

Lehrstuhl für Strahlentherapie und medizinische Onkologie
des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

**Untersuchung der Genexpression
apoptotischer und mikrokernbildender Prozesse**

Sylvia Doleschel

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Abend
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 11.05.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 24.03.2010 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	III
Verzeichnis der in dieser Arbeit differentiell exprimierten Gene	VI
1 Einleitung	1
2 Stand des Wissens	3
2.1 Zelltodesformen	3
2.1.1 Apoptose	3
2.1.1.1 Definition	3
2.1.1.2 Morphologie	3
2.1.1.3 Signaltransduktion	4
2.1.2 Bildung mikrokernhaltiger Zellen	5
2.1.2.1 Definition und Entstehung der mikrokernhaltigen Zellen	5
2.1.2.2 Morphologie	5
2.1.2.3 Signaltransduktion	6
2.2 Zelllinie und Stressor	6
2.2.1 Zelllinie	6
2.2.2 Stressor	7
3 Material und Methoden	9
3.1 Vorarbeiten	9
3.1.1 Vorbereitung und Behandlung der Zellen	9
3.1.2 Aufbereitung und Weiterverarbeitung der behandelten Zellen	10
3.1.3 Der Atlas™ Mouse 1.2 Array (Clontech)	11
3.2 Auswertung	11
3.2.1 Digitalisierung	12
3.2.2 Ermittlung des Normalisierungsfaktors der digitalisierten Arrays	13
3.2.3 Ausrichtung der Auswertungsmaske an die hybridisierte Nylon-Membran	16
3.2.4 Datenanalyse I	17
3.2.4.1 Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität	19
3.2.4.2 Berechnung der differentiellen Genexpression unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität	21
3.2.5 Datenanalyse II	22
3.2.5.1 Selektion von Genen und graphische Darstellung	22
3.2.5.2 Plausibilitätskontrolle durch semiquantitativen optischen Vergleich	22
4 Ergebnisse	26
4.1 Selektion geeigneter Datensätze und Normalisierung	26
4.1.1 Selektion	26
4.1.2 Normalisierung	30
4.1.3 Einfluss der AUG (Areale mit undefinierten Grauwerten) auf die Gesamtgenexpression	32
4.2 Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität	33
4.3 Optische Überprüfung der Ergebnisse	34
4.4 Datenauswertung	37
4.4.1 Untersuchung der Anzahl exprimierter/differentiell exprimierter Gene gegen die Zeit	37

4.4.2	Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26	38
4.4.3	Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 unter Berücksichtigung der funktionellen Hauptgruppen A-F	44
4.4.4	Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 in Abhängigkeit von ihrer Zugehörigkeit zu einer der funktionellen 38 Subgruppen	45
5	Diskussion	51
5.1	Vor- und Nachteile des Verfahrens und seiner Auswirkungen auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit	51
5.2	Genexpression relativ zur VM-26 Konzentration	53
5.3	Vergleich der Mikrokernbildung nach VM-26 (L929-Zellen) und nach ionisierenden Strahlen (L929- und MCF-7-Zellen)	57
5.3.1	Vergleich mit der Genexpression von L929-Zellen nach ionisierender Strahlung	58
5.3.2	Vergleich mit der Genexpression von MCF-7-Zellen nach ionisierender Strahlung	59
5.3.3	Vergleich mit der Genexpression von L929- und MCF-7-Zellen nach ionisierender Strahlung	59
6	Zusammenfassung/Ausblick	61
7	Literatur	62
8	Anhang	72
	Danksagung	101
	Lebenslauf	102

Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Einheit	Beschreibung
A ₁₋₁₀	mm ²	Fläche der Messfenster 1 bis 10
A _{AUG}	mm ²	Fläche der Signale außerhalb des lineardynamischen Bereichs
Abb.		Abbildung
A _G	mm ²	Gesamtfläche
ATM		Signaltransduktionsweg: Ataxia telangiectasia-mutated-Rad3-related DNA damage checkpoint signaling pathway
AUG		Areal mit undefiniertem Grauwert
Bak		Der „Bcl-2-antagonist/killer 1“ ist proapoptotisch.
Bax		Das „Bcl-2-associated X protein“ gehört der Bcl-2 Genfamilie an.
Bcl-2		Proteinfamilie: Bcl-2 (Abk. für engl. B-cell lymphoma 2) ist ein Protein und der Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie, welche bei der Regulation des programmierten Zelltods (Apoptose) eine Rolle spielen.
Bit		Der Begriff Bit (binary digit) wird als Maßeinheit für die Datenmenge bei digitaler Speicherung von Daten. Die Datenmenge entspricht in diesem Fall der verwendeten Anzahl von binären Variablen zur Abbildung der Information, kann also nur als ganzzahliges Vielfaches von 1 Bit angegeben werden.
Bnip3l		BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like
bspw.		beispielsweise
bzw.		beziehungsweise
C3H/An		"congenic mouse" – Maus, die sich an einem bestimmten Gen-Lokus von einer bestimmten Mäuselinie unterscheidet.
Cdh5		cadherin 5
cDNA		cDNA (von eng. complementary DNA) ist eine DNA, die mittels des Enzyms reverse Transkriptase synthetisiert wird.
c-myc		(myelocytomatosis oncogene) c-myc ist ein Protein, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression einer großen Anzahl von Genen aktiviert.
CNT		Counts: Maßeinheit zur Angabe eines Grauwertes. 0 CNT wurde ein weißer Pixel zugeordnet, dem Maximalwert von 65.535 CNT (= 216 - 1 CNT) ein schwarzer Pixel.
DNA		Desoxyribonukleinsäure (von engl. deoxyribonucleic acid)
E2F		Familie aus Transkriptionsfaktoren, die bis zu 5% aller Gene regulieren.
E _{AUG}	CNT	Ausgleichsgrauwert für Signale außerhalb des lineardynamischen Bereichs
e _{dif}		differentielle Genexpression (= e _{G2} '' : e _{G1} '')
E _G	CNT	Gesamtgenexpression
E _G '	CNT	Gesamtgenexpression nach Ausgleich der Signale außerhalb des lineardynamischen Bereichs
e _{G1} / e _{G2}	CNT/mm ²	Grauwert eines Gens in Array 1/Array 2 zweier zu vergleichender Arrays
e _{G1} ' / e _{G2} '	CNT/mm ²	relativer Grauwert eines Gens in Array 1/Array 2 zweier zu vergleichender Arrays nach Abzug des Hintergrundgrauwerts
e _{G1} '' / e _{G2} ''	CNT/mm ²	angeglichener Grauwert eines Gens in Array 1/Array 2 zweier zu vergleichender Arrays nach Abzug des Hintergrundgrauwerts und des Hintergrundschwellenwerts
e _H	CNT/mm ²	mittlerer Grauwert Hintergrund
E _H	CNT	Gesamtexpression Hintergrund
E _{H1} - E _{H10}	CNT	Grauwerte der Messfenster 1 bis 10
e _{H1} / e _{H2}	CNT/mm ²	mittlere Grauwerte des Hintergrunds bei den zu vergleichenden Arrays 1 und 2
e _{Hmax}	CNT/mm ²	größerer, mittlerer Grauwert des Hintergrunds bei zwei zu vergleichenden Arrays
engl.		Englisch
ER		Endoplasmatisches Retikulum
E _Σ	CNT	Summengrauwert des Arrays
Fas-Rezeptor		Bindungsstelle für den FAS-Ligand der natürlichen Killerzellen zur Einleitung der Apoptose (Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie).

Abkürzung	Einheit	Beschreibung
F _H		Faktor zur Definition des Hintergrundschwellenwertes, für die weitere Berechnung in der Doktorarbeit auf 5 festgelegt.
G2-Phase		Phase des Zellzyklus: G2-Phase (für engl. gap: Lücke, Abstand), prämitotische Phase oder Postsynthesephase.
h		Stunden
L929 Zellen		Mäusefibroblasten, adhärent wachsend
MAA-Assay		morphologische fluoreszenzmikroskopische Untersuchung auf mikrokernhaltige, apoptotische und abnormale Zellen
MAP-Kinasen		Die MAP-Kinasen (MAP-K, MAP, engl. mitogen-activated protein) sind kleine Proteinkinasen und werden in drei Gruppen aufgeteilt: - die extracellular signal-related kinases mit den Isoformen ERK-1 und ERK-2 - die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase - die c-Jun-N-terminalen Kinasen JNK Sie sind Teil eines mehrstufigen Signaltransduktionsweges
MAQ		von engl. microarray quality control (MAQ)
MCF-7		Humane Mammacarcinomzellen, adhärent wachsend
Mcl1		myeloid cell leukemia sequence 1
MF		Messfenster
min		Minuten
mRNA		(von engl. messenger RNA), auch Boten-RNA
N _{2/1}		Normalisierungsfaktor
N _{2/1} '		Normalisierungsfaktor nach Ausgleich der Signale außerhalb des lineardynamischen Bereichs
NF _{κB}		(Nukleärer Faktor κB) ist ein wichtiger spezifischer Transkriptionsfaktor, der in praktisch allen Zelltypen und Geweben vorkommt. vgl. auch: Rela (v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A)
NO		Chemische Formel für "Nitric oxide" oder "nitrogen monoxide"
p53		Der Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind.
PKA		Die Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase) ist ein Schlüsselenzym im Energiestoffwechsel mit vielfältigen weiteren Funktionen
PKC		Die Proteinkinase C ist ein Enzym der Familie der Proteinkinasen.
Plagl2		pleiomorphic adenoma gene-like 2
pM		piko Mol. Bei einer Molare Masse von 656,655 g/mol entspricht 100 pM VM-26: 66 ng VM-26 und 5.000 pM VM-26: 3283 ng VM-26
R		Höhe der differentiellen Genexpression, welche als hoch- beziehungsweise als runterreguliert gilt. Für die weitere Berechnung in der Doktorarbeit auf 3 festgelegt.
Raf -Kinasen		Bei den Raf-Proteinen (rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma) handelt es sich um eine Familie von Proteinkinasen.
Ras -Kinasen		Ras (Rat sarcoma) ist ein Proto-Onkogen, das für ein sogenanntes kleines G-Protein (monomeres) codiert.
RNA		Ribonukleinsäure (von engl. ribonucleic acid)
ROI		Region of interest: Kleines Feld in der Ausrichtungsmaske der Software Atlas Image zum Bestimmen des Grauwertes eines Hybridisierungsproduktes
RTQ-PCR		Die Real-Time-quantitative-PCR (RTQ-PCR, auch Real Time Detection PCR, kurz RTD-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction - PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.
s _H	CNT/mm ²	Hintergrundschwellenwert
siRNA		Small interfering RNAs (siRNAs) sind 21-28 Nukleotide lange RNAs, die von der RNase III Dicer aus langen doppelsträngigen RNAs herausgeschnitten werden.
SNAP		Abkürzung für S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (ONSC(CH ₃) ₂ CH(NHAc)CO ₂ H)
S-Phase		Synthesephase des Zellzyklus
Tab.		Tabelle

Abkürzung	Einheit	Beschreibung
Tal1		T-cell acute lymphocytic leukemia 1, an der Hämatopoese beteiligt
Tgfb1		transforming growth factor, beta 1
TIFF		Das Tagged Image File Format ist ein Dateiformat zur Speicherung von Bilddaten.
TNF-alpha		"Tumor necrosis factor ligand superfamily member 2" (TNFSF2) ist ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems, welcher bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist.
TNF-Rezeptor		Tumornekrosefaktor-Rezeptor: seine Aktivierung führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen
TRAIL-Rezeptor		Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand ist ein für das Immunsystem wichtiges Protein. Es wird zu den Tumornekrosefaktoren gezählt. Seine Aufgabe ist es, Zielzellen zu inaktivieren, indem es Apoptose in der Zielzelle auslöst.
vgl. VM-26		vergleiche Topoisomerase-II-Hemmer (Teniposid, BristolMyersSquibb)

Verzeichnis der in dieser Arbeit differentiell exprimierten Gene

Gen ID (NCBI), offizielles Gen Kürzel und Gen Name

Gen Name	Gen Kürzel	Gen ID (NCBI)
3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	236539
activating transcription factor 4	Atf4	11911
amino-terminal enhancer of split	Aes	14797
basigin	Bsg	12215
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1, NIP3	Bnip3	12176
Bcl2-associated athanogene 1	Bag1	12017
biglycan	Bgn	12111
Braf transforming gene	Braf	109880
cadherin 1	Cdh1	12550
calmodulin 1	Calm1	12313
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	12912
catenin (cadherin associated protein), delta 2	Ctnnd2	18163
cathepsin D	Ctsd	13033
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2	17684
chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	20306
clusterin	Clu	12759
cofilin 1, non-muscle	Cfl1	12631
collagen, type VI, alpha 1	Col6a1	12833
colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2ra	12982
cryptochrome 1 (photolyase-like)	Cry1	12952
cyclin D1	Ccnd1	12443
cyclin D2	Ccnd2	12444
cyclin G1	Ccng1	12450
cyclin-dependent kinase 4	Cdk4	12567
cyclin-dependent kinase 5	Cdk5	12568
cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	Cdkn2d	12581
cystatin C	Cst3	13010
defender against cell death 1	Dad1	13135
DNA-damage inducible transcript 3	Ddit3	13198
dynein light chain LC8-type 1	Dynll1	56455
endoglin	Eng	13805
enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	Ezh2	14056
expressed in non-metastatic cells 2, protein	Nme2	18103

Gen Name	Gen Kürzel	Gen ID (NCBI)
ezrin	Ezr	22350
FBJ osteosarcoma oncogene B	Fosb	14282
fibronectin 1	Fn1	14268
frizzled homolog 7 (Drosophila)	Fzd7	14369
gene model 1840, (NCBI)	Gm1840	233995
gene model 1916, (NCBI)	Gm1916	383070
GLI-Kruppel family member GLI3	Gli3	14634
glutathione S-transferase, mu 2	Gstm2	14863
GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus	Gnas	14683
H6 homeo box 2	Hmx2	15372
heat shock protein 110	Hsp110	15505
heat shock protein 5	Hspa5	14828
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	Hsp90aa1	15519
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	Hsp90ab1	15516
hematopoietically expressed homeobox	Hhex	15242
high mobility group nucleosomal binding domain 1	Hmgn1	15312
inhibin beta-C	Inhbc	16325
inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2	Itpr2	16439
Jun oncogene	Jun	16476
kinesin family member 3B	Kif3b	16569
klotho	Kl	16591
laminin, alpha 2	Lama2	16773
laminin, gamma 1	Lamc1	226519
ligase III, DNA, ATP-dependent	Lig3	16882
microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	Mapre2	212307
minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)	Mcm5	17218
mitogen activated protein kinase 14	Mapk14	26416
mitogen activated protein kinase kinase 4	Map2k4	26398
mitogen activated protein kinase kinase kinase 3	Map3k3	26406
myelocytomatosis oncogene	Myc	17869
myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl1	17210
myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	Myl6	17904
neurofilament, light polypeptide	Nefl	18039
nibrin	Nbn	27354
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	18035
oxytocin receptor	Oxtr	18430

Gen Name	Gen Kürzel	Gen ID (NCBI)
pancreatic and duodenal homeobox1	Pdx1	18609
pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	Phlda1	21664
prion protein	Prnp	19122
proliferating cell nuclear antigen	Pena	18538
protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 2	Ppef2	19023
prothymosin alpha	Ptma	19231
proviral integration site 1	Pim1	18712
Purkinje cell protein 4	Pcp4	18546
RAB2A, member RAS oncogene family	Rab2a	59021
RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>)	Rad21	19357
RAS p21 protein activator 3	Rasa3	19414
retinoid X receptor alpha	Rxra	20181
ring finger protein 2	Rnf2	19821
S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	S100a10	20194
secreted phosphoprotein 1	Spp1	20750
sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	Sema5a	20356
sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5B	Sema5b	20357
sequestosome 1	Sqstm1	18412
short stature homeobox 2	Shox2	20429
SKI-like	Skil	20482
split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1	Shfm1	20422
stromal antigen 2	Stag2	20843
structure specific recognition protein 1	Ssrp1	20833
syntaxin 2	Stx2	13852
T-cell leukemia, homeobox 2	Tlx2	21909
THO complex 4	Thoc4	21681
thrombospondin 2	Thbs2	21826
thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2	11652
transcription elongation factor A (SII), 3	Tcea3	21401
transcription termination factor 1	Ttf1	22130
transducer of ErbB-2.1	Tob1	22057
transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	21803
tripartite motif protein 27	Trim27	19720
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Tnfaip3	21929
vascular endothelial growth factor A	Vegfa	22339

Gen Name	Gen Kürzel	Gen ID (NCBI)
vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	Vat1	26949
vimentin	Vim	22352
v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	Rela	19697
Y box protein 1	Ybx1	22608

1 Einleitung

Ziel jeder Strahlentherapie ist die Zerstörung von Tumorzellen. Noch vor drei Jahrzehnten wurde der strahleninduzierte Zelltod im Sinne eines **passiven** Geschehens verstanden: Die Zelle wird zerstört. Als morphologisches Korrelat entsteht die Nekrose. Im Gegensatz dazu versteht die moderne Radiobiologie den Schaden durch einen Stressor an einer Zelle als den Auslöser einer Reihe von **aktiven** zellgesteuerten Vorgängen, die unter anderem mit dem Tod der Zelle enden können (Cohen 1993, S. 126). Nachdem ein Stressor der Zelle einen Schaden zugefügt hat, versucht die Zelle zuerst mit Reparaturprogrammen diesen zu beheben. Ist das nicht möglich, können verschiedene Formen des Zelltodes wie z.B. Bildung mikrokernhaltiger Zellen, Apoptose oder bestimmte Formen der Nekrose eingeleitet werden. Dieses hat für das Gewebe vermutlich unterschiedliche Konsequenzen: Während mikrokernhaltige Zellen mit einer Restfunktion erhalten bleiben, jedoch nicht mehr teilungsfähig sind, muss bei der Apoptose die Reparatur durch Zellersatz erfolgen. Kommt es gar zur Nekrose, werden auch benachbarte Zellen durch die entstehende Entzündungsreaktion geschädigt (Leist und Jäätelä 2001, S. 589).

Die Apoptose kann als erste Form des Zelltodes verstanden werden, bei der eine aktive Beteiligung der Zelle nachgewiesen werden konnte (Ashwell 1994, S. 147; Majno 1995, S. 3; Abend und van Beuning 1998, S156). Im weiteren Verlauf der Forschung ergaben sich vermehrt Hinweise dafür, dass auch andere Arten des Zelltodes neben der Apoptose Bestandteil eines zellgesteuerten Vorgangs sein könnten (Abend et al. 1999, S. 1570; Banasiak et al. 2000, S. 215; Leist und Jäätelä 2001, S. 589). Von Portera-Cailliau et al. wurde 1997, Seite 70 das Apoptose-Nekrose-Kontinuum postuliert. Damit ist ein fließender Übergang zwischen den beiden Arten des Zelltodes Apoptose und Nekrose im Gegensatz zur strikten Trennung zwischen diesen gemeint (siehe auch Martin et al. 1998, S. 281; Zeiss 2003, S. 481; Matyja et al. 2005, S. 7). Als Zeichen der aktiven Steuerung durch die Zelle fanden sich außerdem Hinweise für die Beteiligung der Mitochondrien bei der Apoptose und der Nekrose (Trump et al. 1997, S. 82; Halestrap et al. 2000, S. 170; Nicotera 2002, S. 189) oder eine bestimmte, sich gleichende Art der DNA-Fragmentierung bei Apoptose und der Bildung mikrokernhaltiger Zellen (Walker et al. 1994, S. 100; 1995, S. 97; Walker und Sikorska 1997, S. 287; Abend et al. 1999, S. 1570).

Die Art des Zelltodes wird durch verschiedene Parameter bestimmt. Entscheidende Kriterien sind dabei: die Intensität des Stressors (Meier 2001, S. 101; Gonzalez et al. 2001, S. 657; Abend 2003, S. 932-933), die Art des Stressors (Ruemmele et al. 1999, S. 45; Sané und Bertrand 1999, S. 3565; Humphreys und Wilson 1999, S. 773) und die Zellpopulation, auf die der Stressor einwirkt (Rupnow und Knox 1999, S. 115; Schmitt und Lowe 1999, S. 127; Abend et al. 2000, S. 255; Steel 2001, S. 968). In der Regel werden durch einen Stressor bzw.

durch die Änderung der Intensität eines Stressors verschiedene Arten des Zelltodes in einer Zellpopulation induziert. Daher ist erst durch die Berücksichtigung der verschiedenen Arten des Zelltodes eine Abschätzung des Zellschadens möglich, wie zum Beispiel mit Hilfe des MAA-Assays. Dies ist eine morphologische fluoreszenzmikroskopische Untersuchung auf mikrokernhaltige, apoptotische und abnormale Zellen (MAA), wie z.B. Nekrose oder Mitosefehlerzellen (Abend et al. 2000, S. 257).

Eine Voraussetzung für solche morphologische Untersuchungen sind Mehrfachmessungen. Man erhält Ergebnisse erst zu einem späten Zeitpunkt, da bereits die morphologischen Veränderungen erfolgt sein müssen. Geht man allerdings davon aus, dass nach einem Schaden in der Zelle aktive Prozesse zum Zelltod führen, müssten diese Prozesse auf Genexpressionsebene kontrolliert werden. Deshalb wird versucht durch differentiell exprimierte Gene, einen Rückschluss auf die Schädigung der Zellpopulation zu erreichen. Da der Zelltod mittels verschiedener Wege der Signaltransduktion, dem zellinternen Kommunikationssystem, eingeleitet wird sind sowohl gemeinsame, als auch spezifische Veränderungen der verschiedenen Arten des Zelltodes auf Genexpressionsebene anzunehmen. So könnte man auf diesem Weg den zu erwartenden Zellschaden durch einen Stressor abschätzen.

Ziel dieser Arbeit war es, Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Entstehung mikrokernhaltiger und apoptotischer Prozesse auf Genexpressionsebene zu untersuchen. Hierzu wurden Mäusefibroblasten (L929 Zellen) in vitro mit einem handelsüblichen Chemotherapeutikum, einem Topoisomerase-II-Hemmer (Teniposid, VM-26, BristolMyersSquibb) in zwei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Bei einer niedrigen VM-26-Konzentration konnten ca. 30 % mikrokernhaltige Zellen induziert werden. Bei höheren Konzentrationen wurde die Apoptose eingeleitet, ohne dass jeweils eine andere Art des Zelltodes auftrat. Anhand dieses Modells wurde die Messung der differentiellen Genexpression von etwa 1200 unter besonders starker Transkriptionskontrolle stehenden Genen durchgeführt. Neben dieser Arbeit wurden weitere in vitro Untersuchungen an L929 und an MCF-7 Zellen im Rahmen anderer Dissertationen durchgeführt (Stäßen 2002, S. 1-113, Ruf 2007, S. 1-111). Daher konnte auch eine vergleichende Untersuchung der Genexpressionsänderung in Abhängigkeit von einem anderen Stressor durchgeführt werden. Diese Untersuchung ist im Diskussionsteil der Arbeit wiedergegeben.

Ziel der Arbeit war es:

- zwei unterschiedliche Arten des Zelltodes (Apoptose und Mikrokernbildung) auf Genexpressionsebene bezüglich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu untersuchen.
- die Genexpressionsänderung nach VM-26 mit strahleninduzierten Genexpressionsänderungen zu vergleichen (Kapitel 5 Diskussion).

2 Stand des Wissens

2.1 Zelltodesformen

2.1.1 Apoptose

2.1.1.1 Definition

Die Apoptose beschreibt ein bestimmtes morphologisches Bild des Zelltodes: Schrumpfung der Zelle, DNA-Kondensation entlang der Kernmembran, Knospenbildung des Zellkörpers und eine fehlende Entzündungsreaktion (Kerr et al. 1972, S. 239). Sie stellt eine aktive Form des Zelltodes dar, die nach einer Schädigung der Zelle durch diese eingeleitet wird. Entsprechende Stressoren können unter anderem sein: ionisierende Strahlung, chemische Substanzen, Verarmung an Wachstumsfaktoren, Hormone oder Virusinfektionen (Ashwell et al. 1994, S. 147; Isaacs 1994, S. 82; Majno und Joris 1995, S. 3).

Es wird vermutet, dass die Apoptose eine Zelltodesform ist, die das Fortbestehen des gesunden Gewebes durch die Elimination von geschädigten Zellen schützt. Sie hat daher eine große Bedeutung in der Onkogenese oder beispielsweise bei Virusinfektionen (Ashwell et al. 1994, S. 147; Isaacs 1994, S. 82). Außerdem ermöglicht sie die regelrechte Entwicklung dreidimensionaler Strukturen während der Embryonalentwicklung (Majno und Joris 1995, S. 3) und dient zum Erhalt der Homöostase als Gegenspieler zur Mitose (Kanduc et al. 2002, S. 165).

2.1.1.2 Morphologie

Der Begriff Apoptose beschreibt charakteristische morphologische Veränderungen der Zelle (siehe Abbildung 1).

Es entsteht zunächst eine Volumenreduktion der Zelle mit einem gleichzeitigen Verklumpen des Chromatins. Im weiteren Verlauf bildet das Zytoplasma Ausstülpungen aus. Dieser Vorgang wird auch Knospung oder „budding“ bezeichnet. Das verdichtete Chromatin konzentriert sich während dessen entlang der Kernmembran. Die abgeschnürten Ausstülpungen sind mit intakten Zellmembranen versehen und werden apoptotische

Körperchen genannt. In diesem Stadium ist eine Differenzierung zwischen den apoptotischen Körperchen und den Pyknosen des nekrotischen Zelltodes schwierig.

Apoptose betrifft vorwiegend einzelne Zellen oder in seltenen Fällen kleinere Zellcluster und geht charakteristischerweise ohne Auftreten einer Entzündungsreaktion vonstatten.

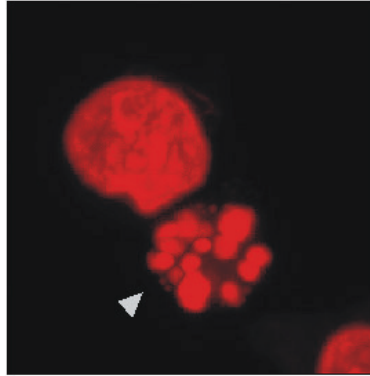


Abb. 1: Laserscanmikroskopische Darstellung eines normalen und eines apoptotischen Zellkerns (Pfeil).

2.1.1.3 Signaltransduktion

Apoptotische Prozesse werden durch viele verschiedene Signaltransduktionsmoleküle gesteuert (Schwartz und Osborne 1993, S. 582; Vaux 1993, S. 786-788). Hierzu gehören:

- Ceramide als Produkte des Sphingomyelinstoffwechsels (Obeid et al. 1993, S. 1769; Sawai et al. 1995, S. 27326),
- die Ras-, Raf-, MAP-Kinasen als Bestandteile zytoplasmal gelegener Signaltransduktionswege (Fernandez-Sarabia und Bischoff 1993, S. 274),
- Proteinkinase C bzw. A (PKC, PKA) (Fuks et al. 1995, S. 19; Ojeda et al. 1995, S. 389),
- Sauerstoffradikale (Buttke und Sandstrom 1994, S. 7; Slater et al. 1995, S. 59),
- energieverbrauchende Prozesse (poly-ADP-Ribosyl-Polymerase, PARP) (Moubarak et al. 2007, S. 4844),
- die Bcl₂-Proteinfamilie als protektive, Apoptose verhindernde und zum Teil auch aktivierende Mechanismen (Hockenbery et al. 1993, S. 241; Hockenbery 1995, S. 16),
- Caspasen (Kuida et al. 1995, S. 2000; Thornberry und Lazebnik 1998, S. 1312),
- „Todesrezeptoren“ (Fas-, TNF-, und TRAIL-Rezeptor) (Dragovich et al. 1998, S. 3207),
- p53 als Apoptose induzierendes Protein (Strasser et al. 1994, S. 329; Fukunaga-Johnson et al. 1995, S. 1761; Goetz und Montenahr 1995, S. 1129; Lee und Bernstein 1995, S. 149)
- und andere Transkriptionsfaktoren wie c-myc (Kerr et al. 1994, S. 2013; Wagner et al. 1993, S. 2432), NF_κB (Mohan und Melz 1994, S. 97; Granville et al. 1998, S. 893) und die E2F-Familie (Shan und Lee 1994, S. 8166).

2.1.2 Bildung mikrokernhaltiger Zellen

2.1.2.1 Definition und Entstehung der mikrokernhaltigen Zellen

Mikrokerne sind mit einer Kernmembran versehene Chromatinfragmente, die seit etwa 100 Jahren bekannt sind. Nach ihren Entdeckern wurden sie zunächst Howell-Jolly-Körperchen genannt (Howell 1891, S. 57; Jolly 1907, S. 133). Da sie unter anderem nach Bestrahlung auftreten, wurde durch Evans et al. versucht, die Mikrokerne als Indikatoren für Schäden durch ionisierende Strahlen einzusetzen (Übersicht bei Heddle et al. 1983, S. 61).

Die Entstehung der Mikrokerne wird als ein passiver Prozess betrachtet. Chromosomen und azentrische Chromosomenfragmente, die bei der Zellteilung durch den Spindelapparat nicht erfasst werden, können nicht in die Tochterkerne aufgenommen werden. Aus diesem Grund verbleiben sie separat, von einer Kernmembran umschlossen, im Zytoplasma liegen.

Es existieren verschiedene Mechanismen, die zur Bildung mikrokernhaltiger Zellen führen:

- Azentrische Chromosomenfragmente entstehen durch ionisierende Strahlen oder chemische Substanzen (Hayashi et al. 1984, S. 129; Heddle und Carrano 1977, S. 63; Pincu et al. 1984, S. 61 und 1985, S. 423). Da sie weder eine Zentromerregion, noch eine Kinetochorstruktur besitzen, kann der Spindelapparat während der Mitose nicht ansetzen, was ein Einbringen in die Tochterkerne verhindert. Bei der Entstehung der Chromosomenfragmente werden DNA-Doppelstrangbrüche als Ursache vermutet (Natarajan et al. 1986, S. 231).
- Multizentrische Chromosomen besitzen mehr als ein Kinetochor, an denen die Spindelfasern beider Pole ansetzen, wodurch das Chromosom in keinen der Tochterkerne gezogen werden kann.
- Geschädigte Kinetochore können nicht mehr als Ansatzpunkt für die Spindelfasern dienen und somit auch nicht in die Tochterkerne gelangen (Brenner et al. 1980).
- Schädigungen des Spindelapparates wie durch die Spindelgifte Colchicin oder Vincristin führen zur Bildung mikrokernhaltiger Zellen (Maier und Schmid 1976, Chai et al. 1985).

2.1.2.2 Morphologie

Mikrokerne sind Chromatinfragmente, die von einer Kernmembran umhüllt sind (siehe Abbildung 2). Sie befinden sich im Zytoplasma der Zelle. Die Chromatinfragmente bestehen aus ganzen Chromosomen oder azentrischen Chromosomen-Fragmenten (Heddle et al. 1983). Die Größe der Mikrokerne variiert erheblich und kann bis zu einem Drittel des Hauptkerns betragen. Die Form ist rund bis oval. Die einhüllende Kernmembran ist wie beim Zellkern

eine Doppelmembran mit Kernmatrix und Kernporen (Müller und Streffer 1994). Die mikrokernhaltigen Zellen haben wahrscheinlich eine Restfunktion, da sie noch zur RNA- und mRNA-Synthese in der Lage sind (Kato und Sandberg 1968).

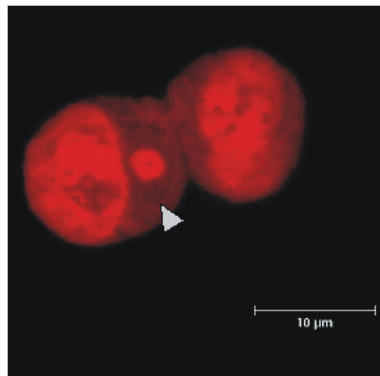


Abb. 2: Laserscanmikroskopische Darstellung eines normalen und eines mikrokernhaltigen Zellkerns (Pfeil).

2.1.2.3 Signaltransduktion

In neuesten Untersuchungen gibt es Hinweise, dass auch die Bildung mikrokernhaltiger Zellen durch Signaltransduktionsmoleküle beeinflusst werden, die bereits bei apoptotischen Vorgängen auffällig sind. So hemmt beispielsweise das Enzym Proteinkinase C (PKC) die Freisetzung mikrokernhaltiger Zellen, hingegen wird sie durch Ceramide verstärkt. Dies weist darauf hin, dass es sich bei der Bildung von mikrokernhaltigen Zellen um einen aktiven, von der Zelle selbst gesteuerten Prozess handeln könnte (Abend et al. 1999, Abend et al. 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass Mikrokerne DNA-Fragmente von einer Größe enthalten, wie sie im Rahmen des endonukleolytischen DNA Verdau der Apoptose vorkommen (Abend et al. 1999).

2.2 Zelllinie und Stressor

2.2.1 Zelllinie

Bei diesen Versuchen wurde mit der Zelllinie L929 (Abbildung 3) gearbeitet. Dabei handelt es sich um Mäusefibroblasten aus normalem Gewebe einer männlichen C3H/An Maus (Harlan Laboratories, Inc. 2008, S. 1). Diese Zellen wachsen adhärent. Im Weiteren werden diese Zellen als L929 Zellen bezeichnet.

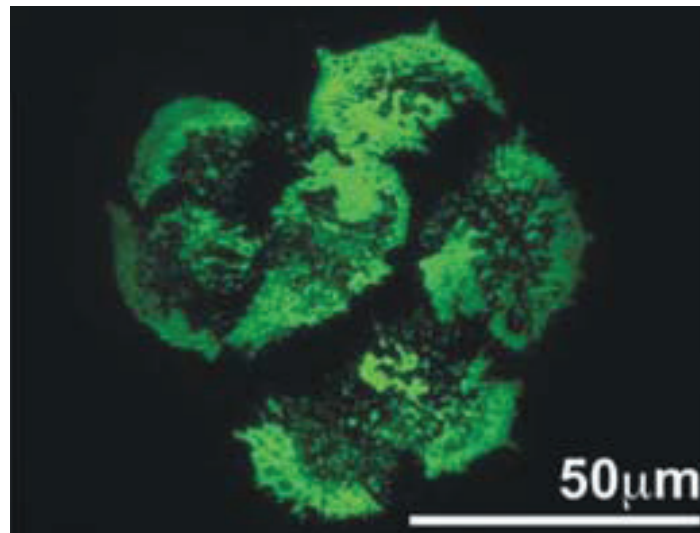


Abb. 3: Darstellung von L929 Zellen. Der Vitalfarbstoff wurde mit einem Argon Laser angeregt.

2.2.2 Stressor

Als Stressor wurde das handelsübliche Chemotherapeutikum VM-26, Teniposid verwendet. Es wird halbsynthetisch aus der Wurzel des *Podophyllum peltatum*, des Maiapfels (Abbildung 4) gewonnen.

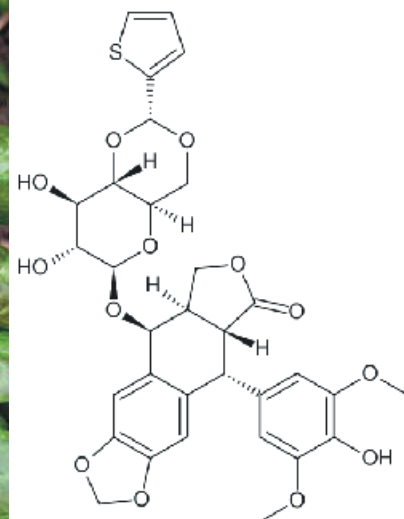


Abb. 4: Fotografie des *Podophyllum peltatum*, des Maiapfels, aus dessen Wurzel der Topoisomerase II Hemmer VM-26 gewonnen wird sowie Darstellung der Strukturformel von Teniposid.

Es hemmt die Topoisomerase II und behindert somit die DNA-Replikation in der Zelle während der S-Phase (und auch G2-Phase) des Zellzyklus. Eingesetzt wird es als Zytostatikum gegen verschiedene Tumoren.

Die Topoisomerase II ist ein Enzym, das in allen Organismen vorkommt und Helix-Windungen von DNA-Strängen auflockern und lösen kann.

Die S-Phase ist die Synthesephase. In ihr geschieht die Reduplikation (Replikation) der DNA und die Produktion der Histone. Danach hat jedes Chromosom zwei Chromatiden.

Die G2-Phase ist die prämitotische Phase oder Postsynthesephase: das Endoplasmatische Retikulum wird eingeschmolzen, die Zelle bereitet sich auf die Mitose vor. In Geweben lösen sich die Zellkontakte zu den Nachbarzellen, die Zelle rundet sich ab und vergrößert sich durch Flüssigkeitsaufnahme. Es werden verstärkt RNA-Moleküle und zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert, um die nachfolgende Mitose vorzubereiten.

3 Material und Methoden

3.1 Vorarbeiten

Als Vorarbeiten für diese Arbeit wurden *in vitro* Versuche durchgeführt und die aus diesen Versuchen gewonnenen Daten zur Auswertung übernommen.

3.1.1 Vorbereitung und Behandlung der Zellen

Als *in vitro* Modell wurde die Zelllinie L929 (Mäusefibroblasten) untersucht. Die in Zellkultur wachsenden Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Topoisomerase-II-Hemmers VM-26 (100 pM, 5000 pM, 10.000 pM, sowie Kontrolle ohne VM-26) behandelt. Bei einer Konzentration von 100 pM wurde bei ca. 30% der Zellen die Bildung mikrokernhaltiger Zellen induziert, bei einer Konzentration von 5.000 pM wurden die Zellen zu nahezu 100% in die Apoptose geführt. Das besondere war, dass gleichzeitig immer nur eine Art des Zelltodes auftrat (Abbildung 5).

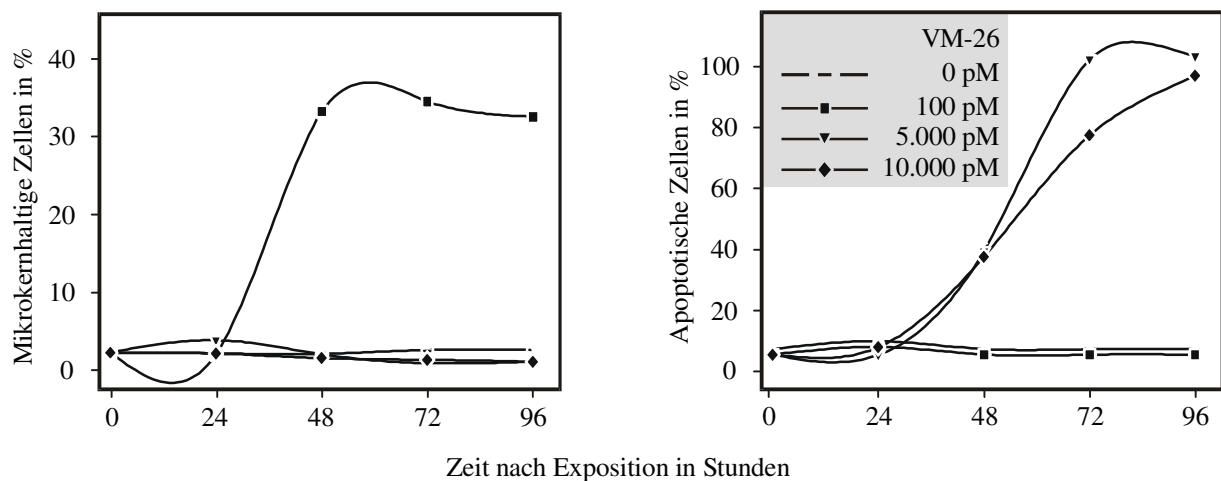


Abb. 5: Anzahl apoptotischer und mikrokernhaltiger Zellen nach Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen VM-26 (0 pM, 100 pM, 5.000 pM und 10.000 pM). Mikrokernhaltige Zellen entstanden nahezu ausschließlich nach Exposition mit 100 pM VM-26, Apoptose wurde durch die beiden höheren Konzentrationen 5.000 pM und 10.000 pM hervorgerufen.

3.1.2 Aufbereitung und Weiterverarbeitung der behandelten Zellen

Zu den Zeitpunkten 20 min, 24 h, 48 h und 72 h nach Exposition mit VM-26, sowie in der identisch kultivierten Kontrollprobe wurde jeweils aus exponierten und nicht exponierten Zellen die Gesamt-RNA isoliert. Dabei wurden nach Durchführung mehrerer Versuchsreihen die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche, die die Qualitätskriterien erfüllten und somit uneingeschränkt auswertbar waren (z.B. weitgehend frei von Artefakten mit kaum überlappenden Hybridisierungsprodukten), in die endgültige Analyse aufgenommen (im weiteren Versuch 1 und 2). Es folgten u.a. eine Anreicherung der mRNA, die Umschreibung in radioaktiv markierte cDNA und schließlich die Hybridisierung der cDNA auf eine Nylonmembran, auf der sich 1176 verschiedene, punktförmig aufgetragene, immobilisierte cDNA Spezies befanden. Diese immobilisierten cDNA Spezies dienten als Bindungsstellen für die radioaktiv markierten, komplementären cDNA Spezies aus den Proben. Detailliertere Angaben zur genutzten Zellkulturmethode sowie der Aufbereitung bis hin zur Hybridisierung wurden bereits veröffentlicht (Port et al., Stassen et al., Abbildung 6).

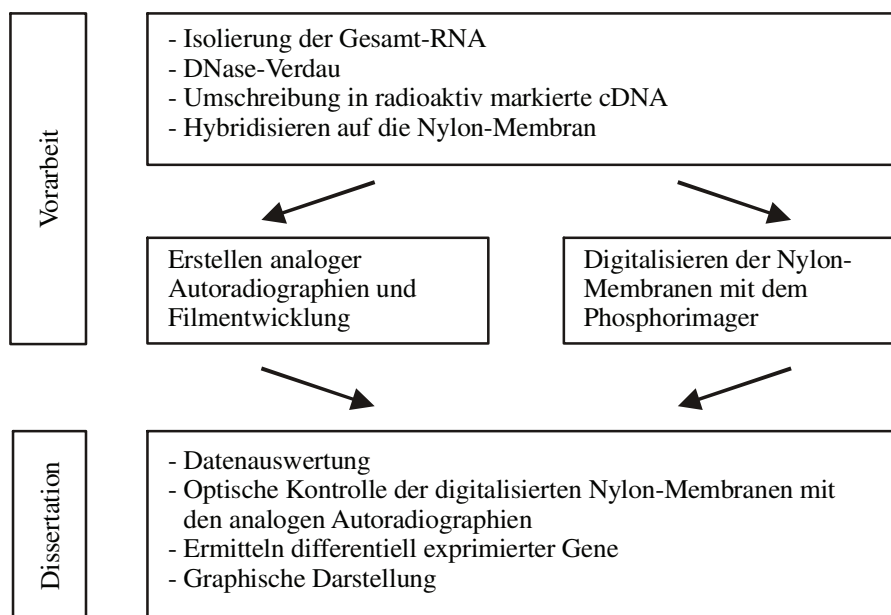


Abb. 6: Übersicht über die Versuchsschritte des Genexpressionsarrays unter der Berücksichtigung der im Institut erfolgten Vorarbeiten und dem Auswertungsteil als Bestandteil der Dissertation. Eine genauere Übersicht über den Auswertungsteil ist der Abbildung 7 in Kapitel 3.2 zu entnehmen.

3.1.3 Der Atlas™ Mouse 1.2 Array (Clontech)

Der Atlas™ Mouse 1.2 Array (Clontech, Heidelberg, Deutschland) ermöglicht die Untersuchung von 1176 unter besonders starker Transkriptionskontrolle stehender Gene.

Den 1176 aufgetragenen Genen des Atlas™ Mouse 1.2 Array werden Schlüsselrollen in verschiedenen biologischen Prozessen zugeschrieben. Anhand dieser Funktionen lassen sie sich in die 6 Gruppen (A bis F) zu je 196 Genen unterteilen (siehe auch Abbildung 9 in Kapitel 3.2.3):

- Gruppe A: Onkogene, Tumorsuppressoren und Zellzyklusregulatoren
- Gruppe B: „stress response“-Gene, Gene für Ionenkanäle und Ionentransport, intrazelluläre Signaltransduktionsmodulatoren und –effektoren
- Gruppe C: Apoptose, DNA-Synthese, Reparatur und Rekombination
- Gruppe D: Transkriptionsfaktoren und generelle DNA-bindende Proteine
- Gruppe E: Zelloberflächenantigene und Zelladhäsionsmoleküle
- Gruppe F: Zell-Zell-Kommunikationsmoleküle: Wachstumsfaktoren, Chemokine, Interleukine, Interferone, Hormone und ihre Rezeptoren, sowie Rezeptoren für Neurotransmitter.

Je nach Anzahl der gebundenen radioaktiv markierten cDNA-Moleküle wird mittels Phosphorimager ein unterschiedlich starkes Signal detektiert, bzw. findet sich in der Autoradiographie eine mehr oder wenig starke Schwärzung.

Aufgrund von Artefakten wie Verwischen der Hybridisierungsprodukte, Verunreinigungen, zu geringer oder zu hoher radioaktiver Intensität mussten häufig Wiederholungsversuche durchgeführt werden.

3.2 Auswertung

Die Auswertung bestand in der Digitalisierung der Nylonmembranen, der Bearbeitung der digitalisierten Scans, der Auswahl geeigneter Scans, ggf. Wiederholung nicht geeigneter Scans/Experimente, der Gewinnung von Rohdaten, der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität des Verfahrens, der Bestimmung der differentiellen Genexpression und der Selektion von Genen, die durch die verschiedenen Expositionen mit VM-26 differentiell exprimiert waren (vgl. auch Abbildung 7).

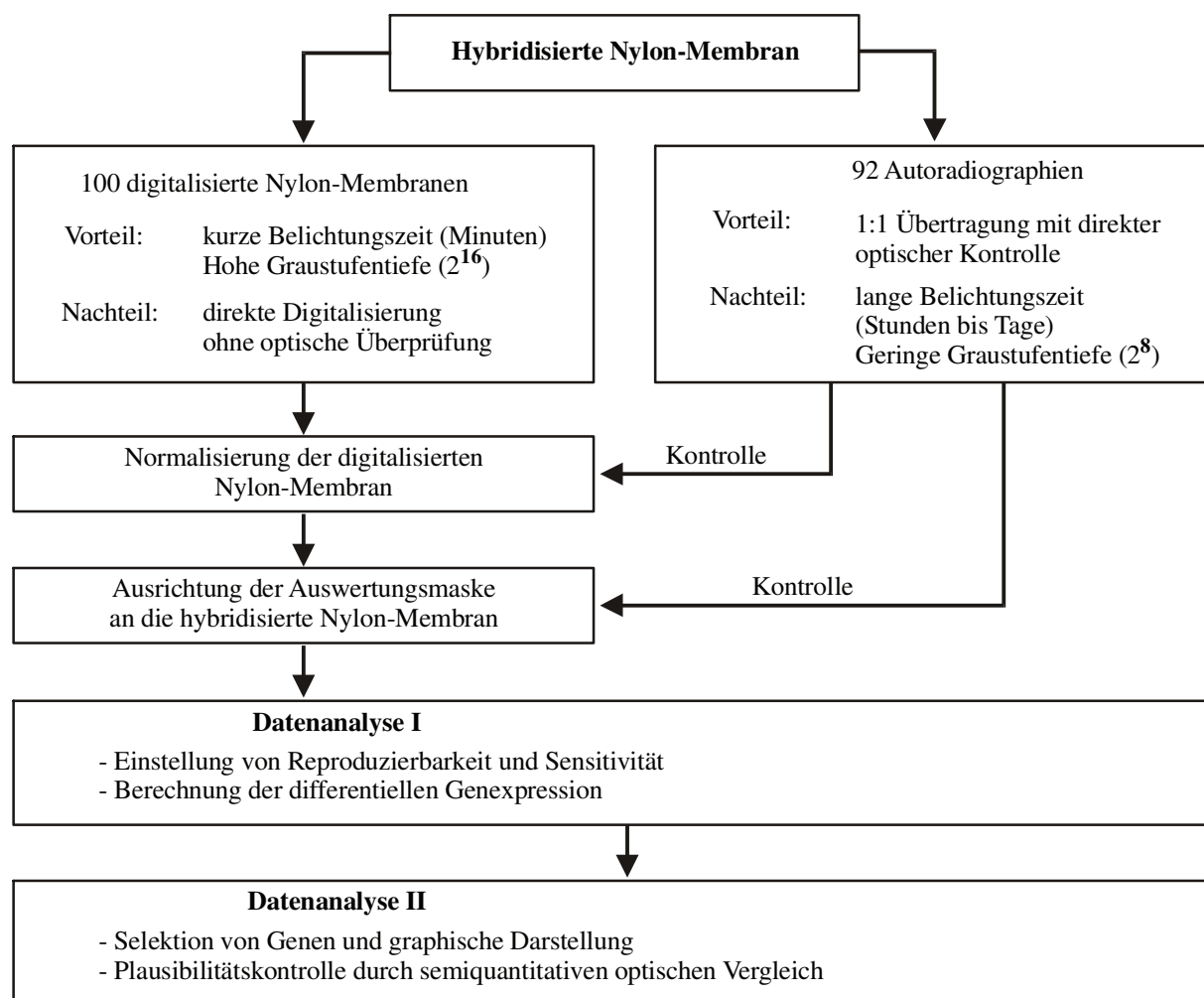


Abb. 7: Überblick über die Vorgehensweise bei der Auswertung der hybridisierten Nylon-Membranen.

3.2.1 Digitalisierung

Die hybridisierten Nylon-Membranen (im Weiteren Arrays genannt) wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers (BioRad) digitalisiert. Hierzu wurde zunächst eine Membran gegen den radioaktiven Array exponiert und diese nach ausreichender Expositionszeit mittels Phosphorimager eingescannt. Der genutzte Phosphorimager war in der Lage, Radioaktivität orts aufgelöst in Lichtsignale umzuwandeln und digital zweidimensional mit einer Grauwertskala, die über 2^{16} Stufen verfügt, abzuspeichern. Die erhaltenen Counts (CNT) wurden als Grauwert gespeichert. 0 CNT wurde ein weißer Pixel zugeordnet, dem Maximalwert von 65.535 CNT ($= 2^{16} - 1$ CNT) ein schwarzer Pixel. Die Phosphorimager Scans wurden zunächst mit einer Spezialsoftware des Phosphorimager Herstellers namens Quantity One^R ausgewertet (insbesondere Analyse der Hintergrundaktivität zur Einstellung der Normalisierung), danach erfolgte die Konvertierung aus dem BioRad eigenen Format in ein 16-bit kodierte TIFF-Graustufenbild, bzw. zu Dokumentationszwecken auch in graustufenoptimierte 8-bit kodierte TIFF-Bilder.

Zusätzlich wurden Autoradiographien (auf Kodak Bio Max MS Filmen) erstellt. Diese bereits länger etablierte aber aufwendigere und ungenauere Methode wurde zusätzlich zu den Phosphorimager-Auswertungen als Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Belichtungszeiten der Autoradiographien variierten zwischen einigen Stunden bis zu mehreren Tagen. Die bei der Auswertung der Autoradiographien nach Digitalisierung mittels Scanner zu erzielenden Graustufen betragen nur 2^8 Graustufen. Aus diesen Gründen dienten die Autoradiographien lediglich zur optischen Überprüfung der korrekten Ausrichtung der Auswertungsmaske, zum Ausschluss von Fehlern, so z.B. unter anderem der Plausibilitätskontrolle möglicher differentiell exprimierter Gene, wie im Weiteren beschrieben.

3.2.2 Ermittlung des Normalisierungsfaktors der digitalisierten Arrays

Die Normalisierung war notwendig, um neben methodischen Aspekten auch Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchen auf Genexpressionsebene zu erzeugen (u.a. versuchsbedingte ausgeprägte Schwankungen in der Hybridisierung aller Gene, stark differente Expositionszeiten). Die Normalisierung kann auf zwei Wegen erfolgen: Die erste Möglichkeit besteht im Vergleich der Expression eines Gen oder mehrerer Gene, welche immer und homogen exprimiert werden. Dabei handelt es sich um die so genannten „Haushaltsgene“ der Arrays, z.B. Ubiquitin, die durch Exposition gegen VM-26 keine Intensitätsänderung zeigen sollen. Nachteil der Methode ist, dass die Normalisierung der Arrays von einem Gen oder wenigen Genen abhängig ist und eine fehlende Regulation gegenüber der Noxe eine Hypothese ist, die sich ohne weiteres nicht verifizieren lässt.

Die zweite und robustere, aber aufwendigere Möglichkeit für die Normalisierung ist es, die Gesamtgenexpression der Phosphorscans zu bestimmen. Für die Auswertung des Versuchs wurde die zweite Methode gewählt. Die Arrays wurden über die Gesamtgenexpression (in CNT) normalisiert. Die Gesamtgenexpression entspricht der Summe der Grauwerte aller Hybridisierungsprodukte.

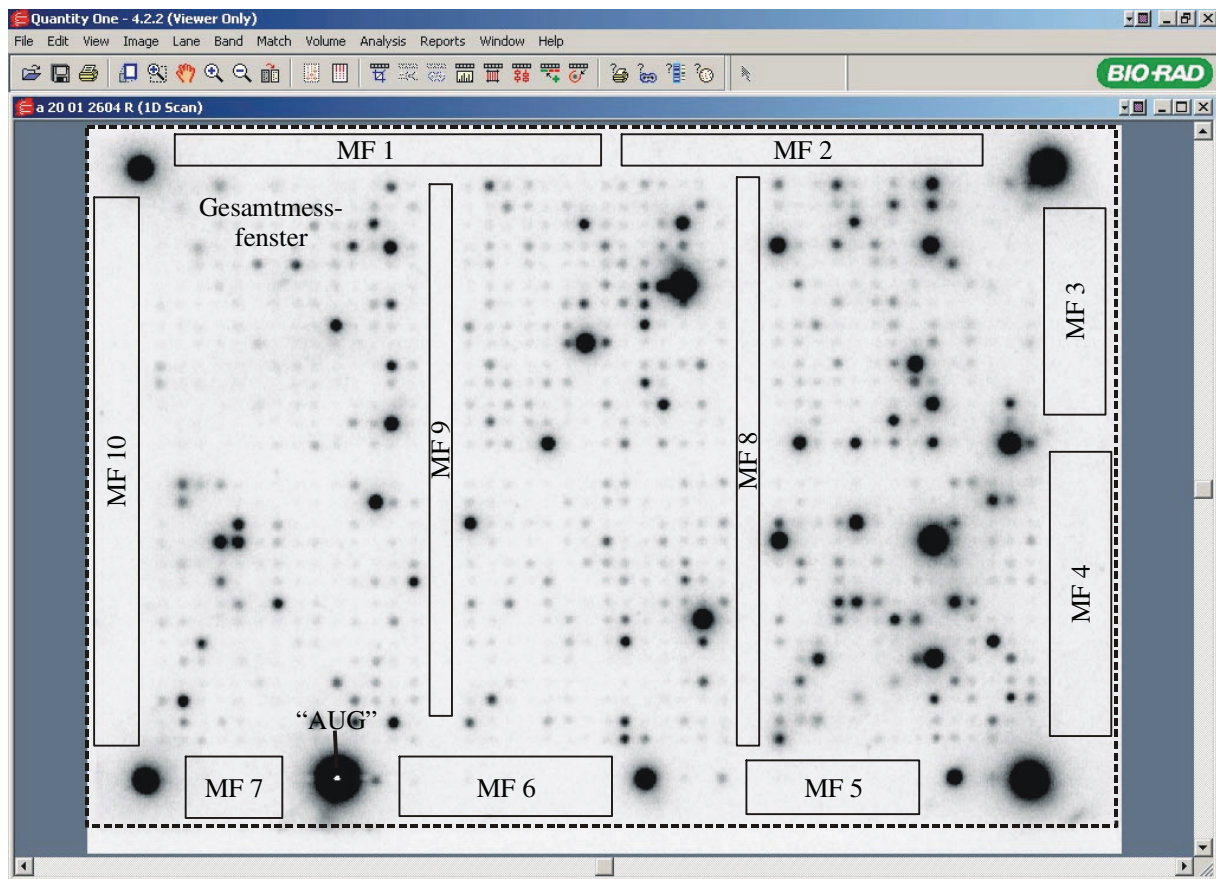


Abb. 8: Eingescannte, hybridisierte Nylon-Membran in der Software Quantity One. MF 1 bis MF 10 Stellen die einzelnen Messfenster (MF) für die Berechnung der Hintergrundgrauwerte dar. Eines der „Housekeeping Genes“ weist zentral ein Areal mit undefiniertem Grauwert („AUG“) auf, der sich außerhalb des lineardynamischen Bereichs befindet. Die Fläche des Gesamtmessfensters (A) wird durch die Strichlinie markiert.

Zur Bestimmung der Gesamtgenexpression wurden zunächst alle Grauwerte des Scans als Flächengrauwert gemessen, sowie 10 repräsentative Messfenster (MF 1 - MF 10) in Bereichen der Grauwerte des Hintergrunds ohne Hybridisierungsprodukte ausgewählt (siehe auch Abbildung 8, Tabelle 1, Gleichung 1). Die Gesamtgenexpression ergab sich als Differenz des Gesamtflächengrauwertes zum Hintergrund (Tabelle 1, Gleichung 3). Der Hintergrund berechnete sich als Produkt des mittleren Grauwerts des Hintergrunds (CNT/mm^2) und der Gesamtfläche des sogenannten Gesamtmessfensters (Tabelle 1, Gleichung 2). Der Quotient der Gesamtgenexpression eines Vergleichspaares (z.B. Kontrollarray (24h) (E_{G1}) zu Array exponiert mit 100 pM VM-26 (24h) (E_{G2})) lieferte dann den Normalisierungsfaktor ($N_{2/1}$), der schließlich auf die einzelnen Gene dieses Versuches angewendet wurde (vgl. Gleichung 4). Als günstig stellten sich auch in anderen Versuchsreihen Arrays heraus, deren Gesamtgenexpression möglichst ähnlich war.

Messfenster	Summengrauwert Messfenster	Fläche
	CNT	mm ²
MF 1	$E_{H1} = 105.135$	$A_1 = 421$
MF 2	$E_{H2} = 50.963$	$A_2 = 163$
MF 3	$E_{H3} = 42.161$	$A_3 = 189$
MF 4	$E_{H4} = 63.709$	$A_4 = 270$
MF 5	$E_{H5} = 163.574$	$A_5 = 550$
MF 6	$E_{H6} = 83.355$	$A_6 = 276$
MF 7	$E_{H7} = 41.706$	$A_7 = 155$
MF 8	$E_{H8} = 66.897$	$A_8 = 254$
MF 9	$E_{H9} = 62.516$	$A_9 = 267$
MF 10	$E_{H10} = 20.869$	$A_{10} = 77$
Summen	$E_{H1-10} = 700.885$	$A_{1-10} = 2.622$
Gesamtmeßfenster	$E_{\Sigma} = 6.189.146$	$A_G = 9.697$
	Formel	Ergebnis
Mittlerer Grauwert des Hintergrunds (e_H)	$e_H = (E_{H1} + E_{H2} + \dots + E_{H10}) / (A_1 + A_2 + \dots + A_{10})$ (1)	267 CNT/mm ²
Gesamt-Grauwert des Hintergrunds (E_H)	$E_H = e_H \cdot A_G$ (2)	2.589.099 CNT
Gesamtgenexpression (E_G)	$E_G = E_{\Sigma} - E_H$ (3)	3.600.047 CNT

Tab. 1: Exemplarische Berechnung der Gesamtgenexpression. MF 1 bis MF 10 entsprechen den 10 repräsentativen Messfenstern zur Bestimmung des Hintergrund-Grauwertes. Die Fläche des Gesamtmeßfensters (A_G) umfasste die gesamte Nylon-Membran. Vgl. Abbildung 8.

$$N_{2/1} = E_{G2} / E_{G1} \quad (4)$$

Gelegentlich ergab sich das Problem, dass einige wenige Hybridisierungsprodukte außerhalb des lineardynamischen Bereichs des Phosphorimagers lagen. Diesen Arealen mit undefinierten Grauwerten (A_{AUG}) wurde durch die Software der Wert 0 CNT zugeordnet. Dabei würde diesen Pixeln sogar Werte oberhalb des maximalen Wertes von 65.535 CNT ($= 2^{16} - 1$) entsprechen. Optisch wurden diese Bereiche im Array weiß dargestellt (vgl. Abbildung 8). Um den Fehler bei der Gesamtgenexpression zu minimieren, wurden die entsprechenden Flächen A_{AUG} (in mm²) ausgemessen und mit dem maximalen Wert 65.535 CNT multipliziert. Dies ergab den Ausgleichswert für die Signale außerhalb des lineardynamischen Bereichs E_{AUG} (in CNT, vgl. Gleichung (5)). Das Produkt wurde zur errechneten Gesamtgenexpression E_G addiert. Dies ergab die korrigierte Gesamtgenexpression E_G' (in CNT, vgl. Gleichung (6)). Eine exemplarische Berechnung wurde in Tabelle 2 durchgeführt. Als Basis für die Berechnung des Normalisierungsfaktor $N_{2/1}'$ wurde in solchen Fällen die korrigierte Gesamtgenexpression E_G' verwendet.

$$E_{\text{AUG}} = A_{\text{AUG}} \cdot (2^{16} - 1) \quad (5)$$

$$E_{\text{G}}' = E_{\text{G}} + E_{\text{AUG}} \quad (6)$$

Messfenster	Summengrauwert Messfenster (CNT*mm ²)	Fläche (mm ²)
AUG 1	0	$A_{\text{AUG}} = 0,35$
	Formel	Ergebnis
Ausgleichsgrauwert für Areale mit undefinierten Grauwerten (E_{AUG})	$E_{\text{AUG}} = A_{\text{AUG}} \cdot (2^{16} - 1)$	22.937 CNT

Tab. 2: Berechnung des Ausgleichsgrauwertes eines Areals mit undefiniertem Grauwert (AUG 1).

3.2.3 Ausrichtung der Auswertungsmaske an die hybridisierte Nylon-Membran

Um die Hybridisierungsprodukte eindeutig zuordnen zu können, war das Ausrichten der Auswertungsmaske des Programms zu den einzelnen Hybridisierungsprodukten (im Weiteren Gene genannt) der Arrays notwendig.

Nach der Bearbeitung der Arrays mit Hilfe des Programmes „Quantity One“ wurden sie im TIFF-Format abgespeichert. Das TIFF-Format ist für die Software Atlas Image (Clontech) lesbar. Dieses Programm bietet eine vorgefertigte Auswertungsmaske, welche ROI's (**R**egions **O**f **I**nterest), ähnlich einem Koordinatensystem, enthält. Die Auswertungsmaske ist in 6 Gruppen, die mit den Buchstaben A bis F gekennzeichnet sind, unterteilt. Die einzelnen Gruppen sind wiederum durch die Koordinaten 1 bis 14 waagrecht von links nach rechts und a bis n senkrecht von oben nach unten in Felder unterteilt (siehe Abbildung 9). Nur in diesen ROI's wurden die Grauwerte bestimmt. Die Ausrichtung der ROI's konnte zunächst halbautomatisch vorgenommen werden. Es wurden die Felder über das korrespondierende Hybridisierungsprodukt zentriert. Nur die Hybridisierungsprodukte, die sich innerhalb eines ROI's befanden und deren Intensität mindestens doppelt so stark wie der Hintergrund war wurden erkannt, im ROI zentriert und einem Gen zugeordnet. Hybridisierungsprodukte, deren Größen die Grenzen der ROI's der Ausrichtungsmaske überschritten oder nur schwach exprimierte Gene mussten jedoch manuell nachgearbeitet werden. Hybridisierungsprodukte, die von anderen Hybridisierungsprodukten, deren Größe die Grenzen der ROI's der Auswertungsmaske überschritten, beeinflusst wurden, wurden entsprechend dem lokalen Hintergrund angeglichen, um keine falsch hohen Grauwerte zu erhalten. Bei schwach exprimierten Genen musste die Lage der ROI's über das Gen zentriert werden. Gelegentlich war es bei ausgeprägten Artefakten notwendig, um Fehler zu vermeiden, die betroffenen ROI's aus der Berechnung künstlich auszublenden. Dies wurde erreicht, indem manuell der

Grauwert des Hintergrunds höher als der der Felder gewählt wurde. Am Ende der manuellen Bearbeitung erfolgte nochmals eine optische Überprüfung mit Hilfe der Autoradiographien. Abbildung 9 zeigt exemplarisch einen Array im Programm Atlas Image mit ausgerichteter Maske.

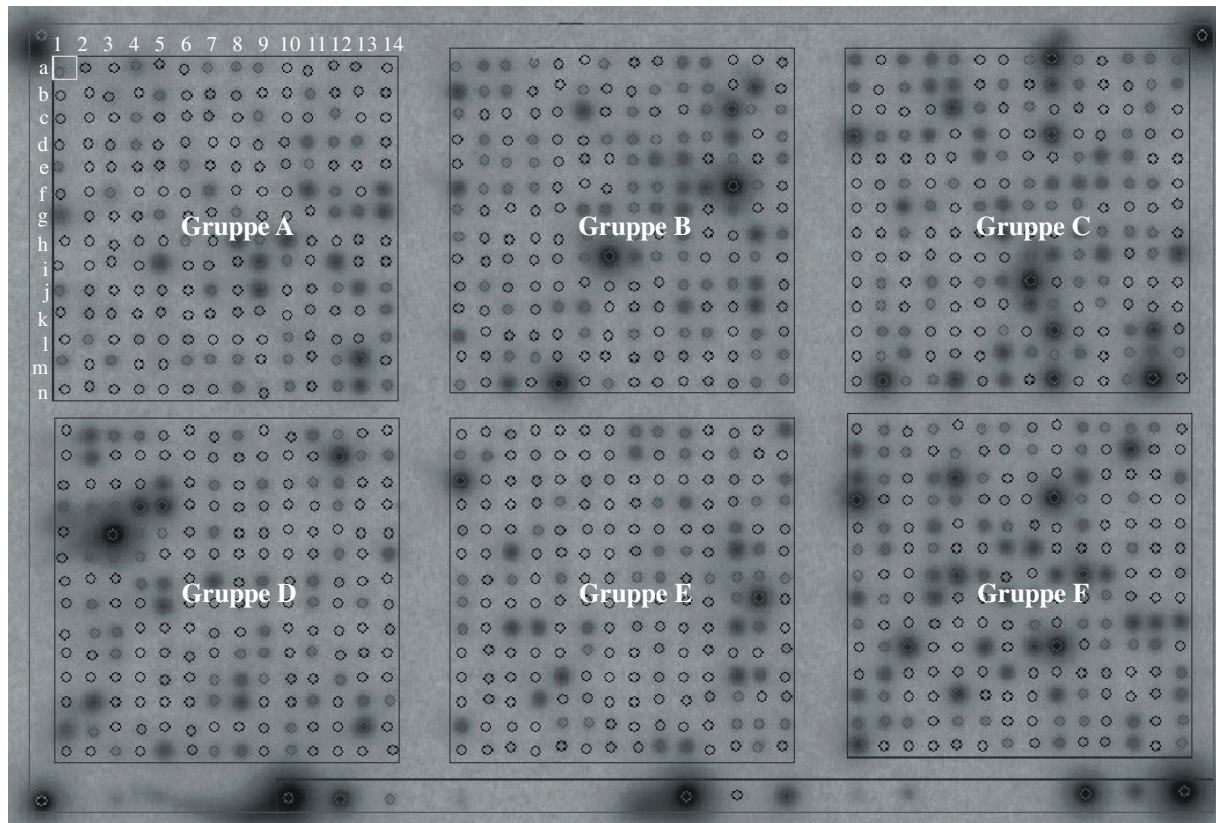


Abb. 9: Beispiel einer Darstellung des bearbeiteten Atlas™ Mouse 1.2 Arrays im Programm Atlas Image. In Gruppe A ist die Beschriftung der Koordinaten exemplarisch angegeben (waagrecht 1-14, senkrecht a-n). Die Bezeichnung eines Gens setzt sich demzufolge aus dem Kennbuchstaben der Gruppe und den beiden Koordinaten-Bezeichnungen zusammen (z.B. Gen im kleinen weißen Quadrat oben links: A01a). Die kleinen Kreise kennzeichnen die über den Hybridisierungsprodukten ausgerichteten ROI's (**R**egions **O**f **I**nterest).

3.2.4 Datenanalyse I

Nach dieser Anpassung folgte der Vergleich von jeweils zwei Arrays miteinander (Übersicht Abbildung 35, Anhang). Das Programm erstellte einen Bericht, der eine Liste aller Gene mit folgenden Spalten enthielt (vgl. Tabelle 3):

- Koordinate
- Grauwert des Gens von Array 1 (e_{G1})
- Grauwert des Hintergrunds des Gens von Array 1 (e_{H1})
- Relativer Grauwert des Gens von Array 1 (= Grauwert des Gens 1 - Grauwert des Hintergrunds des Gens 1, lässt keine negativen Werte zu) (e_{G1}')

- Grauwert des Gens von Array 2 (e_{G2})
- Grauwert des Hintergrunds des Gens von Array 2 (e_{H2})
- Relativer Grauwert des Gens von Array 2 (= Grauwert des Gens 2 - Grauwert des Hintergrunds des Gens 2, lässt keine negativen Werte zu) (e_{G2}')
- Ratio: Der Quotient der relativen Grauwerte der Gene 1 und 2 voneinander entspricht der differentiellen Genexpression (qualitativ)
- Die Differenz der relativen Grauwerte der Gene 2 und 1 voneinander (Relative Intensität 2 - Relative Intensität 1).

Weitere Berechnungen der ausgegebenen Daten wurden mit dem Programm Excel von Microsoft durchgeführt, in das die ausgegebenen Listen exportiert werden konnten.

Wie man aus Tabelle 3 entnehmen kann, wird durch das Programm nur eine qualitative Aussage über die differentielle Genexpression gemacht. Ist der Quotient der relativen Grauwerte nicht definiert, erschien im entsprechenden Fenster „nicht berechnet“. Diese differentielle Genexpression konnte für Gene, die für Array 1 oder Array 2 eine geringere Expression als der Hintergrund aufwiesen nicht berechnet werden. Für diese Gene ergäbe sich eine negative Expression (≤ 0 CNT). Das Programm ließ keine negativen Werte zu und definierte aus diesem Grund den relativen Grauwert (e_{G1}' , e_{G2}') als 0 CNT (vgl. auch Tabelle 3).

Koordinaten	e_{G1}	e_{H1}	e_{G1}'	e_{G2}	e_{H2}	e_{G2}'	Quotient der relativen Grauwerte der Gene 1 und 2 (qualitativ)	Die Differenz der relativen Grauwerte der Gene 2 und 1
A01d	1910	587	1323	215	136	79	hochreguliert	-1244
A01g	1194	587	607	1740	136	1604	runterreguliert	997
A01k	513	587	0	251	136	115	nicht berechnet	115
A02e	584	587	0	126	136	0	nicht berechnet	0
A02j	970	587	383	56	136	0	nicht berechnet	-383

Tab. 3: Beispiele möglicher Ergebnisse eines Reports des Vergleichs zweier Arrays durch das Programm „Atlas Image“.

Anhand von Fall 1 im Beispiel 1 (im Anhang) soll dieser Sachverhalt genauer erläutert werden. Die ersatzweise angewandte Differenz der Grauwerte der Gene gibt dem Benutzer einen Hinweis auf Unterschiede, ist jedoch nicht aussagekräftig und stellt nur eine unzureichende Hilfskonstruktion des Programms dar, um die beiden entsprechenden Gene überhaupt in Abhängigkeit zueinander zu beschreiben. Eine bessere Auswertung konnte mit folgenden, modifizierten Methoden erreicht werden.

3.2.4.1 Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität

Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte aus den oben erwähnten Gründen mit Hilfe einer Makro-Berechnung im Programm Excel von Microsoft. Vor dem eigentlichen Vergleich der verschiedenen Proben wurde zunächst die Einstellung der Reproduzierbarkeit und Sensitivität vorgenommen. Dazu wurden die beiden entsprechenden, voneinander unabhängig durchgeführten Wiederholungsversuche miteinander verglichen.

Ziel war es, Parameter so einzustellen, dass ein möglichst guter Kompromiss zwischen Reproduzierbarkeit und Sensitivität erzielt wurde. Die Parameter, über die diese Zielsetzung ermöglicht wurde, waren zum einen die Festlegung eines Hintergrundschwellenwertes und zum anderen die Festlegung der Höhe der differentiellen Genexpression, welche als hoch- oder runterreguliert definiert wurde.

Der Hintergrundschwellenwert wurde definiert als das Produkt aus dem größeren Hintergrund der beiden zu vergleichenden Versuche und einem zu definierenden Faktor (F_H), mit dem der größere Hintergrundgrauwert multipliziert wurde. Alle Gene, deren Grauwerte unter dem Hintergrundschwellenwert lagen, galten als nicht exprimiert. Als Grauwerten wurde diesen Genen der Hintergrundschwellenwert zugewiesen. Für den Faktor F_H wurden drei verschiedene Werte bei der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität überprüft: $F_H = 2, 5$ und 10 . Durch eine Erhöhung des Hintergrundschwellenwertes wurde erreicht, dass sehr niedrig exprimierte Gene nicht in die Berechnung mit einbezogen wurden. In Fall 2 des Beispiels 1 (im Anhang) wird genauer erläutert, wie die Berechnung in den verschiedenen möglichen Fällen erfolgte.

Die Höhe der differentiellen Genexpression, die als hoch- bzw. runterreguliert bezeichnet wurde, war der zweite zu bestimmende Parameter. Dabei wurde der Quotient aus den Grauwerten eines Gens in den zu vergleichenden Versuchen oberhalb eines bestimmten Wertes als hoch- oder runterreguliert gewertet. Die Reproduzierbarkeit und Sensitivität wurden in Abhängigkeit von der Höhe der differentiellen Genexpression untersucht. Im Rahmen dieser Einstellung wurden folgende drei Werte für die Höhe der differentiellen Genexpression, welche als hoch- beziehungsweise runterreguliert gilt (R) überprüft: $R = 2, 3$ und 5 . Durch die Erhöhung dieser Werte wurde erreicht, dass sich die Expressionen eines Gens in den beiden Versuchen stärker unterscheiden mussten, um als hoch- oder runterreguliert zu gelten. Die genaue Erläuterung der Berechnung erfolgt in Fall 3 des Beispiels 1 (im Anhang).

Ziel war es, die beiden Parameter, den Hintergrundschwellenwert und die Höhe der differentiellen Genexpression, so einzustellen, dass eine möglichst gute Reproduzierbarkeit bei einer nicht zu geringen Sensitivität erreicht wurde. Angestrebt wurde eine

Reproduzierbarkeit auf der Basis aller untersuchten Gene von $\geq 95\%$ und auf der Basis der Anzahl der differentiell exprimierten Gene von $\geq 90\%$.

Im Weiteren folgt die Beschreibung der genauen Vorgehensweise bei der Berechnung. Als Übersicht über die wichtigsten Schritte soll die schematische Darstellung im Anhang Abbildung 35 dienen. Die Abkürzungen sind im Verzeichnis auf Seite III beschrieben.

Berechnungsschritte für die Festlegung des variablen Faktors für den Hintergrundschwellenwert und die Ermittlung des angeglichenen Grauwertes der Gene:

Für die weitere Berechnung wurde der größere mittlere Grauwert des Hintergrunds (e_{Hmax}) der beiden zu vergleichenden Arrays 1 und 2 herangezogen (mittlere Grauwerte des Hintergrunds 1 und 2; e_{H1} , e_{H2}) (Formel 7). Dieser wurde von den Grauwerten der einzelnen Gene (e_{G1} , e_{G2}) der zu vergleichenden Arrays 1 und 2 abgezogen. Das Ergebnis entsprach dann den relativen Grauwerten der Gene der Arrays (e_{G1}' , e_{G2}') (Formel 8). Der Hintergrundschwellenwert (s_H) war definiert als das Produkt aus dem größeren mittleren Hintergrund der beiden Arrays (e_{Hmax}) und einem variablen Faktor (F_H), für den die Werte 2, 5 und 10 eingesetzt wurden (Formel 9). Der angegliche Grauwert der einzelnen Gene aus Array 1 und 2 (e_{G1}'' , e_{G2}'') wurde nun nach folgender Fallunterscheidung bestimmt: War der relative Grauwert eines Gens (e_{G1}' , e_{G2}') größer oder gleich groß wie der Hintergrundschwellenwert (s_H), entsprach er dem angeglichenen Grauwert dieses Gens (e_{G1}'' , e_{G2}'') (Formel 10). War der relative Grauwert eines Gens (e_{G1}' , e_{G2}') kleiner als der Hintergrundschwellenwert (s_H), wurde für den angeglichenen Grauwert dieses Gens (e_{G1}'' , e_{G2}'') der Hintergrundschwellenwert (s_H) eingesetzt (Formel 11).

In Beispiel 2 (im Anhang) wird diese Berechnung exemplarisch an 3 Fällen erörtert.

$$e_{Hmax} = \text{Max} (e_{H1}; e_{H2}) \quad (7)$$

$$e_{G1}' = e_{G1} - e_{Hmax}$$

$$e_{G2}' = e_{G2} - e_{Hmax} \quad (8)$$

$$s_H = e_{Hmax} \cdot F_H \quad (9)$$

$$e_{G1}'' = e_{G1}' \quad \text{falls } e_{G1}' \geq s_H$$

$$e_{G2}'' = e_{G2}' \quad \text{falls } e_{G2}' \geq s_H \quad (10)$$

$$e_{G1}'' = s_H \quad \text{falls } e_{G1}' < s_H$$

$$e_{G2}'' = s_H \quad \text{falls } e_{G2}' < s_H \quad (11)$$

Berechnungsschritte für die Festlegung der Definition für Hoch- und Runterregulation der Gene anhand der Höhe der differentiellen Genexpression:

Zunächst wurde die differentielle Genexpression (e_{dif}) durch die Bildung des Quotienten aus den beiden angeglichenen Grauwerten der Gene der zu vergleichenden Arrays ($e_{G1''}$, $e_{G2''}$) bestimmt (Formel 12). Ergab dieser Quotient einen Wert, der höher als die festgelegte Höhe der differentiellen Genexpression für hoch- beziehungsweise runterregulierte Gene (R) oder niedriger als ihr Kehrwert ($1/R$) war, galt das Gen als differentiell hoch- oder runterreguliert. Lag das Ergebnis des Quotienten dazwischen, war das Gen nicht hoch- oder runterreguliert (Formel 13). Für den Wert der differentiellen Genexpression für hoch- beziehungsweise runterregulierte Gene wurde $R = 2, 3$ und 5 im Rahmen der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität eingesetzt.

In Beispiel 3 wird diese Berechnung exemplarisch an 3 Fällen (im Anhang) erörtert.

$$e_{\text{dif}} = e_{G2''} / e_{G1''} \quad (12)$$

$$1/R < e_{\text{dif}} < R \quad \Rightarrow \quad \text{nicht hoch-/runterreguliert}$$

$$1/R \geq e_{\text{dif}} \text{ oder } e_{\text{dif}} \geq R \quad \Rightarrow \quad \text{hoch-/runterreguliert} \quad (13)$$

3.2.4.2 Berechnung der differentiellen Genexpression unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität

Nach Einstellung der beiden Parameter (der Faktor für den Hintergrundschwellenwert (F_H) und die Höhe der differentiellen Genexpression, welche als hoch-/runterreguliert gilt (R)) waren Reproduzierbarkeit und Sensitivität festgelegt, sodass unter diesen Bedingungen die Analyse nach hoch-/runterregulierten Genen durchgeführt werden konnte. Auch dieser Vergleich wurde zunächst im Programm Atlas Image von Clontech durchgeführt und in eine Excel-Datei ausgegeben. Die einzelnen Berechnungsschritte entsprachen den in Kapitel 3.2.3 beschriebenen.

3.2.5 Datenanalyse II

3.2.5.1 Selektion von Genen und graphische Darstellung

Im Anschluss wurden die differentiell exprimierten nach VM-26 Exposition hoch- und runterregulierten Gene mit Hilfe des Programmes Sigma Plot graphisch dargestellt. Dabei wurde die differentielle Genexpression logarithmisch auf der y-Koordinate gegenüber dem Zeitintervall auf der x-Koordinate aufgetragen. In eine Graphik wurden immer beide Graphen für 100 pM VM-26 (mit weißen Kreisen markiert) und für 5000 pM VM-26 (mit schwarzen Vierecken markiert) integriert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der zwei Wiederholungsversuche. In Abbildung 10 ist ein Beispiel für eine derartige graphische Darstellung eines beliebigen Gens.

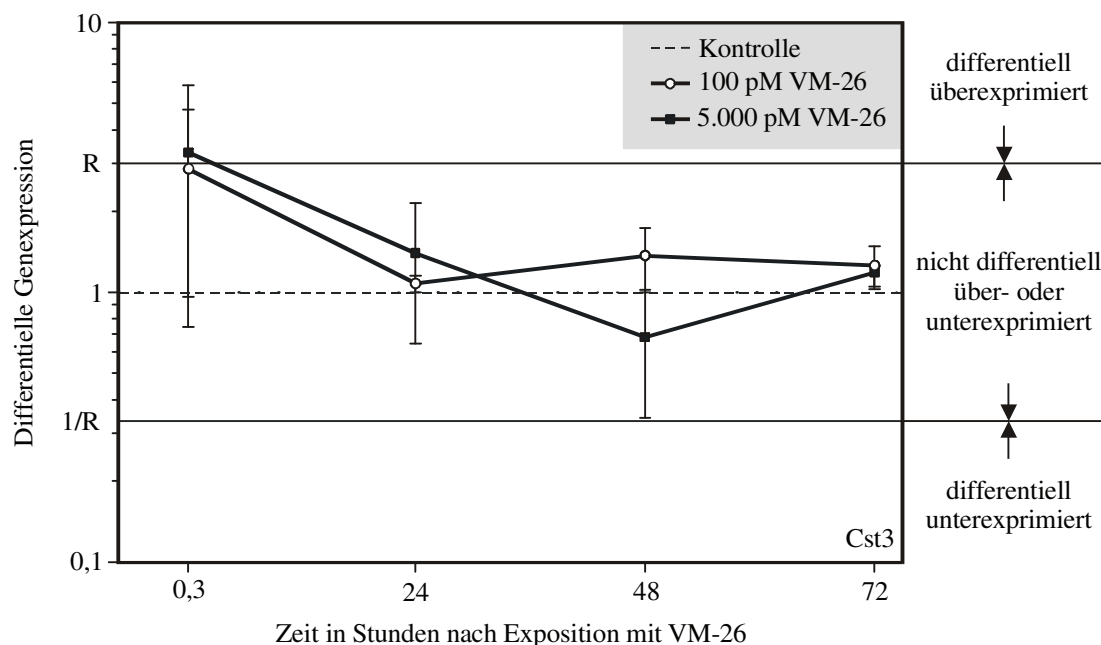


Abb. 10: Beispiel der graphischen Darstellung des Gens „cystatin C“ (Cst3) im Programm Sigma Plot. In den einzelnen Graphen wurden die Wertepaare der differentiellen Genexpression abhängig von der Zeit mit den zugehörigen Mittelwerten der zwei Wiederholungsversuche eingetragen. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar. Die gestrichelte Linie entspricht der in Kontrollen gemessenen Genexpression.

3.2.5.2 Plausibilitätskontrolle durch semiquantitativen optischen Vergleich

Als letzter Schritt wurde eine Plausibilitätskontrolle mittels optischen Vergleichs vorgenommen. Diese erfolgte ausschließlich bei den hoch- und runterregulierten Genen, um eventuell aufgetretene Fehler, wie eine falsche Zuordnung in der Auswertungsmaske oder andere im Rahmen von manuellen Schritten erfolgten Fehlern zu eliminieren.

Zunächst wurden die Gene im Programm Atlas Image aufgesucht und auf ihre richtige Lokalisation in der Maske überprüft. Im Anschluss wurde die bildliche Darstellung dieser Gene für alle Versuche inklusive der Kontrollen zusammengestellt (siehe Abbildung 11).

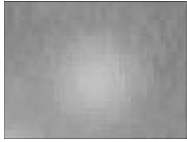

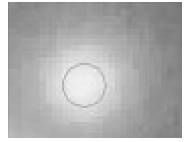
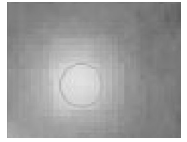
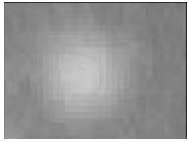
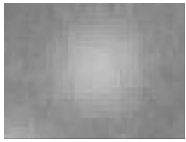
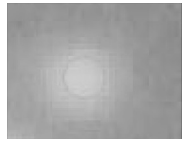
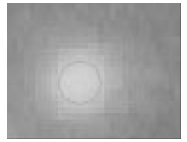
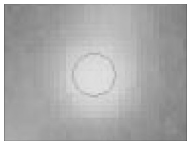

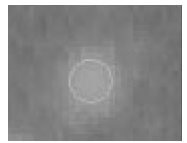



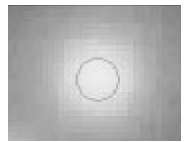
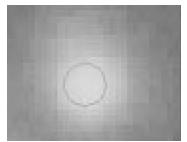
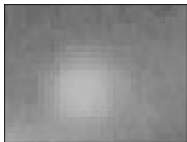

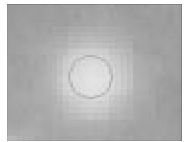
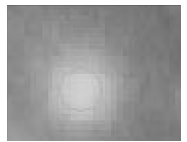
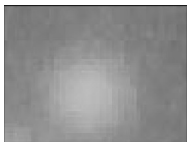
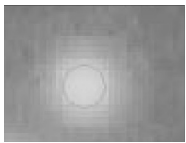
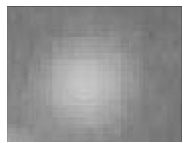
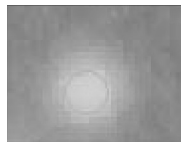

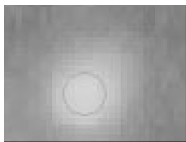



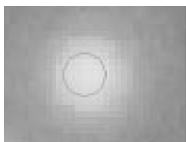
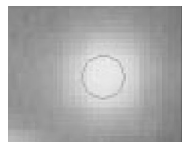
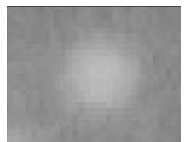
"secreted phosphoprotein 1" (Spp1)					
	Zeit	Versuch 1		Versuch 2	
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
100 pM VM-26	20 min				
	24 h				
	48 h				
	72 h				
5.000 pM VM-26	Zeit	Versuch 1		Versuch 2	
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
	20 min				
	24 h				
	48 h				
72 h					

Abb. 11: Bildliche Darstellung der Hybridisierungsprodukte eines Gens „secreted phosphoprotein 1“ (Spp1) für alle Versuche (jeweils linke Spalte) und Kontrollen (jeweils rechte Spalte).

Nun erfolgte jeweils zwischen dem Versuch mit VM-26 Exposition und der Kontrolle der optische Vergleich. Dabei wurde die Stärke des Hybridisierungsproduktes in semiquantitativer Weise einem Zahlenwert zugeordnet. In der Tabelle 4 ist diese Bewertung exemplarisch für das Gen „secreted phosphoprotein 1“ (Spp1) dargestellt. Die Bewertung erfolgte nach folgendem Einteilungsschema:

- stark überexprimiert (++) 10
- überexprimiert (++) 2
- schwach überexprimiert (+) 1,2

- neutral (0) 1

- schwach unterexprimiert (-) 0,8
- unterexprimiert (--) 0,5
- stark unterexprimiert (---) 0,1

„secreted phosphoprotein 1“ (Spp1)						
	optische Kontrolle				rechnerisch	
100 pM	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 1	Versuch 2
	Symbol	Wert	Symbol	Wert		
20 min	++	2	++	2	1,7	1,3
24 h	++	2	--	0,5	0,9	0,6
48 h	+++	10	++	2	3,2	1,0
72 h	+++	10	++	2	4,2	1,8
5.000 pM	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 1	Versuch 2
	Symbol	Wert	Symbol	Wert		
20 min	--	0,5	++	2	1,0	4,3
24 h	--	0,5	--	0,5	0,4	1,0
48 h	---	0,1	---	0,1	0,2	0,2
72 h	--	0,5	+++	10	0,6	5,2

Tab. 4: Übersicht über die Darstellung der Symbole und zugeordneten Zahlenwerten aus der optischen Überprüfung gegenüber der errechneten differentiellen Genexpression anhand eines Beispiels „secreted phosphoprotein 1“ (Spp1).

Die beiden Graphiken wurden nun auf ihr Übereinstimmen verglichen (Abbildung 12). Auf diese Weise konnte schnell ein Überblick erhalten werden, ob die rechnerischen Ergebnisse auch dem optischen Eindruck entsprachen.

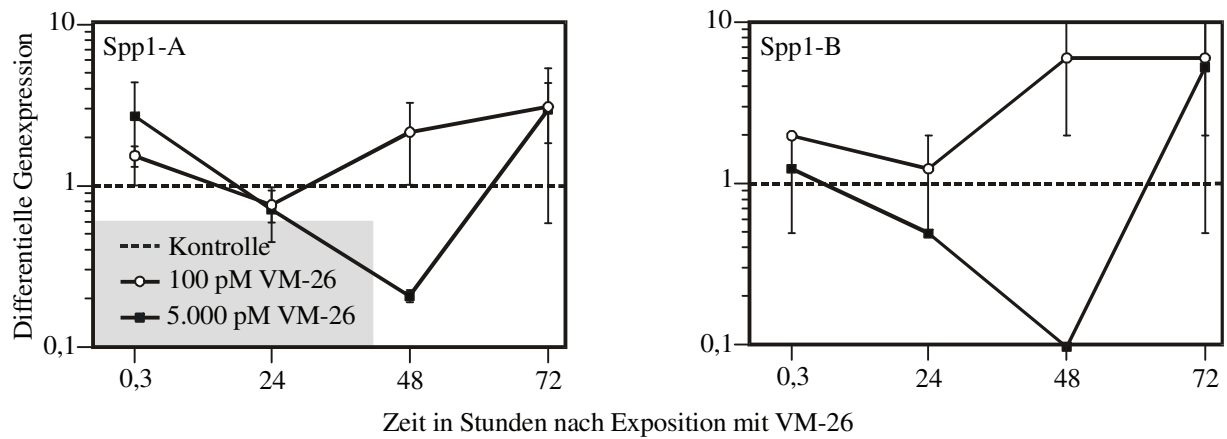


Abb. 12: Gegenüberstellung der Differentiellen Genexpression gegen die Zeit basierend auf den Grauwertbestimmungen am Makroarray (A) und des Verfahrens der optischen Kontrolle (B) für das Gen „secreted phosphoprotein 1“ (Spp1). Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar. Es konnte eine weitgehende Übereinstimmung der Verfahren gezeigt werden. Gleichzeitig ist Spp1 ein Beispiel für ein Gen aus Gruppe 4 entsprechend der Gruppeneinteilung in Kapitel 4.4.2. Die Abbildung zeigt dabei die wechselnd gegen- und gleichsinnig hoch-/herunterregulierte Genexpression eines Gens der Gruppe 4 nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26.

4 Ergebnisse

4.1 Selektion geeigneter Datensätze und Normalisierung

4.1.1 Selektion

Bis zu 72 h nach Inkubation mit 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und aufgrund von Mehrfachbelichtungen insgesamt 100 hybridisierte Makroarrays digitalisiert (Anhang, Tabelle 14). Für die weitere Datenanalyse fand eine Auswahl nach bestimmten Kriterien statt. Entscheidende Auswahlkriterien waren zunächst eine kontrastreiche und scharfe Abbildung der Hybridisierungsprodukte auf den Makroarrays (Abbildung 13). Zudem wurde geprüft, ob durch Fehlhybridisierung oder unvollständige Hybridisierungen die Auswertung beeinträchtigt wurde (Abbildung 14). In solchen Fällen musste unter Umständen das Experiment wiederholt werden. Nachdem diese Kriterien erfüllt waren (Abbildung 15) fand die weitere Auswahl danach statt, dass die errechnete Gesamtgenexpression der zu vergleichenden Makroarrays sich nicht mehr als um den Faktor 2 voneinander unterschied.

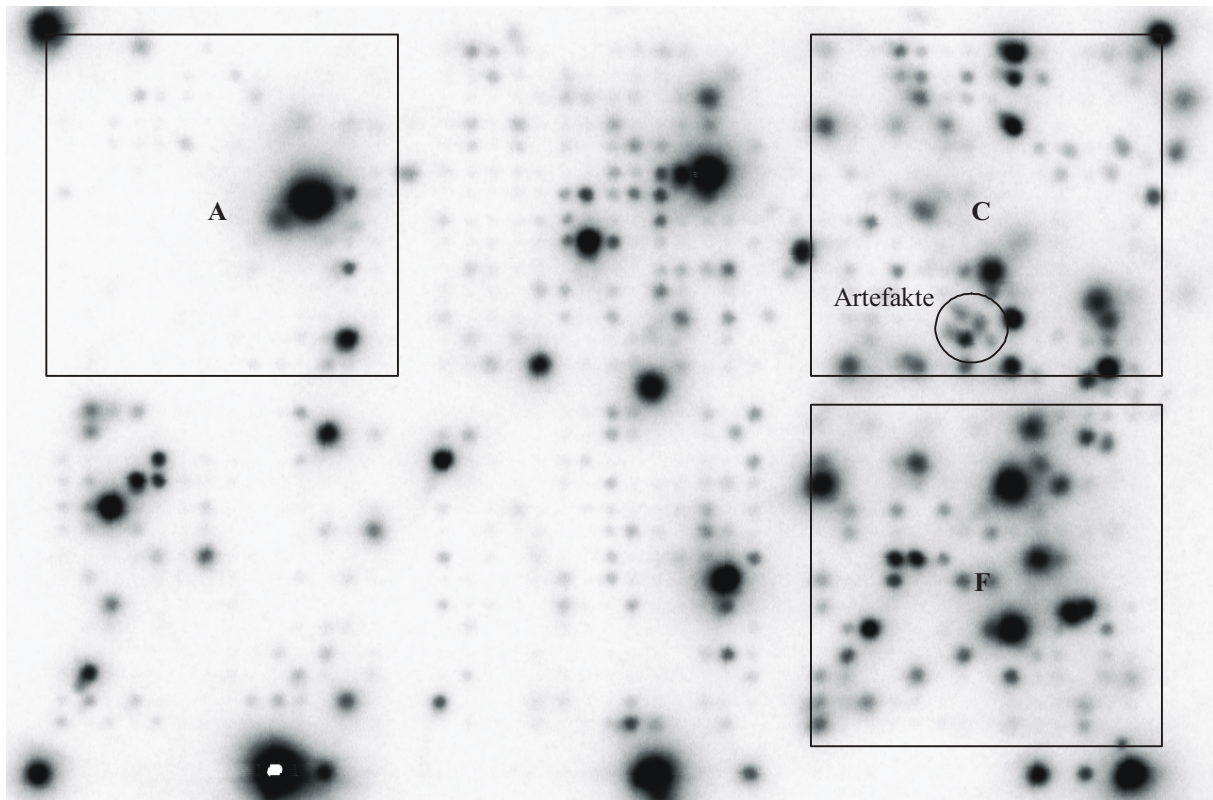


Abb. 13: Darstellung eines hybridisierten Makroarrays, bei dem die Hybridisierungen unscharf erschienen (Gruppen A, C und F), artifizielle Fehlhybridisierungen sichtbar waren (Gruppe C) und auf dem verschiedene Gene großflächige Hybridisierungen aufwiesen, welche die ROIs (nicht dargestellt) überschritten.

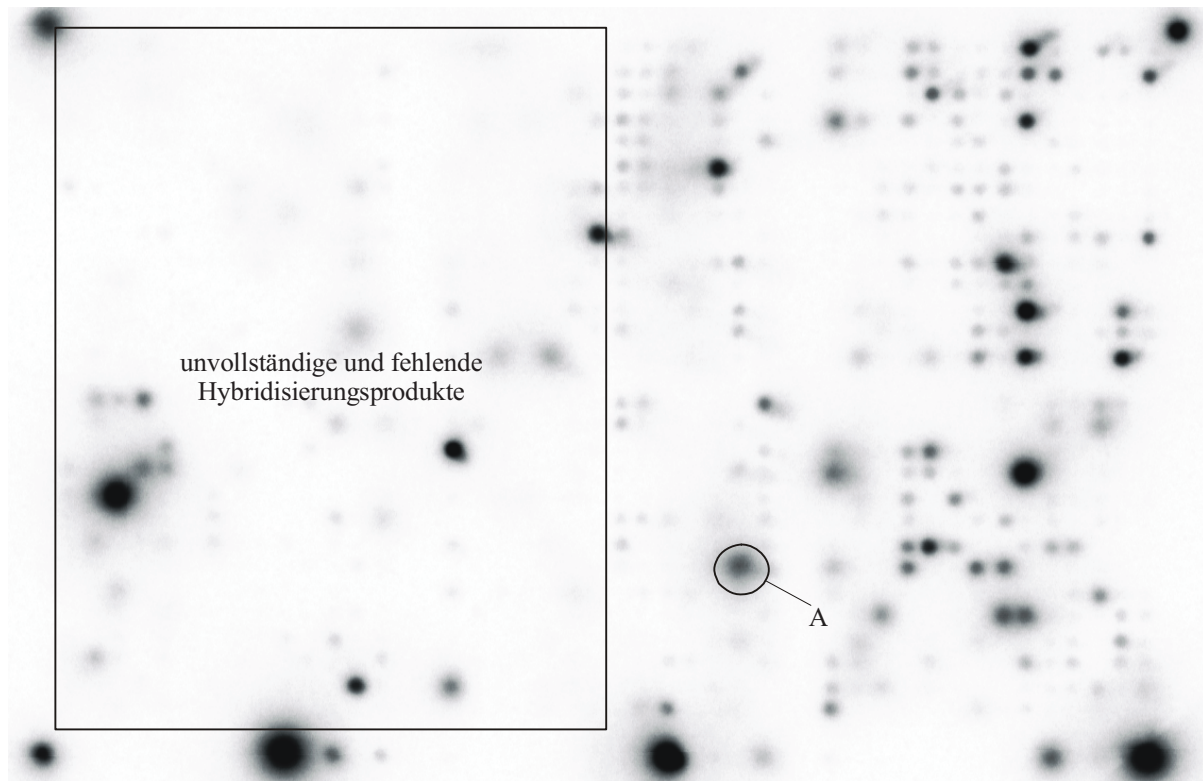


Abb. 14: Darstellung eines hybridisierten Makroarrays, bei dem die Hybridisierung fehlerhaft verlief. In Folge wiesen Teile der Membran unvollständige oder fehlende Hybridisierungen auf (umrahmter Bereich links). Zudem wurden Bereiche identifiziert, die unscharfe und kontrastarme Hybridisierungen zeigten (A).

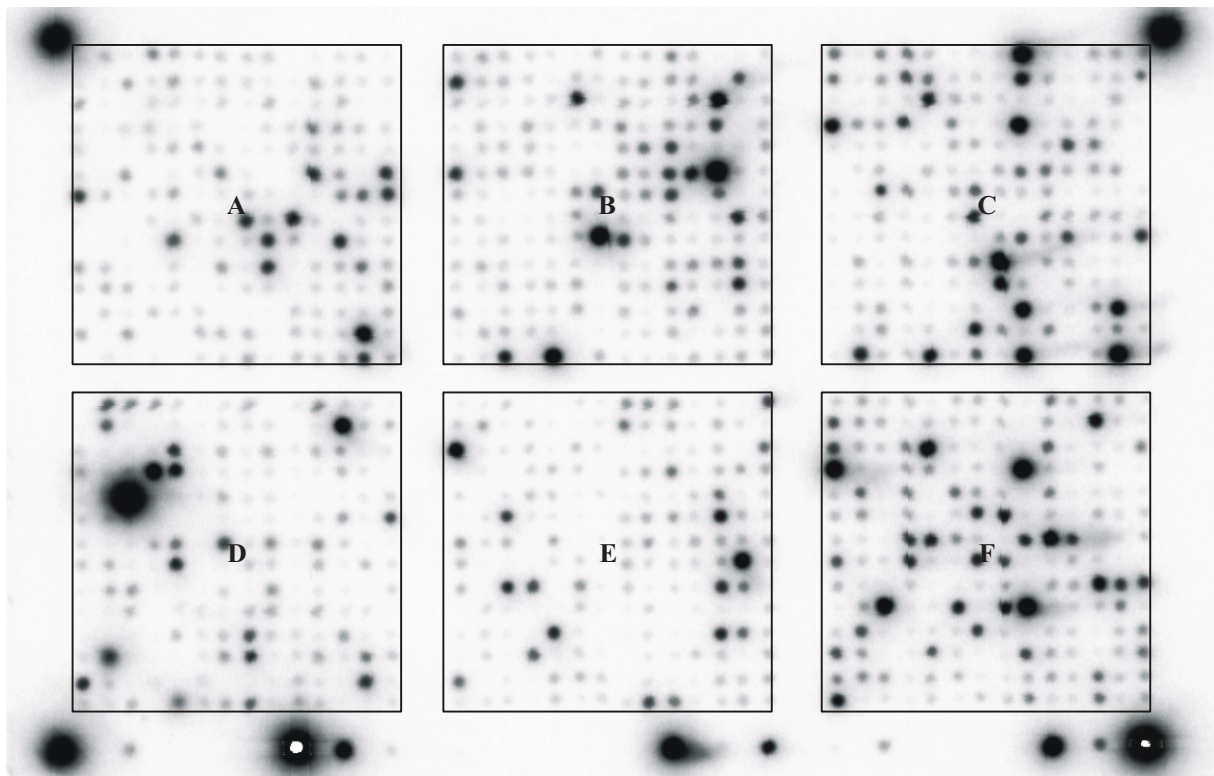


Abb. 15: Darstellung eines hybridisierten Makroarrays, bei dem eine weitgehend artefaktfreie, vollständige und kontrastreiche Hybridisierung in allen Gruppen des Makroarrays (A-F) festgestellt werden konnte. Zudem lagen die meisten gemessenen Graustufen im linear-dynamischen Bereich. Lediglich bei zwei „house-keeping genes“ lagen die gemessenen Graustufen darüber (weiße Flächen).

Mikroarrays				Gesamtgen- expression (unkorrigiert)	AUG	Gesamtgen- expression (korrigiert)
Array ID	Versuch	Zeit	[VM-26] (pMol)	CNT	CNT	CNT
4	a 100	20 min	0	3.617.834	22.937	3.640.771
7	a 100	20 min	100	5.409.058	38.665	5.447.724
51	b 100	20 min	0	3.932.132	11.796	3.943.928
53	b 100	20 min	100	6.971.134	55.704	7.026.839
9	a 100	24 h	0	2.187.389		2.187.389
11	a 100	24 h	100	3.125.908	24.903	3.150.811
55	b 100	24 h	0	4.590.001	258.863	4.848.865
57	b 100	24 h	100	6.033.632	198.571	6.232.203
14	a 100	48 h	0	2.090.131		2.090.131
16	a 100	48 h	100	5.374.837	78.642	5.453.479
61	b 100	48 h	0	2.024.911		2.024.911
65	b 100	48 h	100	1.213.188		1.213.188
17	a 100	72 h	0	2.359.989		2.359.989
21	a 100	72 h	100	7.663.748	150.730	7.814.479
66	b 100	72 h	0	4.446.949	140.900	4.587.849
69	b 100	72 h	100	5.343.234	87.816	5.431.051
26	a 5000	20 min	0	5.000.237	62.913	5.063.151
28	a 5000	20 min	5000	3.453.897	14.417	3.468.315
72	b 5000	20 min	0	3.710.482		3.710.482
78	b 5000	20 min	5000	1.932.657		1.932.657
32	a 5000	24 h	0	4.488.512	138.934	4.627.447
34	a 5000	24 h	5000	3.428.283	60.292	3.488.576
81	b 5000	24 h	0	3.487.526		3.487.526
83	b 5000	24 h	5000	2.244.447		2.244.447
35	a 5000	48 h	0	5.208.730	118.618	5.327.349
41	a 5000	48 h	5000	5.208.987	69.467	5.278.454
86	b 5000	48 h	0	3.991.766	11.796	4.003.563
93	b 5000	48 h	5000	3.895.436		3.895.436
44	a 5000	72 h	0	2.277.926	47.840	2.325.767
48	a 5000	72 h	5000	1.923.539		1.923.539
97	b 5000	72 h	0	1.842.529		1.842.529
98	b 5000	72 h	5000	2.567.798	14.417	2.582.215

Tab. 5: Zusammenstellung der digitalisierten Makroarrays, an denen die weitere Datenanalyse erfolgte. Experimente und deren Wiederholung (a und b) mit 100 pM VM-26 sind gegen die Zeit und Kontrolle (0 pM) im oberen Teil, diejenigen mit 5.000 pM VM-26 im unteren Teil der Tabelle wiedergegeben. Die korrespondierenden Berechnungen der unkorrigierten und korrigierten Gesamtgenexpression und der AUG (Areale mit undefinierten Grauwerten) sind in den folgenden Spalten abgebildet.

Eine Zusammenstellung der selektierten digitalisierten Makroarrays ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Mittels der von Clontech zur Verfügung gestellten Software wurde die Gesamtgenexpression (unkorrigiert) berechnet. Da die Gesamtgenexpression von dieser Software nur innerhalb der ROIs („region of interest“) gemessen wurde, fanden großflächigere Hybridisierungen keine Berücksichtigung (Abbildung 16). Mittels gängiger Bildanalysesoftware (KS 400, Zeiss) wurden die summarischen Grauwerte in diesen Regionen nachbestimmt (AUG) und zur unkorrigierten Gesamtgenexpression addiert. Daraus ergab sich die korrigierte Gesamtgenexpression (Tabelle 5).

In der Regel befand sich die errechnete Gesamtgenexpression in einem Bereich zwischen 3.000.000 – 5.000.000 CNT (Tabelle 5). Bei großflächigen Hybridisierungsprodukten, die sich über die ROI erstreckten, wies die unkorrigierte/korrigierte Gesamtgenexpression häufig höhere Werte auf. Zudem kam es aufgrund der stark exprimierten Gene zu Überlagerungen auch in den Bereich der benachbarten Gene auf der Membran. Somit konnte nicht nur das stark exprimierte Gen selbst nicht ausgewertet werden, sondern auch die Abgrenzung zu den benachbarten Genen war nicht möglich. Häufig befand sich zudem auf solchen Makroarrays die Expression einzelner Gene außerhalb des lineardynamischen Bereichs (Abbildung 16).

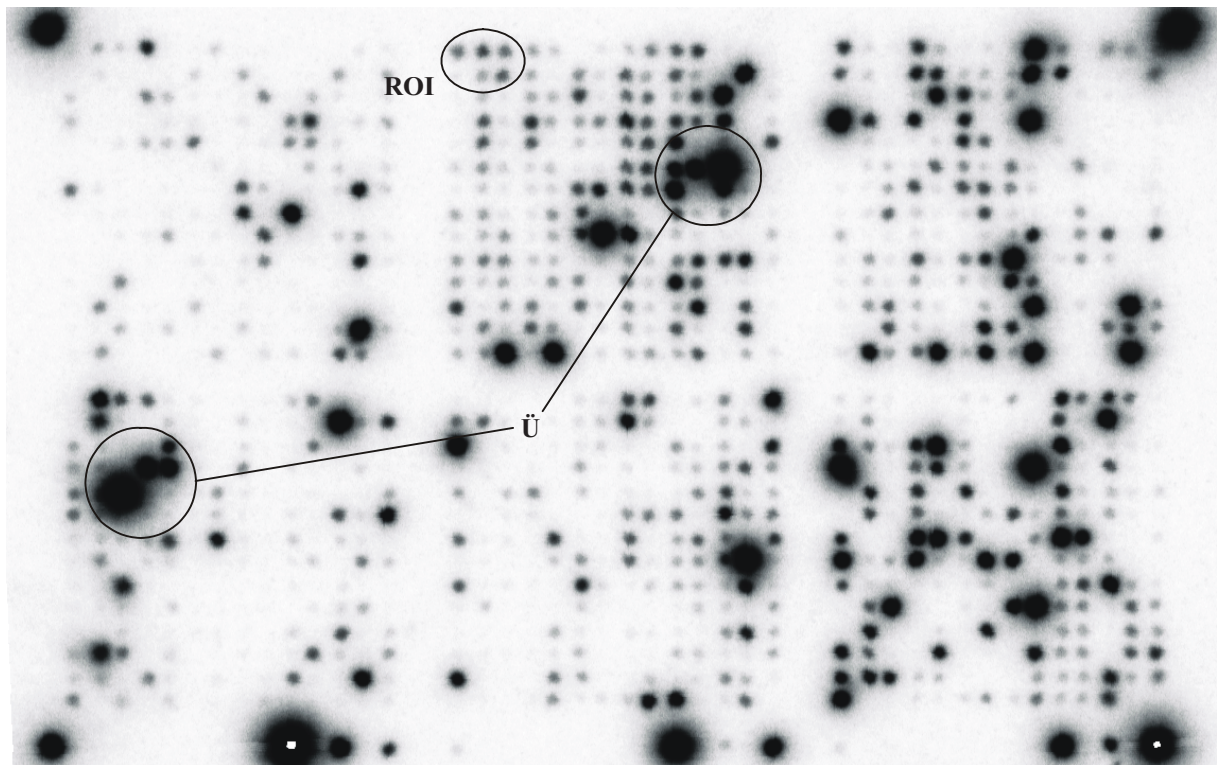


Abb. 16: Dargestellt ist ein Genexpressionsarray mit einer Gesamtgenexpression über 10.000.000 CNT. Dieser Mikroarray konnte nicht ausgewertet werden, weil die stark exprimierten Gene benachbarte Gene überlagerten (Ü). Die Hybridisierungsprodukte des Gens überragten zudem die ROI, so dass durch das Programm „Atlas Image“ nur die Summengrauwerte im vorgesehenen Teilbereich (ROI) durchgeführt wurden. Wiesen die Hybridisierungen eine Größe wie mit „ROI“ bezeichnet aus, dann konnte die Bestimmung des Summengrauwerts durch die Software korrekt durchgeführt werden.

Lag die errechnete Gesamtgenexpression unterhalb des Summengrauwertes 3.000.000 CNT, ging dies in der Regel mit der Darstellung einer reduzierten Anzahl exprimierter Gene einher (Abbildung 17).

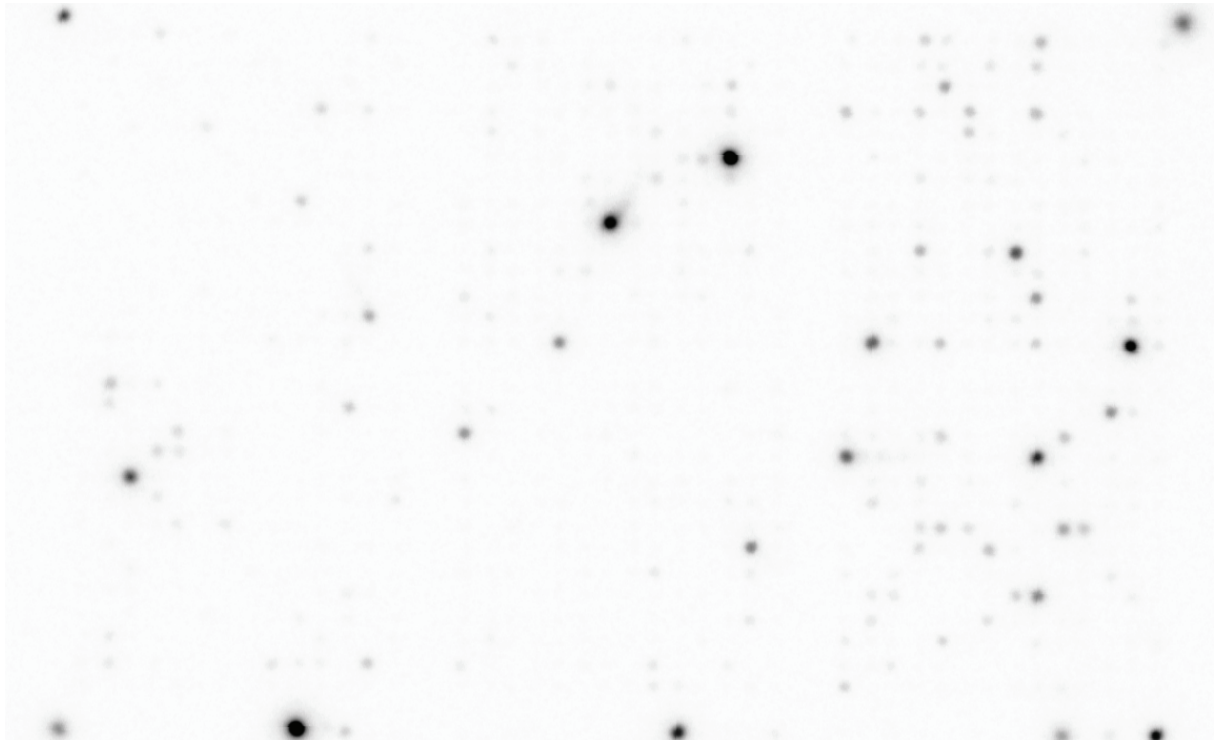


Abb. 17: Bei einer Genexpression unter 3.000.000 CNT (bspw. < 1.000.000 CNT s.o.), sank die Anzahl exprimierter Gene, da die schwächer exprimierten Gene nicht vom Hintergrund differenziert werden konnten.

4.1.2 Normalisierung

Die Normalisierung erfolgte wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben über die Gesamtgenexpression. Die entsprechenden Normalisierungsfaktoren für die Wiederholungsversuche sind in Tabelle 6 und für die 100 pM/5.000 pM VM-26 Exposition in Tabelle 7 (jeweils relativ zu den zeitlich korrespondierenden Kontrollen) aufgeführt. Die Mehrzahl der Normalisierungsfaktoren (29 von 32) überstieg nicht den Faktor 2 bzw. unterschritt nicht den Faktor 0,5 (Abbildung 18). Für drei Vergleiche nahm der Normalisierungsfaktor Werte von 0,2 sowie 2,6 und 3,3 an (Tabelle 6 und 7). Trotz mehrfacher Wiederholung der Versuche konnte keine Angleichung der Gesamtgenexpressionswerte und damit eine Änderung der Normalisierungsfaktoren in Richtung 1 erzielt werden.

Zeit	[VM-26] (pMol)	Makroarray 1		Gesamtgen- expression 1 korrigiert	Makroarray 2		Gesamtgen- expression 2 korrigiert	Normali- sierungs- faktor
		Array ID	Versuch	CNT	Array ID	Versuch	CNT	
20 min	0	4	a 100	3.640.772	51	b 100	3.943.929	1,1
20 min	100	7	a 100	5.447.724	53	b 100	7.026.839	1,3
24 h	0	9	a 100	2.187.389	55	b 100	4.848.865	2,2
24 h	100	11	a 100	3.150.811	57	b 100	6.232.203	2,0
48 h	0	14	a 100	2.090.131	61	b 100	2.024.911	1,0
48 h	100	16	a 100	5.453.480	65	b 100	1.213.188	0,2
72 h	0	17	a 100	2.359.989	66	b 100	4.587.850	1,9
72 h	100	21	a 100	7.814.479	69	b 100	5.431.052	0,7
20 min	0	26	a 5000	5.063.151	72	b 5000	3.710.483	0,7
20 min	5000	28	a 5000	3.468.316	78	b 5000	1.932.658	0,6
24 h	0	32	a 5000	4.627.447	81	b 5000	3.487.526	0,8
24 h	5000	34	a 5000	3.488.576	83	b 5000	2.244.447	0,6
48 h	0	35	a 5000	5.327.349	86	b 5000	4.003.563	0,8
48 h	5000	41	a 5000	5.278.455	93	b 5000	3.895.436	0,7
72 h	0	44	a 5000	2.325.767	97	b 5000	1.842.530	0,8
72 h	5000	48	a 5000	1.923.540	98	b 5000	2.582.216	1,3

Tab. 6: Berechnung der Normalisierungsfaktoren der Wiederholungsversuche (a und b) nach VM-26 Exposition. Es wurde der Quotient der Gesamtgenexpression 2/Gesamtgenexpression 1 gebildet. Dieser Quotient bezog sich auf Wiederholungsversuche zum gleichen Zeitpunkt und mit der korrespondierenden VM-26 Konzentration durchgeführt waren (in der gleichen Zeile dargestellt). Dadurch wurden Genexpressionsmessungen vergleichbar gemacht. Danach wurde die Genexpression jedes einzelnen Gens des Makroarrays 1 mit dem entsprechenden Normalisierungsfaktor multipliziert.

Zeit	Versuch	Makroarray 1		Gesamtgen- expression 1 korrigiert	Makroarray 2		Gesamtgen- expression 2 korrigiert	Normali- sierungs- faktor
		Array ID	[VM-26] (pMol)	CNT	Array ID	[VM-26] (pMol)	CNT	
20 min	a 100	4	0	3.640.772	7	100	5.447.724	1,5
20 min	b 100	51	0	3.943.929	53	100	7.026.839	1,8
24 h	a 100	9	0	2.187.389	11	100	3.150.811	1,4
24 h	b 100	55	0	4.848.865	57	100	6.232.203	1,3
48 h	a 100	14	0	2.090.131	16	100	5.453.480	2,6
48 h	b 100	61	0	2.024.911	65	100	1.213.188	0,6
72 h	a 100	17	0	2.359.989	21	100	7.814.479	3,3
72 h	b 100	66	0	4.587.850	69	100	5.431.052	1,2
20 min	a 5000	26	0	5.063.151	28	5000	3.468.316	0,7
20 min	b 5000	72	0	3.710.483	78	5000	1.932.658	0,5
24 h	a 5000	32	0	4.627.447	34	5000	3.488.576	0,8
24 h	b 5000	81	0	3.487.526	83	5000	2.244.447	0,6
48 h	a 5000	35	0	5.327.349	41	5000	5.278.455	1,0
48 h	b 5000	86	0	4.003.563	93	5000	3.895.436	1,0
72 h	a 5000	44	0	2.325.767	48	5000	1.923.540	0,8
72 h	b 5000	97	0	1.842.530	98	5000	2.582.216	1,4

Tab. 7: Berechnung der Normalisierungsfaktoren für den Vergleich der Kontrollen (0 pM) gegenüber VM-26 exponierten Zellen (100 pM bzw. 5.000 pM). Die miteinander abgeglichenen Gesamtgenexpressionsmessungen sind in der gleichen Zeile dargestellt und die Wiederholungsversuche mit a und b gekennzeichnet. Es wurde der Quotient der Gesamtgenexpression 2/Gesamtgenexpression 1 gebildet. Dadurch wurden die Genexpressionsmessungen vergleichbar gemacht. Danach wurde die Genexpression jedes einzelnen Gens des Makroarrays 1 mit dem entsprechenden Normalisierungsfaktor multipliziert.

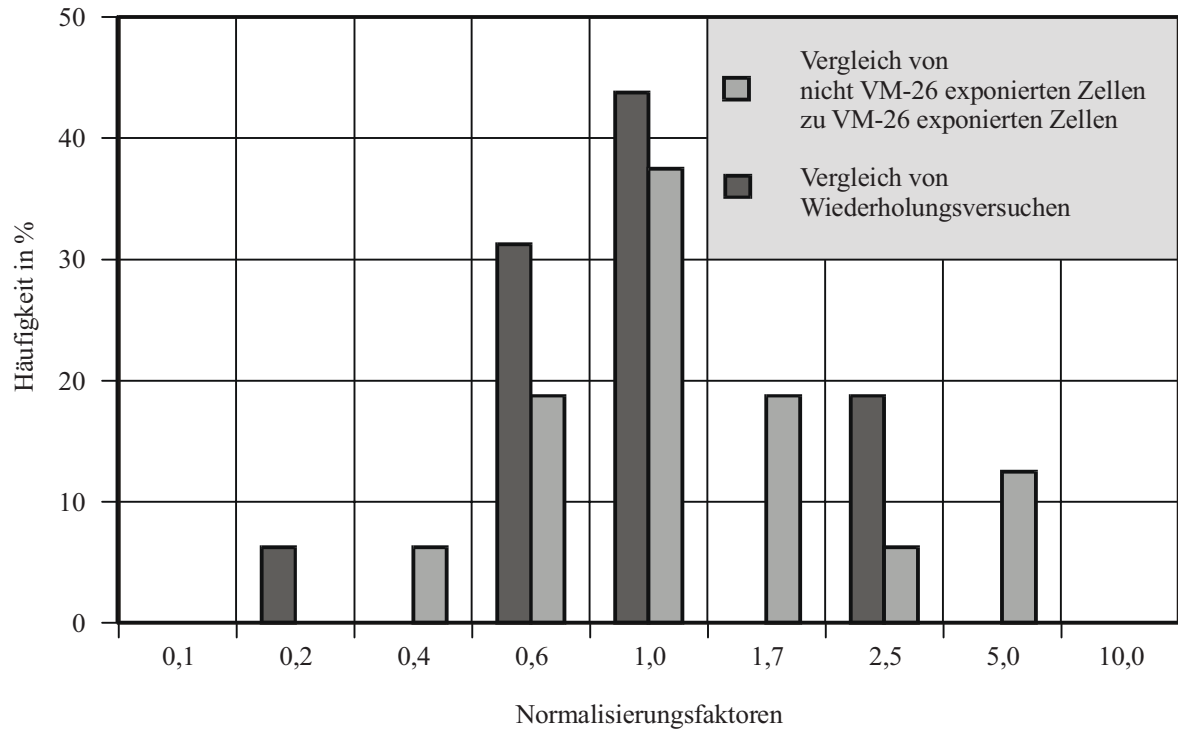


Abb. 18: Darstellung der Auftretshäufigkeit der Normalisierungsfaktoren.

4.1.3 Einfluss der AUG (Areale mit undefinierten Grauwerten) auf die Gesamtgenexpression

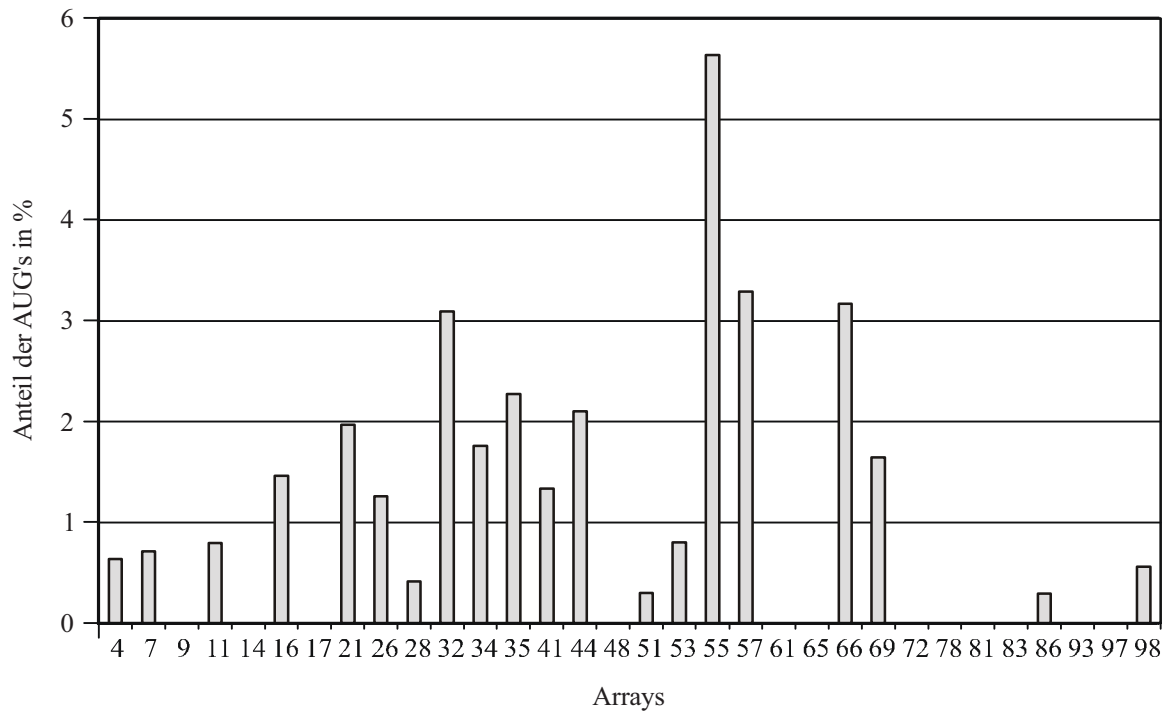


Abb. 19: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils der AUG's an der Gesamtgenexpression der 32 ausgewählten Arrays. Die Nummern entsprechen der Array ID der Makroarrays in Tabelle 5.

Für die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen AUG (Areale mit undefinierten Grauwerten, da sie sich über die „region of interest“ (ROI) erstreckten) wurden Werte zwischen 258.863 CNT und 11.796 CNT mit Hilfe der Bildanalysesoftware (KS 400, Zeiss) und dem Programm Excel (Microsoft) berechnet. In 20 der 32 ausgewählten Arrays (63%) wurden AUG gefunden. In 80% (16 von 20 Fällen) betrug der Anteil der AUG an der unkorrigierten Gesamtgenexpression bis zu 2,5% (Abbildung 19). In drei weiteren Fällen lag er zwischen 3% und 3,5%, In einem Fall wurden 5,7% erreicht.

4.2 Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität

Zur Einstellung von Reproduzierbarkeit und Sensitivität wurde der in Kapitel 3.2.3 erklärte Berechnungsmodus angewandt. Zur Definition *exprimierter* Gene wurde geprüft, wie sich die Anzahl der exprimierten Gene ändert, wenn ein 2-, 5- und 10-faches des Hintergrundschwellenwertes (F_H) angenommen wurde. Zur Definition *differentiell exprimierter* Gene wurde geprüft, wie sich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene ändert, wenn ein 2-, 3- und 5-faches der Höhe der Genexpression relativ zur Genexpression der Kontrolle (eines Versuchs) angenommen wurde. Weil als Kontrolle (Kalibrator) einer der Wiederholungsversuche galt und dieser relativ zum anderen Versuch in Beziehung gesetzt wurde, sollte idealerweise bei jeder Parametereinstellung eine 100%ige Übereinstimmung erfolgen. Insgesamt wurden 9 Kombinationen von Parametereinstellungen durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse zum einen auf die Gesamtzahl der 1.176 Gene bezogen (Tabelle 8a) und zum anderen relativ zur Anzahl der exprimierten Gene dargestellt (Tabelle 8b). Die Reproduzierbarkeit sollte dabei folgende Werte erreichen:

- auf der Basis aller 1.176 untersuchten Gene einen Wert $\geq 95\%$ (Tabelle 8a)
- auf der Basis der Anzahl aller exprimierten Gene einen Wert $\geq 90\%$ (Tabelle 8b)

Bei der Festlegung des Faktors des Hintergrundschwellenwertes auf 5 und die Höhe der differentiellen Genexpression für hoch- bzw. runterregulierte Gene auf 3 ergab sich eine Reproduzierbarkeit von 99% bezogen auf die Gesamtgenzahl der untersuchten Gene (Tabelle 8a) und von 88% bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene (Tabelle 8b). Wählte man für F_H und R höhere Werte, stieg die Reproduzierbarkeit bis auf 100% bezogen auf die Gesamtgenzahl der untersuchten Gene, beziehungsweise bis auf 96% bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene. Gleichzeitig sank die Anzahl differentiell exprimierter Gene und damit die Sensitivität.

A) Reproduzierbarkeit bezogen auf die Gesamtzahl der 1.176 untersuchten Gene (%)					B) Reproduzierbarkeit bezogen auf die Zahl der exprimierten Gene (%)				
		variabler Faktor für den Hintergrundschwellenwert (F_H)					variabler Faktor für den Hintergrundschwellenwert (F_H)		
		2	5	10			2	5	10
Höhe der differentiellen Genexpression (relativ zur Kontrolle) (R)	2	94	97,4	98,5	Höhe der differentiellen Genexpression (relativ zur Kontrolle) (R)	2	69,2	73,9	72,8
	3	97,4	98,8	99,4		3	86,5	88,1	89,1
	5	99,1	99,6	99,8		5	95,8	96,3	96,4

Tab. 8: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Wiederholungsversuche miteinander relativ zur Gesamtzahl der untersuchten 1.176 Gene (A) und bezogen auf die Anzahl der exprimierten Gene (B). Die Definition der exprimierten Gene erfolgte unter Berücksichtigung unterschiedlicher Faktoren des Hintergrundschwellenwertes. Die Definition der differentiell exprimierten Gene wurde relativ zu einem mehrfachen der Höhe der Genexpression zweier zu vergleichender Wiederholungsversuche durchgeführt.

Aufgrund dieser Vergleiche wurde mit Priorität für hohe Reproduzierbarkeit und unter in Kaufnahme einer reduzierten Sensitivität folgende Definition für differentiell exprimierte Gene getroffen:

- alle Gene, deren mittlerer Grauwert mindestens das fünf-fache des Hintergrundgrauwerts aufweist und zugleich
- eine Höhe der Genexpression (Summengrauwert) zeigt, die sich um den Faktor 3 vom korrespondierenden Wert der Kontrolle unterscheidet,

gelten als differentiell exprimiert.

4.3 Optische Überprüfung der Ergebnisse

Als weitere Kontrolle und zum Ausschluss der Auswertung von Artefakten wurde eine optische Kontrolle der differentiell exprimierten Gene durchgeführt (siehe 3.2.4.2). Für 101 differentiell exprimierte Gene (89%) konnten somit die rechnerischen Ergebnisse durch die optische Kontrolle bestätigt werden (Abbildung 12, Kapitel 3.2.5.2, Material und Methoden). Bei 12 differentiell exprimierten Genen (11%) wurde eine schlechte Übereinstimmung beider Verfahren gefunden (Abbildung 20).

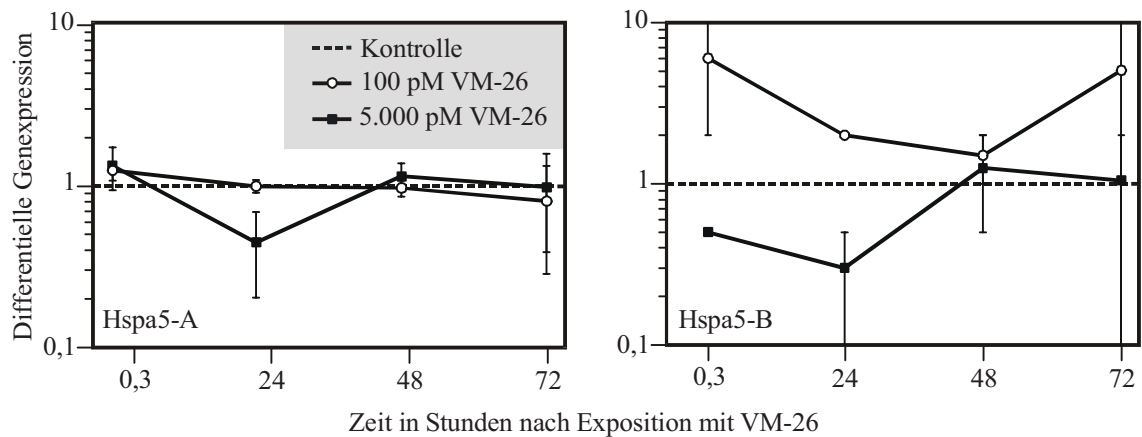


Abb. 20: Übereinstimmung der Berechnung der differentiellen Genexpression basierend auf den Grauwertbestimmungen am Makroarray (Hspa5-A) und des Verfahrens der optischen Kontrolle (Hsp5a-B) für das Gen „heat shock protein 5“. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar. Es konnte für 100 pM VM-26 eine nur geringe Übereinstimmung beider Verfahren gezeigt werden.

Bei abweichenden Ergebnissen mit beiden Verfahren wurden folgende Parameter erneut überprüft:

- Übereinstimmung der Koordinate des Gens mit der Auswertungsmaske
- Optimale Ausrichtung der Auswertungsmaske für diese Koordinate
- Überprüfung auf Artefakte an dieser Stelle der Nylon-Membran, die die Auswertung beeinflussen.

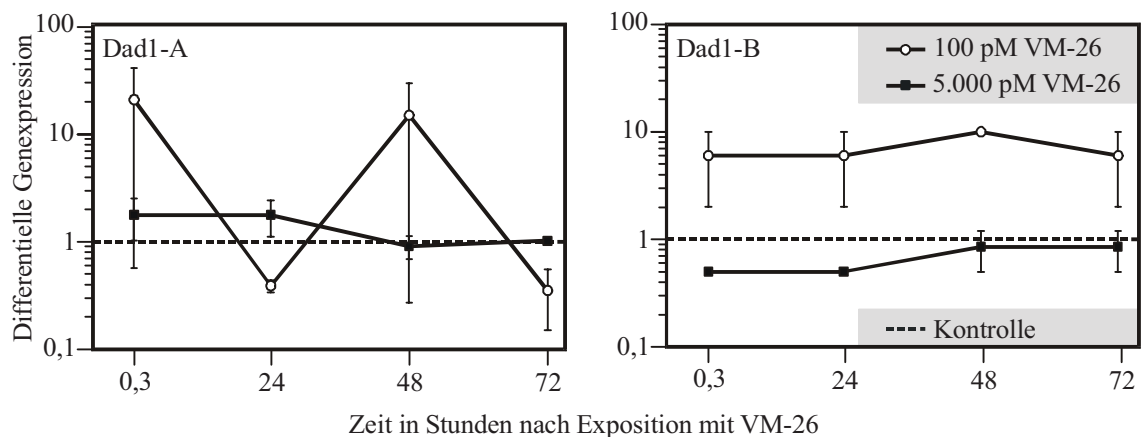


Abb. 21: Übereinstimmung der Berechnung der differentiellen Genexpression basierend auf den Grauwertbestimmungen am Makroarray (A) und des Verfahrens der optischen Kontrolle (B) für das Gen „defender against cell death 1“ (Dad1). Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

"defender against cell death 1" (Dad1)					
	Zeit	Versuch 1		Versuch 2	
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
100 pM VM-26	20 min				
	24 h				
	48 h				
	72 h				
	Zeit	Versuch 1		Versuch 2	
		Versuch	Kontrolle	Versuch	Kontrolle
5.000 pM VM-26	20 min				
	24 h				
	48 h				
	72 h				

Abb. 22: Zusammenstellung der Hybridisierungsprodukte des Gens „defender against cell death 1“ (Dad1) zu verschiedenen Zeiten nach Applikation von 100 pM VM-26 (oben) und 5.000 pM VM-26 (unten). ROI's sind kreisförmig innerhalb der Hybridisierungsprodukte wiedergegeben.

Nach dieser weiteren Kontrolle wurde für folgende Gene eine in Abhängigkeit vom gewählten Verfahren unterschiedliche Messung der differentiellen Genexpression gefunden: amino-terminal enhancer of split; basigin; defender against cell death 1; gene model 1840, (NCBI); glutathione S-transferase, mu 2; heat shock protein 5; hematopoietically expressed homeobox; S100 calcium binding protein A10 (calpactin); transducer of ErbB-2.1; vascular endothelial growth factor A; v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian); Y box protein 1. In diesen Fällen wurden die Grauwertberechnungen und die assoziierten Makroarrays erneut auf Artefakte überprüft. Wurde keine Beanstandung gefunden, dann wurden die erhobenen Berechnungen übernommen.

Für das Gen „defender against cell death 1“ (Dad1) konnte allerdings gezeigt werden, dass es aufgrund seiner starken Expression über die ROI hinaus zur Darstellung kam und sich damit der üblichen Auswertung entzog (Abbildung 21 und 22).

4.4 Datenauswertung

Die Analyse der Daten erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Untersuchung der Anzahl exprimierter/differentiell exprimierter Gene gegen die Zeit (4.4.1).
- Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 (4.4.2).
- Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 unter Berücksichtigung der funktionellen Hauptgruppen A bis F (4.4.3).
- Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 in Abhängigkeit von ihrer Zugehörigkeit zu einer der 38 funktionellen Untergruppen (4.4.4).

4.4.1 Untersuchung der Anzahl exprimierter/differentiell exprimierter Gene gegen die Zeit

Es waren durchschnittlich 13% aller Gene exprimiert (von 3% bis 32%). Dabei stellten sich durchschnittlich 1,1% der Gene als differentiell exprimiert dar (von 0,3% bis 2,0%). Bei der Darstellung gegen die Zeit konnten zu allen Zeitpunkten 38 bis 383 exprimierte Gene nach 100 pM VM-26 gefunden werden, während die Anzahl der differentiell exprimierten Gene bis zu 20 war (Abbildung 23).

Eine ähnliche Beziehung konnte nach 5.000 pM VM-26 Applikation gezeigt werden: während die Anzahl der exprimierten Gene zu jedem Zeitpunkt 70 bis 199 betrug, stieg die Anzahl der differentiell exprimierten Gene nicht über 25. Nach Exposition mit 100 pM VM-26 konnten relativ zur Applikation mit 5.000 pM VM-26 zu den Zeitpunkten 20 min und 72 h eine um das 2-3fache erhöhte Anzahl an exprimierten Genen gefunden werden, während die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (mit Ausnahme des 20 min Wertes) weitgehend vergleichbare Werte aufwies (Abbildung 23).

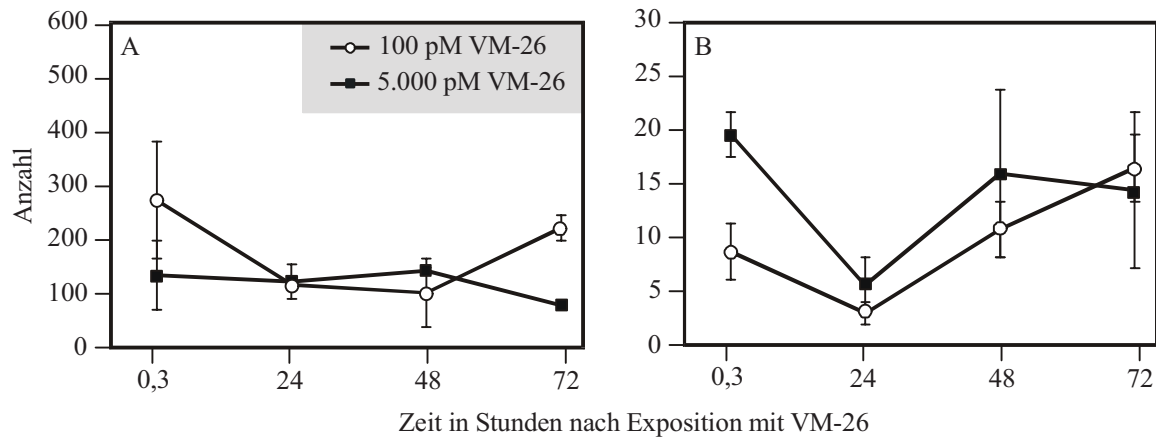


Abb. 23: Darstellung der Anzahl exprimierter (A) und differentiell exprimierter (B) Gene nach Applikation von 100 pM sowie 5.000 pM VM-26. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die maximale und die minimale Anzahl an.

4.4.2 Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26

Es wurden insgesamt nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 relativ zu den korrespondierenden Kontrollen 113 differentiell exprimierte Gene gefunden. Zu mindestens einem Zeitpunkt wiesen diese Gene eine differentielle Genexpression auf. Während der anderen Zeitpunkte entsprach deren Genexpression den Kontrollwerten. Diese 113 Gene wurden zunächst unter Berücksichtigung des Zeitpunktes nach Exposition mit VM-26 in zwei Gruppen eingeteilt. Danach ergab sich die Gruppe der *differentiell exprimierten* Gene (hoch- und herunterregulierte Gene subsumiert). Die zweite Gruppe entsprach in ihrer Genexpression den Kontrollen und wurde als *nicht-differentiell exprimiert* bezeichnet. Im Verlauf gegen die Zeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der differentiell exprimierten Gene nach 100 pM VM-26 ab 24 h nach Applikation bis 72 h anstieg, während nach 5.000 pM VM-26 der Anteil von 70% 20 min nach Applikation stetig auf 50% bis zu 72 h nach Applikation sank (Abbildung 24).

Wurden nun diese 113 nach Exposition mit 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 differentiell exprimierten Gene *unabhängig von der Zeit* auf Gemeinsamkeiten/Unterschiede nach Exposition mit VM-26 untersucht, dann konnten 20% der Gene (23) sowohl nach 100 pM als auch nach 5.000 pM VM-26 als differentiell exprimiert gefunden werden (Abbildung 25). Nach Exposition mit 100 pM VM-26 waren 37% der Gene (42) differentiell exprimiert, die sich bei 5.000 pM VM-26 nicht differentiell exprimiert darstellten. Im Gegensatz dazu konnten für 43% der Gene (48) nur nach Exposition mit 5.000 pM VM-26 eine differentielle Expression gezeigt werden.

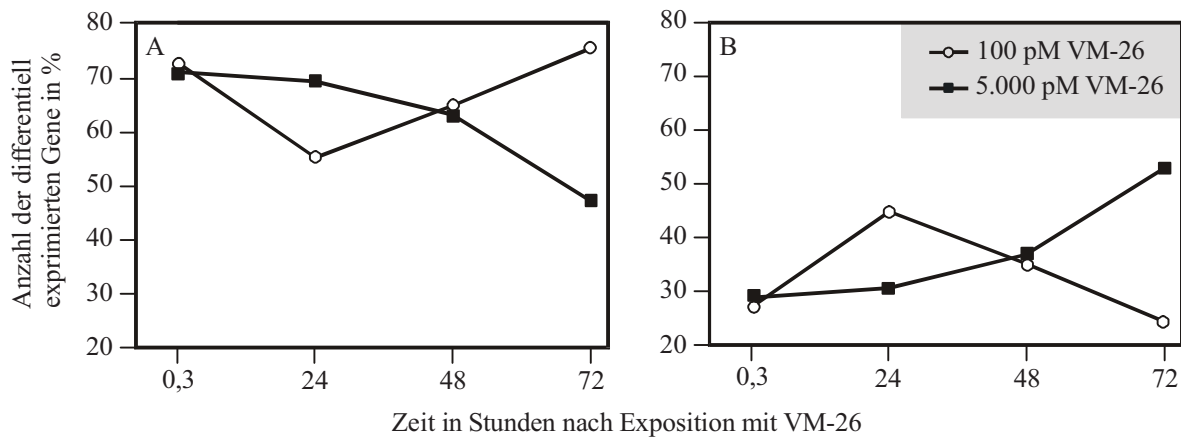


Abb. 24: Vergleich der 113 zu mindestens einem Zeitpunkt differentiell exprimierten Gene. Während der prozentuale Anteil der differentiell exprimierten Gene nach 5.000 pM VM-26 im zeitlichen Verlauf stetig abnimmt, kommt es zwischen den Zeitpunkten 24 Stunden und 72 Stunden nach Exposition mit 100 pM VM-26 zu einer kontinuierlichen Zunahme der differentiell exprimierten Gene (A). Dazu entgegengesetzt stellen sich die Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten dar, die dem Kontrollwert entsprechen (B).

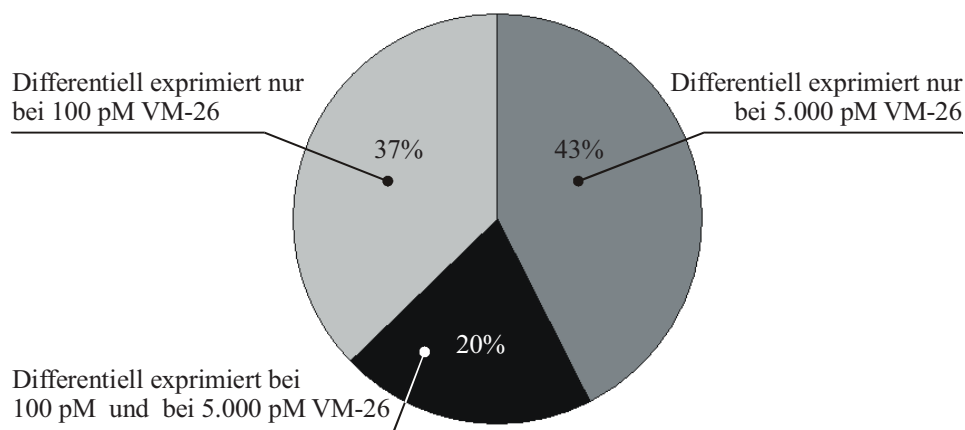


Abb. 25: Anzahl gemeinsamer/unterschiedlich differentiell exprimierter Gene relativ zur Exposition mit 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 ohne Berücksichtigung des Zeitpunkts der differentiellen Genexpression.

Im Rahmen der Mikrokernbildung konnten zu *unterschiedlichen Zeitpunkten* nach 100 pM VM-26 Applikation insgesamt 78 differentiell exprimierte Gene gefunden werden (Tabelle 9). Während der Apoptoseinduktion nach Applikation von 5.000 pM VM-26 waren 104 Gene differentiell exprimiert (Tabelle 9).

Während der Mikrokernbildung stieg die Anzahl der hochregulierten Gene von 13 nach 20 min bis auf 25 Gene 72 h nach Applikation an. Die Anzahl der herunterregulierten Gene schwankte zwischen 6 bis 10 Genen. Nach 24 h waren nur 2 Gene differentiell exprimiert. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der hochregulierten Gene während der Apoptosebildung zu Beginn (20 min) mit 39 Genen am höchsten und sank danach auf 7 bis 13 Gene. Erst 48 h und 72 h nach VM-26 Applikation wurden 13 bzw. 17 herunterregulierte Gene gefunden. Nach 24 h waren nur 4 Gene differentiell exprimiert. Die Gegenüberstellung der über- und unterexprimierten Gene gegen die verschiedenen Zeitpunkte erlaubte zu untersuchen, ob

bestimmte Gene sowohl nach Mikrokernbildung (100 pM VM-26) als auch nach Apoptose Induktion (5.000 pM VM-26) zum gleichen Zeitpunkt nach VM-26 Applikation und gleichsinnig differentiell exprimiert waren (Tabelle 9). Im Rahmen der Mikrokernbildung konnte für 15 von insgesamt 77 differentiell exprimierten Gene (16%) eine zur Apoptoseinduktion zeitgleiche und gleichsinnige differentielle Genexpression gezeigt werden.

a) Differentiell exprimierte Gene nach Exposition mit 100 pM VM-26 (Mikrokernbildung)				
Zeit	20 min	24 h	48 h	72 h
Überexprimierte Gene	Cfl1, Col6a1, Cst3, Dad1, Eng, Fn1, Gnao1, Hsp90ab1, Mcm5, Nbn, Nfkbia, Rasa3, Sqstm1 (13)	Ccng1, Cry1, Jun, Ttf1 (4)	Bgn, Ccl7, Ccng1, Cdk4, Col6a1, Dad1, Fn1, Hmgn1, Rxra, Spp1, Ttf1 (11)	Bnip3, Ccl7, Ccnd1, Ccng1, Cdk4, Col6a1, Dynll1, Ezh2, Fosb, Gstp1, Hmx2, Lama2, Mapk14, Pcp4, Phlda1, Pim1, Prnp, Rab2a, Rad21, Sema5a, Spp1, Stx2, Tlx2, Ttf1 (24)
Unter-exprimierte Gene	Ccnd2, Cdk5, Fzd7, Hhex, Mcl1, Tcea3 (6)	Cdk5, Myc (2)	Dad1, Ezr, Gm1840, Gnas, Gstm2, Ppof2, Ptma, Rnf2, Vim, Ybx1 (10)	Dad1, Ddit3, Hspa5, Mcl1, Myc, Rad21, Vegfa (7)

b) Differentiell exprimierte Gene nach Exposition mit 5.000 pM VM-26 (Apoptose)				
Zeit	20 min	24 h	48 h	72 h
Überexprimierte Gene	Atf4, Bsg, Cdh1, Cfl1, Creb1, Csf2ra, Cst3, Ctnnd2, Fn1, Gli3, Gm1916, Gnas, Hsp110, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Inhbc, Kif3b, Kl, Lamc1, Map2k4, Map3k3, Nefl, Nme2, Oxtr, Pdna, Pdx1, Rad21, Rfng, Sema5b, Shox2, Spp1, Stag2, Tgfb1, Thbs2, Thoc4, Tnfaip3, Trim27, Vat1, Ybx1 (39)	Calm1, Ccl7, Cfl1, Ctsd, Myl6, Pdna, Ttf1 (7)	Aes, Bag1, Ccl7, Clu, Ctsd, Jun, Lig3, Mcm5, Myl6, Rela, Ssrp1, Tob1, Ttf1 (13)	Akt2, Ccl7, Ctsd, Gstp1, Hmgn1, Myl6, S100a10, Shfm1, Spp1, Ssrp1, Ttf1 (11)
Unter-exprimierte Gene		Gstp1, Hspa5, Myc, Vegfa (4)	Atf4, Csf2ra, Fn1, Hsp90ab1, Itpr2, Mapre2, Myc, Phgdh, Rad21, Sdc3, Spp1, Vat1, Vegfa (13)	Aes, Atf4, Braf, Bsg, Ddit3, Fn1, Gm1840, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Mapre2, Myc, Nme2, Ptma, Sdc3, Vegfa, Ybx1 (17)

Tab. 9: Darstellung differentiell exprimierter Gene, die nach Mikrokernbildung (100 pM VM-26, a) oder Apoptose (5.000 pM VM-26, b) zu verschiedenen Zeiten nach VM-26 Applikation auftraten und teilweise gleichsinnig sowie zum gleichen Zeitpunkt differentiell exprimiert waren (grau unterlegt). Die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene ist in Klammern (fett) für jeden Zeitpunkt und beide VM-26 Dosierungen angegeben.

Ausgehend von Tabelle 9 ließen sich für beide VM-26 Konzentrationen 11 Gene (8 bei Einfachnennung) ermitteln, die in beiden Experimenten eine differentielle *Überexpression* zeigten (Tabelle 10) bzw. vier Gene (drei bei Einfachnennung), die in beiden Experimenten differentiell *herunterreguliert* waren.

Für 2 Gene „secreted phosphoprotein“ (Spp1) und „collagen, type X, alpha 1“ (Col10a1) konnte eine entgegengesetzte differentielle Genexpression gezeigt werden, sodass die Gene 48 h nach 100 pM VM-26 überexprimiert und nach Exposition mit 5.000 pM VM-26 herunterreguliert erschienen. Die verbliebenen 108 Gene wiesen nur in einer der beiden Versuchsreihen zum gleichen Zeitpunkt eine differentielle Genexpression auf und fanden deshalb keine Berücksichtigung.

Zeit	20 min	24 h	48 h	72 h
überexprimiert	Cfl1, Cst3, Fn1, Hsp90ab1	Ttf1	Ccl7, Ttf1	Ccl7, Gstp1, Spp1, Ttf1
unterexprimiert		Myc		Ddit3, Myc, Vegfa

Tab. 10: Zusammenstellung solcher Gene, die sich gleichsinnig nach 100 pM/5.000 pM VM-26 differentiiell über-/unterexprimiert gegen die Zeit darstellten.

Abschließend wurden die 113 differentiiell exprimierten Gene in 4 Gruppen aufgeteilt. Die Unterteilung orientierte sich primär am Vergleich der Genexpression nach 100 pM und 5.000 pM VM-26 gegen die Zeit.

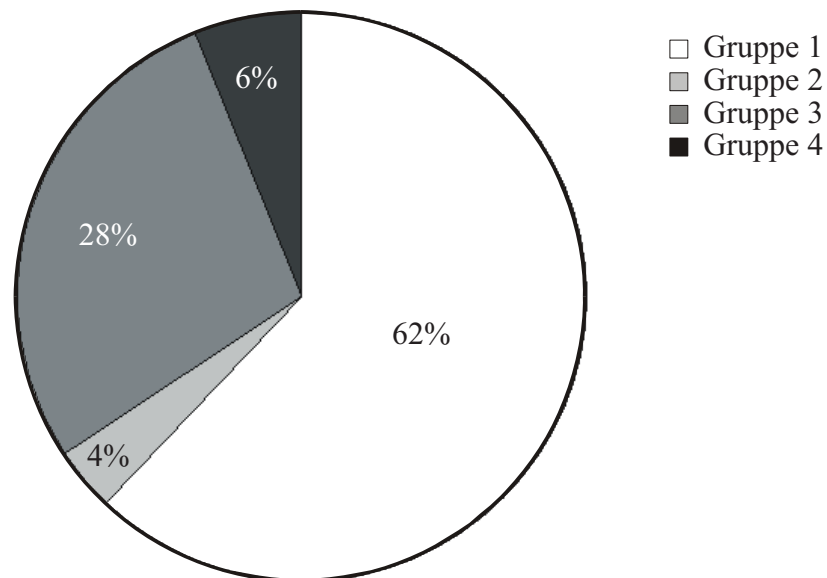


Abb. 26: Die Graphik stellt die Aufteilung der Gene nach dem Verlauf ihrer Genexpression in die Gruppen 1 bis 4 dar.

Die Gruppen wurden wie folgt definiert und enthalten folgende Gene:

Gruppe 1: alle Gene, die nach Exposition mit 100 pM oder 5.000 pM VM-26 zu einem einzigen Zeitpunkt einen differentiiell über- oder unterexprimierten Wert aufwiesen.

- Gruppe 2: alle Gene, die nach Exposition mit 100 pM und 5.000 pM VM-26 gleichsinnig zu mindestens einem Zeitpunkt über- oder unterexprimiert waren. Gleichzeitig sollte keine gegensinnige differentielle Genexpression zu einem anderen Zeitpunkt gefunden werden. Alternativ mussten sich zu mindestens drei Zeitpunkten die differentiell exprimierten Gene gleichsinnig nach Exposition mit 100 pM und 5.000 pM VM-26 verhalten.
- Gruppe 3: alle Gene, die sich nach Exposition mit 100 pM und 5.000 pM VM-26 gegensinnig zu mindestens einem Zeitpunkt über- oder unterexprimiert zeigten. Gleichzeitig sollte keine gleichsinnige differentielle Genexpression zu einem anderen Zeitpunkt gefunden werden. Alternativ mussten sich zu mindestens drei Zeitpunkten die differentiell exprimierten Gene gegensinnig nach Exposition mit 100 pM und 5.000 pM VM-26 verhalten.
- Gruppe 4: alle Gene, bei denen nach Exposition mit 100 pM und 5.000 pM VM-26 teilweise eine gleichsinnige und teilweise eine gegensinnige Genexpression gefunden wurde. Dies entsprach allen Genen, die nicht in die Gruppen 1-3 eingeordnet waren.

Der größte Anteil der Gene (62%) konnte der Gruppe 1 zugeordnet werden (Abbildung 26). In der Regel wurde eine differentielle Genexpression nur einmal während des Untersuchungszeitraums gefunden. Dieser Gruppe konnten 70 verschiedene Gene zugeordnet werden:

Differentiell überexprimiert waren:

Bag1, Bgn, Calm1, Cdh1, Clu, Creb1, Cry1, Ctnnd2, Dynll1, Eng, Ezh2, Fosb, Gli3, Gnao1, Hmx2, Hrk, Hsp110, Inhbc, Kif3b, Kl, Lama2, Lamc1, Lig3, Map2k4, Map3k3, Mapk14, Nbn, Nefl, Oxtr, Pcp4, Pdx1, Phlda1, Pim1, Prnp, Rab2a, Rasa3, Rela, Rfng, Rxra, S100a10, Sema5a, Sema5b, Shfm1, Shox2, Sqstm1, Stag2, Stx2, Tgfb1, Thbs2, Thoc4, Tlx2, Tnfaip3, Trim27.

Differentiell unterexprimiert waren:

Atf4, Braf, Ccnd2, Cdkn2d, Cited2, Ezr, Fzd7, Gstm2, Hhex, Itpr2, Phgdh, Ppef2, Rnf2, Skil, Tcea3, Vim.

Exemplarisch für Gruppe 1 ist in Abbildung 26 das Gen „laminin, gamma 1“ (Lamc1) dargestellt.

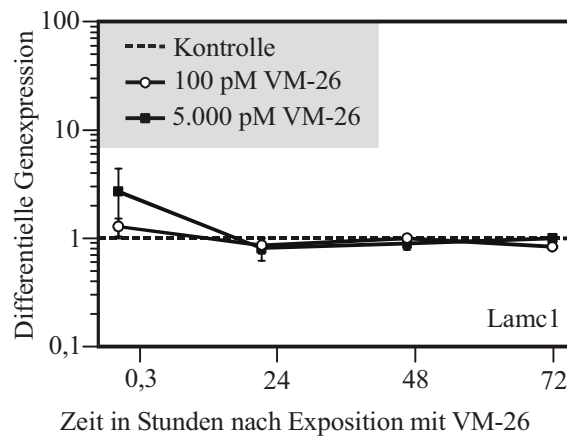


Abb. 27: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Genexpression eines Gens der *Gruppe 1* „laminin, gamma 1“ (Lamc1) nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26. Die Fehlerbalken stellen den maximal und den minimal gemessenen Genexpressionswert dar.

Mit 4% stellte sich die Gruppe 2 als die kleinste Gruppe dar (Abbildung 26). Insgesamt vier Gene (Ccl7, Cst3, Ddit3, Ttf1) wurden in diese Gruppe subsummiert und exemplarisch der zeitliche Verlauf der Genexpression für beide VM-26 Konzentrationen in Abbildung 28 für das Gen „transcription termination factor 1“ (Ttf1) dargestellt.

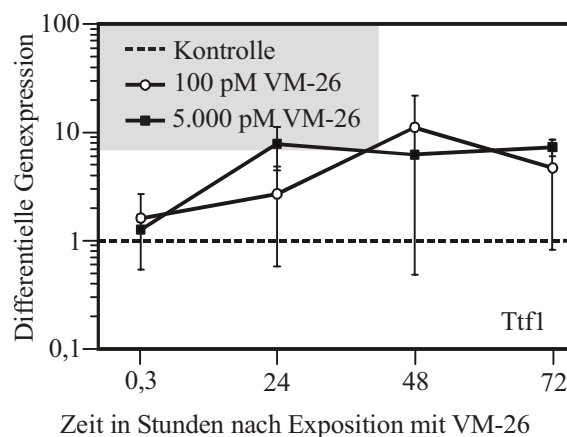


Abb. 28: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der gleichsinnig hoch-/herunterregulierten Genexpression eines Gens der *Gruppe 2* „transcription termination factor 1“ (Ttf1) nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26. Die Fehlerbalken stellen den minimal und den maximal gemessenen Genexpressionswert dar.

Mit 28% befanden sich in der Gruppe 3 insgesamt 32 der 113 Gene (Abbildung 26). Dazu gehörten die Gene:

Aes, Akt2, Atf4, Bsg, Ccnd1, Ccng1, Cdk4, Col6a1, Csf2ra, Ctsd, Dad1, Gm1840, Gm1916, Gnass, Gstp1, Hmgn1, Hsp90aa1, Hspa5, Jun, Mapre2, Mc11, Mcm5, Myl6, Nfkb1a, Nme2, Pcn1, Ptma, Rad21, Sdc3, Ssrp1, Vat1, Ybx1.

Exemplarisch ist der zeitliche Verlauf der Genexpression für beide VM-26 Konzentrationen in Abbildung 29 für das Gen „myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle“ (Myl6) dargestellt.

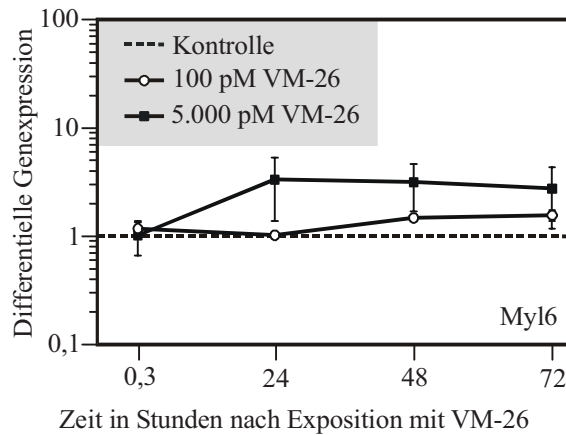


Abb. 29: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der gegensinnig hoch-/herunterregulierten Genexpression eines Gens der *Gruppe 3* „myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle“ (Myl6) nach Exposition mit 100pM/5.000 pM VM-26. Die Fehlerbalken stellen den minimal und den maximal gemessenen Genexpressionswert dar.

Die Gruppe 4 subsummiert 6% der 113 Gene (Abbildung 26). Zu dieser Gruppe gehörten folgende 7 Gene:

Cfl1, Fn1, Hsp90ab1, Myc, Spp1, Tob1, Vegfa.

Ein exemplarischer Verlauf der Genexpression des Gens „secreted phosphoprotein 1“ (Spp1) ist in Abbildung 12, Kapitel 3.2.5.2 wiedergegeben.

4.4.3 Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 unter Berücksichtigung der funktionellen Hauptgruppen A-F

Die der Abbildung 26 zugrunde liegenden Gene wurden im Folgenden nach ihrer Hauptfunktion gemäß Clontech den folgenden 6 Gruppen zugeordnet:

- Gruppe A: enthält Transkriptionsfaktoren und Zelloberflächenantigene.
- Gruppe B: enthält Zellzyklusregulatoren und Zelladhäsionsmoleküle.
- Gruppe C: enthält Onkogene, Tumorsuppressorgene, „Stress-response“-Gene und Gene, die für Ionenkanäle und Ionentransport kodieren.
- Gruppe D: enthält Gene mit Beteiligung an der Apoptoseregulation, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Hormone.
- Gruppe E: enthält Signaltransduktionsmodulatoren und –effektoren.
- Gruppe F: enthält Gene mit Beteiligung an der DNA-Synthese, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination und DNA-Bindung.

Die Mehrzahl differentiell exprimierter Gene gehörte zu Gruppe F (39, Tabelle 11). Die geringste Anzahl differentiell exprimierter Gene war der Gruppe A zuzuordnen (12, Tabelle 11). In den Gruppen B-E waren jeweils sowohl nach 100 pM VM-26 als auch nach 5.000 pM VM-26 eine vergleichbare Anzahl differentiell exprimierter Gene (jeweils 9 bis 16) zu finden (Tabelle 11).

Der Anteil der Gene, die sowohl nach Exposition mit 100 pM VM-26 als auch nach 5.000 pM VM-26 differentiell exprimiert waren lag in allen Hauptgruppen zwischen 31 bis 46%. Eine Ausnahme bildet die Gruppe A, in der kein Gen sowohl nach Exposition mit 100 pM VM-26 als auch nach 5.000 pM VM-26 differentiell exprimiert war.

	Funktionelle Hauptgruppe					
	A	B	C	D	E	F
Anzahl der differentiell exprimierten Gene <u>nur nach</u> Exposition mit <u>100 pM VM-26</u>	4	16	13	9	9	14
Anzahl der differentiell exprimierten Gene <u>nur nach</u> Exposition mit <u>5.000 pM VM-26</u>	8	14	13	9	8	19
Anzahl der differentiell exprimierten Gene nach Exposition mit <u>100 pM VM-26</u> <u>sowie</u> <u>5.000 pM VM-26</u>	0	5	6	3	3	6

Tab. 11: Anzahl differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 aufgeteilt in funktionelle Hauptgruppen wie weiter oben aufgeführt.

4.4.4 Unterschiede/Gemeinsamkeiten differentiell exprimierter Gene nach 100 pM bzw. 5.000 pM VM-26 in Abhängigkeit von ihrer Zugehörigkeit zu einer der funktionellen 38 Subgruppen

Neben den funktionelle Hauptgruppen A-F konnten die 113 differentiell exprimierten Gene in weitere 38 verschiedene funktionelle Subgruppen eingeordnet werden (Tabelle 12). Die den Subgruppen zugeordneten Zahlen (Tabelle 12) korrespondieren gleichzeitig zu den Zahlen auf der rechten Seite der Abbildung 30 bis 33, in denen die differentiell exprimierten Gene nach den vier Zeitpunkten der VM-26 Applikation in Subgruppen zusammengefasst separat dargestellt sind. Die weitere Aufgliederung der 113 differentiell exprimierten Gene in 38 funktionelle Subgruppen ließ erkennen, dass im Besonderen die Anzahl der Gene zu den Subgruppen, die für Transkriptionsfaktoren (2 und 3), Onkogene (9) und Cytoskelett- und Motilitätsproteine (32) kodierten gegenüber den anderen Subgruppen um den Faktor 2 bis 7 erhöht waren (Abbildung 30 bis 33).

Unabhängig davon konnten nach 20 min der Applikation beider VM-26 Konzentrationen vorwiegend hochregulierte (häufig < 3) und nur wenige (nicht gemäß Definition) herunterregulierte Gene (18 von 113) gefunden werden (Abbildung 30). 24 h nach

Applikation beider VM-26 Konzentrationen erschienen die meisten Gene mit einer Genexpression nahe 1 (Abbildung 31), während 48 h und 72 h danach primär hochregulierte Gene (häufig < 3) nach 100 pM VM-26 sowie hoch- und herunterregulierte Gene (häufig < 3 bzw. $> 0,3$) nach 5.000 pM VM-26 imponierten (Abbildung 32 und 33).

	Funktionelle Subgruppe		Funktionelle Subgruppe
1	Zelloberflächen-Antigene	20	Signaltransduktion und extrazelluläre Kommunikation
2	Transkriptions-Faktoren	21	Wachstumsfaktoren
3	Aktivierung und Unterdrückung von Transkription	22	Intrazellulär vermittelnde, ausführende und modulierende Proteine
4	Cycline	23	Intrazelluläre Kinasen
5	Zellzyklusregulierende Kinasen	24	G-Proteine
6	CDK-Inhibitoren	25	GTP/GDP Austauscher
7	Zellzyklus-Proteine	26	Phospholipasen
8	Zell-Adhäsion	27	Calcium bindende Proteine
9	Onkogene, Tumorsuppressoren	28	Intrazelluläre Transduktoren, Effektoren und Modulatoren
10	Hitzeschockproteine	29	Aspartase Proteasen
11	Xenobiotische Transporter	30	Proteasen
12	Andere Stress-Antwort-Proteine	31	Am Proteinturnover beteiligte Enzyme
13	Symporter und Antiporter	32	Cytoskelett- und Motilitäts-Proteine
14	Protein-Veränderungs-Enzyme	33	Intermediär-Filamente
15	Bcl-Familie	34	Motoren
16	Todeskinasen	35	DNA Polymerasen, Replikationsfaktoren und Topoisomerasen
17	Apoptose Assoziierte	36	DNA-Reparatur-Proteine
18	Wachstumsfaktoren und Chemokine	37	Rekombinierende Proteine
19	Hormon-Rezeptoren	38	Funktionell unklassifizierte Proteine

Tab. 12: Beschreibung der 38 funktionellen Subgruppen, denen die differentiell exprimierten Gene für die vier verschiedenen Zeitpunkte zugeordnet wurden. Die Zahlen korrespondieren gleichzeitig zu den Zahlen auf der rechten Seite der folgenden Abbildung 30 bis 33.

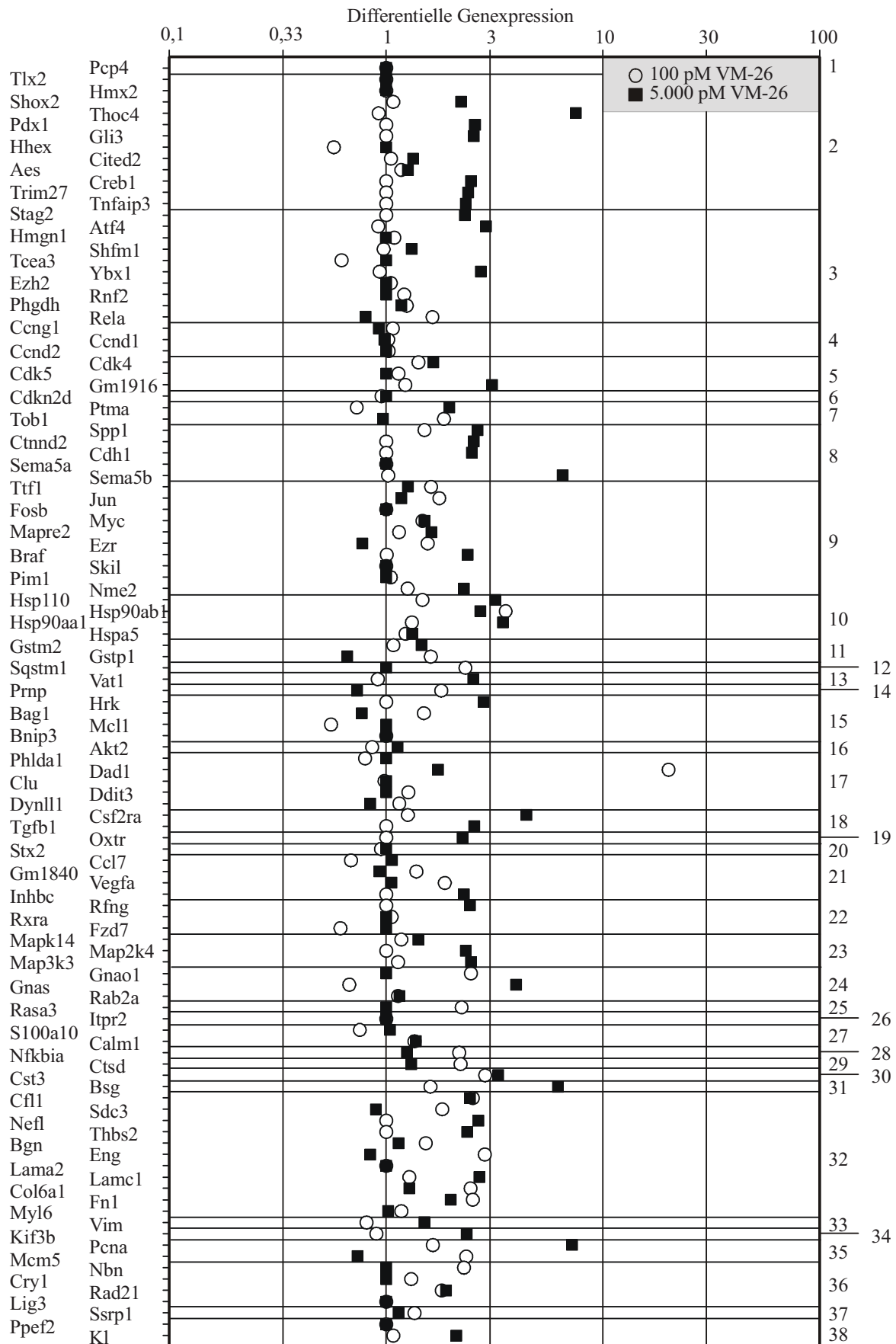


Abb. 30: Einteilung der differentiell exprimierten Gene entsprechend ihrer Funktion in 38 Subgruppen 20 Minuten nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26. Die Zahlen auf der rechten Seite entsprechen den funktionelle Subgruppen gemäß Tabelle 12.

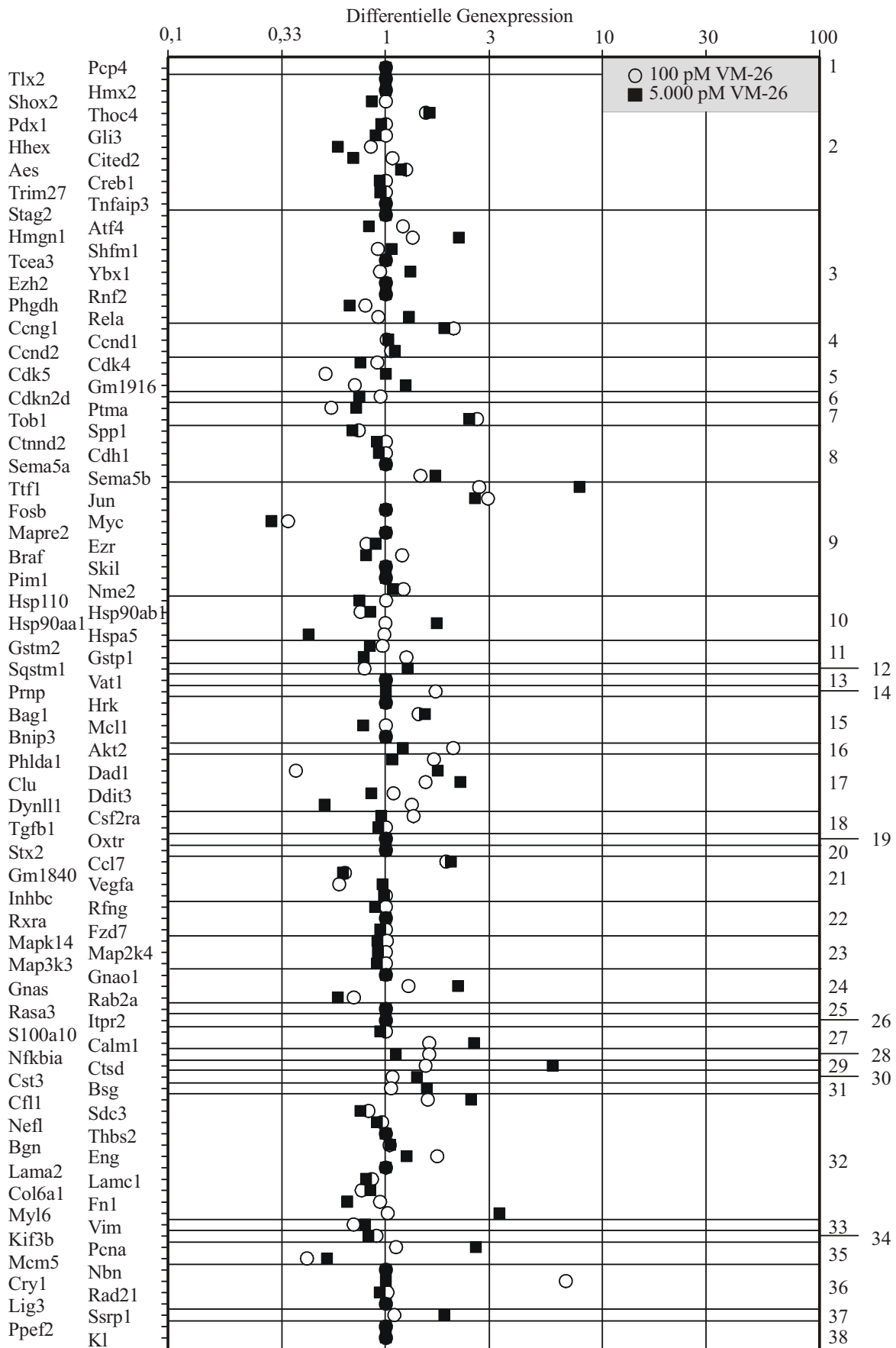


Abb. 31: Einteilung der differentiell exprimierten Gene entsprechend ihrer Funktion in 38 Subgruppen 24 Stunden nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26. Die Zahlen auf der rechten Seite entsprechen den funktionelle Subgruppen gemäß Tabelle 12.

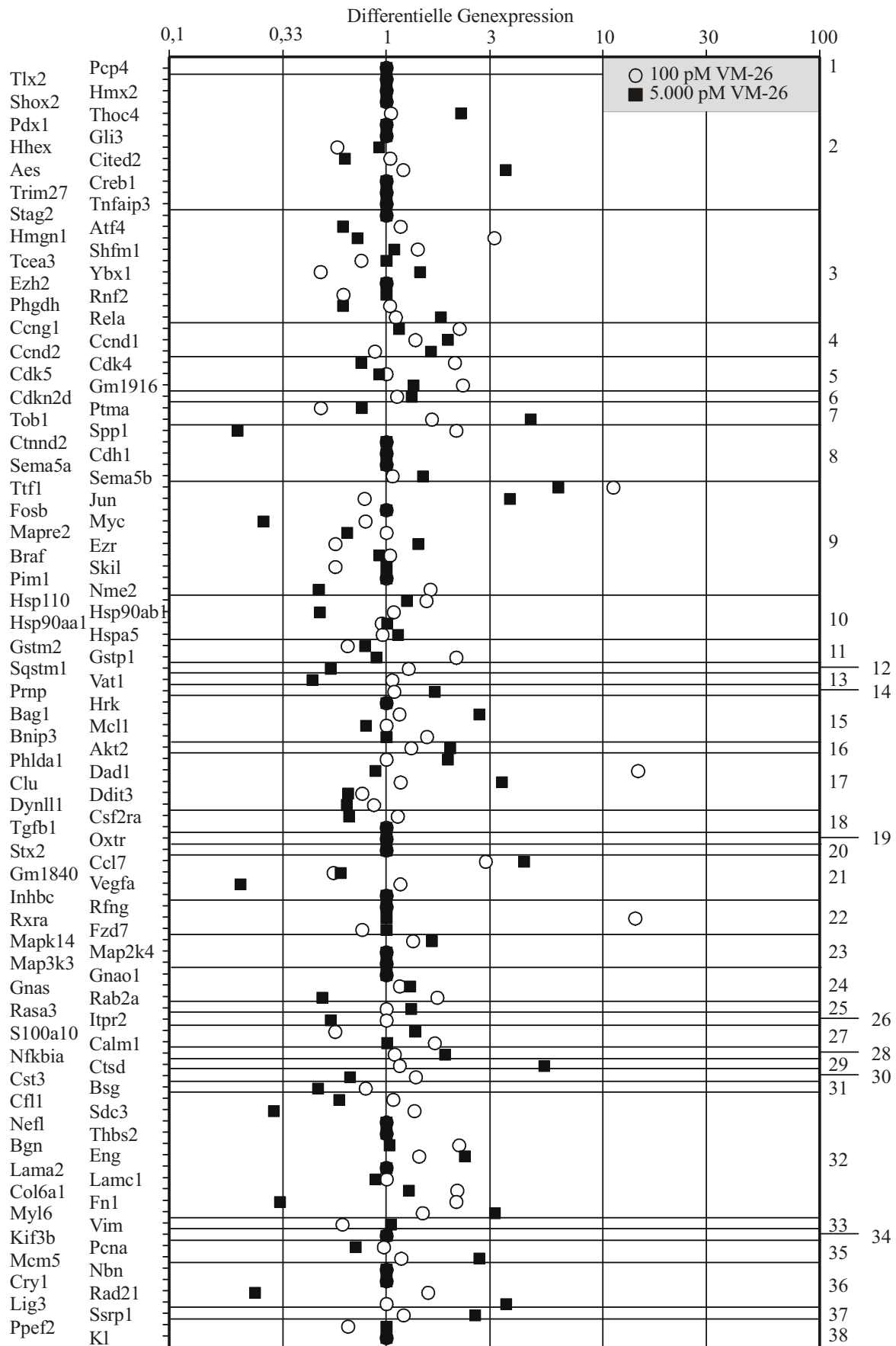


Abb. 32: Einteilung der differentiell exprimierten Gene entsprechend ihrer Funktion in 38 Subgruppen 48 Stunden nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26. Die Zahlen auf der rechten Seite entsprechen den funktionelle Subgruppen gemäß Tabelle 12.

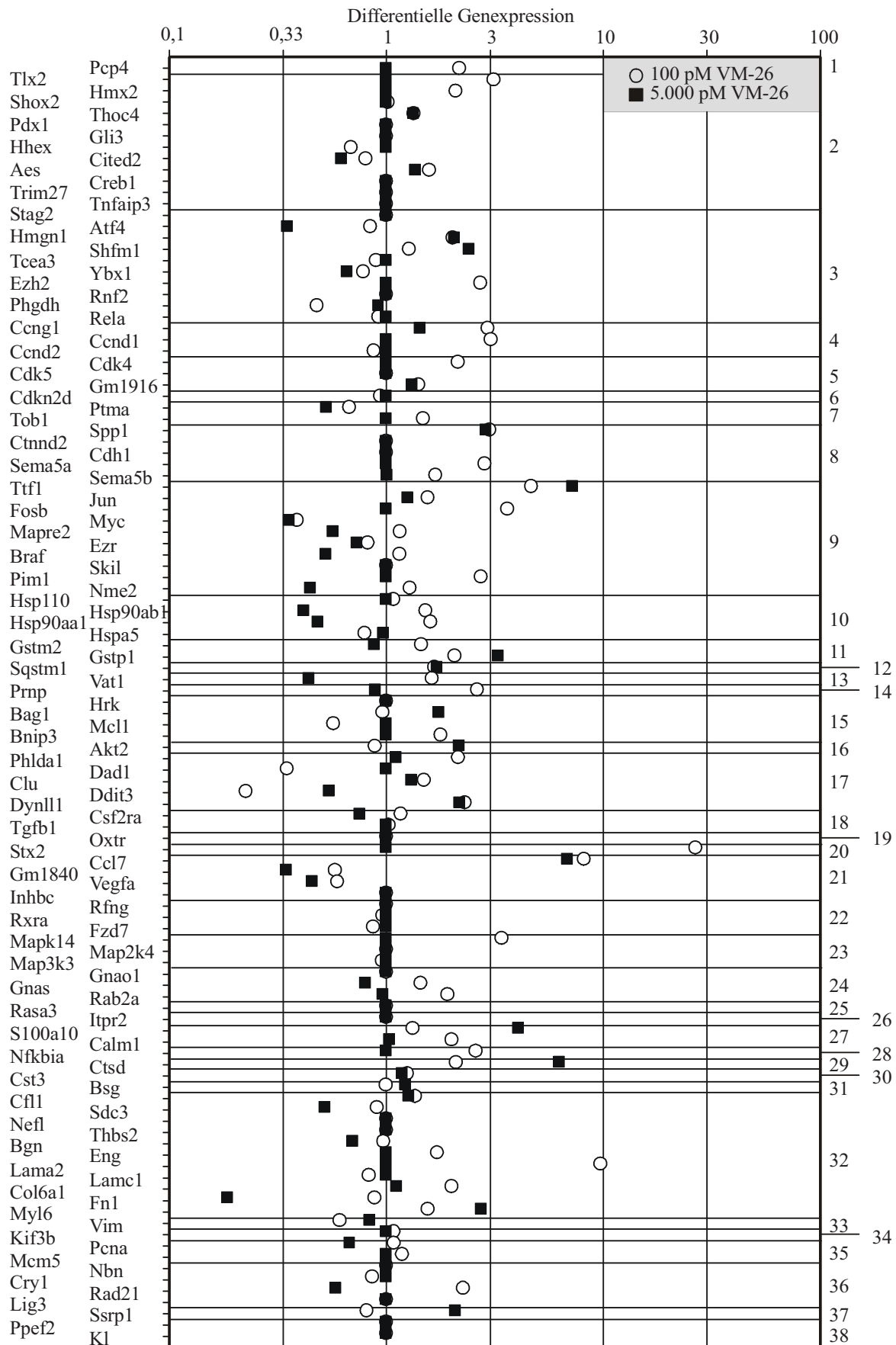


Abb. 33: Einteilung der differentiell exprimierten Gene entsprechend ihrer Funktion in 38 Subgruppen 72 Stunden nach Exposition mit 100 pM/5.000 pM VM-26. Die Zahlen auf der rechten Seite entsprechen den funktionelle Subgruppen gemäß Tabelle 12.

5 Diskussion

5.1 Vor- und Nachteile des Verfahrens und seiner Auswirkungen auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit

Nach der Einführung von Genexpressionsarrays im Jahr 1995 häufte sich die Anzahl an Veröffentlichungen, die Zweifel an ihrer Sensitivität und Spezifität übten. Im Besonderen erregte die Arbeit von Tan und Mitarbeitern in 2003 die Aufmerksamkeit. Es wurde eine cDNA Probe auf drei verschiedene Mikroarrayplattformen hybridisiert. Für 4 von 185 getesteten Genen konnte eine Übereinstimmung ihrer Genexpression in allen drei Mikroarrayformen gezeigt werden (Tan et al. 2003, S. 5676). In 2005 wurde das MAQ-Konsortium (microarray quality control) gegründet. Es wurde von der „Food and Drug Administration“ (FDA) initiiert (Casciano und Woodcock 2006, S. 1103) und besteht aus 51 unterschiedlichen Institutionen und 137 Wissenschaftlern. Zur Messung der Reproduzierbarkeit wurden 20 Mikroarrayprodukte in verschiedenen Laboratorien und mehr als 1.300 Tests durchgeführt. Optimale Bedingungen vorausgesetzt konnte eine Reproduzierbarkeit im Bereich der Mikroarrays von 80% gefunden werden (Kuo et al. 2006, S. 832; Bosotti et al. 2007, S. S5). Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit älteren Arbeiten (Lee et al. 2000, S. 9834; Brazama und Vilo 2000, S. 17; Staßen 2002, S. 50; Staßen et al. 2003, S. 319). Im Gegensatz zu den auf Fluoreszenz oder Chemolumineszenz beruhenden Detektionsverfahren des MAQ-Konsortiums wurde in der vorliegenden Arbeit mit Autoradiographien gearbeitet. Die ersten kommerziell erhältlichen Mikroarrays benutzen Radionuklide zur Detektion. Dies war attraktiv, da in der Regel keine Neugeräte angeschafft werden mussten. Unter sehr hohem Aufwand und einer sehr sorgfältigen und Zeit intensiven Nachbearbeitung der Autoradiographien konnten einige Kandidatengene selektiert werden. So wurden aus 100 Autoradiographien 32 ausgewählt und weiter bearbeitet. Diese Reduktion ist schon ein Hinweis auf die Anfälligkeit des Verfahrens.

Diese Auswertung gestaltete sich schwierig, da stark exprimierte Gene die benachbart gelegenen Hybridisierungssignale überlagerten (Abbildung 13 und 14) oder die Hybridisierungen unvollständig erfolgten (Abbildung 14). Grund für die zum Teil frustrierten Ergebnisse war die Verwendung eines starken β -Emitters (P-32). Bei der Verwendung von P-33, einem schwachen β -Emitters mussten die Expositionszeiten erheblich (Wochen) verlängert werden (Erfahrungen aus der eigenen Arbeitsgruppe Abend et al.), so dass sich viele Gene als nicht exprimiert darstellten und sich deshalb der weiteren Untersuchung entzogen. Mit der Verwendung von Radionukliden zur Detektion geht ein lineardynamischer Bereich von ca. einer Logstufe einher. Die Grauwerte wurden im 16-bit Format abgelegt. Es standen deshalb 65.536 Grauwertstufen zur Verfügung. In Folge der dennoch zu geringen Grauwerttiefe entstanden Areale mit undefinierten Grauwerten (AUG, Abbildung 19 und Tabelle 5). Ferner wurde durch die vom Hersteller gelieferte Software die

Grauwertbestimmung nur innerhalb der ROI durchgeführt. Stärker exprimierte Gene mit darüber hinausragenden Hybridisierungen wurden durch die Software nicht erkannt bzw. den benachbarten Genen zugeordnet. Diese Fehlerquellen wurden manuell für jede der selektierten Autoradiographien korrigiert. Mit Hilfe einer weiteren Bildanalysesoftware konnten diese großflächigen Hybridisierungen vollständig erfasst werden und der Summengrauwert korrigiert werden. Allerdings betrug der Anteil der AUG an der unkorrigierten Gesamtgenexpression bis zu 2,5% in 90% aller untersuchten Autoradiographien (Abbildung 19) und hatte damit einen nur geringen Einfluss auf die weiteren Auswertungen.

Zur Normalisierung wurde in dieser Arbeit die Gesamtgenexpression verwendet. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass ein geeignetes „housekeeping gene“ (z.B. Ubiquitin) zu vergleichbaren Ergebnissen führt (Stäßen 2002, S. 50-55; Stäßen et al. 2003, S. 319). Vorteilhaft bei Verwendung der Gesamtgenexpression ist die größere Robustheit gegen Fehlhybridisierungen, die sich im Falle eines „housekeeping genes“ stärker auswirken würden. Aufgrund des geringen lineardynamischen Bereichs wurde bei der Auswahl der Autoradiographien großer Wert darauf gelegt, dass die Normalisierungsfaktoren möglichst nicht einen Bereich zwischen 0,5 bis 2 überstiegen (Abbildung 18 und Tabelle 6 und 7). Dies konnte bei 91% der ausgewählten Arrays realisiert werden. Auch für die Autoradiographien mit einem höheren Normalisierungsfaktor konnte gezeigt werden, dass sich die Reproduzierbarkeit nicht extrem veränderte (Tabelle 6 und 7).

Zum Erreichen einer befriedigenden Reproduzierbarkeit (88%) war die Reduktion der Sensitivität erforderlich. So galt ein Gen in dieser Arbeit nur dann als exprimiert, wenn sich der mittlere Grauwert des Gens um das Fünffache über dem mittleren Grauwert des Hintergrunds befand. Als differentiell exprimiert galt ein Gen, sobald sich der Summengrauwert um den Faktor 3 vom Kalibrator (unbehandelte Kontrolle) unterschied (Tabelle 8). Auch in anderen Arbeiten wurde mit ähnlichen Verfahren gearbeitet, die ebenso die Sensitivität stark einschränkten (Port et al. 2005, S. 59; Stäßen 2002, S. 48-49; Stäßen et al. 2003, S. 319; Ruf 2007, S. 28-30). Zur Kontrolle der selektierten Kandidatengene wurde eine zusätzliche optische Überprüfung eingeführt (Abbildung 20 bis 22). Es konnte eine Übereinstimmung in 89% der Kandidatengene zwischen den kalkulierten Summengrauwerten der Autoradiographien und der optischen Kontrolle gefunden werden (siehe 4.2.2). Für die verbliebenen 11% wurden die unterschiedlichsten Fehlerquellen ausgeschlossen.

Die reduzierte Sensitivität spiegelte sich in der durchschnittlichen Anzahl der exprimierten Gene (15%) wieder. Diese liegt deutlich unter den üblicherweise zu erwartenden 40-50%, wenn moderne Detektionsverfahren wie Chemolumineszenz verwendet werden (Port et al. 2007, S. 38) und muss als eine weitere Limitierung unserer Untersuchungen betrachtet werden. Durch Shi und andere Arbeitsgruppen wurde die Höhe der differentiellen

Genexpression und die weitere statistische Auswertung von Wiederholungswerten als entscheidende Faktoren zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität angesehen. Beispielsweise durch den Ausgleich des Fehlers, der durch gleichzeitig durchgeführte Mehrfachmessungen vorhandener Endpunkte hervorgerufen wurde mit der „false discovery rate“ (FDR) (Shi et al. 2008, S. S10; Higdon et al. 2008, S. 1225; Zhang et al. 2008, S. 2057).

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit ist ein weiteres quantitatives Verfahren notwendig, die sogenannte „real-time quantitative PCR“ (RTQ-PCR). Die Überprüfung von semiquantitativen Genexpressionsarray-Daten mittels RTQ-PCR zeigten in vergleichbaren Arbeiten (Verwendung der selben Technologie) eine Übereinstimmung im Bereich von 80% (Staßen et al. 2003, S. 319; Port et al. 2005, S. 61-62). Für die in dieser Arbeit beschriebenen Kandidatengene sind zur Validierung der Daten noch entsprechende RTQ-PCR Messungen durchzuführen.

5.2 Genexpression relativ zur VM-26 Konzentration

Nach Exposition mit 100 pM VM-26 konnten relativ zur Applikation mit 5.000 pM VM-26 zu jedem Zeitpunkt eine um das 2-3fache erhöhte Anzahl an exprimierten Genen gefunden werden (Abbildung 23). Für die differentiell exprimierten Gene ergab sich gegen die Zeit, dass ihre Anzahl nach 100 pM VM-26 anstieg, während nach 5.000 pM VM-26 der Anteil sank (Abbildung 24). Auch beim Vergleich der exprimierten Gene gegen die Zeit unter Berücksichtigung der 38 funktionellen Subgruppen ergab sich zu späteren Zeitpunkten eine höhere Aktivität nach 100 pM VM-26 relativ zu 5.000 pM VM-26 (Abbildung 30-33). Die Ergebnisse weisen zusammenfassend auf eine erhöhte Genexpressionsaktivität bei der geringeren VM-26 Konzentration. Dies steht im Einklang mit der erhöhten Zelltodesrate nach 5.000 pM VM-26 relativ zu 100 pM VM-26 (Abbildung 5).

Wurden die Gene *unabhängig von der Zeit* auf Gemeinsamkeiten/Unterschiede nach Exposition mit VM-26 untersucht, dann konnten 20% der Gene (23) sowohl nach 100 pM VM-26 als auch nach 5.000 pM VM-26 als differentiell exprimiert gefunden werden (Abbildung 25). Unter *Berücksichtigung der Zeit* konnten im Rahmen der Mikrokernbildung für 16% (15 von 77) der Gene eine zur Apoptoseinduktion zeitgleiche und gleichsinnige differentielle Genexpression gezeigt werden (Tabelle 9). Auch die Aufteilung der differentiell exprimierten Gene in vier Gruppen, die sich primär am Vergleich der Genexpression nach 100 pM und 5.000 pM VM-26 gegen die Zeit orientierte, zeigte eine Übereinstimmung der Genexpression in der Mehrzahl der Messwerte (Abbildung 26 bis 29, Abbildung 12). Abweichend davon wiesen 28% der Gene, die in Gruppe 3 subsummiert worden waren, eine gegensinnige Genexpression abhängig von der VM-26 Konzentration auf. Wurden die Gene

gemäß ihrer Hauptfunktion einer der Gruppen B bis F zugeordnet, dann lag auch hier ein Anteil der Gene, die sowohl nach Exposition mit 100 pM VM-26 als auch nach 5.000 pM VM-26 differentiell exprimiert waren, in allen Hauptgruppen zwischen 31% und 46% (Tabelle 11). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Mikrokernbildung und Apoptose zumindest teilweise ähnliche Genaktivitätsmuster zugrunde liegen. Eine Zusammenstellung der 11 sich nach 100 pM und nach 5.000 pM VM-26 bezüglich ihrer differentiellen Über-/Unterexpression **gleichsinnig** verhaltenen Gene und der 2 sich nach 100 pM und nach 5.000 pM VM-26 bezüglich ihrer differentiellen Über-/Unterexpression **gegensinnig** verhaltenen Gene, ihrer Funktionen und des in der Literatur beschriebenen Zusammenhangs mit Zelltodesprozessen ist in Tabelle 13 beschrieben (12 Gene bei Einfachnennung).

Koordinate	Gen-Name	Gen-Funktion	Literaturangaben bezüglich Apoptose / Zelltod (PubMed NCBI Stand 02/08)
Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	Wachstumsfaktor , Cytokin / Chemokin	0 Veröffentlichungen in PubMed (NCBI).
Cfl1	cofilin 1, non-muscle	Zytoskelett und Motilität beeinflussend	0 Veröffentlichungen in PubMed (NCBI).
Col10a1	Collagen, type X, alpha 1	Zytoskelett und Motilität beeinflussend	Postmitotische hypertrophe Chondrozyten produzieren Collagen Typ X und Vegfa gefolgt von Zelltod und Blutgefäßeinsprossungen: beeinflusst durch Parathormon (Lee et al. 1996, S. 5109-18) ; beeinflusst durch Galectin 3 (Colnot et al. 2001, S. 203-214); beeinflusst durch HIF-1 α (Schipani et al. 2001, S. 2865-76); beeinflusst durch transcription factor c-maf (MacLean et al. 2003, S. 51-63); beeinflusst durch Vegfa (Maes et al. 2004, S. 188-99) .
Cst3	cystatin C	Protease-Hemmer	0 Veröffentlichungen in PubMed (NCBI).

Koordinate	Gen-Name	Gen-Funktion	Literaturangaben bezüglich Apoptose / Zelltod (PubMed NCBI Stand 02/08)
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	Apoptose assoziiertes Stress-Protein, Aufgaben im Bereich DNA-Synthese, -Rekombination und Reparatur, Onkogen / Tumorsuppressor	Bei beeinträchtigter Funktion des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist Ddit3 am programmierten Zelltod beteiligt (Zinszner et al. 1998, S. 982); Der NO-Donor SNAP induziert Ddit3 über "endoplasmic reticulum (ER) stress". Ddit3 spielt eine Rolle bezüglich Wachstumsstop und Zelltod (Oyadomari et al. 2001, S. 10845-50); Iscämie induziert Ddit3 über die „ER stress“ Signaltransduktion (Tajiri et al. 2004, S. 403); hsp70-DnaJ chaperone pair verhindert NO- und Ddit3-induzierte Apoptose (Gotoh et al. 2004, S. 390); Ansammlungen Von Typ IV Kollagen im erweiterten ER führt zu Ddit3 induzierter Apoptose (Marutani et al. 2004, S. 5913); Cholesterol verursacht die Ddit3 induzierte Apoptose von Makrophagen (Devries-Seimon et al. 2005, S. 61); In Abwesenheit des „Neurotrophic factors“ folgt die Ddit3 induzierte Apoptose (Tajiri et al. 2006; S. 3462); GRP78/BiP schützt vor Ddit3 induzierter Apoptose (Luo et al. 2006, S. 5688); Bei mildem Stress auf das ER ist die Zelle in der Lage die Ddit3 induzierte Apoptose über Anpassungsmechanismen zu vermeiden (Rutkowski et al. 2006, S. e374).
Fnl	fibronectin 1	Zytoskelett und Motilität beeinflussend	Fnl schützt Nervenzellen vor der Apoptose (Sakai et al. 2001, S. 324); Integrin alpha8beta1 interagiert mit Fnl und fördert das Überleben der Zellen (Farias et al. 2005, S. 305); tissue transglutaminase hat einen Einfluss auf die Vernetzung von Fnl, Zellanheftung und Zelltod (Verderio 1998, S. 119).
Gstp1	glutathione S-transferase, pi 1	xenobiotischer Transporter, Apoptose-assoziiertes Protein	0 Veröffentlichungen in PubMed (NCBI).
Hsp90ab1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	Hitzeschock-Protein	Hsp90ab1 hemmt die Apoptose durch Hemmung der proapoptotischen Kinase „apoptosis signal-regulating kinase 1“ (ASK1) (Zhang et al. 2005, S. 3954); Die antiapoptotische Funktion von Bcl-2 in Mastzellen ist abhängig von Hsp90ab1 (Cohen-Saidon et al. 2006, S. 1413); Hsp90ab1 ist an der antiapoptotischen „deoxycytidyl-deoxyguanosine oligonucleotid class B“ (CpG-B ODN)-vermittelten Antwort beteiligt (Kuo et al. 2007, S. 6100).

Koordinate	Gen-Name	Gen-Funktion	Literaturangaben bezüglich Apoptose / Zelltod (PubMed NCBI Stand 02/08)
Myc	myelocytomatosis oncogene	Onkogen / Tumorsuppressor; Transkription aktivierend / hemmend; intrazellulärer Vermittler; Effektor und Modulator; Apoptose-assoziiert	Myc induziert Leukämie ohne Hinweis auf Apoptose-Induktion bei Knochenmarksstammzellen (Luo et al. 2005, S. 2452); Runx2 and MYC wirken in der Lymphomentstehung durch Unterdrückung des apoptotischen und des wachstumshemmenden Signaltransduktionsweges zusammen (Blyth et al. 2006, S. 2195); Myc and E2F1 schalten den ATM-Signaltransduktionsweg ein um p53 zu aktivieren und die Apoptose zu induzieren (Hong et al. 2006, S. 801); Bax, jedoch nicht Bak wird zur Myc-induzierte Apoptose und Tumorsuppression benötigt. (Dansen et al. 2006, S. 10890); Myc pathway response agents (MYRAs) induzieren die Myc-abhängige Apoptose und hemmen die durch Myc verursachte zelluläre Transformation (Mo und Henriksson, 2006, S. 6344); Der N Terminus von C/EBPepsilon ist für die meisten Aspekte der Differenzierung von Knochenmarkszellen verantwortlich und wird dabei von Myc beeinflusst. (Nakajima et al. 2006, S. 14494); Die Proteindomäne „Myc Box IV“ (MBIV) von Myc beeinflusst die Apoptose, aber nicht die Zellproliferation (Cowling et al. 2006, S. 5201); Es gibt eine Beziehung zwischen Myc- und p53-induzierter Apoptose unabhängig von der Möglichkeit von Myc p53 zu induzieren (Taylor et al. 2006, S. 53); Myc reguliert die Apoptose während der Brust-Rückbildung nach Lactation (Sutherland et al. 2006, S. 5805); Fehlendes “ataxia telangiectasia mutated homolog (human)” (Atm) vermehrt Myc-Induzierte Lymphom-Entstehung und reduziert die Apoptose-Induktion, die normalerweise die Tumorgenese abschwächt (Maclean et al. 2007, S. 705).
Spp1	secreted phosphoprotein 1	Zelladhäsion vermittelnd	Autokrine Stimulation durch Spp1 trägt zur antiapoptotischen Signaltransduktion in Melanozyten bei (Geissinger et al. 2002, S. 4820); Erhöhte Zelltodesraten treten in Increased cell death in Spp1-defizitären Fibroblasten des Herzen auf (Zohar et al. 2004, S. H1730); Annahme einer antiapoptotischen Rolle von Spp1 durch Versuche mit Spp1-null Mäusen (Hsieh et al. 2006, S. 7119); Die unterdrückte TNF-alpha Expression in Spp1-null Mäusen spiegelte sich in einer erhöhten nicht-apoptotischen Zelltodesrate wieder (Da Silva et al. 2006, S. 629); Spp1 reguliert die Apoptose der Nierenzellen und die interstitielle Fibrose bei chronischen unilateralen Ureterobstruktionen bei Neugeborenen (Yoo et al. 2006, S. 1735); Die Resistenz auf Chemotherapeutika ist in Mamma-Ca-Zellen durch Spp1 über die Hemmung der Apoptose vermittelt (Graessmann et al. 2007, S. 2840).
Ttfl	transcription termination factor 1	Onkogen / Tumorsuppressor	0 Veröffentlichungen in PubMed (NCBI).

Koordinate	Gen-Name	Gen-Funktion	Literaturangaben bezüglich Apoptose / Zelltod (PubMed NCBI Stand 02/08)
Vegfa	vascular endothelial growth factor A	Wachstumsfaktor, Cytokin / Chemokin	Das Fehlen von „cadherin 5“ (Cdh5) induziert die Apoptose von Endothelzellen und verhindert die Übertragung des „endothelial survival signal“ durch Vegfa (Carmeliet et al. 1999, S. 147); „T-cell acute lymphocytic leukemia 1“ (Tal1) interagiert mit Vegfa um die Apoptose beim Beginn der Hämatopoese zu unterdrücken (Martin et al. 2004, S. 693); Inaktivierung von Vegfa führt zu einer Beeinträchtigung der Angiogenese im Gehirn und zur Apoptose von neuronalen Zellen (Raab et al. 2004, S. 595); Vegfa induziert „myeloid cell leukemia sequence 1“ (Mcl1) Hochregulation und schützt Multiple Myelom-Zellen gegen Apoptose (Le Gouill et al. 2004, S. 2886); Das antiapoptotische Vegfa induziert in Verbindung mit „transforming growth factor, beta 1“ (Tgfb1) die Apoptose bei Endothelzellen (Ferrari et al. 2006, S. 17260).

Tab. 13: Zusammenstellung solcher Gene, die sich gleichsinnig nach 100 pM/5.000 pM VM-26 differentiell über-/unterexprimiert gegen die Zeit darstellten. Die letzte Spalte nennt die Anzahl der Veröffentlichungen nach PubMed (NCBI), in denen ein Zusammenhang mit Zelltodesmechanismen wie Apoptose und Mikrokernbildung beschrieben wird. Für das Gen „myelocytomatosis oncogene“ (Myc) wurden nur die 10 aktuellsten Literaturstellen aufgezeigt.

Wurden die differentiell exprimierten Gene nach ihrer Funktion in Subgruppen unterteilt, dann ergab sich eine Überrepräsentation der Anzahl der Gene, die für Transkriptionsfaktoren und Onkogene, sowie für Cytoskelett- und Motilitätsproteine kodieren (Abbildung 30 bis 33). Ein Zusammenhang dieser funktionellen Gruppen mit Zelltodesmechanismen ist weitgehend akzeptiert und unterstützt die durchgeführten Analysen.

5.3 Vergleich der Mikrokernbildung nach VM-26 (L929-Zellen) und nach ionisierenden Strahlen (L929- und MCF-7-Zellen)

Mit der gleichen Technologie wurden zwei weitere Untersuchungen bezüglich Apoptose und Mikrokernbildung durchgeführt. So wurden die gleichen Zellen (L929), wie in dieser Arbeit, mit ionisierenden Strahlen (2 Gy und 6 Gy) bestrahlt (Ruf 2007, S. 14). In einer weiteren Untersuchung wurden humane MCF-7 Zellen (Mamma-Karzinomzelllinie) mit ionisierenden Strahlen (2 Gy und 6 Gy) bestrahlt (Staßen 2002, S. 23-24).

Der Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung mit den humanen MCF-7 Zellen kann nur eingeschränkt erfolgen, da der in dieser Arbeit verwendete Array zum Teil andere Gene repräsentierte. In allen Untersuchungen wurde der Schwerpunkt auf Reproduzierbarkeit gelegt. Dadurch sank die Sensitivität der Auswertungen. Dennoch kann eine hohe Übereinstimmung der in den verschiedenen Untersuchungen gemeinsam differentiell exprimierten Gene gezeigt werden (Abbildung 34).



Abb. 34: Übereinstimmung der Anzahl differentiell exprimierter Gene in vier unterschiedlichen Untersuchungen. Die Gesamtzahl der Gene ist außerhalb der sich überlappenden Kreise angegeben. In den sich überlappenden Kreisen ist die korrespondierende Anzahl an Genen der verglichenen Untersuchungen wiedergegeben.

Unabhängig von der untersuchten Zellart (L929/MCF-7) und unabhängig vom Stressor (VM-26/ionisierende Strahlen) wurde in allen vier Untersuchungen eine vergleichbare Anzahl differentiell exprimierter Gene gefunden (61 bis 72 Gene). Das entspricht 5% bis 6% aller untersuchten Gene. Auch die Übereinstimmung der Gene, die in jeweils zwei Modellen differentiell exprimiert waren, erschien unabhängig von Zellart und Stressor zu sein und lag zwischen 20% und 40% (siehe auch Port et al. 2005, S. 62). Im Folgenden werden die Übereinstimmungen der differentiell exprimierten Gene der verschiedenen Modelle genauer betrachtet.

5.3.1 Vergleich mit der Genexpression von L929-Zellen nach ionisierender Strahlung

Beim Vergleich der differentiell exprimierten Gene dieser Arbeit mit denen nach Strahlenexposition an L929 Zellen (Ruf 2007, S. V-VI), stellten sich 24 Gene in beiden Untersuchungen als differentiell exprimiert dar (Abbildung 34). Eine Darstellung des

zeitlichen Verlaufs dieser Gene ist im Vergleich für beide Versuche im Anhang wiedergegeben (Abbildung 48 bis 52). 13 der übereinstimmenden Gene zeigten einen gleichsinnigen Verlauf der differentiellen Genexpression gegen die Zeit. Hierzu zählten bereits die in Kapitel 5.2 benannte Gene DNA-damage inducible transcript 3 und fibronectin 1. Auch in der Literatur sind bereits 8 dieser Gene im Zusammenhang mit Apoptose oder Zelltod erwähnt worden.

5.3.2 Vergleich mit der Genexpression von MCF-7-Zellen nach ionisierender Strahlung

Beim Vergleich der differentiell exprimierten Gene dieser Arbeit mit denen nach Strahlenexposition an MCF-7 Zellen (Stäben 2002, S. VI-IX), stellten sich 8 der Gene in beiden Untersuchungen als differentiell exprimiert dar (Abbildung 34). Allerdings war die Vergleichbarkeit der beiden Arbeiten durch die Verwendung der unterschiedlichen Arrays eingeschränkt. Lediglich 21 der 72 differentiell exprimierten Gene aus der Arbeit mit den MCF-7 Zellen waren auch in den Arbeiten mit den L929 Zellen untersucht worden. Eine Darstellung des zeitlichen Verlaufs dieser Gene ist im Vergleich für beide Versuche im Anhang wiedergegeben (Abbildung 58 und 59). Fünf der übereinstimmenden Gene zeigten einen gleichsinnigen Verlauf der differentiellen Genexpression gegen die Zeit.

5.3.3 Vergleich mit der Genexpression von L929- und MCF-7-Zellen nach ionisierender Strahlung

Beim Vergleich der differentiell exprimierten Gene dieser Arbeit mit denen nach Strahlenexposition an MCF-7 Zellen (Stäben 2002, S. VI-IX) und denen nach Strahlenexposition an L929 Zellen (Ruf 2007, S. V-VI), stellten sich zwei Gene in beiden Untersuchungen als differentiell exprimiert dar (Abbildung 60):

- „BCL2/adenovirus E1B interacting protein 1, NIP3“ (Bnip3)
- „RAB2A, member RAS oncogene family“ (Rab2a)

Rab2a zeigt dabei einen gleichsinnigen Verlauf aller drei Graphen (Abbildung 60). Für Rab2a lässt sich in der Literatur (PubMed, NCBI) keine Verbindung mit Zelltodesmechanismen herstellen. Dagegen ist Bnip3 in der Literatur bereits mehrfach mit Apoptose in Verbindung gebracht worden:

- „BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like“ (Bnip3l) and Bnip3 bilden eine Unterfamilie von proapoptotischen mitochondrialen Proteinen (Chen et al. 1999, S. 7).
- Bnip3 vermittelt einen Nekrose-artigen Zelltod (Vande Velde et al. 2000, S. 5454).
- Bnip3 wird durch „pleiomorphic adenoma gene-like 2“ (Plagl2) induziert und führt zur Expression von proapoptotischen Proteinen (Mizutani et al. 2002, S. 15851).
- Metaanalyse, zitiert Chen et al. (Reed et al. 2003, S. 1376).
- NO (Nitric oxide) induziert Bnip3-Expression, das den Zelltod von Makrophagen verursacht (Yook et al. 2004, S. 298).
- Eine Hochregulation von Bnip3 verstärkt die autophagische Aktivität. Dies schützt die Zellen vor dem durch Bnip3 aktivierten Apoptose induzierenden Signaltransduktionsweg (Hamacher-Brady et al. 2006, S. 307).
- Die Aktivierung von Ras-Kinasen führt zu einer Hochregulation des apoptotischen Bnip3 bei NO-induziertem Zelltod (An et al. 2006, S. 33939).
- Bnip3 vermittelt mitochondriale Dysfunktion und Zelltod durch „BCL2-associated X protein“ (Bax) und „BCL2-antagonist/killer 1“ (Bak) (Kubli et al. 2007, S. 407).
- Die mitochondrialen Proteine Bnip3 and „BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like“ (Bnip3l) sind beteiligt am toxininduzierten Zelltod bei Anthrax (Ha et al. 2007, S. 26275).
- Gezielte Ablation von Bnip3 führt zu einer Hemmung der Apoptose bei ischämischen Kardiomyozyten (Diwan et al. 2007, S. 2825).

Hier konnte also ein Gen, das in seiner proapoptotischen Funktion beschrieben ist, in drei verschiedenen Arbeiten (diese Arbeit; Staßen 2002, S. 1-113; Ruf 2007, S. 1-111) im Zusammenhang mit mikrokernbildenden Zellen als bedeutend ermittelt werden. Dies unterstreicht die These, dass auch die Mikrokernbildung ein aktiver, von der Zelle gesteuerter Prozess ist.

6 Zusammenfassung/Ausblick

Nach Lehrmeinung stellt die Mikrokernbildung einen passiven Prozess dar. Dieser wird von der Zelle nicht gesteuert. Apoptose hingegen wird als eine aktive Form der Selbstzerstörung durch die geschädigte Zelle angesehen. Durch Änderung der Konzentration eines Topoisomerase II Inhibitors konnte der Zelltod einer damit exponierten Mäusezelllinie bei 100 pM VM-26 in Richtung Mikrokernbildung und bei 5.000 pM VM-26 in Richtung Apoptose gelenkt werden. Dieses Modell erlaubte zu untersuchen, ob beiden Zelltodesmechanismen Gemeinsamkeiten auf Genexpressionsebene zugrunde liegen. Ergebnisse in dieser Richtung würden als Hinweis auf eine aktive Beteiligung auch bei der Mikrokernbildung sprechen. Mittels Genexpression Makroarray wurden 113 differentiell exprimierte Gene gefunden. Nach Einteilung der Gene unter Verwendung unterschiedlichster Kriterien konnte gezeigt werden, dass ca. 20% der Gene sowohl bei apoptotischen Prozessen als auch bei der Bildung von Mikrokernen differentiell exprimiert waren. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit ähnlichen Arbeiten aus der selben Arbeitsgruppe konnte weiter bestätigt werden, dass bei Verwendung eines anderen Stressors (ionisierende Strahlung) im Rahmen der Mikrokernbildung und Apoptose zu 19% bis 41% die gleichen Gene differentiell exprimiert wurden wie nach VM-26 Applikation. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass auch die Mikrokernbildung ein von der Zelle aktiv durchgeführter Prozess mit Ähnlichkeiten zu apoptotischen Prozessen darstellt. Somit sind klinisch-wissenschaftlich durchgeführte Untersuchungen, die nur eine Form des Zelltodes untersuchen von vornherein limitiert. Entsprechende Genexpression Untersuchungen könnten dazu beitragen, diese Limitierungen aufgrund der Beteiligung der selben Gene für unterschiedliche Zelltodesformen aufzuheben.

In weiteren Untersuchungen gilt es mittels RTQ-PCR die vorhandenen semiquantitativen Ergebnisse zu verifizieren und die Kausalität zwischen den differentiell exprimierten Genen und der Mikrokernbildung z.B. mittels siRNA (small interfering RNA) zu zeigen.

7 Literatur

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

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

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

Abend, M., van Beuningen, D. Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie Teil I. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) 156-166

An, H.J., Maeng, O., Kang, K.H., Lee, J.O., Kim, Y.S., Paik, S.G., Lee, H. Activation of Ras up-regulates pro-apoptotic BNIP3 in nitric oxide-induced cell death. *J Biol Chem.* 281 (2006) 33939-33948

Ashwell, J.D., Berger, N.A., Cidlowski, J.A., Lane, D.P., Korsmeyer, S.J. Coming to terms with death : apoptosis in cancer and immune development. *Immunol Today* 15 (1994) 147-151

Banasiak, K.J., Xia, Y., Haddad, G.G. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 62 (2000) 215-249

Blyth, K., Vaillant, F., Hanlon, L., Mackay, N., Bell, M., Jenkins, A., Neil, J.C., Cameron, E.R. Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways in vivo. *Cancer Res.* 66 (2006) 2195-2201

Bosotti, R., Locatelli, G., Healy, S., Scacheri, E., Sartori, L., Mercurio, C., Calogero, R., Isacchi, A. Cross platform microarray analysis for robust identification of differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics.* 8 Suppl (2007) S5

Brazma, A., Vilo, J.: Gene expression data analysis. *FEBS Letters* 480 (2000) 17-24

Brenner, S.L., Liaw, L.-H., Berns, M.W. Laser microirradiation of kinetochores in mitotic PtK2 cells: chromatid separation and micronucleus formation. *Cell Biophys* 2 (1980) 139-152

Buttke, T., Sandstrom, P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15 (1994) 7-12

Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oostuyse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenbergerde Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.M., Collen, D., Dejana, E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 98 (1999) 147-157

- Casciano, D.A., Woodcock, J.** Empowering microarrays in the regulatory setting. *Nat Biotechnol.* 24 (2006) 1103
- Chai, L.S., Schumer, J.M., Sandberg, A.A.** Effect of mitochondrial inhibitors on metaphase-telophase progression and nuclear membrane formation in Chinese hamster cells. *Cell Tiss Kinetik* 18 (1985) 13-25
- Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J.H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D., Greenberg, A.** Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem.* 274 (1999) 7-10
- Cohen, J.J.** Apoptosis. *Immunol Today* 14 (1993) 126-129
- Cohen-Saidon, C., Carmi, I., Keren, A., Razin, E.** Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90beta. *Blood.* 107 (2006) 1413-1420
- Colnot, C., Sidhu, S.S., Balmain, N., Poirier, F.** Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin 3 null mutant bones. *Dev Biol.* 229 (2001) 203-214
- Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., Cole, M.D.** A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol.* 26 (2006) 4226-4239
- Da Silva, A.P., Pollett, A., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sodek, J., Zohar, R.** Exacerbated tissue destruction in DSS-induced acute colitis of OPN-null mice is associated with downregulation of TNF-alpha expression and non-programmed cell death. *J Cell Physiol.* 208 (2006) 629-639
- Dansen, T.B., Whitfield, J., Rostker, F., Brown-Swigart, L., Evan, G.I.** Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo. *J Biol Chem.* 281 (2006) 10890-10895
- Devries-Seimon, T., Li, Y., Yao, P.M., Stone, E., Wang, Y., Davis, R.J., Flavell, R., Tabas, I.** Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol.* 171 (2005) 61-73
- Diwan, A., Krenz, M., Syed, F.M., Wansapura, J., Ren, X., Koesters, A.G., Li, H., Kirshenbaum, L.A., Hahn, H.S., Robbins, J., Jones, W.K., Dorn, G.W.** Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest.* 117 (2007) 2825-2833
- Dragovich, T., Rudin, C.M., Thompson, C.B.** Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17 (1998) 3207-3213
- Farias, E., Lu, M., Li, X., Schnapp, L.M.** Integrin alpha8beta1-fibronectin interactions promote cell survival via PI3 kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 329 (2005) 305-311
- Fernandez-Sarabia, M.J., Bischoff, J.R.** Bcl-2 associates with the ras-related protein R-Ras p23. *Nature* 366 (1993) 274-275

- Ferrari, G., Pintucci, G., Seghezzi, G., Hyman, K., Galloway, A.C., Mignatti, P.** VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 17260-17265
- Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R.N.V.T.** The role of the sphingomyelin pathway and protein kinase C in radiation-induced cell kill. In: *"Important Advances in Oncology"*; DeVita, S.; Hellmann, S. A.; Rosenberg, J. B. (Eds.); Philadelphia äJ. B. Lipincott Company (1995) 19-30
- Fukunaga-Johnson, N., Ryan, J.J., Wicha, M., Nunez, G., Clarke, M.F.** Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and -independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis* 16 (1995) 1761-1767
- Geissinger, E., Weisser, C., Fischer, P., Scharl, M., Wellbrock, C.** Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res.* 62 (2002) 4820-4828
- Goetz, C., Montenahr, M.** p53 and its implication in apoptosis (Review). *Int J Oncol* 6 (1995) 1129-1135
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., Perez, J.M.** Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59 (2001) 657-663
- Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., Mori, M.** hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 11 (2004) 390-402
- Graessmann, M., Berg, B., Fuchs, B., Klein, A., Graessmann, A.** Chemotherapy resistance of mouse WAP-SVT/t breast cancer cells is mediated by osteopontin, inhibiting apoptosis downstream of caspase-3. *Oncogene.* 26 (2007) 2840-2850
- Granville, D.J., Carthy, C.M., Hunt, D.W., McManus, B.M.** Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78 (1998) 893-913
- Ha, S.D., Ng, D., Lamothe, J., Valvano, M.A., Han, J., Kim, S.O.** Mitochondrial proteins Bnip3 and Bnip3L are involved in anthrax lethal toxin-induced macrophage cell death. *J Biol Chem.* 282 (2007) 26275-26283
- Halestrap, A.P., Doran, E., Gillespie, J.P., O'Toole, A.** Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 170-177
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Gottlieb, R.A., Gustafsson, A.B.** Autophagy as a protective response to Bnip3-mediated apoptotic signaling in the heart. *Autophagy.* 2 (2006) 307-309
- Harlan Laboratories, Inc. (2008) C.C3H-H-2^k** (http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/congenic_mice/cc3hh2k.hl) Stand 13.11.2008
- Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M.Jr.** Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. *Mut Res* 127 (1984) 129-137

Heddle, J.A., Carrano, A.V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mut Res* 44 (1977) 63-69

Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W., Salamone, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mut Res* 123 (1983) 61-118

Higdon, R., van Belle, G., Kolker, E. A note on the false discovery rate and inconsistent comparisons between experiments. *Bioinformatics*. 24 (2008) 1225-1228

Hockenbery, D. Defining apoptosis. *American J Pathol* 146 (1995) 16-23

Hockenbery, D., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl₂ functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75 (1993) 241-251

Hong, S., Pusapati, R.V., Powers, J.T., Johnson, D.G. Oncogenes and the DNA damage response: Myc and E2F1 engage the ATM signaling pathway to activate p53 and induce apoptosis. *Cell Cycle*. 5 (2006) 801-803

Howell, W.H. The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *Journal of Morphology* 4 (1891) 57-116

Hsieh, Y.H., Juliana, M.M., Hicks, P.H., Feng, G., Elmets, C., Liaw, L., Chang, P.L. Papilloma development is delayed in osteopontin-null mice: implicating an antiapoptosis role for osteopontin. *Cancer Res*. 66 (2006) 7119-7127

Humphreys, D.T., Wilson, M.R. Models of L929 cell death induced by TNF-alpha and other cytotoxic agents. *Cytokine* 11 (1999) 773-782

Isaacs, J. T.: Advances and controversies in the study of programmed cell death / apoptosis in the development of and therapy for cancer. *Curr Opin Oncol* 6 (1994) 82-89

Jolly, J.: Recherches sur la formation des globles rouges des mammifères. *Arch Anat Microc* 9 (1907) 133-314

Kanduc D.; Mittelman A.; Serpico R.; Sinigaglia E.; Sinha A. A.; Natale C.; Santacroce R.; Di Corcia M. G.; Lucchese A.; Dini L.; Pani P.; Santacroce S.; Simone S.; Bucci R.; Farber E.: Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*. 21 (2002) 165-170

Kato, H.; Sandberg, A. A.: Chromosome pulverisation in human cells with micronuclei. *J Nat Cancer Inst* 40 (1968) 165-179

Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R.: Apoptosis: a basis biological phenomen with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J Cancer* 26 (1972) 239-257

Kerr, J. F. R; Winterford, C. M.; Harmon, B. V.: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 (1994) 2013-2026

Kubli, D.A., Ycaza, J.E., Gustafsson, A.B. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J*. 405 (2007) 407-415

Kuida, K.; Lippke, J. A.; Ku, G.; Harding, M. W.; Livingston, D. J.; Su, M. S.-S.; Flavell, R. A.: Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 converting enzyme. *Science* 267 (1995) 2000-2009

Kuo, C.C., Liang, C.M., Lai, C.Y., Liang, S.M. Involvement of heat shock protein (Hsp)90 beta but not Hsp90 alpha in antiapoptotic effect of CpG-B oligodeoxynucleotide. *J Immunol.* 178 (2007) 6100-6108

Kuo W. P., Liu F., Trimarchi J., Punzo C., Lombardi M., Sarang J., Whipple M. E., Maysuria M., Serikawa K., Lee S. Y., McCrann D., Kang J., Shearstone J. R., Burke J., Park D. J., Wang X., Rector T. L., Ricciardi-Castagnoli P., Perrin S., Choi S., Bumgarner R., Kim J. H., Short G. F. 3rd, Freeman M. W., Seed B., Jensen R., Church G. M., Hovig E., Cepko C. L., Park P., Ohno-Machado L., Jenssen T. K.: A sequence-oriented comparison of gene expression measurements across different hybridization-based technologies. *Nat Biotechnol.* 24 (2006) 832-840.

Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P.G., Harousseau, J.L., Anderson, K.C. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood.* 104 (2004) 2886-2892

Lee, J. M.; Bernstein, A.: Apoptosis, cancer and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 14 (1995) 149-161

Lee, M. L.; Kuo, F. C.; Whitmore, G. A.; Sklar, J.: importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 9834-9839

Lee, K., Lanske, B., Karaplis, A.C., Deeds, J.D., Kohno, H., Nissenson, R.A., Kronenberg, H.M., Segre, G.V. Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology.* 137 (1996) 5109-5118

Leist, M.; Jäättelä, M.: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews / Molecular Cell Biology* 2 (2001) 589-598

Luo, H., Li, Q., O'Neal, J., Kreisel, F., Le Beau, M.M., Tomasson, M.H. c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations. *Blood.* 106 (2005) 2452-2461

Luo, S., Mao, C., Lee, B., Lee, A.S. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol.* 26 (2006) 5688-5697

MacLean, H.E., Kim, J.I., Glimcher, M.J., Wang, J., Kronenberg, H.M., Glimcher, L.H. Absence of transcription factor c-maf causes abnormal terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development. *Dev Biol.* 262 (2003) 51-63

Maclean, K.H., Kastan, M.B., Cleveland, J.L. Atm deficiency affects both apoptosis and proliferation to augment Myc-induced lymphomagenesis. *Mol Cancer Res.* 5 (2007) 705-711

- Maes, C., Stockmans, I., Moermans, K., Van Looveren, R., Smets, N., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G.** Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J Clin Invest.* 113 (2004) 188-199
- Maier, P.; Schmid, W.:** Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mut Res* 40 (1976) 325-338
- Majno, G.; Joris, I.:** Review, apoptosis, oncosis and necrosis, an overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146 (1995) 3-8
- Martin L. J.; Al-Abdulla N. A.; Brambrink A. M.; Kirsch J. R.; Sieber F. E.; Portera-Cailliau C.:** Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull.* 46 (1998) 281-309
- Martin, R., Lahlil, R., Damert, A., Miquerol, L., Nagy, A., Keller, G., Hoang, T.** SCL interacts with VEGF to suppress apoptosis at the onset of hematopoiesis. *Development.* 131 (2004) 693-702
- Marutani, T., Yamamoto, A., Nagai, N., Kubota, H., Nagata, K.** Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47- knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J Cell Sci.* 117 (2004) 5913-5922
- Matyja, E., Nagańska, E., Taraszewska, A., Rafałowska, J.** The mode of spinal motor neurons degeneration in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol.* 43 (2005) 7-13
- Meier, B.** Reactive oxygen intermediates involved in cellular regulation. *Protoplasma* 217 (2001) 101-116
- Mizutani, A., Furukawa, T., Adachi, Y., Ikehara, S., Taketani, S.** A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J Biol Chem.* 277 (2002) 15851-15858
- Mo, H., Henriksson, M.** Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 6344-6349
- Mohan, N., Meltz, M.L.** Induction of nuclear Faktor κ B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. *Radiat Res* 140 (1994) 97-104
- Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J., Susin, S.A.** Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol.* 27(2007) 4844-62
- Müller, W.U., Streffer, C.** Micronucleus Assay. *Adv Mut Res* 5 (1994) 1-133

- Nakajima, H., Watanabe, N., Shibata, F., Kitamura, T., Ikeda, Y., Handa, M.** N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation. *J Biol Chem.* 281 (2006) 14494-14502
- Natarajan, A.T., Darroudi, F., Mullenders, L.H.F., Meijers, M.** The nature and repair of DNA lesions that lead to chromosomal aberrations induced by ionizing radiations. *Mut Res* 160 (1986) 231-236
- Nicotera, P.** Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Toxicol Lett* 127 (2002) 189-195
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A.** Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259 (1993) 1769-1772
- Ojeda, F., Guarda, M.I., Maldonado, C., Folch, H.** Induction of apoptosis in thymocytes: new evidence for an interaction of PKC and PKA pathways. *Biol Chem* 376 (1995) 389-393
- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E., Mori, M.** Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 10845-10850
- Pincu, M., Bass, D., Norman, A.** An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mut Res* 139 (1984) 61-65
- Pincu, M., Callisen, H., Norman, A.** DNA content of micronuclei in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 47 (1985) 423-432
- Port, M., Schmelz, H.U., Stassen, T., Müller, K., Stockinger, M., Obermair, R., Abend M.** Correcting false gene expression measurements from degraded RNA using RTQ-PCR. *Diagn Mol Pathol.* 16 (2007) 38-49
- Port, M., Schmelz, H.U., Stockinger, M., Sparwasser, C., Albers, P., Pottek, T., Abend, M.** Gene expression profiling in seminoma and nonseminoma. *J Clin Oncol* 23 (2005) 58-69
- Portera-Cailliau, C., Price, D.L., Martin, L.J.** Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 378 (1997) 70-87
- Raab, S., Beck, H., Gaumann, A., Yüce, A., Gerber, H.P., Plate, K., Hammes, H.P., Ferrara, N., Breier, G.** Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost.* 91 (2004) 595-605
- Reed, J.C., Doctor, K., Rojas, A., Zapata, J.M., Stehlik, C., Fiorentino, L., Damiano, J., Roth, W., Matsuzawa, S., Newman, R., Takayama, S., Marusawa, H., Xu, F., Salvesen, G., Godzik, A.; RIKEN GER Group; GSL Members** Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res.* 13 (2003) 1376-1388

Ruemmele, F.M., Russo, P., Beaulieu, J., Dionne, S., Levy, E., Lentze, M.J., Seidman E.G. Susceptibility to FAS-induced apoptosis in human nontumoral enterocytes: role of costimulatory factors. *J Cell Physiol* 181 (1999) 45-54

Ruf, C.G.A. Strahleninduzierte Genexpression in L 929-Zellen. *Dissertation, TU München* (2007) 1-111

Rupnow, B.A., Knox, S.J. The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy. *Apoptosis*. 4 (1999) 115-43

Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., Kaufman, R.J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 4 (2006) e374

Sakai, T., Johnson, K.J., Murozono, M., Sakai, K., Magnuson, M.A., Wieloch, T., Cronberg, T., Isshiki, A., Erickson, H.P., Fässler, R. Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med.* 7 (2001) 324-330

Sané, A.T., Bertrand, R. Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G1 arrest followed by necrotic cell death. *Cancer Res* 59 (1999) 3565-3569

Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Ishikura, H., Umehara, H., Domae, N. Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* 270 (1995) 27326-27331

Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., Johnson, R.S. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.* 15 (2001) 2865-2876

Schmitt, C.A., Lowe, S.W. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 187 (1999) 127-137

Schwartz, L.M., Osborne, B.A. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 14 (1993) 582-590

Shan, B., Lee, W.-H. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 8166-8173

Shi, L., Jones, W.D., Jensen, R.V., Harris, S.C., Perkins, R.G., Goodsaid, F.M., Guo, L., Croner, L.J., Boysen, C., Fang, H., Qian, F., Amur, S., Bao, W., Barbacioru, C.C., Bertholet, V., Cao, X.M., Chu, T.M., Collins, P.J., Fan, X.H., Frueh, F.W., Fuscoe, J.C., Guo, X., Han, J., Herman, D., Hong, H., Kawasaki, E.S., Li, Q.Z., Luo, Y., Ma, Y., Mei, N., Peterson, R.L., Puri, R.K., Shippy, R., Su, Z., Sun, Y.A., Sun, H., Thorn, B., Turpaz, Y., Wang, C., Wang, S.J., Warrington, J.A., Willey, J.C., Wu, J., Xie, Q., Zhang, L., Zhang, L., Zhong, S., Wolfinger, R.D., Tong, W. The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies. *BMC Bioinformatics.* 9 Suppl (2008) S10

- Slater, F.G., Stefan, C., Nobel, I., Orrenius, S.** The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1271 (1995) 59-62
- Staßen, T.** Strahleninduzierte Genexpression bei MCF-7-Zellen. *Dissertation, TU München* (2002) 1-113
- Staßen, T., Port, M., Nuyken, I., Abend, M.** Radiation-induced gene expression in MCF-7 cells. *Int J Radiat Biol.* 79 (2003) 319-331
- Steel, G.G.** The case against apoptosis. *Acta Oncol* 40 (2001) 968-975
- Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T., Cory, S.** DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79 (1994) 329-339
- Sutherland, K.D., Vaillant, F., Alexander, W.S., Wintermantel, T.M., Forrest, N.C., Holroyd, S.L., McManus, E.J., Schutz, G., Watson, C.J., Chodosh, L.A., Lindeman, G.J., Visvader, J.E.** c-myc as a mediator of accelerated apoptosis and involution in mammary glands lacking Socs3. *EMBO J.* 25 (2006) 5805-5815
- Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S., Morioka, M., Gotoh, T., Hamada, J.I., Ushio, Y., Mori, M.** Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.* 11 (2004) 403-415
- Tajiri, S., Yano, S., Morioka, M., Kuratsu, J., Mori, M., Gotoh, T.** CHOP is involved in neuronal apoptosis induced by neurotrophic factor deprivation. *FEBS Lett.* 580 (2006) 3462-3468
- Tan, P.K., Downey, T.J., Spitznagel, E.L.Jr., Xu, P., Fu, D., Dimitrov, D.S., Lempicki, R.A., Raaka, B.M., Cam, M.C.** Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5676-5684
- Taylor, A.C., Schuster, K., McKenzie, P.P., Harris, L.C.** Differential cooperation of oncogenes with p53 and Bax to induce apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer.* 5 (2006) 53
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.** Caspases: Enemies within. *Sciences* 281 (1998) 1312-1316
- Trump, B.F., Berezsky, I.K., Chang, S.H., Phelps, P.C.** The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol* 25 (1997) 82-88
- Vande Velde, C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., Greenberg, A.H.** BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 20 (2000) 5454-5468
- Vaux, D.L.** Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (1993) 786-789
- Verderio, E., Nicholas, B., Gross, S., Griffin, M.** Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. *Exp Cell Res.* 239 (1998) 119-138

- Wagner, A.J., Small, M.B., Hay, N.** Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of Bcl₂. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 2432-2440
- Walker, P.R., Pandey, S., Sikorska, M.** Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death and Differentiation* 2 (1995) 97-104
- Walker, P.R., Weaver, V.M., Lach, B., Leblanc, J., Sikorska, M.** Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Experimental Cell Research* 213 (1994) 100-106
- Walker, P.R., Sikorska, M.** New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cll Biol* 75 (1997) 287-299
- Yoo, K.H., Thornhill, B.A., Forbes, M.S., Coleman, C.M., Marcinko, E.S., Liaw, L., Chevalier, R.L.** Osteopontin regulates renal apoptosis and interstitial fibrosis in neonatal chronic unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 70 (2006) 1735-1741
- Yook, Y.H., Kang, K.H., Maeng, O., Kim, T.R., Lee, J.O., Kang, K.I., Kim, Y.S., Paik, S.G., Lee, H.** Nitric oxide induces BNIP3 expression that causes cell death in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 321 (2004) 298-305
- Zeiss, C.J.** The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 40 (2003) 481-495
- Zhang, M., Yao, C., Guo, Z., Zou, J., Zhang, L., Xiao, H., Wang, D., Yang, D., Gong, X., Zhu, J., Li, Y., Li, X.** Apparently low reproducibility of true differential expression discoveries in microarray studies. *Bioinformatics.* 24 (2008) 2057-2063
- Zhang, R., Luo, D., Miao, R., Bai, L., Ge, Q., Sessa, W.C., Min, W.** Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene.* 24 (2005) 3954-3963
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D.** CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12 (1998) 982-995
- Zohar, R., Zhu, B., Liu, P., Sodek, J., McCulloch, C.A.** Increased cell death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287 (2004) H1730-H1739

8 Anhang

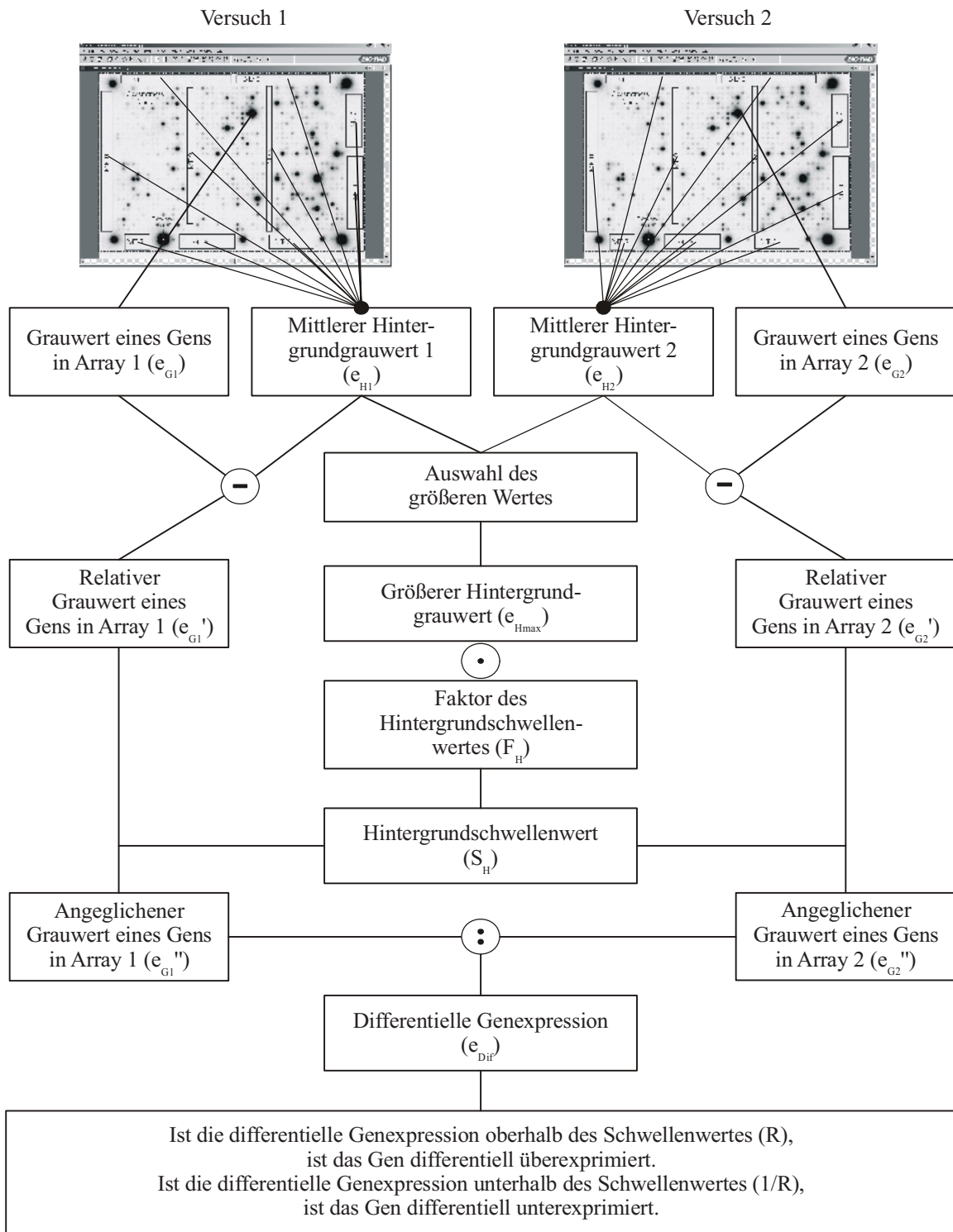


Abb. 35: Übersicht über die einzelnen Berechnungsschritte zur differentiellen Genexpression und die Definition der hoch- und runterregulierten Gene.

Nylon-Membran					Genexpression (CNT)	Zu ergänzender Grauwert für die AUG's (CNT)	errechnete Genexpression (CNT)
Array ID	Versuch	Zeit	[VM-26] (pMol)	Datum (2002)			
1	a 100	20'	0	01.02.	211523		211523
2	a 100	20'	0	17.04.	551737		551737
3	a 100	20'	0	21.02.	1068508		1068508
4	a 100	20'	0	26.04.	3617834	22937	3640772
5	a 100	20'	0	04.02.	806833		806833
6	a 100	20'	100	01.02.	1353946		1353946
7	a 100	20'	100	21.02.	5409059	38666	5447724
8	a 100	20'	100	4.02.	4312013	22937	4334951
9	a 100	24 h	0	13.02.	2187389		2187389
10	a 100	24 h	0	07.02.	429610		429610
11	a 100	24 h	100	13.02.	3125908	24903	3150811
12	a 100	24 h	100	07.02.	745552		745552
13	a 100	48 h	0	15.02.	588193		588193
14	a 100	48 h	0	19.02.	2090131		2090131
15	a 100	48 h	100	15.02.	1765108		1765108
16	a 100	48 h	100	19.02.	5374838	78642	5453480
17	a 100	72 h	0	01.03.	2359989		2359989
18	a 100	72 h	0	20.02.	1416096		1416096
19	a 100	72 h	0	26.02.	1003986		1003986
20	a 100	72 h	0	04.03.	185244		185244
21	a 100	72 h	100	01.03.	7663749	150731	7814479
22	a 100	72 h	100	20.02.	4862894	183498	5046392
23	a 100	72 h	100	26.02.	3522354		3522354
24	a 100	72 h	100	04.03.	720698		720698
25	a 5000	20'	0	22.02.	1938311		1938311
26	a 5000	20'	0	25.02.	5000237	62914	5063151
27	a 5000	20'	0	04.03.	305983		305983
28	a 5000	20'	5000	22.02.	3453898	14418	3468316
29	a 5000	20'	5000	25.02.	9911091	100269	10011360
30	a 5000	20'	5000	04.03.	586380		586380
31	a 5000	24 h	0	28.02.	1495477		1495477
32	a 5000	24 h	0	04.03.	4488513	138934	4627447
33	a 5000	24 h	5000	28.02.	1036621		1036621
34	a 5000	24 h	5000	04.03.	3428284	60292	3488576
35	a 5000	48 h	0	11.03.	5208731	118618	5327349
36	a 5000	48 h	0	11.03. - 6h	588028		588028
37	a 5000	48 h	0	08.03.	2136987		2136987
38	a 5000	48 h	5000	11.03.	9560743	251654	9812398
39	a 5000	48 h	5000	11.03. - 6h	1052741		1052741
40	a 5000	48 h	5000	18.04.	1782558		1782558
41	a 5000	48 h	5000	02.05.	5208988	69467	5278455
42	a 5000	48 h	5000	08.03.	3987517	12452	3999969

Nylon-Membran					Genexpression (CNT)	Zu ergänzender Grauwert für die AUG's (CNT)	errechnete Genexpression (CNT)
Array ID	Versuch	Zeit	[VM-26] (pMol)	Datum (2002)			
43	a 5000	72 h	0	13.03.	773903		773903
44	a 5000	72 h	0	18.03.	2277927	47841	2325767
45	a 5000	72 h	0	02.04. - I	2348901		2348901
46	a 5000	72 h	0	02.04. - II	2322959		2322959
47	a 5000	72 h	5000	13.03.	489606		489606
48	a 5000	72 h	5000	18.03.	1923540		1923540
49	a 5000	72 h	5000	02.04. - I	1555117		1555117
50	a 5000	72 h	5000	02.04. - II	1577708		1577708
51	b 100	20'	0	01.02.	3932133	11796	3943929
52	b 100	20'	0	04.02.	9935270	233305	10168574
53	b 100	20'	100	01.02.	6971135	55705	7026839
54	b 100	20'	100	04.02.	16387353	398453	16785806
55	b 100	24 h	0	13.02.	4590002	258863	4848865
56	b 100	24 h	0	07.02.	1196444		1196444
57	b 100	24 h	100	13.02.	6033632	198571	6232203
58	b 100	24 h	100	07.02.	1547733		1547733
59	b 100	48 h	0	15.02.	4013008		4013008
60	b 100	48 h	0	17.04.	166636		166636
61	b 100	48 h	0	02.05.	2024911		2024911
62	b 100	48 h	0	21.02.	17829526	227406	18056932
63	b 100	48 h	100	15.02.	216986		216986
64	b 100	48 h	100	17.04.	229852		229852
65	b 100	48 h	100	21.02.	1213188		1213188
66	b 100	72 h	0	20.02.	4446949	140900	4587850
67	b 100	72 h	0	26.02.	3116953	50462	3167415
68	b 100	72 h	0	27.02.	1025391		1025391
69	b 100	72 h	100	20.02.	5343235	87817	5431052
70	b 100	72 h	100	26.02.	3684048		3684048
71	b 100	72 h	100	27.02.	1098076		1098076
72	b 5000	20'	0	22.02.	3710483		3710483
73	b 5000	20'	0	25.02.	9393192	271315	9664507
74	b 5000	20'	0	04.03.	235338		235338
75	b 5000	20'	5000	18.04.	2224432		2224432
76	b 5000	20'	5000	22.02.	1094819		1094819
77	b 5000	20'	5000	23.04.	8332742	79953	8412695
78	b 5000	20'	5000	25.02.	1932658		1932658
79	b 5000	20'	5000	04.03.	68281		68281
80	b 5000	24 h	0	28.02.	617658		617658
81	b 5000	24 h	0	06.03.	3487526		3487526
82	b 5000	24 h	0	06.03. - 6h	157444		157444
83	b 5000	24 h	5000	28.02.	2244447		2244447
84	b 5000	24 h	5000	06.03.	10399909	443672	10843581

Nylon-Membran					Genexpression (CNT)	Zu ergänzender Grauwert für die AUG's (CNT)	errechnete Genexpression (CNT)
Array ID	Versuch	Zeit	[VM-26] (pMol)	Datum (2002)			
85	b 5000	24 h	5000	06.03. - 6h	598065		598065
86	b 5000	48 h	0	11.03.	3991767	11796	4003563
87	b 5000	48 h	0	08.03.	1332535		1332535
88	b 5000	48 h	5000	11.03.	5300802	30146	5330948
89	b 5000	48 h	5000	18.04.	2769814		2769814
90	b 5000	48 h	5000	02.05.	10140107	227406	10367513
91	b 5000	48 h	5000	24.04.	3904213	43908	3948121
92	b 5000	48 h	5000	26.04.	356635		356635
93	b 5000	48 h	5000	06.05.	3895436		3895436
94	b 5000	48 h	5000	08.03.	1888437		1888437
95	b 5000	72 h	0	13.03.	302735		302735
96	b 5000	72 h	0	20.03. - 6h	69654		69654
97	b 5000	72 h	0	20.03.	1842530		1842530
98	b 5000	72 h	5000	13.03.	2567798	14418	2582216
99	b 5000	72 h	5000	20.03. - 6h	568889		568889
100	b 5000	72 h	5000	20.03.	12622185	174323	12796508

Tab. 14: Auflistung aller erstellten Autoradiographien mit den wichtigen Daten zur Nylon-Membran (laufender Nummer, Versuchsreihe, Expositionsdauer, Konzentration VM-26, Erstellungsdatum im Jahr 2002) und den bei der Auswertung ermittelten Ergebnissen (Gesamtgenexpression, zu ergänzender Grauwert für die AUG's, errechnete Gesamtgenexpression).

Beispiele

Beispiel 1:

1. Fall: relativer Grauwert 1 ist ≤ 0

$$\text{relativer Grauwert 1} = \text{Grauwert 1} - \text{Hintergrund} = 513 - 587 = -74 \quad \Rightarrow 0$$

$$\text{relativer Grauwert 2} = \text{Grauwert 2} - \text{Hintergrund} = 251 - 136 = 115$$

Die differentielle Genexpression (115 / 0) ist **nicht definiert**.

2. Fall: relativer Grauwert 2 ist ≤ 0

$$\text{relativer Grauwert 1} = \text{Grauwert 1} - \text{Hintergrund} = 970 - 587 = 383$$

$$\text{relativer Grauwert 2} = \text{Grauwert 2} - \text{Hintergrund} = 56 - 136 = -80 \quad \Rightarrow 0$$

Die differentielle Genexpression (0 / 383) ist **nicht definiert**.

3. Fall: relative Grauwerte 1 und 2 sind ≤ 0

$$\text{relativer Grauwert 1} = \text{Grauwert 1} - \text{Hintergrund} = 584 - 587 = -3 \Rightarrow 0$$

$$\text{relativer Grauwert 2} = \text{Grauwert 2} - \text{Hintergrund} = 126 - 136 = -10 \Rightarrow 0$$

Die differentielle Genexpression (0 / 0) ist **nicht definiert**.

Beispiel 2:

1. Fall: Die Differenz zwischen dem relativen Grauwert eines Gens und Hintergrundschwellenwert ergab einen negativen Wert, zwischen dem relativen Grauwert des anderen Gens und dem Hintergrundschwellenwert einen positiven Wert.

Relativer Grauwert eines Gens von Array 1 (e_{G1}')	=	3600	CNT
Relativer Grauwert eines Gens von Array 2 (e_{G2}')	=	520	CNT
größerer Hintergrundwert aus Array 1 und 2 (e_{Hmax})	=	210	CNT
variabler Faktor für den Hintergrundschwellenwert (F_H)	=	5	

$$\begin{aligned}
 s_H &= e_{Hmax} \cdot F_H = 210 \text{ CNT} \cdot 5 = 1050 \text{ CNT} \\
 e_{G1}' - s_H &= 3600 \text{ CNT} - 1050 \text{ CNT} = 2550 \text{ CNT} \\
 e_{G2}' - s_H &= 520 \text{ CNT} - 1050 \text{ CNT} = -530 \text{ CNT} \Rightarrow \text{nicht definiert}
 \end{aligned}$$

In diesem Beispiel würden folgende angeglichenen Grauwerte der Gene aus den beiden Arrays für die Berechnung herangezogen werden:

$e_{G1}'' = 3600 \text{ CNT} \Rightarrow$ Da der relative Grauwert des Gens aus Array 1 größer als der Hintergrundschwellenwert war, wird er für die weitere Berechnung übernommen.

$e_{G2}'' = 1050 \text{ CNT} \Rightarrow$ Da der relative Grauwert des Gens aus Array 2 kleiner als der Hintergrundschwellenwert war, wird für die weitere Berechnung der Hintergrundschwellenwert herangezogen.

Die differentielle Genexpression beträgt: $1050 / 3600 = 0,29$

2. Fall: Die Differenzen zwischen den relativen Grauwerten beider Gene und dem Hintergrundschwellenwert ergaben einen positiven Wert.

Relativer Grauwert eines Gens von Array 1 (e_{G1}')	=	3600	CNT
Relativer Grauwert eines Gens von Array 2 (e_{G2}')	=	5700	CNT
größerer Hintergrundwert aus Array 1 und 2 (e_{Hmax})	=	210	CNT
variabler Faktor für den Hintergrundschwellenwert (F_H)	=	5	

$$\begin{aligned}
 s_H &= e_{Hmax} \cdot F_H = 210 \text{ CNT} \cdot 5 = 1050 \text{ CNT} \\
 e_{G1}' - s_H &= 3600 \text{ CNT} - 1050 \text{ CNT} = 2550 \text{ CNT} \\
 e_{G2}' - s_H &= 5700 \text{ CNT} - 1050 \text{ CNT} = 4650 \text{ CNT}
 \end{aligned}$$

In diesem Beispiel würden folgende angeglichenere Grauwerte der Gene aus den beiden Arrays für die Berechnung herangezogen werden:

$e_{G1}'' = 3600 \text{ CNT} \Rightarrow$ Da der relative Grauwert des Gens aus Array 1 größer als der Hintergrundschwellenwert war, wird er für die weitere Berechnung übernommen.

$e_{G2}'' = 5700 \text{ CNT} \Rightarrow$ Da der relative Grauwert des Gens aus Array 2 größer als der Hintergrundschwellenwert war, wird er für die weitere Berechnung übernommen.

Die differentielle Genexpression beträgt: $5700 / 3600 = 1,58$

3. Fall: Die Differenzen zwischen den relativen Grauwerten beider Gene und dem Hintergrundschwellenwert ergaben negative Werte.

Relativer Grauwert eines Gens von Array 1 (e_{G1}')	=	260	CNT
Relativer Grauwert eines Gens von Array 2 (e_{G2}')	=	520	CNT
größerer Hintergrundwert aus Array 1 und 2 (e_{Hmax})	=	210	CNT
variabler Faktor für den Hintergrundschwellenwert (F_H)	=	5	

$$\begin{aligned}
 s_H &= e_{Hmax} \cdot F_H = 210 \text{ CNT} \cdot 5 = 1050 \text{ CNT} \\
 e_{G1}' - s_H &= 260 \text{ CNT} - 1050 \text{ CNT} = -790 \text{ CNT} \quad \Rightarrow \text{nicht definiert} \\
 e_{G2}' - s_H &= 520 \text{ CNT} - 1050 \text{ CNT} = -530 \text{ CNT} \quad \Rightarrow \text{nicht definiert}
 \end{aligned}$$

In diesem Beispiel würden folgende angeglichenere Grauwerte der Gene aus den beiden Arrays für die Berechnung herangezogen werden:

$e_{G1}'' = 1050 \text{ CNT} \Rightarrow$ Da der relative Grauwert des Gens aus Array 1 kleiner als der Hintergrundschwellenwert war, wird für die weitere Berechnung der Hintergrundschwellenwert herangezogen.

$e_{G2}'' = 1050 \text{ CNT} \Rightarrow$ Da der relative Grauwert des Gens aus Array 2 kleiner als der Hintergrundschwellenwert war, wird für die weitere Berechnung der Hintergrundschwellenwert herangezogen.

Die differentielle Genexpression beträgt: $1050 / 1050 = 1$

Beispiel 3:

1. Fall: Das Gen ist nicht hoch-/runterreguliert.

Voraussetzung: $R = 3 \quad \Rightarrow \quad 1/R = 0,33$

$$e_{G1}'' = 2100 \text{ CNT}$$

$$e_{G2}'' = 1050 \text{ CNT}$$

$$e_{\text{dif}} = e_{G2}'' / e_{G1}'' = 0,5$$

Da der Wert $e_{\text{dif}} = 0,5$ kleiner als $R = 3$ und größer als $1/R = 0,33$ ist, befindet sich die differentielle Genexpression im Kontrollbereich.

2. Fall: Das Gen ist runterreguliert.

Voraussetzung: $R = 3 \quad \Rightarrow \quad 1/R = 0,33$

$$e_{G1}'' = 4200 \text{ CNT}$$

$$e_{G2}'' = 1050 \text{ CNT}$$

$$e_{\text{dif}} = e_{G2}'' / e_{G1}'' = 0,25$$

Da der Wert $e_{\text{dif}} = 0,25$ kleiner als $1/R = 0,33$ ist, ist das Gen runterreguliert.

3. Fall: Das Gen ist hochreguliert.

Voraussetzung: $R = 3 \quad \Rightarrow \quad 1/R = 0,33$

$$e_{G1}'' = 1050 \text{ CNT}$$

$$e_{G2}'' = 4200 \text{ CNT}$$

$$e_{\text{dif}} = e_{G2}'' / e_{G1}'' = 4$$

Da der Wert $e_{\text{dif}} = 4$ größer als $R = 3$ ist, ist das Gen hochreguliert.

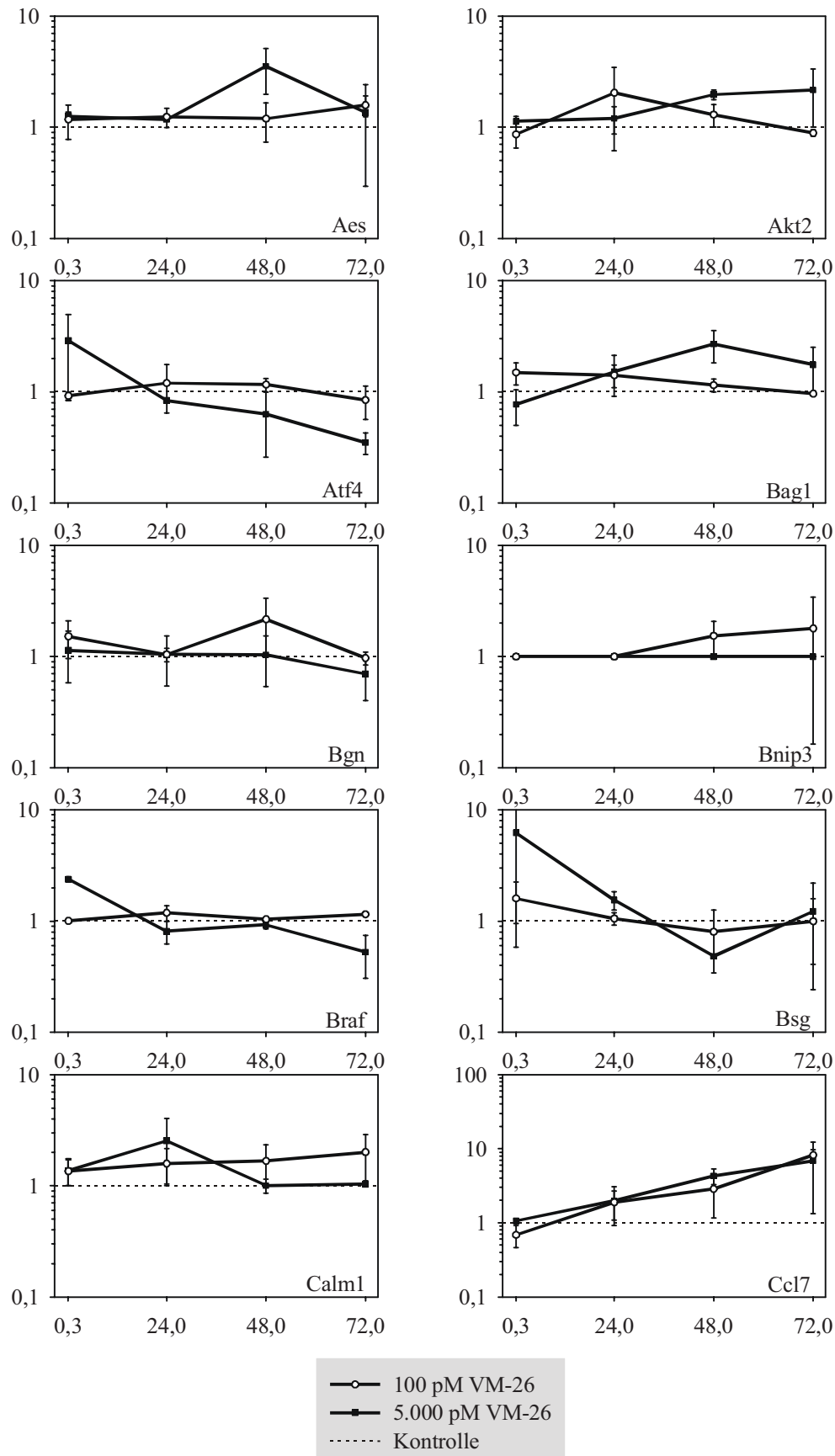


Abb. 36: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

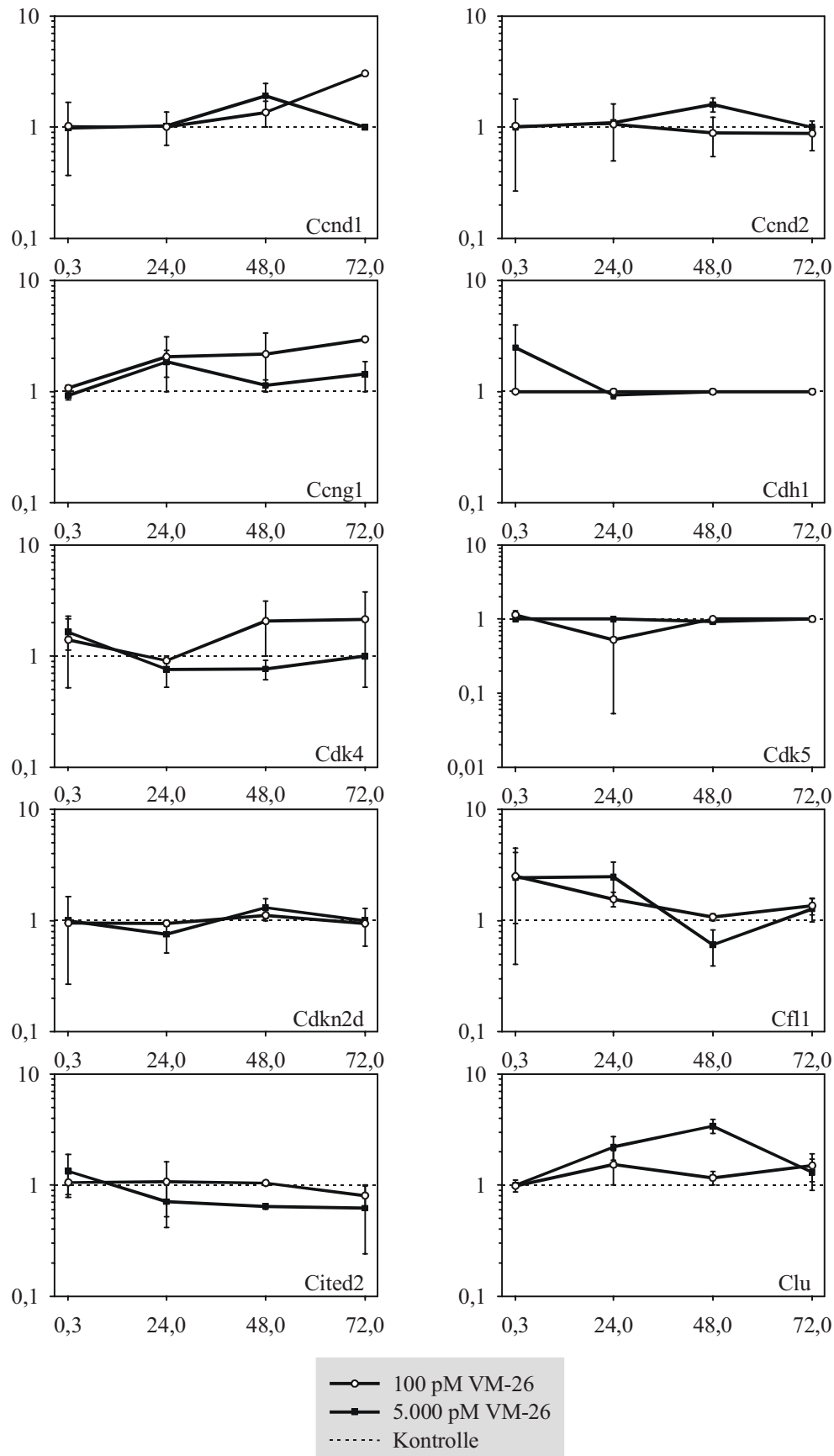


Abb. 37: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

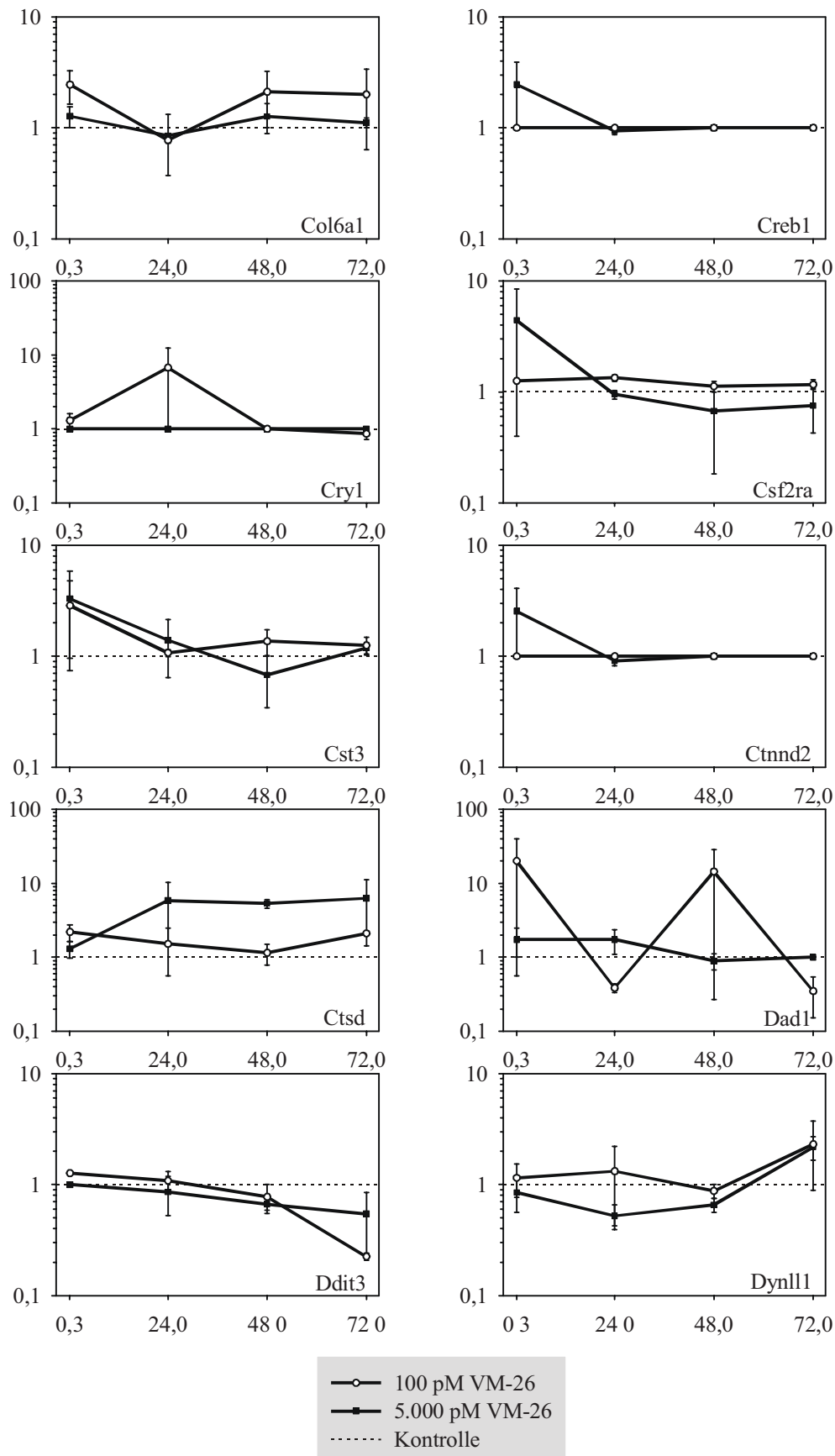


Abb. 38: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

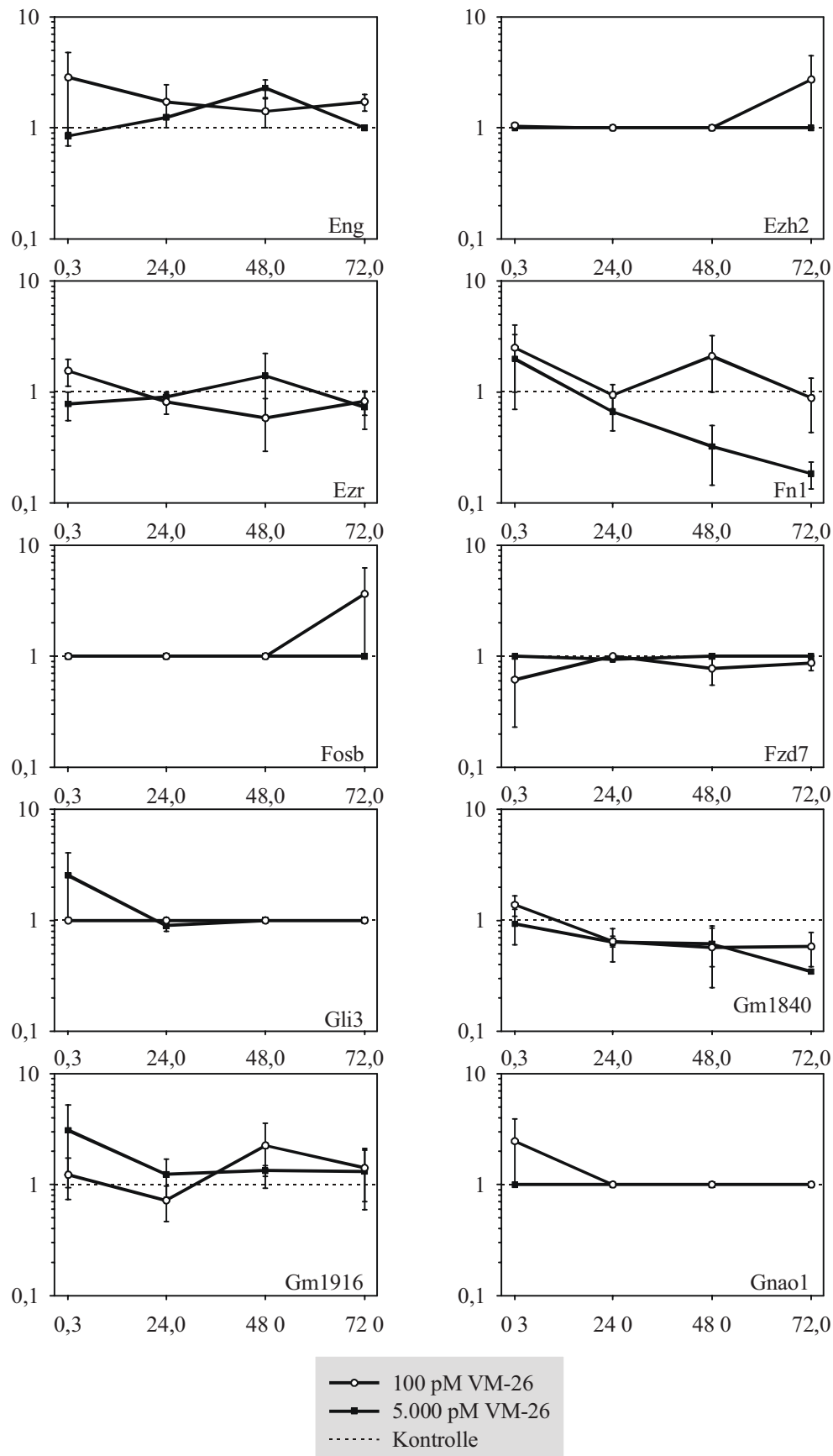


Abb. 39: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

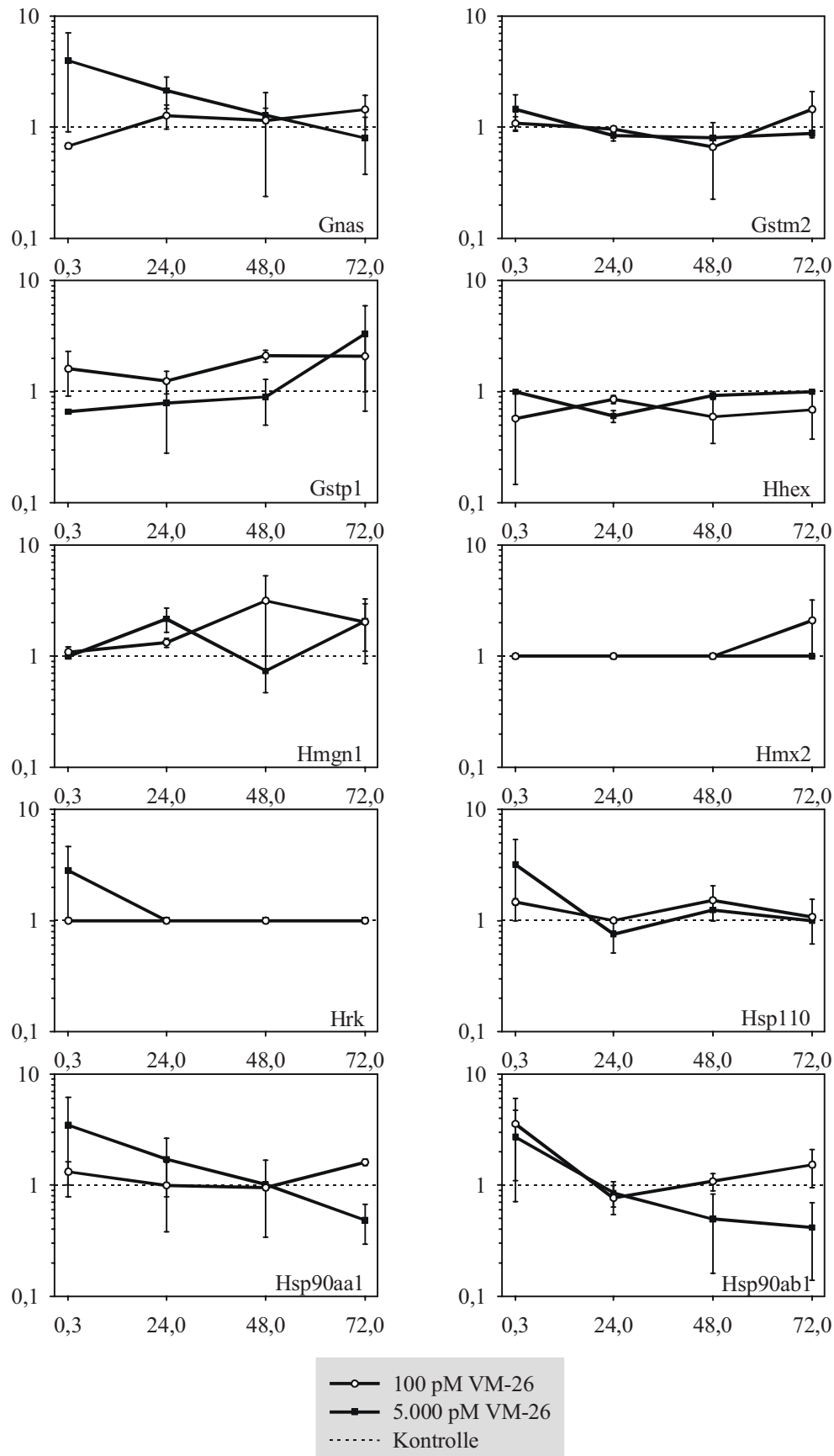


Abb. 40: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

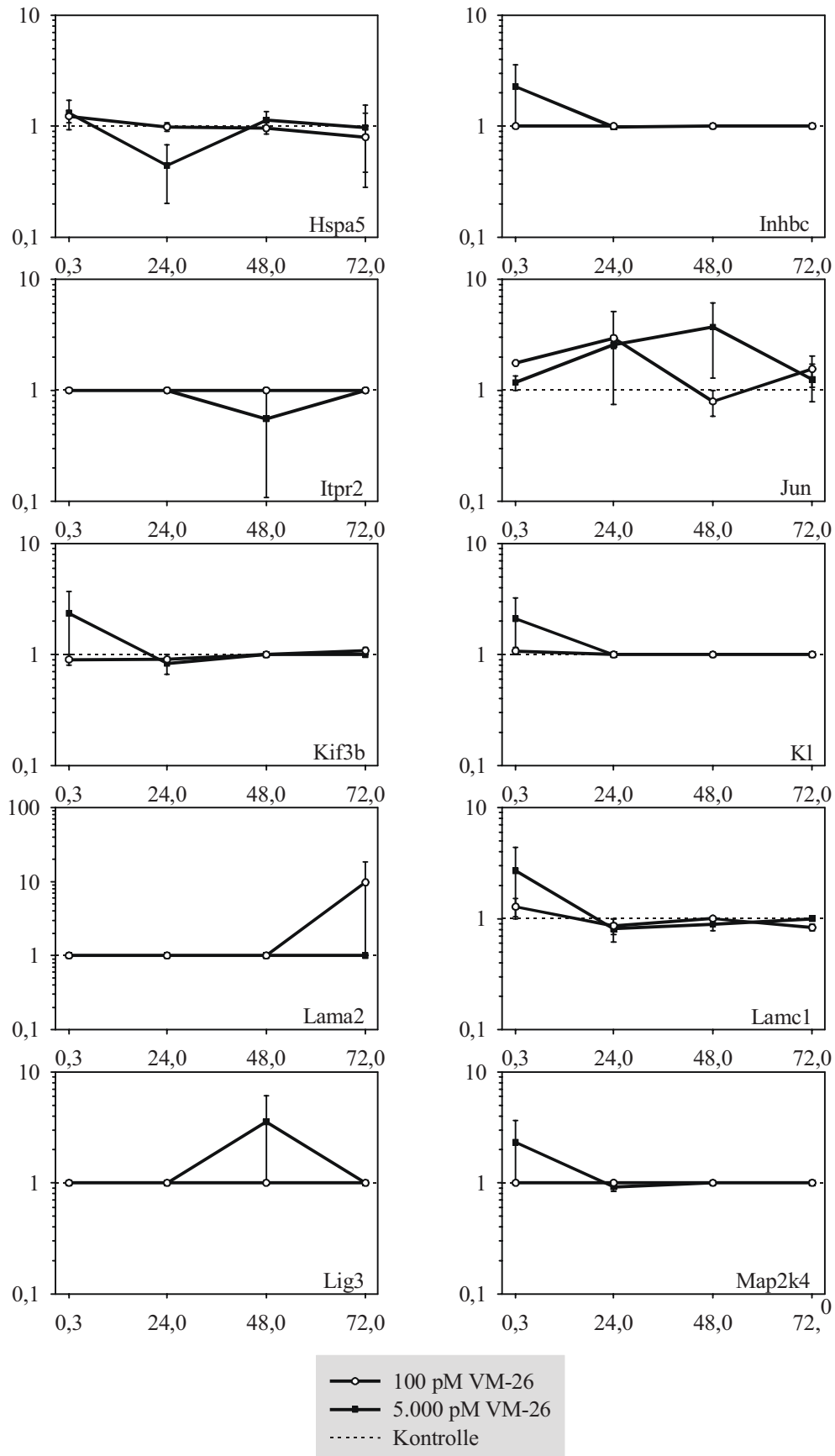


Abb. 41: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

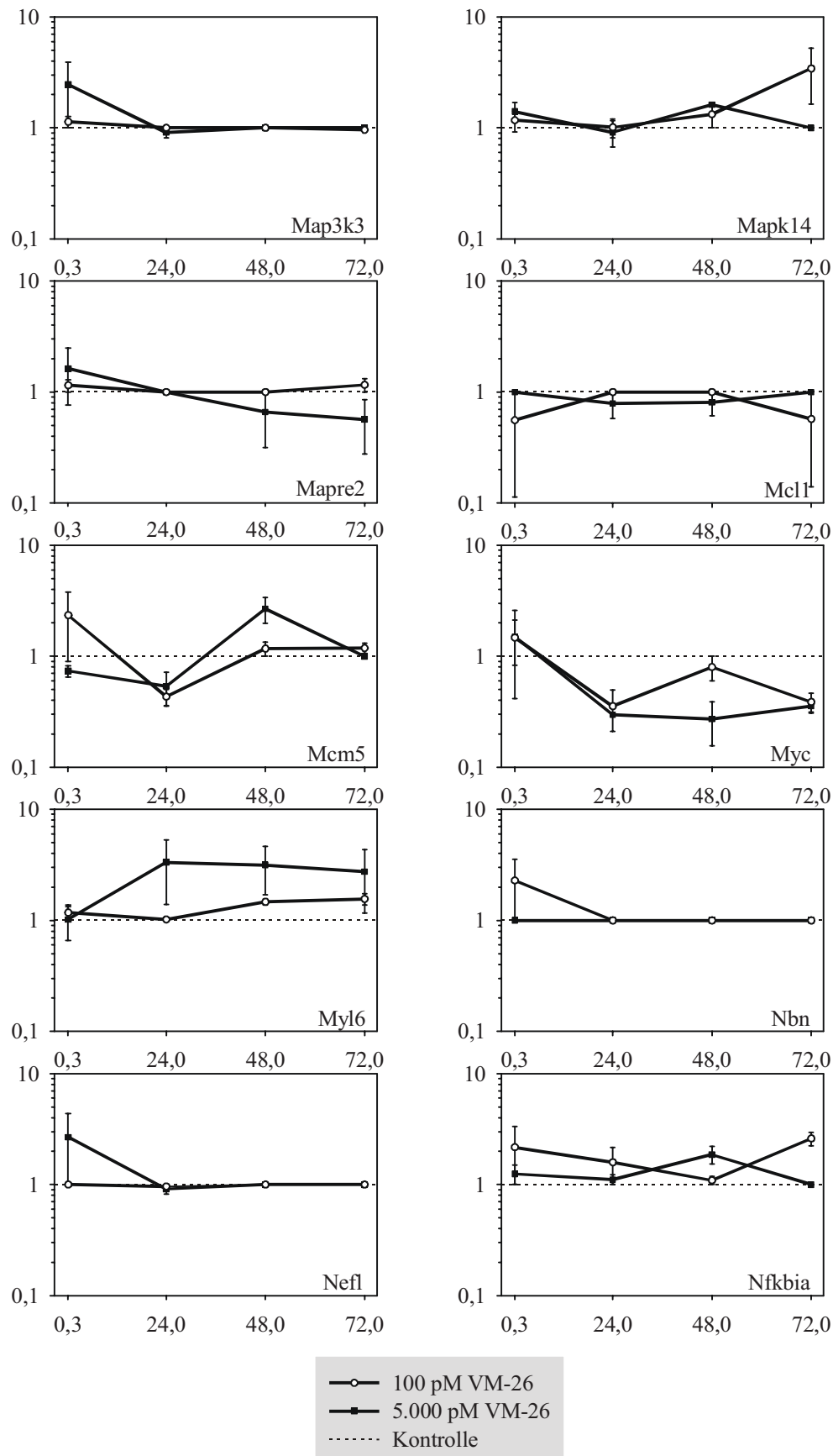


Abb. 42: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

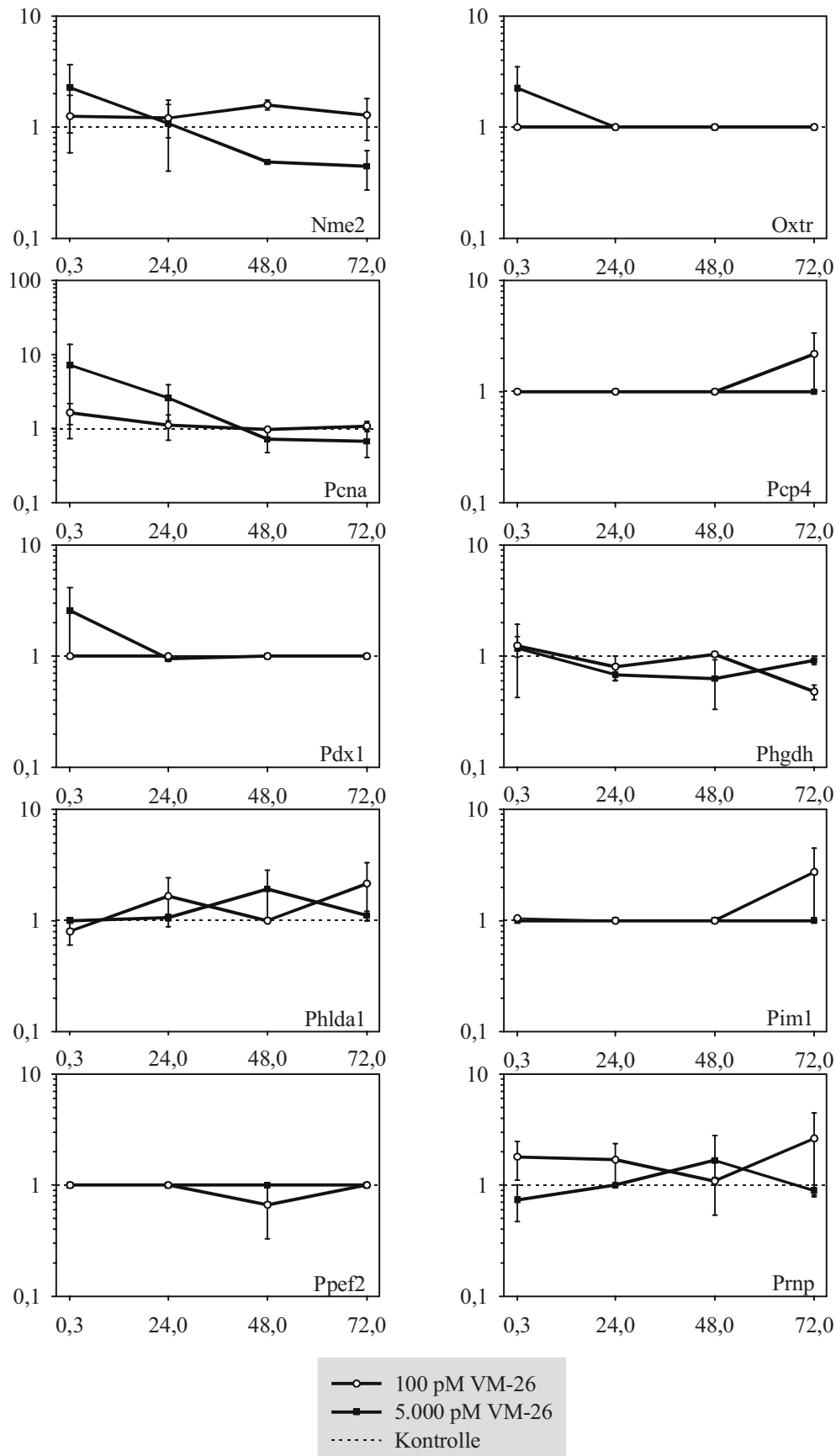


Abb. 43: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

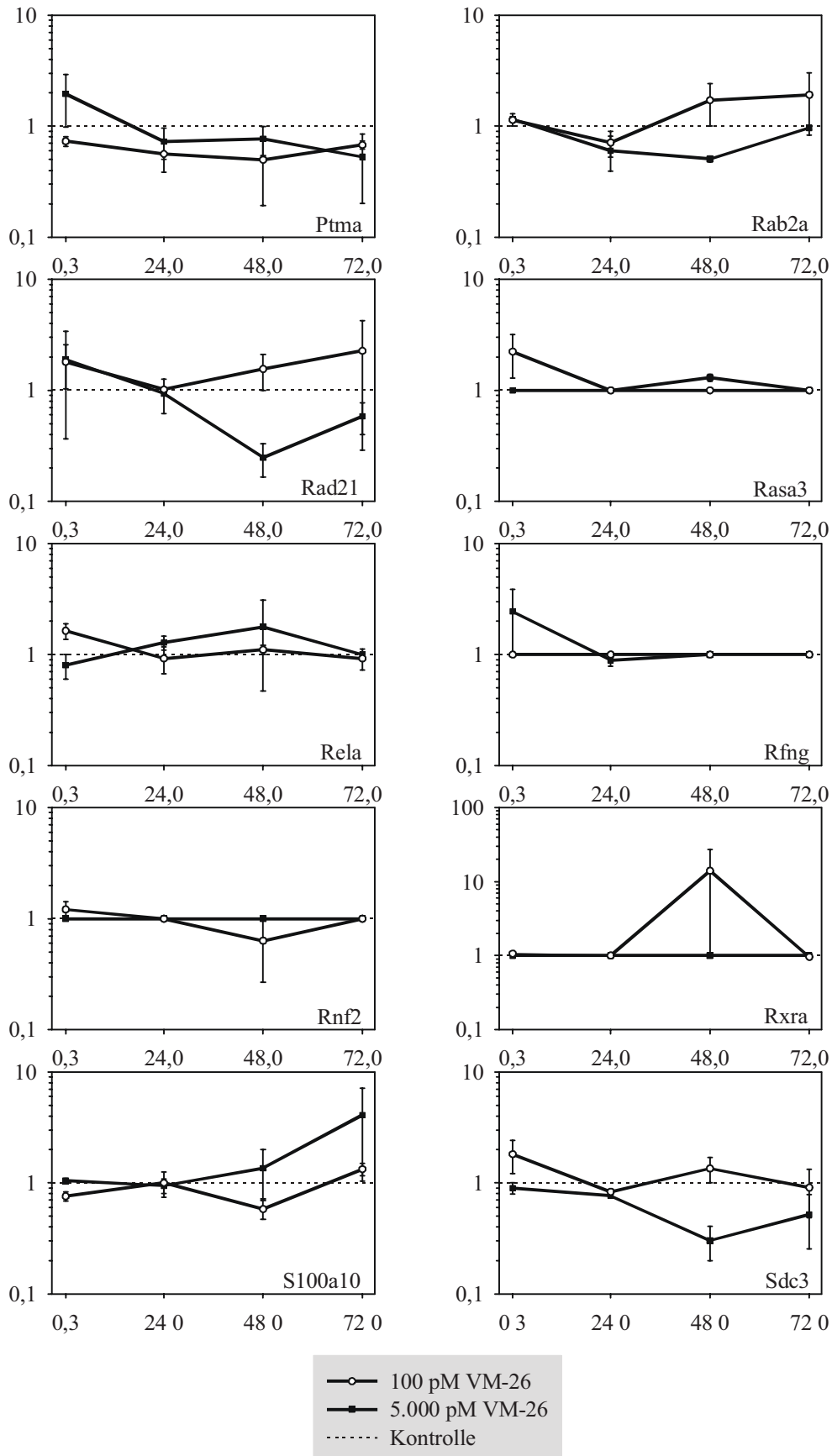


Abb. 44: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

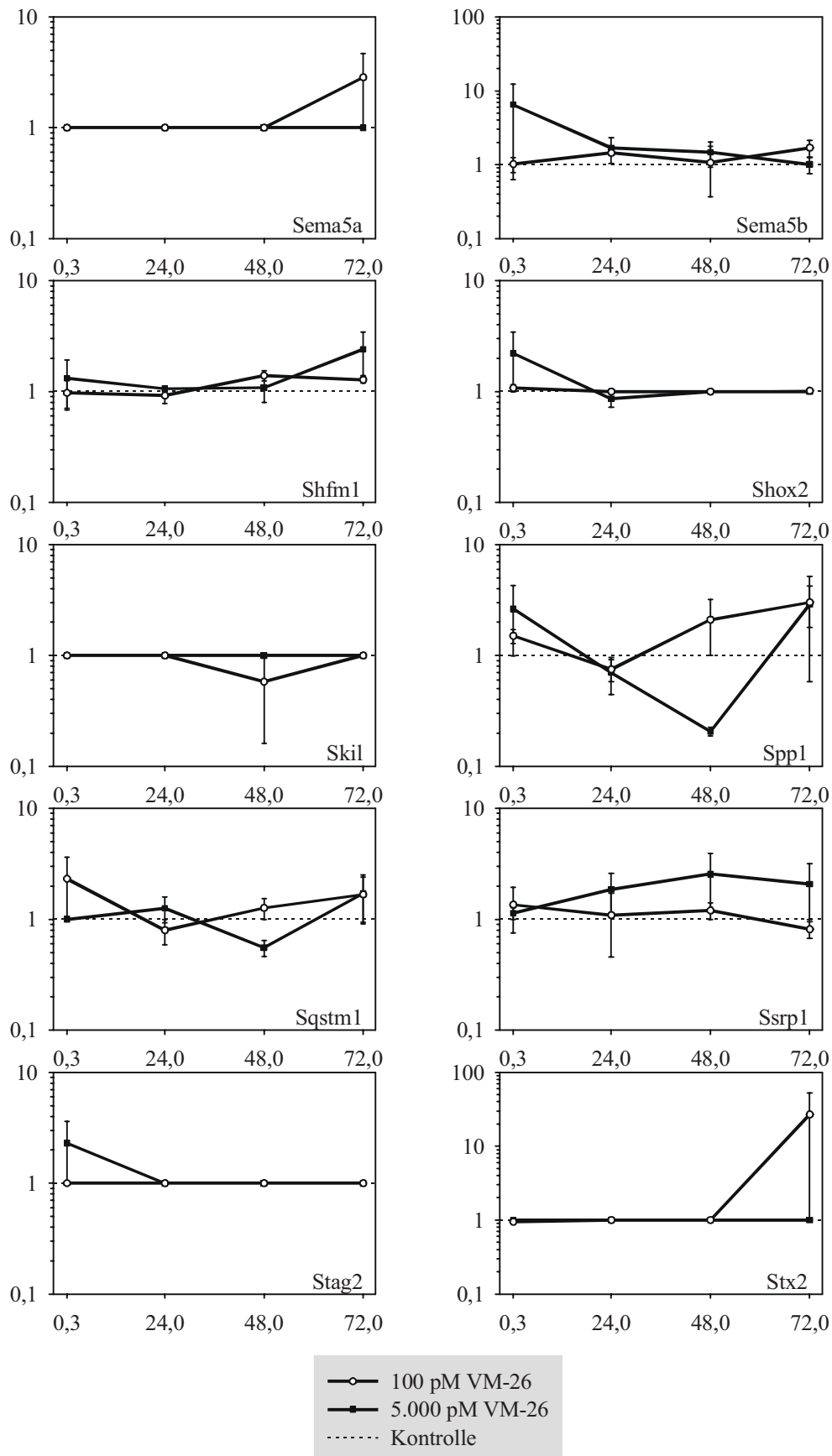


Abb. 45: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

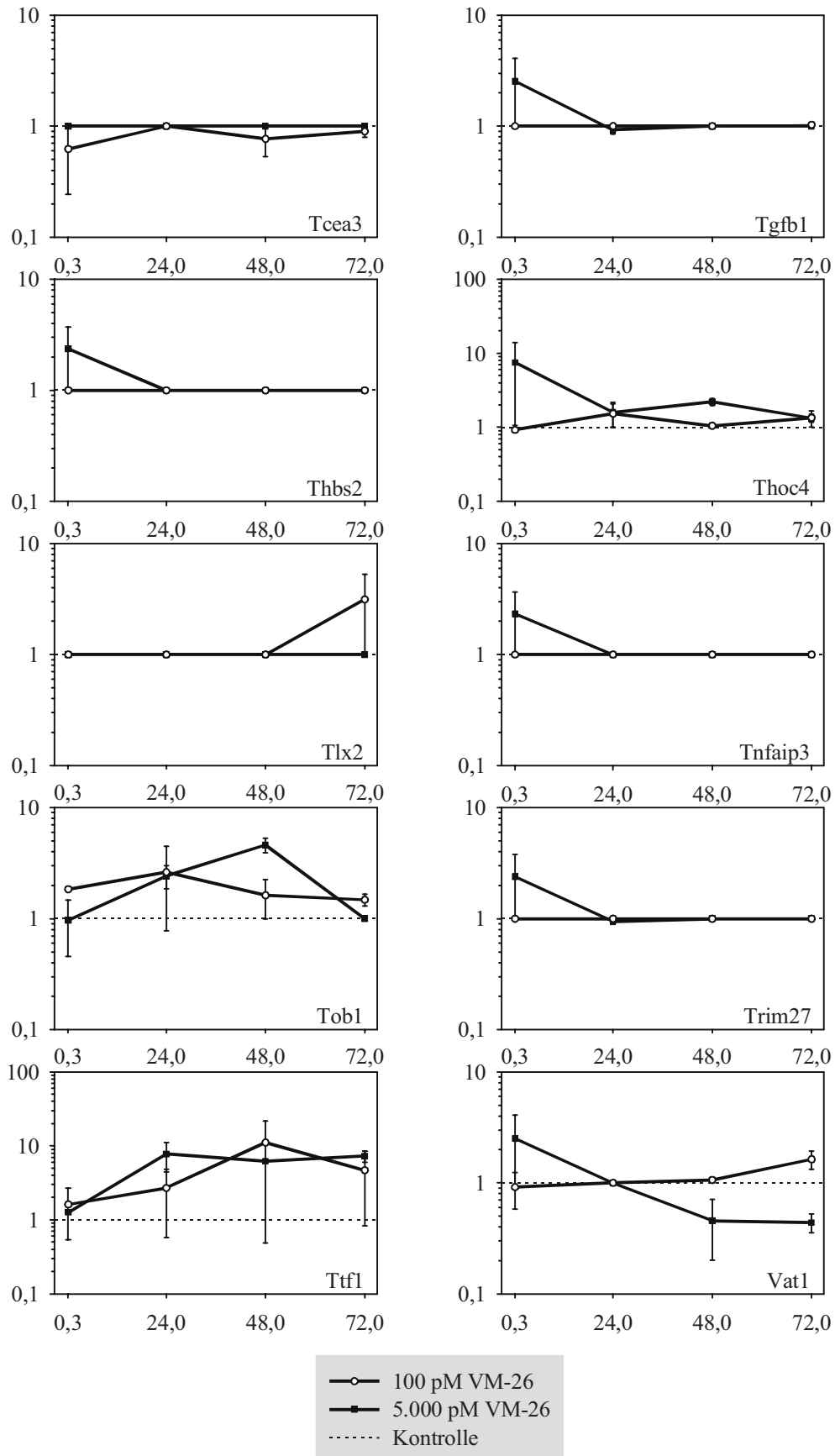


Abb. 46: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

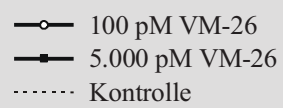
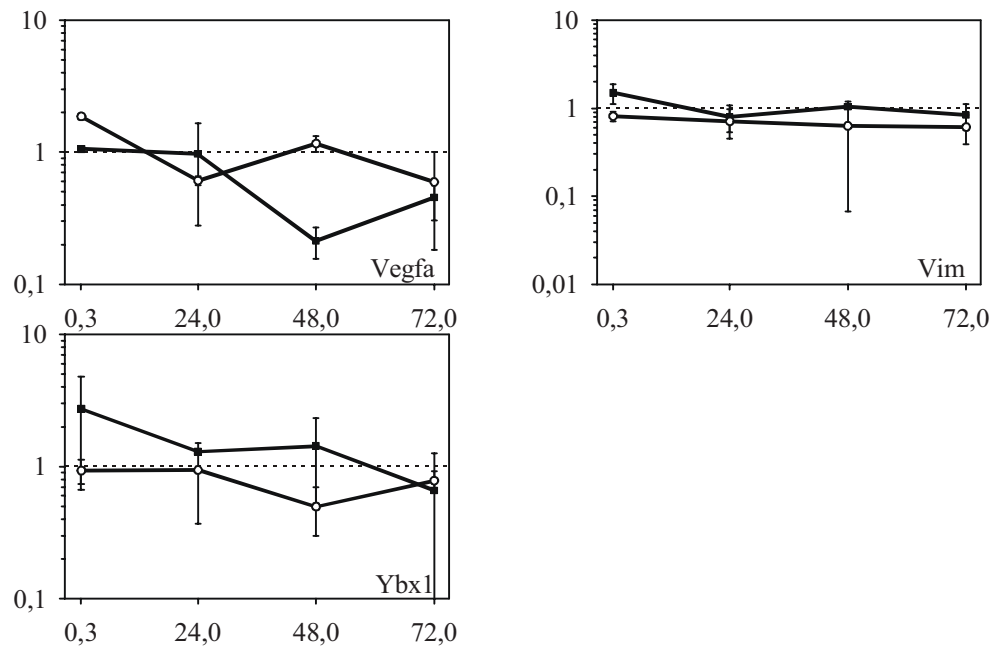


Abb. 47: Ermittelte über- und unterexprimierte Gene alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

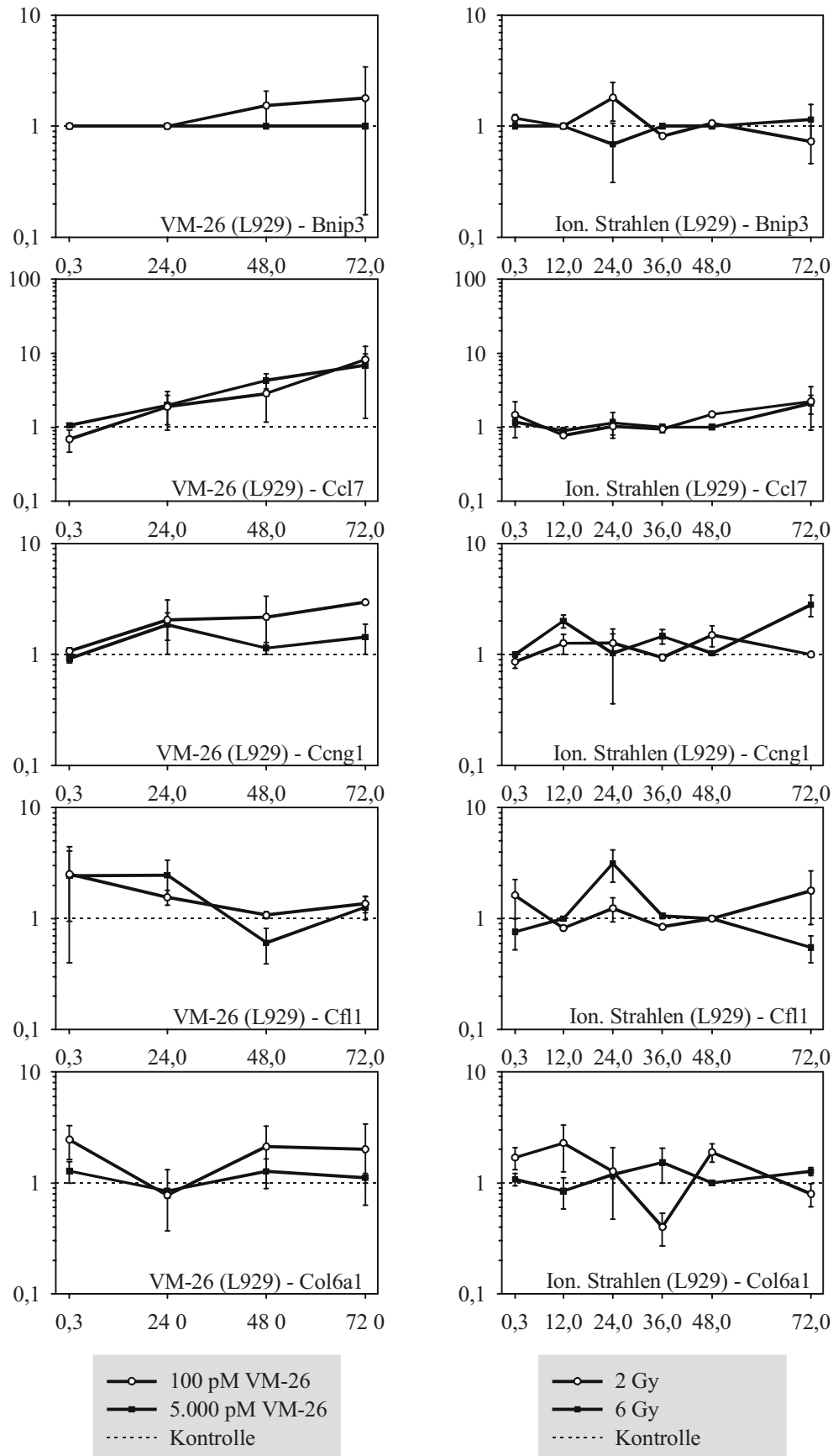


Abb. 48: Ermittelte übereinstimmende Gene nach Exposition von L929 Zellen mit VM-26 bzw. mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

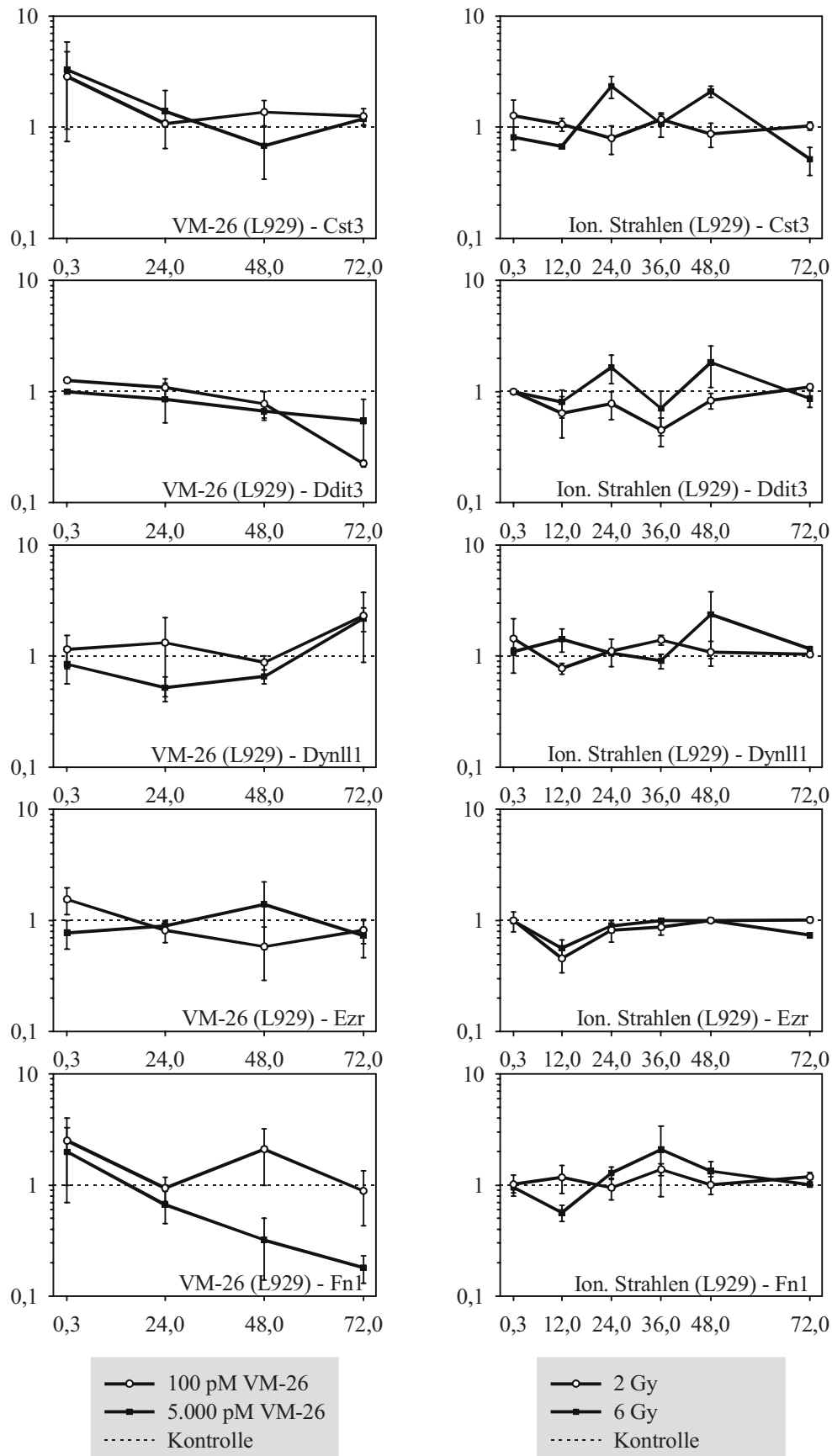


Abb. 49: Ermittelte übereinstimmende Gene nach Exposition von L929 Zellen mit VM-26 bzw. mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

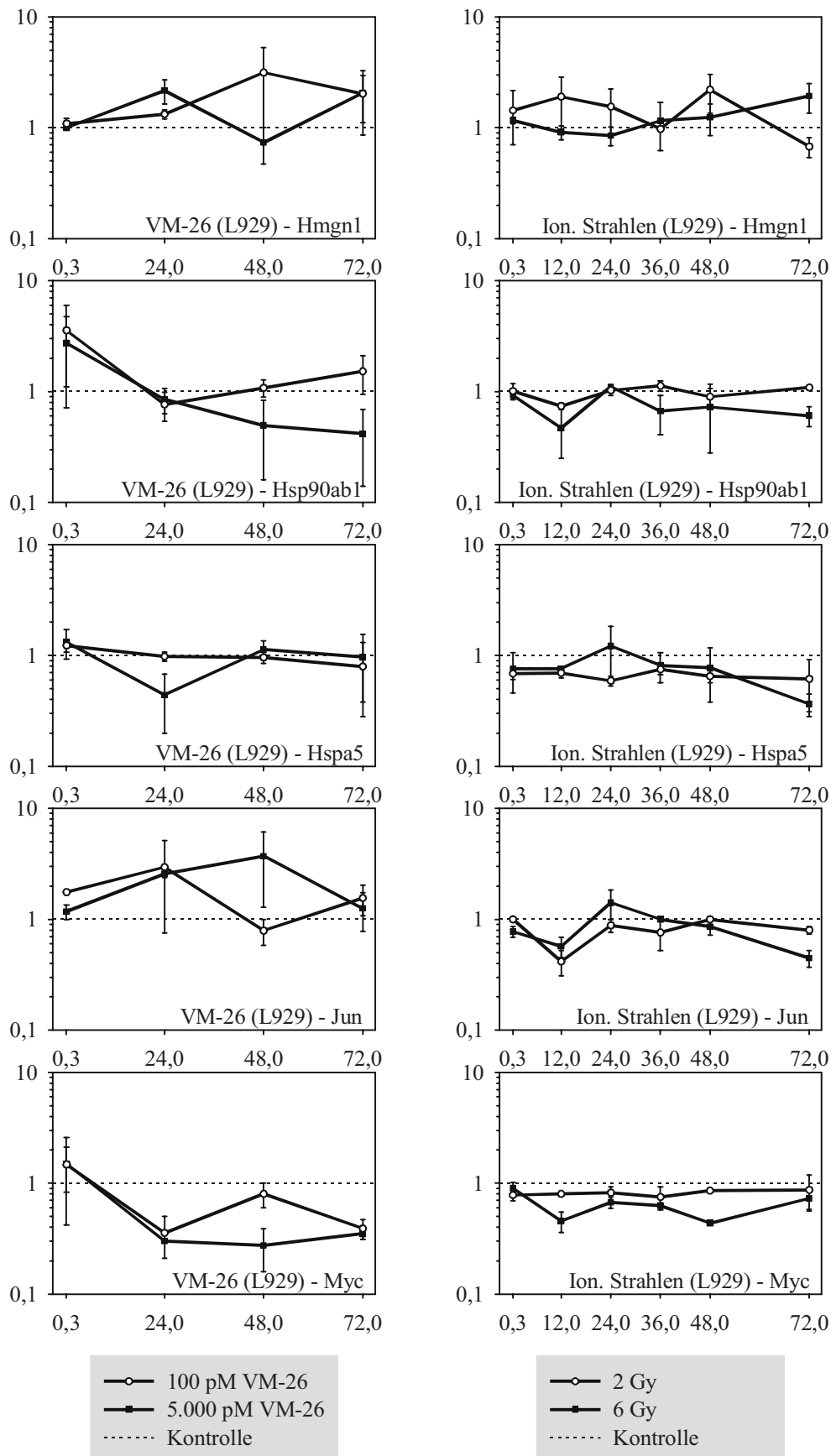


Abb. 50: Ermittelte übereinstimmende Gene nach Exposition von L929 Zellen mit VM-26 bzw. mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

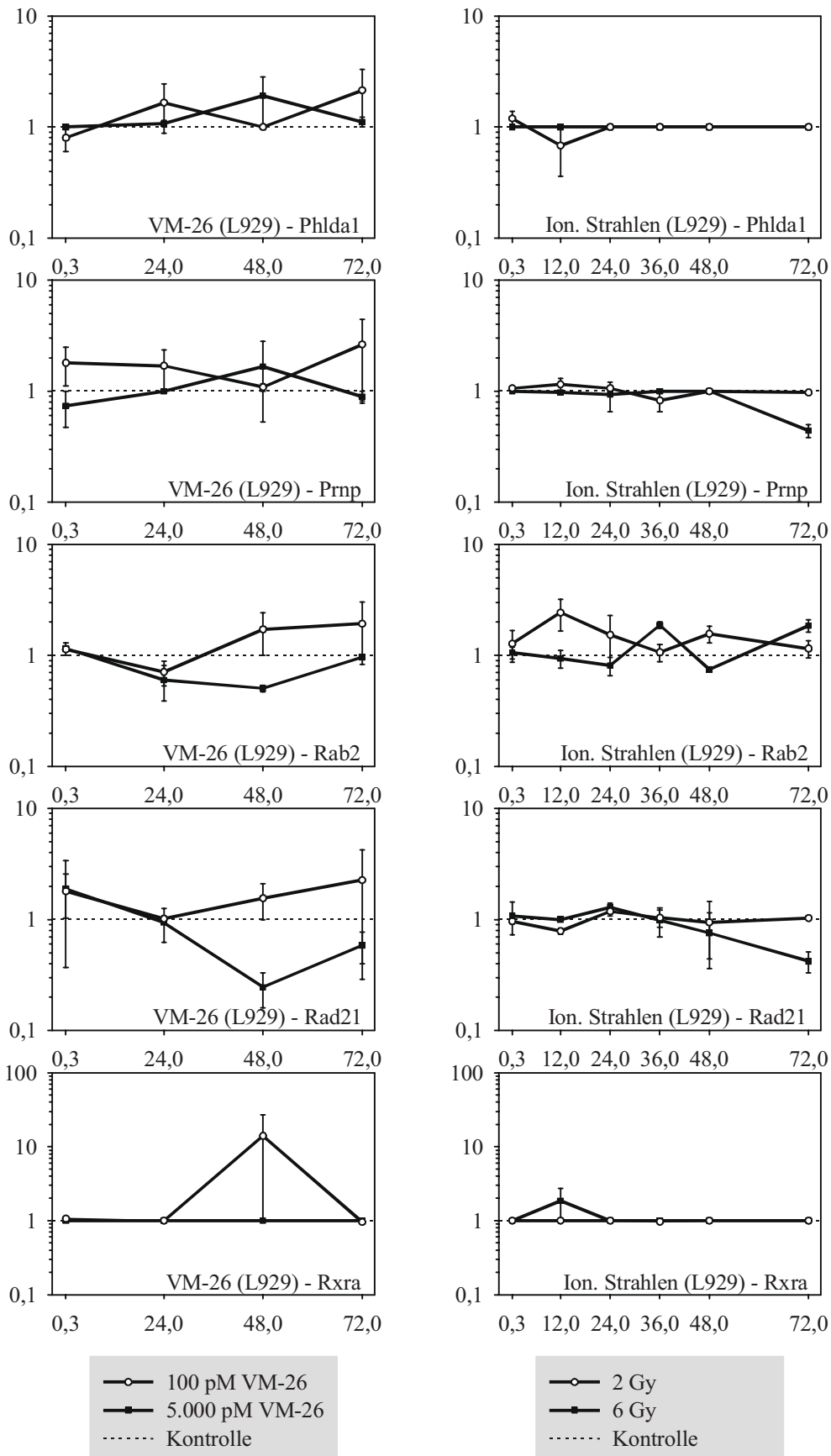


Abb. 51: Ermittelte übereinstimmende Gene nach Exposition von L929 Zellen mit VM-26 bzw. mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

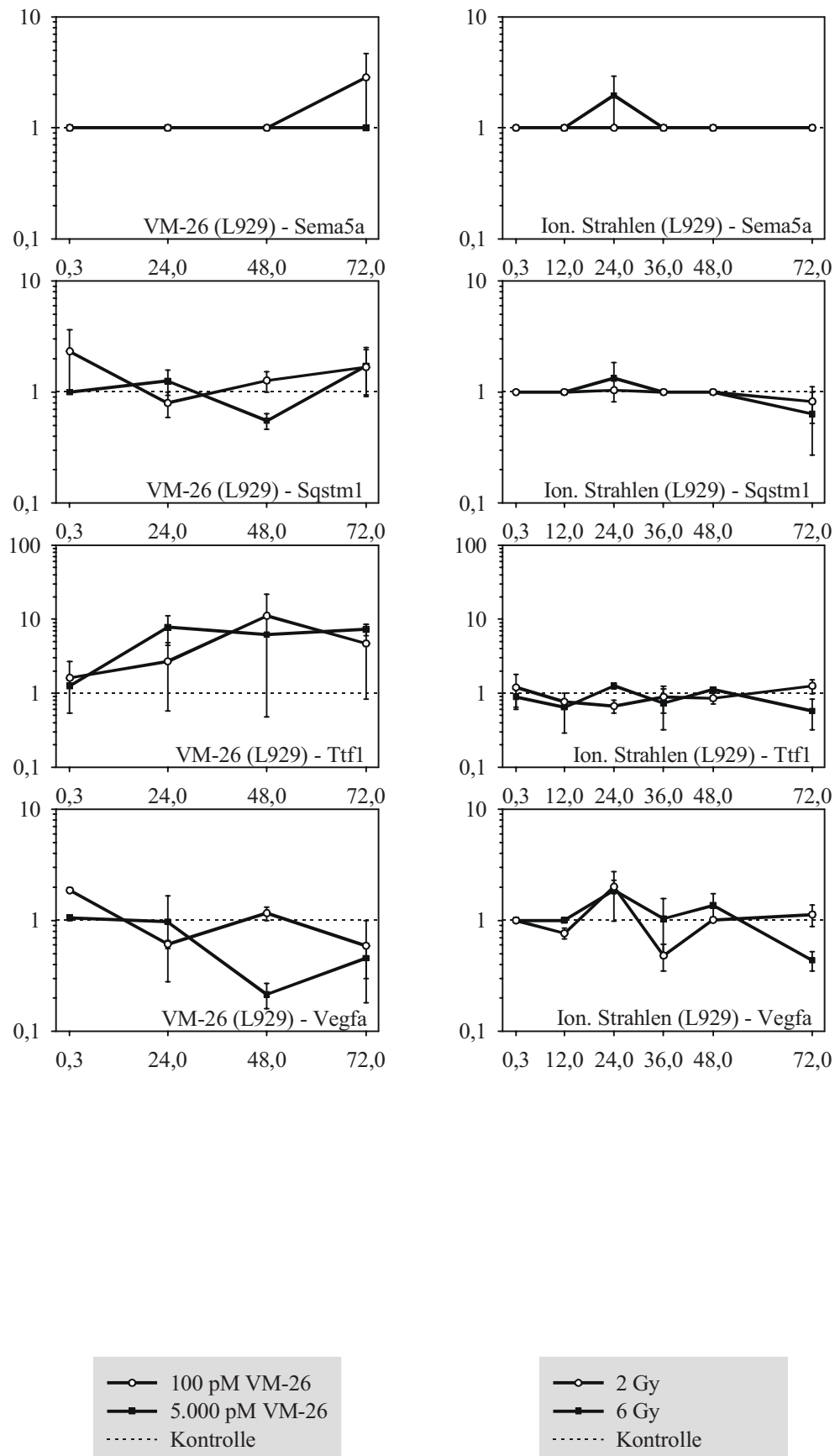


Abb. 52: Ermittelte übereinstimmende Gene nach Exposition von L929 Zellen mit VM-26 bzw. mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

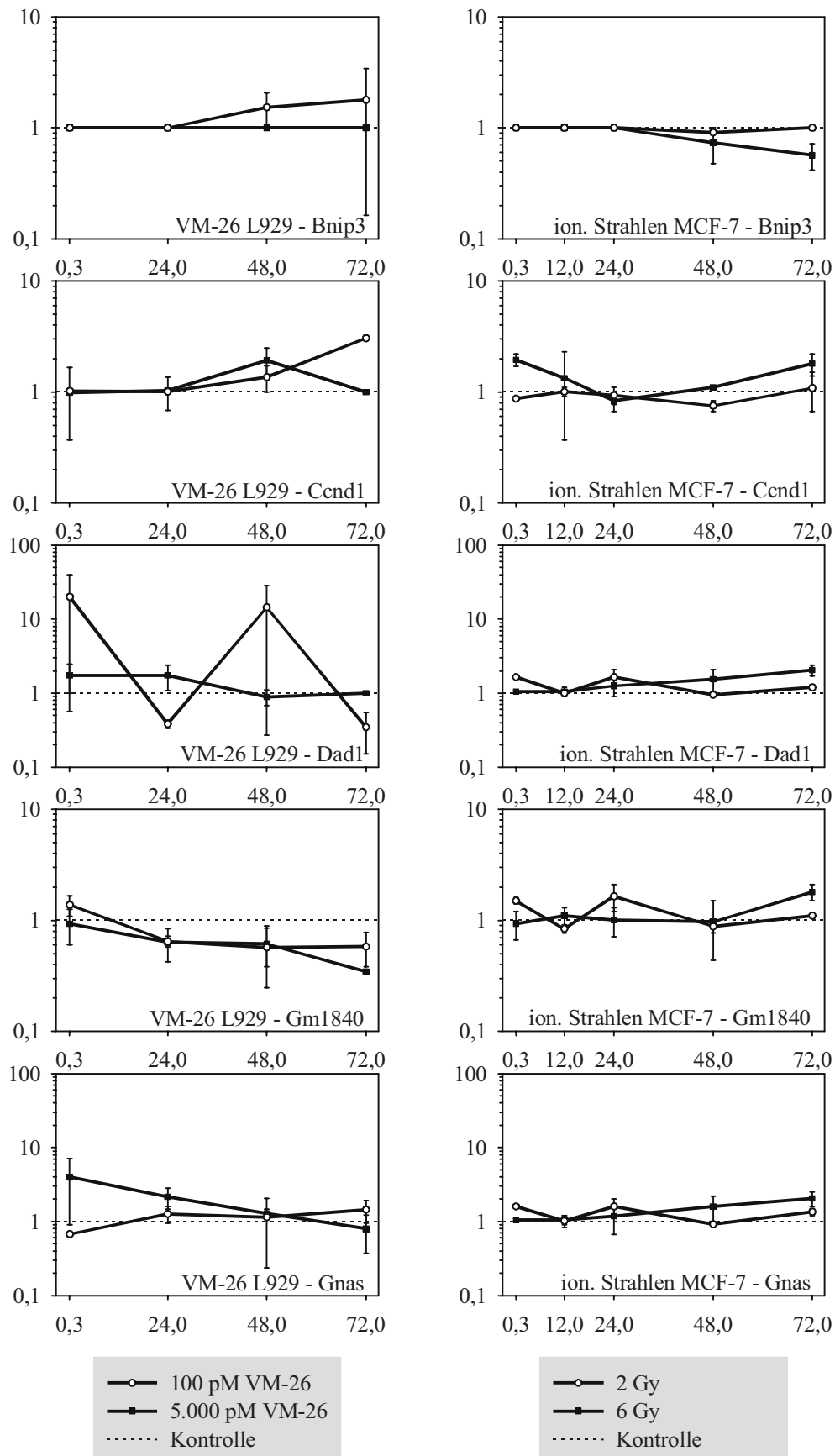


Abb. 53: Ermittelte übereinstimmende Gene von L929 Zellen nach Exposition mit VM-26 und von MCF-7 Zellen nach Exposition mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

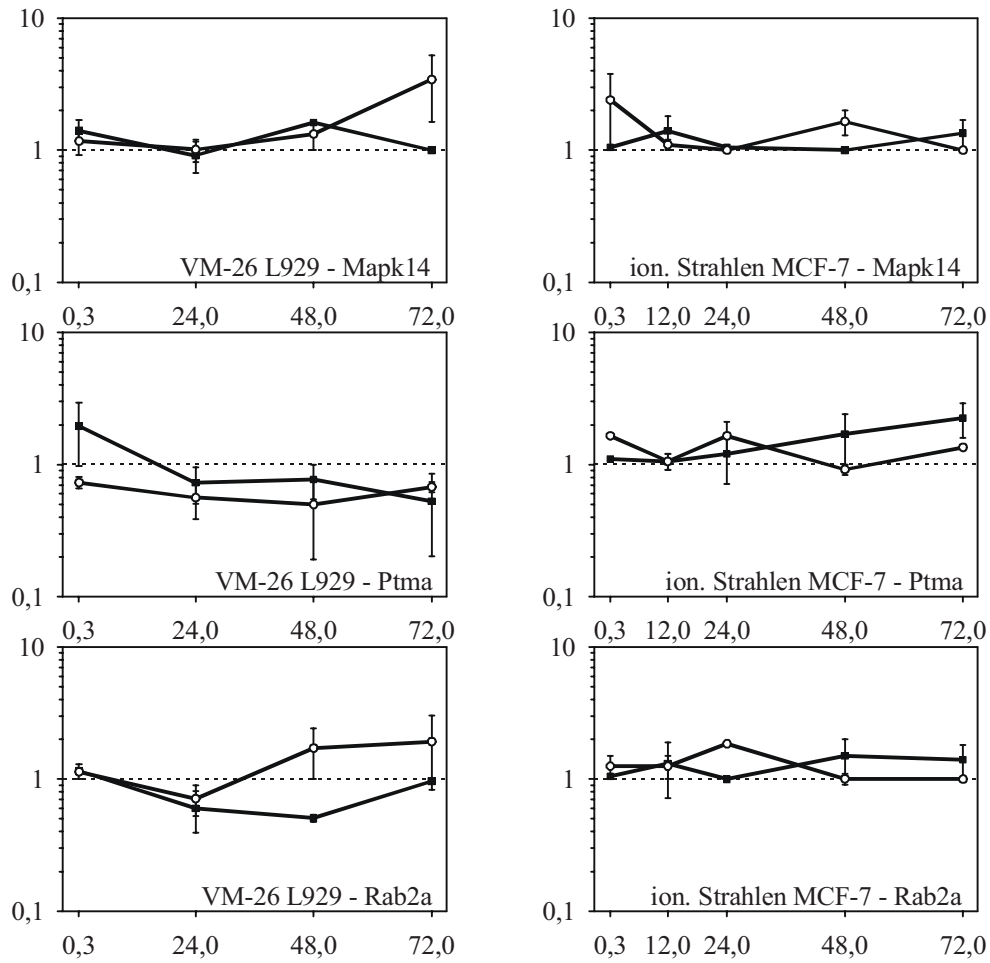


Abb. 54: Ermittelte übereinstimmende Gene von L929 Zellen nach Exposition mit VM-26 und von MCF-7 Zellen nach Exposition mit ionisierenden Strahlen alphabetisch nach ihren offiziellen Kurznamen (NCBI) aufgelistet. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

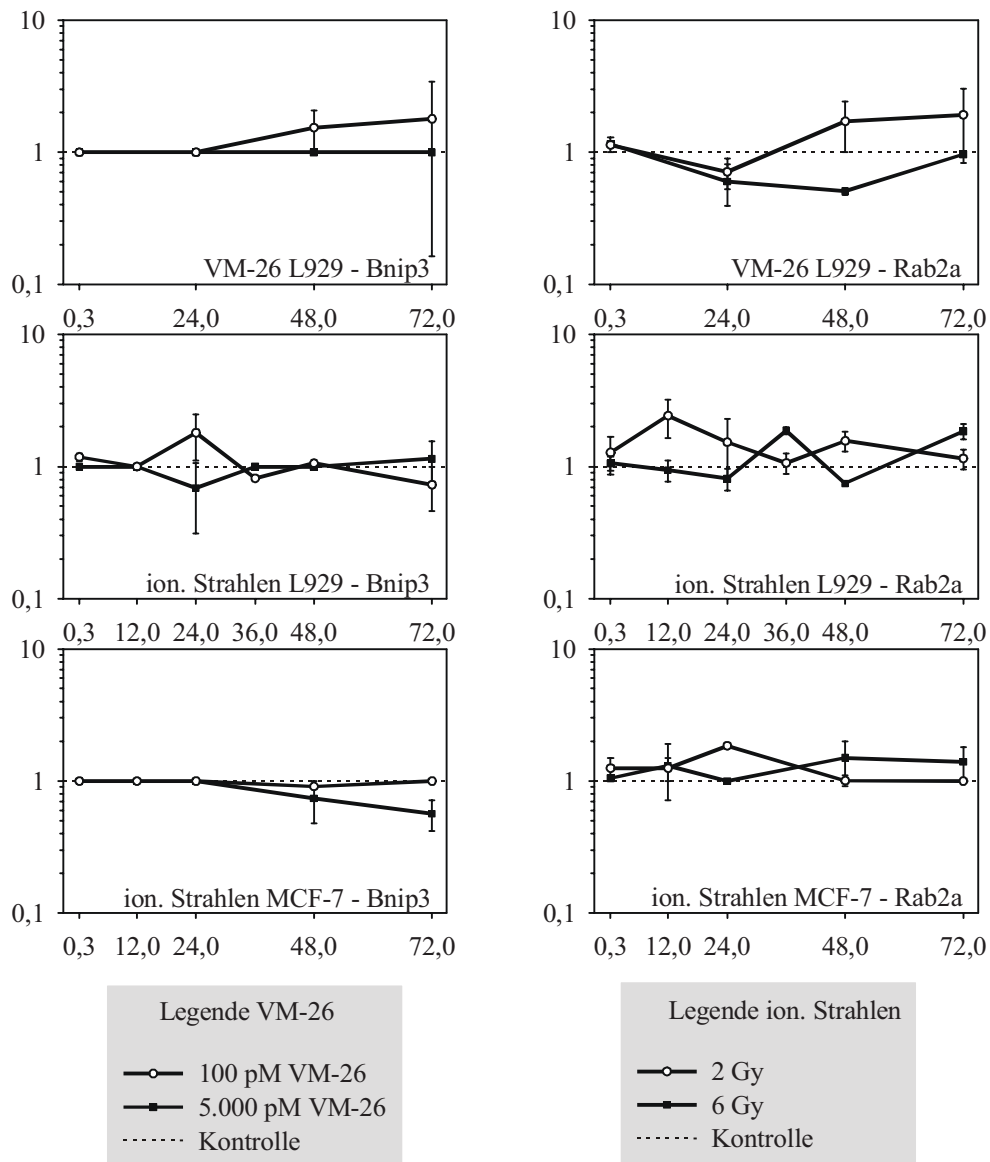


Abb. 55: Die zwei ermittelten übereinstimmenden Gene aus den drei Versuchen: L929 Zellen mit VM-26 exponiert, L929 Zellen mit ionisierenden Strahlen exponiert und MCF-7 Zellen mit ionisierenden Strahlen exponiert. Die Fehlerbalken stellen das Maximum und das Minimum der Ergebnisse der jeweils unabhängig voneinander durchgeführten Versuche dar.

Danksagung

Die Unterstützung vieler weiterer Personen hat es ermöglicht, dass ich diese Arbeit zu Ende bringen konnte. An dieser Stelle darf ich all diesen Menschen meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. M. Molls für die Vertretung der Arbeit an der Technischen Universität München – meiner Alma Mater studiorum.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. van Beuningen, der sich trotz meiner Schwangerschaft dazu bereit erklärt hat mich am Institut für Radiobiologie an der Sanitätsakademie der Bundeswehr aufzunehmen, sowie seinem Nachfolger Herrn PD Dr. V. Meineke für die Bereitstellung der benötigten Materialien.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. M. Abend für die Überlassung des Themas, die ausdauernde Betreuung und engagierte Korrektur der Arbeit. Durch seine kompetente und professionelle Beratung war es mir möglich, trotz der vielen Unterbrechungen und der reichhaltigen Ablenkung, durch meine Kinder, stets ins Thema zurückzufinden und die Arbeit zu Ende zu führen.

In diesem Sinne danke ich auch Herrn Dr. M. Port, der immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte – nicht zuletzt auch durch gewisse familiäre Parallelen. Zudem war er auch eine wertvolle Unterstützung in allen computertechnischen Fragestellungen.

Der Dank gilt natürlich auch allen anderen Mitgliedern des Instituts, insbesondere Dr. T. Staßen und Dr. C. Ruf für das Überlassen der Daten zur vergleichenden Auswertung, Dr. C. Ruf für die Unterstützung bei Layout-Fragen und der Fertigstellung dieser Arbeit sowie Frau I. Nuyken für die geleisteten Vorarbeiten.

Ein ganz besonderer Dank gebührt natürlich meinem Mann, Dr. Andreas Doleschel, der mich stets motiviert und unterstützt hat. Er hat mir immer, wenn es ihm möglich war, den Rücken freigehalten und sich dabei liebevoll um unsere vier Kinder gekümmert. Meinen Kindern Maximilian, Sophie, Valentin, Xaver und Veronika danke ich für die ihren Möglichkeiten entsprechend entgegengebrachte Geduld und ihre bedingungslose Liebe.

Im Weiteren danke ich meinen Eltern Bärbel und Hans-Jürgen Kruse und meinen Schwiegereltern Christa und Herbert Doleschel für ihre liebevolle Unterstützung und aufopfernde Präsenz. Leider konnte mein Schwiegervater das Ende der Arbeit nicht mehr erleben. Danke auch meinem Bruder Oliver Kruse und meinen Schwagern Bernhard und Wolfgang Doleschel mit Familien sowie allen Freunden und Bekannten die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Sylvia Bettina Doleschel geb. Kruse

Geboren in München am 18.12.1970, evangelisch

Verheiratet mit Dr.-Ing. Andreas Thomas Doleschel

5 Kinder: Maximilian Tobias, geboren am 22.01.2003

Sophie Cornelia, geboren am 19.09.2004

Valentin Jakob, geboren am 15.08.2006

Xaver Florian, geboren am 23.02.2008

Veronika Marie, geboren am 25.09.2009

Eltern: Bärbel Kruse, geboren 1944, Systemadministratorin i. R.

Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Kruse, geboren 1937, lfd. Angestellter bei Siemens i. R.

Bruder: Oliver Kruse, geboren 1972, Betriebswirt

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule III, Ottobrunn

1981-1991 Heinrich-Heine-Gymnasium, München

Leistungsfächer: Mathematik und Physik

Facharbeit: Physikalische Grundlagen der Kernspintomographie

Studium 1991-1998, TU München:

1993 Physikum

1994 1. Staatsexamen

1997 2. Staatsexamen

1998 3. Staatsexamen in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie, Orthopädie (Wahlfach)
und Pharmakologie

Famulaturen:

1994 Krankenhaus Neuperlach, Allgemeinchirurgie, Prof. B. Günther

1994 Orthopädische Praxis, München, Dr. W. Koller

1995 Universitätsklinik Grenoble Unfallchirurgie, Prof. D. Saragaglia

1995 Orthopädische Gemeinschaftspraxis Straubing, Dr. H.J. Eichhorn, PD M. Strobel,
Dr. H. Fett, Dr. R. Bertagnoli, Dr. G. Ebner

PJ 1997-1998:

Innere Medizin Uniklinik Bologna, I. Med. Prof. M. Campieri

Chirurgie Klinikum Rechts der Isar, Prof. J.R. Siewert

Orthopädie: Klinikum Rechts der Isar, Prof. R. Gradinger

AIP Juni 1998 - November 1999, Krankenhaus Neuwittelsbach, Dr. H. Hatz:

Approbation 01.12.1999

Weiterbildung zum Allgemeinarzt und zur Zusatzbezeichnung Naturheilverfahren:

Dezember 1999 - November 2000: Praxis Dr. S. Cejnar (Chirurgie), München,

Dezember 2000 - November 2001: Praxis Dr. G. Schmidt (Allgemeinmedizin), München

März - Juni 2002: Praxis Dr. I. Klofat, München

Facharztprüfung (Allgemeinmedizin): 15.05.2002

Beginn der Promotion am Institut für Radiobiologie (Leiter: PD Dr. V. Meineke) an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München im August 2002

Rigorosum am 06.05.2010

Zusatzbezeichnungen:

Sportmedizin 23.04.2004

Akupunktur 11.04.2005

Naturheilverfahren 09.01.2006

Chirotherapie 11.06.2008

Weitere/aktuelle ärztliche Tätigkeiten und Vertretungen:

Mitarbeit beim Privatärztlichen Akutdienst Mai 2002 bis Januar 2004

Praxis Dr. S. Cejnar, München: Dezember 2001 - Februar 2002

Praxis Dr. I. Klofat, München: Juli 2002

Praxis Dr. G. Schmidt, München: August 2002 und September – Oktober 2002

Praxis Dr. T. Aulinger, Dr. P. Lenhart, München: August, September und November 2002

Praxis Dr. C. Kalb, Aying: Oktober 2003 – September 2008

Praxis Dr. M. Schmid-Wimmer, Bad Aibling: November 2006 – Dezember 2007

Praxis Dr. B. Hierl, Westerham: seit April 2007

Praxis Dr. H. Streibl, Holzkirchen: seit Dezember 2008