHA. 2008. Early gene expression in human lymphocytes after γ -radiation – a genetic pattern with potential for biodosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, *in press*.
- Van't Veer LJ**, Lutz PM, Isselbacher KJ, Bernards R. 1992. Structure and expression of major histocompatibility complex-binding protein 2, a 275 kDa zinc finger protein that binds to an enhancer of major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 8971-8975.

- Volkmer E**, Karnitz LM. 1999. Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1, hus1, and rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 567 – 570.
- Vozenin-Brotans MC**, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, Lasser P, Lusinchi A, Deutsch E, Girinsky T, Aigueperse J, Bourhis J, Mathe D. 2004. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiation Research* **161**: 299-311.
- Wang B**, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ. 2002. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* **298**: 1435 –1438.
- Wang B**, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, Elledge SJ. 2007. Abrax and RAP80 form BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* **316**: 1194-1198.
- Wang JL**, Sun Y, Wu S. 2000. Gamma-irradiation induces matrix metalloproteinase II expression in a p53-dependent manner. *Molecular Carcinogenesis* **27**: 252 – 258.
- Wang Z**, Wade P, Mandell KJ, Akyildiz A, Parkos CA, Mrsny RJ, Nusrat A. 2007. Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor Slug. *Oncogene* **26** (8): 1222-30.
- Waterman MJ**, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. 1998. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genetics* **19**: 175 – 178.
- Weizman N**, Shiloh Y, Barzilai A. 2003. Contribution of the ATM protein to maintaining cellular homeostasis evidenced by continuous activation of the AP-1 pathway in ATM-deficient brains. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 6741–6747.
- Xu X**, Stern DF. 2003. NFB1/KIAA0170 is a chromatin-associated protein involved in DNA damage signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 8795 – 8803.
- Xu X**, Stern DF. 2004. Establishment of a cell-free system to study the activation of Chk2. *Methods in Molecular Biology* **280**: 165 – 174.
- Yazdi PT**, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes and Development* **16**: 571 –582.
- Zhang B**, Su YP, Ai GP, Liu XH, Wang FC, Cheng TM. 2003. Differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated mouse intestinal epithelial cells by two-dimensional

electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *World Journal of Gastroenterology* **9**: 2726 – 2731.

Zhang B, Yongping S, Fengchao W, Guoping A, Yongjiang W. 2005. Identification of differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated rat intestinal epithelial IEC-6 cells by two-dimensional gel electrophoresis and matrix – assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **5**: 426 – 432.

Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F. 2004a. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* **24** (2): 708-18.

Zhang X, Succi J, Feng Z, Prithivirajasingh S, Story MD, Legerski RJ. 2004. Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Molecular Cell Biology* **24**: 9207 – 9220.

Zhou XY, Wang X, Hu B, Guan J, Iliakis G, Wang Y. 2002. An ATM-independent S-phase checkpoint response involves CHK1 pathway. *Cancer Research* **62**:1598 – 1603.

6 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1: Radiogene Schäden an der DNA (schematisch) (aus Herrmann und Baumann, 1997)._____ 9
- Abb. 2: Schematischer Überblick der wichtigsten strahlenempfindlichen physiologischen Prozesse und der Proteine, die in ihnen involviert sind._____15
- Abb. 3: Größenverteilung der isolierten Lymphozyten, gemessen mit dem CASY®-Counter; die Lymphozytenfraktion war durch zwei Hauptpeaks, die zwischen 6 und 10 µm im Durchmesser lagen, charakterisiert. _____ 41
- Abb. 4: Lymphozytäre Phosphoproteine, aufgetrennt in einem 12 %-igen 2D-PAGE-Gel mit pH-Bereich 3-10. Links befindet sich die unbestrahlte Kontrolle und rechts die bestrahlte Probe (2 Gy). 1P-14P deuten auf die Proteinspots, die eine mindestens 2-fache Konzentrationsänderung in der bestrahlten Probe gegenüber der Kontrolle zeigten ($P \leq 0,05$)._____ 43
- Abb. 5: Lymphozytäre Gesamtproteine, elektrophoretisch aufgetrennt in einem 12 %-igen 2D-PAGE-Gel (pH 3-10): Unbestrahlte Kontrolle links, bestrahlte Probe (2 Gy) rechts. Nr. 1-15 weisen auf die Proteinspots, die eine mindestens 2-fache Konzentrationsänderung in der bestrahlten gegenüber der unbestrahlten Kontrolle aufwiesen ($P \leq 0,05$). _____ 44
- Abb. 6: Das Nano-HPLC-Chromatogramm des Proteinspots 13P aus Abb. 2, erfasst mit dem Massenspektrometer QTrap2000® (AB) und ausgewertet mit Analyst 1.4® Software (AB). Die Ordinate repräsentiert die relative Intensität, während die Abszisse die Zeit (min) darstellt. Einzelne Peaks sind mit der jeweiligen Retentionszeit gekennzeichnet. _____ 47

- Abb. 7: MS-Spektrum des in Chromatogramm (Abb. 5) markierten Bereichs; auf der Abszisse ist das Masse / Ladungsverhältnis (m/z) abgebildet. _____ **48**
- Abb. 8: „Enhanced-Resolution“-Spektrum des Isotopenverteilungsmusters des in Abb. 6 markierten Peptids (m/z 566,5) _____ **49**
- Abb. 9: Das MS/MS-Spektrum des in der Abb. 6 markierten Peptids. Die Abstände zwischen zwei MS-Peaks entsprechen der Masse einer bestimmten Aminosäure (AS). Aus diesen Informationen wurde folgende AS-Sequenz des fragmentierten Peptids ermittelt: **AEPKIEAFR** _____ **49**
- Abb. 10: Die Aminosäuresequenz der Phosphoglyceratkinase-1 (Protein Spot Nr. 13P in Abb. 3), das mit einer MS/MS-Sequenzwiederfindung von 28 % identifiziert wurde. Das rotmarkierte Peptid entspricht dem in Abb. 8 dargestellten MS/MS-Spektrum. Die blaumarkierten Peptide sind ebenfalls mit MS/MS identifiziert worden (hier nicht gezeigt). _____ **50**
- Abb. 11: Elektropherogramm einer lymphozytären RNA-Probe, aufgenommen mit dem Bioanalyser®-System. _____ **52**
- Abb. 12: Relative Genexpressionen von Annexin-A6, β -Actin, Talin-2 und PGK1, gemessen mittels RT-qPCR als Funktion steigender γ -Strahlendosen. _____ **54**
- Abb. 13: Relative Genexpression von RND1 und dessen Dosisabhängigkeit nach Exposition mit γ -Strahlen (Dosis: 1, 2 und 4 Gy) _____ **55**
- Abb. 14: Relative Genexpressionen von DUSP8 und CDKN1A und deren dosisabhängige Veränderungen nach Exposition mit γ -Strahlen (Dosis: 1, 2 und 4 Gy) _____ **56**
- Abb. 15: Relative Genexpression von OCLN in Abhängigkeit steigender γ -Dosen _____ **56**
- Abb. 16: Relative Genexpression von IFNG und ISG20L1 nach Applikation steigender γ -Dosen (1, 2 und 4 Gy) _____ **57**

- Abb. 17: Relative Genexpression von SERHL2 in Abhängigkeit steigender γ -Dosen, gemessen mit der RT-qPCR. _____ 58
- Tabelle 1: G-Werte der primären γ -Radiolyseprodukten des Wassers. _____ 7
- Tabelle 2: Gesamtproteinuntersuchungen auf strahlenempfindliche Proteine – Übersicht der bisherigen Arbeiten
(^a) Anzahl der Stunden, die zwischen Bestrahlungs- und Analysenbeginn verstrichen sind.
* Im Durchschnitt erhaltene Gesamtdosis (nach entsprechender Fraktionierung) von 68 Patienten mit 18 verschiedenen Tumoren _____ 25
- Tabelle 3: Bezeichnungen der TaqMan™-Sonden (AB), die in den Genexpressionsuntersuchungen mittels RT-qPCR verwendet worden sind. Für genaue Angaben zur jeweiligen Gen-Splice-Variante und den zugehörigen cDNA-Sequenzen siehe: www.appliedbiosystems.com. _____ 39
- Tabelle 4: Identifizierte ERPRO (Early Response Proteins) menschlicher Lymphozyten und deren dosisabhängige relative Proteinkonzentration (RP) nach Exposition mit γ -Strahlen (Dosis: 1, 2 und 4 Gy). Die Proteine 2P bis 14P sind Phosphoproteine. Die \pm -Schwankungen repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes aus drei unabhängigen Messungen. *Drei separate Spots sind auf Grund der massenspektrometrischen Identifizierung dem gleichen Protein zugeordnet worden (mit der gleichen Masse), wiesen aber auf dem Gel unterschiedliche pI-Werte auf. _____ 51
- Tabelle 5: Ergebnisse der relativen Proteinexpression (RP) aus 2D-PAGE-Untersuchungen. Die Werte V1-V3 stellen drei biologische Replikate dar, und P ist die Signifikanz im Vergleich zu den Kontrollen, errechnet mit zweiseitigem Student's t-Test für zwei unabhängige Beobachtungen mit gleicher Varianz. _____ 93

Tabelle 6: Einzelergebnisse der relativen Genexpression (GE) aus RT-qPCR Untersuchungen; die Werten V1-V3 stellen drei biologische Replikate dar. _____ **94**

Tabelle 7: Statistische Auswertung der aus der Tabelle 2 stammenden Daten: GE ist der Mittelwert der relativen Genexpression, SD die Standardabweichung des Mittelwertes und P die Signifikanz gegenüber den Kontrollen, errechnet mit zweiseitigem Student's t-Test für zwei unabhängige Beobachtungen mit gleicher Varianz. _____ **95**

Tabelle 8: Auswahl der in der Tabelle 4 aufgeführten Proteine, die eine PEST-Sequenz aufweisen.

Die Sequenz befindet sich nah an dem (*) C- oder (**) N-Terminus.

Berechnungen wurden mit der auf der EMBnet AUSTRIA Webseiten[†] befindlichen Software durchgeführt:

[†] <https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>. **96**

7 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alcoholdehydrogenase
APE1	Apurinic/Apyrimidinic-Endonuclease
ATM	Ataxia Telangiectasia
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related
BAX	Bcl2-Associated X-Protein
BBC3	BCL2-Binding Component-3
BCL2	B-Cell Leukemia/Lymphoma-2-Protein
BER	Base Excision Repair
BRCA1	Breast Cancer Protein-1
53BP1	Tumor Protein p53 Binding Protein-1
CDC25A	Cell Division Cycle-25 Homologue-A
CDK	Cycline Dependent Kinase
CDKN1A	Cycline Dependent Kinase Inhibitor 1 A
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CHK	Checkpoint Homolog
c-JUN	JUN-Oncogen
DNA-PK	DNA-Dependent Protein Kinase
DUSP8	Dual Specificity Phosphatase 8
DSB	Doppeltstrangbruch
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGR	Early Growth Response
EMS	Enhanced Mass Spektrum
ENO	Enolase
ER	Enhanced Resolution
ERBB4	v-ERB-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homologue
ERK	Extracellular Regulated MAP Kinase
ERPRO	Early Response Protein
ESI	Elektrospray Ionisation

ESB	Einzelstrangbruch
FAS	TNF-Receptor Superfamily Member-6
FBP1	Fructose-1,6-Bisphosphatase-1
FEN1	Flap Endonuclease
FISH	Fluoreszenz <i>In-Situ</i> Hybridisierung
FLIP	CASP8 FADD-Like Apoptosis Regulator Protein
c-FOS	c-FOS Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homologue
GADD45	Growth Arrest and DNA-Damage Inducible Protein-45
Gy	Gray
HIF1	Hypoxia Inducible Factor-1
HPLC	High Precision Liquid Chromatography
hSMG-1	PI-3 Kinase Related Kinase SMG-1
HWZ	Halbwertszeit
IAEA	International Atomic Energy Agency
IDA	Information Dependent Data Acquisition
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFNG	Interferon-Gamma
IL8	Interleukin-8
IL17E	Interleukin-17E
ILK	Integrin Linked Kinase
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
ISG20L1	Interferon-Stimulated Exonuclease Gene 20kDa – like 1
c-JUN	Avian Sarcoma Virus
KEN	Lysin, Glutaminsäure, Asparagin
LET	Linear Energy Transfer
MAP	Mitogen-Activated-Protein
MBP2	MHC-bindendes Protein 2
MDC1	Mediator of DNA Damage Checkpoint-1
MRN	MRE11-RAD50-NBS1-Protein Komplex
MDM2	Mouse Double Minute-2
MEK	MAP Kinase - ERK Kinase
MS	Massenspektrometer

NF- κ B	Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Enhancer in B-Cells
NHEJ	Non Homologous End Joining
OCLN	Occludin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP1	Poly ADP-Ribose Polymerase Family Member-1
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCK1	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-1
PEST	Prolin, Glutaminsäure, Serin, Threonin
PGK1	Phosphoglyceratkinase-1
pI	Isoelektrischer Punkt
PI3K	PI3K-ähnliche Proteinkinase
PRDX	Peroxiredoxin
RAD	RADIation Sensitivity
RAF1	v-RAF-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homologue-1
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene
RING	Really Interesting New Gene
RND1	Rho-family GTPase 1
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication Protein-A
RT-qPCR	Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERHL2	Serine Hydrolase-like 2
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Necrosis Factor
mTOR	FK506 Binding Protein-12 Rapamycin Associated Protein-1
XLJ	Nonhomologous End-Joining Factor 1
XRCC4	X-Ray Repair Cross Complementing Protein-4
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8 Anhang

Protein	RP 1 Gy / K			RP 2 Gy / K			RP 4 Gy / K				
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3	p (4 Gy/K)	
Talin-1	0.386	0.528	0.343	0.000	0.206	0.230	0.198	0.382	0.488	0.350	0.000
Talin-2	0.794	0.664	1.037	0.198	0.443	0.416	0.492	0.467	0.421	0.554	0.000
Peroxin-1	0.839	0.623	1.246	0.622	0.296	0.217	0.465	0.665	0.646	0.700	0.000
Mutant β -Actin	0.345	0.257	0.512	0.001	0.252	0.187	0.374	0.361	0.331	0.419	0.000
β -Actin	0.467	0.716	1.191	0.381	0.323	0.398	0.540	0.282	0.419	0.681	0.010
MBP2	0.940	1.302	0.822	0.890	1.624	1.484	1.886	2.487	2.304	2.832	0.001
Annexin-6	1.776	1.154	2.950	0.142	2.216	2.164	2.312	2.411	2.388	2.453	0.000
Zyxin-2	1.180	0.955	1.606	0.266	3.488	3.211	5.201	1.753	1.386	2.446	0.050
β -Actin	2.144	1.795	2.803	0.013	2.116	1.374	3.579	1.731	1.686	1.817	0.000
	1.205	1.439	1.133	0.049	3.507	4.030	5.415	0.931	1.124	1.493	0.330
	0.881	0.614	1.386	0.870	3.120	2.294	4.256	1.068	0.978	1.239	0.282
PGK-1	0.210	0.299	0.470	0.001	0.361	0.444	0.603	0.550	0.818	1.329	0.682
ILE-17E	0.867	0.634	1.307	0.762	3.377	3.064	3.969	2.063	1.815	2.531	0.006

Tabelle 5:

Ergebnisse der relativen Proteinkonzentration (RP) aus 2D-PAGE-Untersuchungen. Die Werte V1- V3 stellen drei biologische Replikate dar, und P ist die Signifikanz im Vergleich zu den Kontrollen, errechnet mit zweiseitigem Student's t-Test für zwei unabhängige Beobachtungen mit gleicher Varianz.

Gen	GE 1Gy / K			GE 2Gy / K			GE 4Gy / K		
	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V1	V2	V3
Annexin-A6	0,563	0,611	0,642	0,538	0,309	0,478	0,559	0,634	0,565
β - Actin	0,551	0,662	0,572	0,896	0,875	0,819	0,801	0,872	0,843
CDKN1A	2,759	3,354	2,681	4,217	3,873	4,471	6,471	5,798	7,193
DUSP8	1,865	1,637	2,003	2,466	2,310	2,137	3,718	4,048	3,709
IFNG	2,985	2,864	2,784	8,152	6,560	7,325	10,016	8,921	9,607
ISG20L1	4,280	5,097	4,508	2,906	3,298	4,244	3,362	4,497	6,756
OCLN	0,459	0,595	0,535	0,709	0,725	0,603	0,683	0,642	0,636
PGK1	0,809	1,038	0,945	0,785	0,574	0,607	0,735	1,082	0,916
RND1	3,763	5,522	4,170	4,109	4,487	3,764	6,349	8,610	4,274
SERHL2	0,647	0,763	0,576	0,678	0,511	0,656	0,866	0,694	0,776
Talin-2	0,969	0,815	1,214	0,823	1,095	0,979	0,711	1,183	1,310

Tabelle 6:
 Einzelergebnisse der relativen Genexpression (GE) aus RT-qPCR Untersuchungen; die Werte V1-V3 stellen drei biologische Replikate dar.

Gen	GE 1 Gy/K			GE 2 Gy/K			GE 4 Gy/K		
	GE	SD	p (1Gy-K)	GE	SD	p (2Gy-K)	GE	SD	p (4Gy-K)
Annexin-A6	0,605	0,040	0,000	0,442	0,119	0,001	0,586	0,042	0,000
β - Actin	0,595	0,059	0,000	0,863	0,040	0,004	0,839	0,036	0,001
CDKN1A	2,931	0,368	0,001	4,187	0,300	0,000	6,487	0,698	0,000
DUSP8	1,835	0,185	0,001	2,304	0,165	0,000	3,825	0,193	0,000
IFNG	2,878	0,101	0,000	7,346	0,796	0,000	9,515	0,553	0,000
ISG20L1	4,628	0,422	0,000	3,483	0,688	0,003	4,872	1,728	0,018
OCLN	0,530	0,068	0,000	0,679	0,066	0,001	0,654	0,026	0,000
PGK1	0,931	0,115	0,356	0,655	0,114	0,006	0,911	0,174	0,425
RND1	4,485	0,921	0,002	4,120	0,362	0,000	6,411	2,169	0,012
SERHL2	0,662	0,094	0,003	0,615	0,091	0,002	0,779	0,086	0,011
Talin-2	0,999	0,201	0,996	0,966	0,136	0,686	1,068	0,316	0,728

Tabelle 7:

Statistische Auswertung der aus der Tabelle 2 stammenden Daten: GE ist der Mittelwert der relativen Genexpression, SD die Standardabweichung des Mittelwertes und P die Signifikanz gegenüber den Kontrollen, errechnet mit zweiseitigem Student's t-Test für zwei unabhängige Beobachtungen mit gleicher Varianz.

Protein	PEST-Sequenz	Score
Talin-1	419 HFGLGDEESTMLEDSVSPK 438	+ 5.80
Talin-2	422 RFGLGDEESTMLEESVSPK 441	+ 6.12
Peroxin-1	1100 HSSGSDDSA GDGECGLDQSLV SLEMSEILPDESK 1133	+ 7.16 *
MBP2	773 RPQLQPGPSLVSEESFSAIDSDK 796 840 KAPSPSETCDSEISEAPVSEWAPPGDGAESGGK 873 1516 KDGLQSGSSSFSSSLSPSSQDYPSVSPSSR 1545 1574 KESDELIDETASDMSMQSSSLPAGDGGQLEEEGK 1610 1906 HQFSDAEESDGEDGDDNDDDEDEDDDFDDQGDITPK 1941 2026 RLDIPSCMDEECMLPSESPSSPR 2048	+8.15 +13.68 +8.44 +13.82 +24.38 +6.55
Zyxin-2	51 RPDSEPPFPAPGAQR 65 70 RVGEIPPPPEDFLPPPLAGDGDDEAGALGGAFPPP PPPIEESFPAPLEEEIFPPPPPEEGGPEAPPPPQPR 149	+8.02 ** +16.08 **

Tabelle 8:

Auswahl der in der Tabelle 4 aufgeführten Proteine, die eine PEST-Sequenz aufweisen.

Die Sequenz befindet sich nah an dem (*) C- oder (**) N-Terminus.

Berechnungen wurden mit der auf der EMBnet AUSTRIA Webseiten† befindlichen Software durchgeführt:

† <https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>

Danksagung

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Rödel, Direktor des Instituts für Genetik der Technischen Universität Dresden, für die bereitwillige Übernahme des Referates sowie für seine zahlreichen Anregungen und wertvollen Hinweise. Für die freundliche Übernahme des Korreferates gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Baumann, Stellv. Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Technischen Universität Dresden.

In besonderer Weise bin ich Herrn Dr. Schneeweiß für die Stellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung sowie für immer wohlwollenden und fördernden Einsatz sowohl in wissenschaftlichen als auch in persönlichen Fragen dankbar.

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 978-3-89336-221-9
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 978-3-89336-245-5
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 978-3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 978-3-89336-272-1
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-337-7
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 978-3-89336-340-7
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 978-3-89336-344-5
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 978-3-89336-360-5
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 978-3-89336-364-3

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-379-7
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-380-3
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 978-3-89336-382-7
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chlorperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 978-3-89336-387-2
14. **Export von Proteinen mit Zwillingarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 978-3-89336-388-9
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-389-6
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-390-2
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-400-8
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 978-3-89336-407-7

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoine mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkemann (2005), 222 Seiten
ISBN: 978-3-89336-408-4

20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizierender und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 978-3-89336-412-1

21. **Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 978-3-89336-413-8

22. **Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-416-9

23. **Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 978-3-89336-420-6

24. **Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 978-3-89336-423-7

25. **Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 978-3-89336-424-4

26. **Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-427-5

27. **Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-439-8

28. **NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifizierender, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-441-1

29. **Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-442-8

30. **Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging**
Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System
by C. Lackas (2006), XX, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-451-0

31. **Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen**
Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I
von T. Stillger (2006), XIV, 146 Seiten
ISBN: 978-3-89336-457-2

32. **Echtzeitsystem für Phasenrücksetzanalysen und Neuro-Rückkopplungen am MEG**
von H. Rongen (2006), 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-461-9

33. **Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum***
von U. Sorger-Herrmann (2006), 117 Seiten
ISBN: 978-3-89336-466-4

34. **Enantioselective Reduction of Hydrophobic Keto Compounds in Multiphase Bioreactor**
by M. Villela Filho (2007), XVI, 196 pages
ISBN: 978-3-89336-470-1

35. **Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien**
von Michael Caspers (2007), 164 Seiten
ISBN: 978-3-89336-488-6

36. **Regulation der Phosphatmangelgene von *Corynebacterium glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS**
von S. Schaaf (2007), VI, 114 Seiten
ISBN: 978-3-89336-496-1

37. **Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten**
von R. Bujnicki (2007), II, VIII, 163 Seiten
ISBN: 978-3-89336-498-5

38. **Metabolic Engineering of the Valine Pathway in *Corynebacterium glutamicum* – Analysis and Modelling**
by Jørgen Barsett Magnus (2007), XIX, 178 pages
ISBN: 978-3-89336-499-2
39. **Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene**
Verwendung als chirale Synthesebausteine und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen Produktpalette um einen Aminoalkohol
von V. Lorbach (2007), 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-500-5
40. **Untersuchung frühzeitiger Reaktionen lymphozytärer Proteine auf γ -Bestrahlung humanen Vollbluts und deren Dosisabhängigkeit**
Voraussetzung für die Entwicklung eines individuellen strahlenbiologischen Dosimeters
von A. Turtoi (2007), 97 Seiten
ISBN: 978-3-89336-502-9

Andrei Turtoi, geboren am 15. August 1980 in Vrsac, Serbien, besuchte zunächst das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Vrsac und anschließend in Pune (Indien) das Mahindra United World College, wo er sein Abitur 1999 ablegte. Seit 2000 studierte er Chemieingenieurwesen an der Fachhochschule Aachen/Abtlg. Jülich, wo er 2003 als Bachelor und 2004 als Diplomingenieur im Fachgebiet Strahlenbiologie graduierte (Durchführung der experimentellen Arbeiten im Labor für Strahlenbiologie des Forschungszentrums Jülich, Leiter : Dr. F. Schneeweiß). Anfang 2005 begann er in diesem Labor seine Promotionsarbeit unter Betreuung von Dr. Schneeweiß. Er wurde Anfang 2008 an der TU-Dresden im Fachgebiet Biologie zum Dr. rer. nat. promoviert (Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Rödel, Direktor des Instituts für Genetik der TU Dresden).

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 40
ISBN 978-3-89336-502-9

Lebenswissenschaften
Life Sciences