Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

JÜLICH
FORSCHUNGSZENTRUM

# SCHLUSSBERICHT

BMBF-Forschungsvorhaben
Förderkennzeichen: 02NUK005A

Verbundvorhaben

**Biodosimetrie:**
**Ein systembiologischer Ansatz für die Strahlenbiodosimetrie und die Analyse der individuellen Strahlensensitivität**

Teilvorhaben A

„Identifizierung charakteristischer Genexpressionsmuster zum Zwecke der biologischen Dosimetrie“

Forschungszentrum Jülich GmbH
Geschäftsbereich Sicherheit und Strahlenschutz
52425 Jülich

Projektleiter und Autor:
Dr. Ralf Kriehuber

Laufzeit des Vorhabens:
01.05.2008 – 31.12.2014

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02NUK005A gefördert.
Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor

# I Kurzdarstellung

## 1. Aufgabenstellung

Um den Menschen adäquat vor den negativen Wirkungen ionisierender Strahlung bestmöglich zu schützen und bei unabsichtlicher Strahlenexposition angemessene Gegenmaßnahmen zu ergreifen sowie das individuelle Strahlenrisiko besser einschätzen zu können, ist es notwendig,

**a. Methoden zu entwickeln, mit denen die individuelle Strahlendosis zuverlässig und präzise anhand von biologischem Material bestimmt werden kann,**

**b. Marker zu identifizieren und zu untersuchen, mit denen die individuelle Strahlenempfindlichkeit abgeschätzt werden kann,**

**c. die molekularen Komponenten und ihre Wechselwirkungen zu untersuchen, um zu einem besseren Verständnis der zellulären Grundlagen für die individuelle zelluläre Strahlensensitivität zu gelangen.**

Die vorgenannten Punkte wurden, koordiniert durch das Forschungszentrum Jülich, im Verbundprojekt „Biodosimetrie: Ein systembiologischer Ansatz für die Strahlenbiodosimetrie und die Analyse der individuellen Strahlensensitivität“ von einem Konsortium aus mehreren in diesem Forschungsgebiet tätigen Instituten und Arbeitsgruppen bearbeitet.

Im Teilprojekt 02NUK005A wurden dabei die Gen- und Proteinexpression in primären humanen Zellen und humanen Zelllinien mit dem Ziel hin untersucht und analysiert, Gen- und Proteinexpressionsmuster zu identifizieren, die es zum einen erlauben, die Dosis einer vorausgegangenen Strahlenexposition schnell und zuverlässig abzuschätzen und zum anderen ermöglichen soll, Aussagen über die Strahlenqualität zu treffen.

Die Beschreibung und das Verständnis der Interaktion der beteiligten Signaltransduktionswege sollte zudem erlauben, Schlüsselgene zu identifizieren, die eine zeitlich lang andauernde oder verzögert auftretende strahlendosis- und/oder strahlenqualitätsabhängige Expressionsänderung oder Aktivierungsänderung ihrer Genprodukte aufweisen. Dies soll zu einem besseren Verständnis der molekularbiologischen Grundlagen der zellulären Strahlenwirkung beitragen. Ein spezielles Interesse galt hier den Auger-Elektronen, deren biologische Wirkung bislang nicht adäquat in einem Qualitätsfaktor abgebildet ist, da die biologischen Wirkmechanismen weitgehend unverstanden und zudem konventionelle Dosimetriekonzepte nicht anwendbar sind. Die vergleichenden Untersuchungen verschiedener Strahlenqualitäten hinsichtlich der Veränderungen der Genexpression sollten somit auch zu einem besseren Verständnis der biologischen Wirkung von Auger-Elektronen-Emittern (AEE) führen.

## 2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Höhe einer individuellen Strahlenexposition ist nicht immer bekannt und dosimetrisch einfach zu erfassen. Bei einer unvorhergesehenen Strahlenexposition müssen deshalb Verfahren bereitstehen, die es ermöglichen, die Strahlendosis retrospektiv schnell und zuverlässig zu bestimmen, um ggf. notwendige medizinische Behandlungen unmittelbar einzuleiten. Die hierbei ermittelten individuellen Dosiswerte dienen zudem als Grundlage für die Abschätzung von zukünftigen Gesundheitsrisiken, die mit der Strahlenexposition in Verbindung stehen.

Hierbei sind Verfahren wünschenswert, die robust, automatisierbar und kostengünstig sind und die Untersuchung einer großen Vielzahl von Proben in sehr kurzer Zeit erlauben, insbesondere in Anbetracht einer denkbaren Freisetzung von Strahlung aufgrund eines großen Nuklearunfalls oder eines terroristischen Aktes. Verfahren, die infolge von distinkten Merkmalen im Zellmaterial die Bestrahlungshöhe und/oder gar die Strahlenqualität anzeigen, bieten gegenüber Verfahren, die auf unbelebter Materie beruhen, den überragenden Vorteil, dass sie nicht die nominale physikalische Dosis ermitteln, sondern die individuelle physiologische Reaktion abbilden, die aufgrund der individuellen Strahlenempfindlichkeit, bei gleicher physikalischer Dosis, sehr unterschiedlich sein kann.

Da die derzeit verwendeten biodosimetrischen Methoden sehr zeitintensiv sind, für die Auswertung meist hochqualifiziertes Personal benötigt wird und diese für die Einschätzung geringer und hoher Strahlendosen, insbesondere bei einer großen Anzahl von Proben, wenig geeignet sind, besteht dringender Bedarf in der Entwicklung zusätzlicher biodosimetrischer Verfahren.

Ein vielversprechender Ansatz für eine schnelle und zuverlässige Bestimmung der Strahlendosis sind dabei Hochdurchsatzverfahren, durch die zeit- und dosisabhängige Genexpressionsprofile für biodosimetrische Applikationen detektiert werden können. Die zeit- und dosisabhängigen Genexpressionsänderungen resultieren hierbei daraus, dass durch ionisierende Strahlung Änderungen in der Genexpression induziert werden. Diese Änderungen beruhen weitgehend auf den durch die Einwirkung ionisierender Strahlung hervorgerufenen DNA-Schäden, die über Genexpressionsänderungen die Aktivierung der DNA-Reparatur-Maschinerie, des Zellzyklusarrests und/oder Apoptose einleiten.

Die Komplexität der Analyse genomweiter Genexpressionsdaten bedingt jedoch die Implementierung systembiologischer und bioinformatischer Ansätze. Zugleich erscheinen diese Methoden geeignet ggf. auch verschiedene Strahlenqualitäten zu diskriminieren, was wünschenswert im Falle einer Inkorporation von verschiedenen Radionukliden (Alpha-Strahler, Auger-Elektronen-Emitter etc.) ist.

Für die dosimetrische Bewertung sind tiefgreifende Erkenntnisse über die biologische Wirksamkeit von Radionukliden, die Partikel mit kurzer Reichweite emittieren, von großer Wichtigkeit. Hierbei sind neben den Alpha-Emittern vor allem Auger-Elektronen-Emitter (AEE) zu nennen. Sie zeigen unter bestimmten Expositionsbedingungen biologische Wirkungen, wie sie nur für Hoch-LET-Strahlung charakteristisch sind. AEE werden jedoch in der klassischen Dosimetrie und im Strahlenschutz wie Elektronen und daher wie Niedrig-LET-Strahlung behandelt, d.h. AEE besitzen keinen eigenen Strahlenqualitätsfaktor. Zur biologischen Wirksamkeit von AEE liegen immer noch unzureichende Erkenntnisse vor, so dass hier zusätzliche Untersuchungen notwendig sind, um die Frage nach einem separaten Strahlenqualitätsfaktor zu beantworten.

In der deutschen Strahlenforschung war zu Beginn des Forschungsprogrammes ein andauernder Mangel an Zustrom junger Wissenschaftler festzustellen, der zu einer beginnenden Überalterung und zum Verlust der Kompetenz in diesem Forschungsgebiet führte. Durch innovative Forschungsansätze sollte daher die Attraktivität für die Strahlen- und Strahlenschutzforschung in Deutschland gesteigert werden.

Aufgrund der dargelegten Problemstellung, die auch Niederschlag in den vom BMBF formulierten Forschungsschwerpunkten im FuE-Programm „Nukleare Sicherheits- und Entsor-

gungsforschung zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses und zum Kompetenzerhalt“ fand, hat sich ein interdisziplinärer Forschungsverbund gebildet. Dieser hat es sich zur Aufgabe gemacht, mittels systembiologischer und bioinformatischer Ansätze, charakteristische Gen- und Proteinexpressionsmuster zum Zwecke der biologischen Dosimetrie zu identifizieren und Marker für die individuelle Strahlenempfindlichkeit zu detektieren, sowie die molekularen Grundlagen der zellulären Strahlensensitivität zu untersuchen.

Dem Forschungsverbund im Verbundvorhaben 02NUK005 angehörig waren Prof. G. Iliakis (Universität Duisburg-Essen), Prof. M. Stuschke (Universitätsklinikum Essen), Prof. E. Dikomey (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) und Prof. O. Wolkenhauer (Universität Rostock).

Die am Forschungszentrum Jülich verankerte Arbeitsgruppe Strahlenbiologie hat seit 2004, noch unter Leitung von Dr. F. Schneeweiss, wertvolle Vorarbeiten zu strahlenbedingten Genexpressionsänderungen geleistet. Diese Forschungsarbeiten wurde durch seinen Nachfolger Dr. R. Kriehuber weitergeführt und intensiviert. Die Arbeitsgruppe verfügt über weitreichende Expertise in der Zell- und Molekularbiologie und in der Untersuchung und Bewertung von gen- und zytotoxischen Noxen, wobei die biologische Wirkung und Wirksamkeit von Auger Elektronen ein langjähriger Forschungsschwerpunkt ist.

## 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Verbundprojekt „02NUK005 - Biodosimetrie: Ein systembiologischer Ansatz für die Strahlenbiodosimetrie und die Analyse der individuellen Strahlensensitivität“ wurde vom Forschungszentrum Jülich koordiniert.

Die übergeordneten Aufgaben des Gesamtvorhabens wie z.B. die Abstimmung und Vernetzung innerhalb des Verbundprojektes sowie die Erstellung des Kooperationsvertrages machten anfänglich den täglichen Austausch zwischen Projektleitung und Projektbearbeitung innerhalb des FZ Jülich notwendig. Hierbei konnte jederzeit im vollen Maße auf die Infrastruktur des Forschungszentrum Jülichs zurückgegriffen werden.

Die inhaltliche Ausrichtung des Projektes wurde immer an den aktuellen Fragestellungen des Forschungsvorhabens in der aktiven Diskussion mit allen Beteiligten angepasst. Die Projektteilnehmer trafen sich einmal pro Jahr während der Förderphase, wobei immer ein Vertreter des Projektträgers eingeladen war. Die Projektbeteiligten in den Teilprojekten 02NUK005A und 02NUK005D trafen sich zusätzlich regelmäßig in kürzeren Zeitabständen.

Aufgrund der rückwirkenden Bewilligung im Jahr 2008 sowie des durchaus erfolgreichen Verlaufs des Gesamtprojektes, der zu einer Aufstockung und zeitlichen Verlängerung der Laufzeit führte, aber auch aufgrund unerwarteter Personalwechsel am Ende der Laufzeit im Teilprojekt 05NUK005A, wurde dieses Teilprojekt insgesamt für mehr als 6 Jahre gefördert. Dabei wurde im 6-monatigen Rhythmus mittels Zwischenberichte an den Projektträger über den Verlauf des Projektes berichtet.

Das Teilprojekt „02NUK005A - Identifizierung charakteristischer Gen- und Proteinexpressionsmuster zum Zwecke der biologischen Dosimetrie“ wurde in engster Kooperation mit dem Teilprojekt 02NUK005D (Prof. O. Wolkenhauer, Universität Rostock) durchgeführt. Im Projekt 02NUK005A wurden für die Arbeiten zur „Genexpressionsbasierten Biodosimetrie“ in

den ersten 12 Monaten des Projektes die Proben (humane periphere Blutlymphozyten) gewonnen, daraufhin die genomweite Genexpression aller Proben mittels DNA-Microarray-Technologie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gamma-Bestrahlung bestimmt und die Daten vorausgewertet. Für die Identifikation von robusten Gensignaturen für die Biodosimetrie wurden die umfangreichen Datensätze dem Teilprojekt 02NUK005D zur vollständigen Verfügung gestellt. Nach Identifizierung der ersten vielversprechenden Gensignaturen wurden diese mittels einer zweiten, unabhängigen Methode (qRT-PCR) verifiziert und deren Proteinstatus bestimmt. Nach 24 Monaten wurden alle Gensignaturen für die Hochdosisbestrahlungen auf Robustheit untersucht, indem konkurrierende Einflüsse DNA-schädigender Chemikalien systematisch ausgeschlossen wurden. Parallel dazu wurden die Signalweganalysen und *gene ontology*-Analysen durchgeführt. Aufgrund des erfolgreichen Verlaufs nach 36 Monaten wurden die Experimente auf den Niedrigdosisbereich ausgeweitet und das Projekt für weitere 30 Monate verlängert. Hierbei wurde vergleichbar zu den Hochdosisexperimenten verfahren.

Parallel zu den oben beschriebenen Forschungsarbeiten wurden Untersuchungen in menschlichen Zelllinien mit dem Ziel durchgeführt, Genmarker zur Diskriminierung von Strahlenqualitäten zu identifizieren. Hierbei wurde in enger Kooperation mit Dr. Ulrich Giesen an der Physikalisch-Technischen-Bundesanstalt Braunschweig zusammengearbeitet, da dort eine brauchbare Flächenquelle für die beabsichtigte Alpha-Exposition zur Verfügung stand. Um das gesetzte Ziel zu erreichen, wurden für drei biologische Endpunkte die Äqui-Effektdosen für $^{123}$I-UdR, Alpha-Partikel und homogene Gamma-Exposition bestimmt. Zuvor mussten für die $^{123}$I-UdR-Expositionen umfangreiche DNA-Inkorporationskinetiken sowie Zellzyklusstudien durchgeführt werden. Nach 24 Monaten waren alle notwendigen Untersuchungen abgeschlossen und die Genexpressionsexperimente konnten in Angriff genommen werden. Nach notwendigen Dosisanpassungen und zusätzlichen Zeitpunkten zu denen die Genexpressionen ermittelt wurden, waren die Genexpressionsprofile nach weiteren 24 Monaten erstellt und konnten daraufhin analysiert werden. Die Analysen waren nach weiteren 6 Monaten abgeschlossen, so dass die Verifizierung und Validierung mittels qRT-PCR in den folgenden 12 Monaten durchgeführt werden konnte.

Zur biologischen Wirksamkeit von Auger Elektronen Emittern wurden zeitgleich Studien mit DNA-Triplex-bildenden Oligonukleotiden (TFO) als Carrier-Molekül durchgeführt. Die Herstellung spezifisch bindender TFO sowie die Markierung dieser Konstrukte mit $^{125}$I erwiesen sich als sehr langwierig und extrem schwierig. Erst nach 30 Monaten konnten geeignete TFO-Moleküle synthetisiert und mit der notwendigen Spezifität markiert werden, so dass an isolierter DNA die ersten Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden konnten. In den darauf folgenden 36 Monaten wurden umfangreich Biokinetiken, die intrazelluläre Verteilung und chemische Stabilität, sowie die Zyto- und Gentoxizität in Zellsystemen bestimmt. DNA-inkorporiertes $^{125}$I-UdR und Gamma-Bestrahlung wurde als Vergleichsstrahlung herangezogen. In den letzten 12 Monaten der Gesamtlaufzeit des Projektes wurden die Experimente durch $^{32}$P-markierte TFO ergänzt, um die pro Zerfall bei $^{125}$I-TFO festgestellten starken zytotoxischen und gentoxischen Effekte zu verifizieren.

## 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand an dem angeknüpft wurde

In mehreren Genexpressionsstudien waren nach *ex vivo* Bestrahlung humaner Lymphozyten bereits einige Gene identifiziert worden, die eine lineare Dosis-Antwort Beziehung (Amund-

son et al., 2000; Kang et al., 2003) oder eine Dosisspezifität aufweisen (Sokolov et al., 2006b). Einzelne Gene neigen jedoch dazu, große interindividuelle Varianz zu zeigen. Generell ist die Auswahl von robusten Gensignaturen aus der vorliegenden Vielzahl von Genen, die nach Bestrahlung eine signifikante Genexpression aufweisen, ohne systembiologischen und bioinformatischen Ansatz, schwierig. Die Arbeiten von Turtoi und Schneeweiss am Forschungszentrum Jülich zeigten eindrücklich, dass große inter- und intraindividuelle Schwankungen vorliegen können, und die direkte Anwendung dieser Gensignaturen über Regressionsanalysen nicht praktikabel erscheint. Die umfangreiche Genexpressionsstudie zur Identifizierung von Markergenen von Paul und Amundson (2008), die kurz nach Projektbeginn publiziert wurde, zeigte jedoch, dass mittels eines Sets von 74 Genen eine Unterscheidung der in der Studie verwendeten Strahlendosen (0,5 – 8 Gy) *in vitro* möglich war. Eine kleinere Gensignatur, die zusätzlich die Eigenschaft hätte, unabhängig vom Zeitpunkt zwischen Strahlenexposition und Genexpressionsbestimmung zu sein, wurde jedoch als extrem vorteilhaft betrachtet und hat die Zielsetzung im vorliegenden Projekt bestimmt.

Gensignaturen, die geeignet sind, die Strahlenqualitäten zu diskriminieren, waren zu Beginn des Projektes nicht publiziert. In Bezug auf DNA-assoziierte Auger-Elektronen-Emitter (AEE) zeigten jedoch Sokolov et al. 2006a bereits in humanen Lungenfibroblasten, dass γ-Strahlung im Vergleich zu $^{125}$IUdR, die Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur auf Genexpressionsebene signifikant reguliert. So lies sich diesbezüglich vermuten, dass möglicherweise bestimmte Gene in Abhängigkeit von der Strahlenqualität reguliert werden und dass mit deren Hilfe Strahlenqualitäten voneinander diskriminiert werden könnten. Zur Einführung von DNA-Schäden mittels Radionuklid-markierten TFO waren die diversen Vorarbeiten von Panyutin et al. 1996, 2000 und 2005 sowie aus der gleichen Arbeitsgruppe von Sedelnikowa et al. 2000, 2002 und 2004 bekannt, auf deren Erkenntnisstand das dritte Arbeitspaket aufbaute.

Alle wesentlichen Methoden zu genexpressionsbasierten Arbeiten waren bereits etabliert, ebenso alle angewendeten Cyto- und Gentoxizitätstests, Zellkulturtechniken und der Umgang mit offenen Radionukliden. Methodenentwicklung im wesentlichen Umfang fand nur im Bereich der TFO-Untersuchungen statt. Es wurde für die Bewertung der Daten und der Fortführung der Untersuchungen ausschließlich der Wissenstand aus peer-reviewed Fachliteratur einbezogen, die generell über on-line-Datenbanken und unter Zuhilfenahme der Bibliotheksinfrastruktur am Forschungszentrum Jülich lokalisiert wurden.

## 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Bei der Durchführung der Arbeiten wurde intensiv und sehr eng mit dem Lehrstuhl für Systembiologie und Bioinformatik Prof. Olaf Wolkenhauer (02NUK005D) an der Universität Rostock zusammengearbeitet. Bei der Durchführung der Alpha-Bestrahlungen wurde eng mit Dr. Ulrich Giesen an der Physikalisch-Technischen-Bundesanstalt kooperiert. Zudem wurden Genexpressionsprofile für die Arbeiten von Dr. Ali Sak/Prof. Martin Stuschke (02NUK005C) erstellt und bei der biologischen Wirksamkeit von $^{123}$I- und $^{125}$I-UdR sehr eng mit Prof. George Iliakis in Essen kooperiert. Prof George Iliakis war zudem Doktorvater in allen drei, im Rahmen des Teilprojektes 02NUK005A durchgeführten, Promotionen und somit in allen Projektteilen involviert. Bezüglich „Marker für individuelle Strahlensensitivität“ wurde zudem eng mit der Arbeitsgruppe Prof. Ekkehard Dikomey (02NUK005B) am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg kooperiert.

## II Eingehende Darstellung

Nach einem Strahlenunfall mit Beteiligung von Personen ohne physikalische Dosimeter ist es wichtig und notwendig, die individuelle Strahlenexposition anhand von biologischen Indikatoren schnell und zuverlässig bestimmen zu können. Nur so kann gegebenenfalls eine, der Strahlendosis entsprechende, medizinische Versorgung eingeleitet und belastbare Risikobewertungen vorgenommen werden.

Bislang dient die Auszählung dizentrischer Chromosomen als Standardmethode zur Abschätzung der Strahlendosis. Diese Analysemethode ist jedoch sehr zeitaufwendig (2-3 Tage) und sie bedarf des Einsatzes hochqualifizierter Spezialisten, sodass sie für eine schnelle Dosisbestimmung bei größerer Personenanzahl nur eingeschränkt einsetzbar ist.

Das Hauptziel der Untersuchungen war es daher, Gen- und Proteinexpressionsmuster zu identifizieren, die es ermöglichen, die Dosis und den Zeitpunkt einer vorausgegangenen γ-Strahlenexposition schnell und zuverlässig abzuschätzen. Da humane periphere Blutlymphozyten (PBL) problemlos, nach einer Blutabnahme, aus dem Vollblut isoliert werden können, sind diese Zellen ideal für die biologische Dosimetrie geeignet. Der Ansatz verspricht zudem auch im Niedrigdosisbereich zuverlässige Aussagen hinsichtlich der Expositionshöhe zu treffen, die mit herkömmlichen Methoden bislang nicht geleistet werden können.

Des Weiteren sollte an Zelllinien untersucht werden, inwieweit Genexpressionsmuster geeignet sind, die Diskriminierung von Strahlenqualitäten zuverlässig zu erlauben. Hierbei wurden die Strahlenqualitäten γ-Strahlung, α-Strahlung und Auger-Elektronen untersucht. Da Auger Elektronen, je nach Lokalisierung des Emitters, sowohl Niedrig-LET als auch Hoch-LET-Strahlenwirkungen induzieren, sollte zudem die zelluläre Wirkung von DNA-assoziierten Auger Elektronen Emittern untersucht werden.

### 1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

Alle Mittel wurden, gemäß der in der im Mittelbescheid festgelegten und über die Verwendungsnachweise belegten Höhe und Ausgabenart, ausschließlich sachgebunden, für die Durchführung des Projektes verwendet.

Das Teilprojekt 02NUK005A gliederte sich in drei Hauptfragestellungen und war daraus folgend in drei Arbeitspakete untergliedert:

#### 1.1 Können Genexpressionsänderungen in primären Lymphozyten die Höhe einer γ-Exposition bis zu 48 h nach erfolgter *ex vivo* Bestrahlung zuverlässig anzeigen?

Hierzu sollten in isolierten primären Lymphozyten von sechs Spendern zu drei verschiedenen Zeitpunkten und nach Exposition mit vier verschiedenen Strahlendosen RNA-Isolate gewonnen werden. Diese sollten im Anschluss mittels DNA-Microarray-Technologie hinsichtlich signifikanter Änderungen des Genexpressionsprofils analysiert werden. Kandidatengene mit robusten Expressionsänderungen sollten mittels qRT-PCR verifiziert und hinsichtlich ihrer Aussagekraft für eine retrospektive Dosisabschätzung in einer kleinen Population (< 12 Personen) *in vitro* verifiziert werden. Dieser Ansatz wurde um zwei Niedrigdosen in der Aufstockungsphase des Projektes ergänzt.

Das Hauptziel in diesem Projektteil bestand somit darin, Gensignaturen zu identifizieren, die für biodosimetrische Applikationen im Niedrig- und Hochdosisbereich geeignet sind und eine schnelle und zuverlässige Abschätzung der individuellen Dosis erlauben. Weitere Ziele waren, zu klären inwieweit die ggf. identifizierten Gensignaturen strahlenspezifisch sind und ob sich die Genexpressionsänderungen auf Proteinebene abbilden. Zuletzt sollten die ggf. aktivierten/involvierten biologischen Prozesse und Signalwege zeit- und dosisabhängig analysiert werden um hierüber, speziell für den Niedrigdosisbereich, neuartige Erkenntnisse zu möglichen Wirkmechanismen zu erlangen.

Folgende Ergebnisse konnten hierzu erzielt werden:

- Identifizierung von 16 Genen (*FDXR, TNFSF4, PHLDA3, VWCE, SPATA18, DOK7, LGR6, PRICKLE1, RP4-742C19.3, ISG20L1, LOC283454, TCL1A, THC2651023, CNTNAP2, C8orf38* und *E2F7*) für eine robuste Dosisabschätzung nach Hochdosisbestrahlung mit Identifizierung von sieben Genen, die als Kernsignaturen bezeichnet wurden (*FDXR, TNFSF4, PHLDA3, VWCE, SPATA18, DOK7, LGR6*).
- Validierung der Expressionsänderungen der sieben Gene der Kernsignatur für die Dosiszuordnung nach Hochdosisbestrahlung an gepoolten Proben von 6 Spendern mittels qRT-PCR.
- Validierung der Expressionsänderungen der sieben Gene der Kernsignatur für die Dosiszuordnung nach Hochdosisbestrahlung an insgesamt 9 Einzelspenderproben.
- Es konnte keine Korrelation zwischen mRNA- und Proteinmenge nach Hochdosisbestrahlung festgestellt werden. Es konnte keine Verkürzung der Halbwertszeit (*turnover* rate) der Proteine durch Hochdosisbestrahlung festgestellt werden.
- Genexpressionsänderungen nach Inkubation mit den DNA-schädigenden Chemikalien Mitomycin C und 4-Acetamidophenol hatten auf die Genexpressionsdaten der Kernsignatur geringen bis keinen Einfluss. Für Mitomycin C bei human-toxischer Konzentration trat bei zwei Genen (*PHLDA3 und VWCE*) zum Zeitpunkt 48 h nach Exposition eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf, die für diese beiden Gene vergleichbar mit den 1 Gy-Werten 48 h nach Exposition war.
- Identifizierung von neun Genen (*THC2535753, MKL2, FDXR, C10orf39, PFKFB3, A_32_P138939, FLJ35379, BU561469* und *LY6G5C)* für eine Dosisabschätzung nach Niedrigdosisbestrahlung.
- Validierung der Genexpressionsänderungen von drei ausgewählten Markergenen für die Dosiszuordnung nach Niedrigdosisbestrahlung an Einzelspenderproben.
- Identifizierung überrepräsentierter Signalwege in Lymphozyten nach Hochdosisbestrahlung (z.B. p53-Signalweg, systemischer Lupus erythematodes Signalweg, Antigenprozessierungs und –präsentations Signalweg).

Aus der Vielzahl an wertvollen Einzelergebnissen in diesem Arbeitspaket war für die grundlegende Fragestellung insbesondere die Genauigkeit der Strahlendosiszuweisungen sowohl im Hochdosisbereich (0,5 – 4 Gy) als auch im Niedrigdosisbereich (0 – 0,1 Gy) von Bedeutung. Diese Dosiszuweisungen resultieren aus den erhobenen Genexpressionsprofilen sowie

der Auswertestrategie und Methodik der Dosisklassifizierung („*k-nearest neighbour classification*“), die im Projekt 02NUK005D entwickelt wurden.

Die Zuweisungsgenauigkeit (*dose allocation*) für die einzelnen Strahlendosen im Hochdosisbereich (0, 0,5, 1, 2, 4 Gy) lag, unabhängig vom Zeitpunkt nach Bestrahlung (6 – 48 h), im Bereich von 90,1 % bis 100 % (Sensitivität) und 97,5 % bis 100 % (Spezifität) und ist detailliert in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab. 1: Vorhersagegenauigkeit der einzelnen Strahlendosen nach Selektion geeigneter Markergene**

| Dosis (Gy) | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 100 |
| 0,5 | 100 | 98,1 |
| 1 | 90,3 | 97,5 |
| 2 | 90,1 | 99,8 |
| 4 | 97,9 | 99,2 |
| **Durchschnitt** | **95,7** | **98,9** |

Die Zuweisungsgenauigkeit (*dose allocation*) für die einzelnen Strahlendosen im Niedrigdosisbereich (0, 0,02 und 0,1 Gy) lag, unabhängig vom Zeitpunkt nach Bestrahlung (24 – 48 h), im Bereich von 86,7 % bis 100 % (Sensitivität) und 93,3 % bis 100 % (Spezifität), und ist detailliert in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2: Sensitivität und Spezifität der Dosiszuweisung im Niedrigdosisbereich**

| Dosis (Gy) | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 100 |
| 0,02 | 86,7 | 100 |
| 0,1 | 100 | 93,3 |
| **Durchschnitt** | **95,6** | **97,8** |

Die erfolgreiche Verifizierung und Validierung von fünf der sieben Gene aus der Kernsignatur mittels DNA-Microarray-Technologie und qRT-PCR-Technologie ist in Abbildung 1 dargestellt.

Über die Primärziele hinaus, wurden weiterführende wertvolle Erkenntnisse gewonnen. Unterteilt man die angewendeten Strahlendosen in einen Hochdosisbereich (2 und 4 Gy), einem mittleren Dosisbereich (0,5 und 1 Gy) sowie einem Niedrigdosisbereich (0,025 und 0,1 Gy), so zeigten die Analysen, dass sowohl mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung als auch

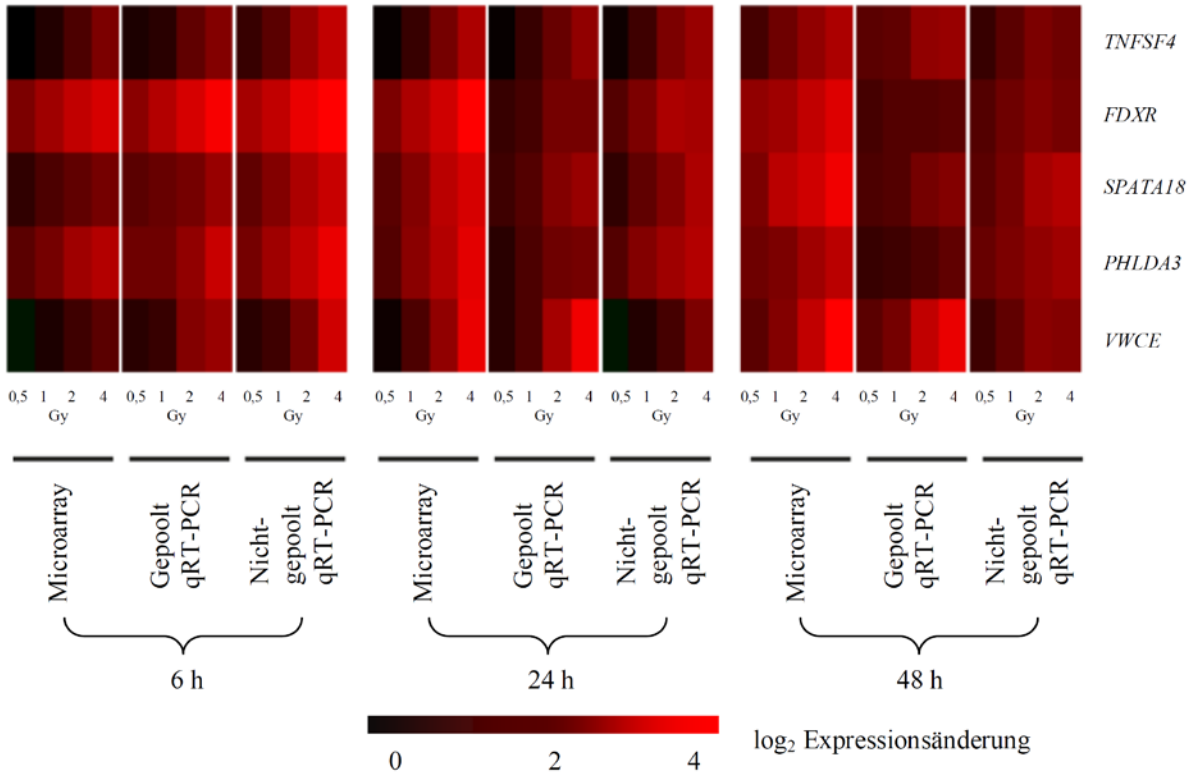


**Abb. 1: Vergleich der Expressionsprofile von fünf Markergenen detektiert mittels Microarrays und in qRT-PCR Messungen.** Sowohl für die Microarrays als auch für einen Teil der qRT-PCR Messungen wurden gepoolte Proben von sechs Spendern verwendet. Interindividuelle Expressionsunterschiede wurden an nicht-gepoolten Proben von sechs Spendern in qRT-PCR Messungen untersucht. Insgesamt ließen sich dabei sehr ähnliche Expressionsprofile für alle Gene, insbesondere für *TNFSF4* und *SPATA18*, in den Microarrays und in den qRT-PCR Messungen detektieren (Boldt *et al.*, 2012; Knops 2012).

mit ansteigender Strahlendosis die Anzahl signifikant deregulierter Gene zunimmt, wobei die Mehrzahl der Gene eine Hochregulierung aufweist. Dies ist vor allem für den mittleren und hohen Dosisbereich prägnant ausgeprägt (Abb. 2, A und B). Vergleicht man die Gene, die 24 und 48 h nach Bestrahlung eine signifikante Deregulierung aufwiesen, so fällt auf, dass im mittleren und hohen Dosisbereich nahezu die identischen Gene dereguliert sind (> 1200 Gene). Dagegen sind bei Niedrigdosisbestrahlung von insgesamt 144 signifikant deregulierten Genen 105 Gene (> 70 %) exklusiv reguliert (Abb. 2, C). Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass nach Niedrigdosisexposition (0,02 Gy und 0,1 Gy) exklusive zelluläre Prozesse aktiviert werden und sich die zelluläre Strahlenantwort qualitativ von der Zellantwort nach Hochdosisbestrahlung (0,5 – 4 Gy) unterscheidet.

Die Unterscheidung bestrahlter Proben (0,02 - 4 Gy) von unbestrahlten Proben (0 Gy) gelang, unabhängig vom Zeitpunkt nach Bestrahlung, mit 100% Sensitivität und Spezifität (Boldt et al. 2012). Bei den Niedrigdosisexperimenten konnte bereits durch hierarchisches Clustern eindrucksvoll gezeigt werden, dass, obwohl nur 24 respektive 144 Gene nach einer

Strahlenexposition mit 0,02 respektive 0,1 Gy signifikant dereguliert waren, die unbestrahlten Proben (0 Gy) sicher von den bestrahlten Proben unterscheidbar waren (Abb. 3).

Ab einer Strahlendosis von 0,1 Gy waren dabei die Genexpressionsprofile (Gesamtheit aller signifikant deregulierten Gene) einer Klasse, daher Strahlendosis, in sich stets ähnlicher, als zu jeder anderen Bestrahlungsklasse, wobei alle bestrahlten Proben in sich wiederum größere Ähnlichkeiten aufwiesen, als zu den unbestrahlten Kontrollen. Somit konnten die

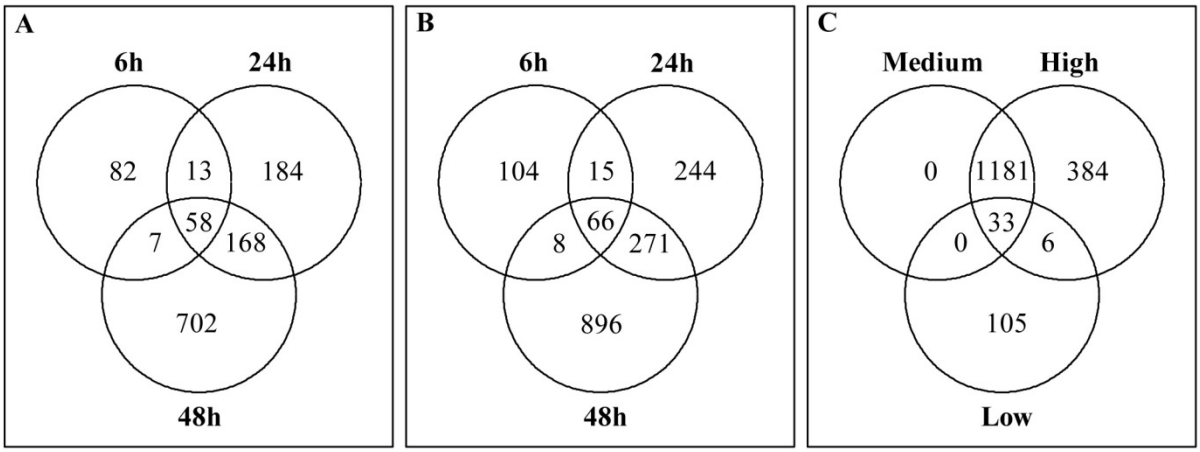


**Abb. 2: Anzahl der Gene mit signifikanten Genexpressionsänderungen nach *ex vivo* γ-Bestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen und nach verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung in humanen peripheren Lymphozyten (Venn-Diagramm).** A – Anzahl und Überlappung der Gene nach Strahlenexposition im mittleren Dosisbereich (0,5 und 1 Gy) mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung (6 – 48 h); B – Anzahl und Überlappung der Gene nach Strahlenexposition im hohen Dosisbereich (2 und 4 Gy) mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung (6 - 48 h); C – Anzahl und Überlappung der Gene nach Strahlenexposition im niedrigen (0,02 und 0,1 Gy, Low), mittleren (0,5 und 1 Gy, Medium), sowie hohen Dosisbereich (2 und 4 Gy, High) nach 24 und 48 h nach Bestrahlung. Auffallend hier, dass nach mittleren und hohen Strahlendosen die identischen Gene dereguliert sind, wogegen nach Niedrigdosisexposition die Mehrzahl der Gene exklusiv, daher nur im Niedrigdosisbereich, dereguliert sind. (nach Knops et al. 2012).

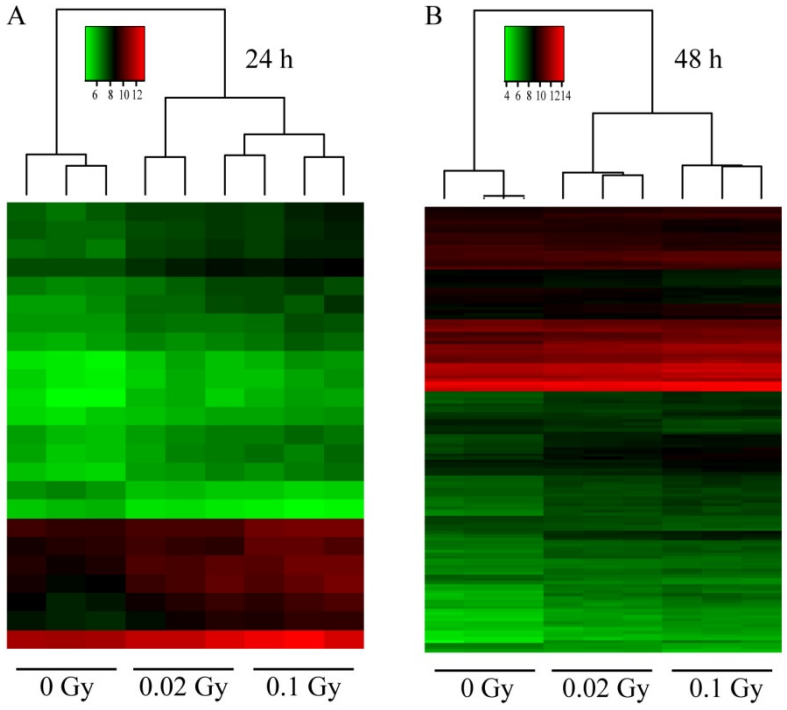


**Abb. 3: Heatmaps signifikant deregulierter Gene nach Niedrigdosisbestrahlung (0,02 und 0,1 Gy).**
A – Hierarchisches Clustern auf Basis von 24 deregulierten Genen (log2-Werte, fold-change > 1,5, Varianz kleiner als die mittlere Varianz über alle Proben) 24 h nach Bestrahlung.
B - Hierarchisches Clustern auf Basis von 144 signifikant deregulierten Genen (one way ANOVA, adjusted p-value <0,05).
Alle drei Dosisklassen (0, 0,02 und 0,1 Gy) können mit großer Güte zu beiden Zeitpunkten diskriminiert werden.
Rot: Hochregulierung; Grün: Herabregulierung. (Knops et al. 2012)

Proben alleine mittels hierarchischen Clustern relativ zueinander zugeordnet werden und die unbestrahlten Kontrollen waren leicht und schnell identifizierbar.

Die Analyse, in welchen biologischen Prozessen und Signalwegen die deregulierten Gene verankert sind, ergab, dass neben den „strahlentypischen“ Prozessen *DNA „damage response“*, *„Apoptosis“* und *„Proteolysis“* sowie dem Signalweg *p53 „signaling pathway“* der biologische Prozess *„Nucleosome asembly“* involviert und die Signalwege *„cytokine-cytokine receptor interaction“* sowie *„systemic lupus erythematosus“* überrepräsentiert waren. Dies war jedoch nur für mittlere (0,5 und 1 Gy) und hohe Strahlendosen (2 und 4 Gy) zu beobachten.

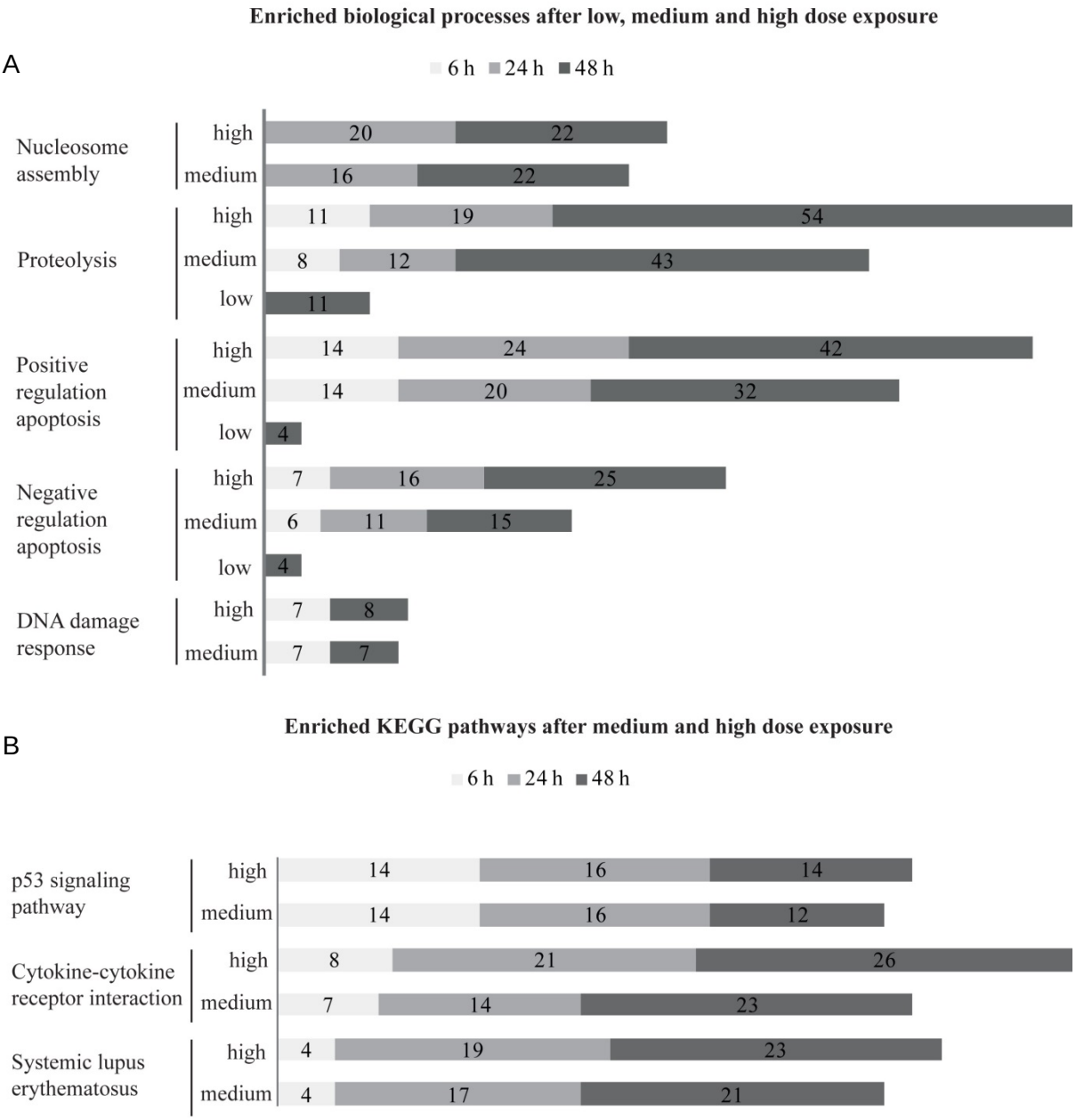


**Abb. 4:** Induzierte biologische Prozesse und Signalwege. A – Die Anzahl der Gene, die den jeweiligen biologischen Prozessen zugeordnet sind, nahm generell mit steigender Dosis und Zeit nach Exposition zu. Bei allen untersuchten Strahlendosen waren die Prozesse „Apoptose“ und „Proteolyse“ involviert. B - Die Anzahl der Gene, die den jeweiligen KEGG Signalwegen zugeordnet sind, nahmen mit steigender Strahlendosis und Zeit nach Bestrahlung zu (Knops et al. 2012).

Insbesondere zeigten die Niedrigdosisexperimente, dass bereits akute Strahlendosen in Höhe von 20 mGy signifikante Genexpressionsänderungen bewirken. Die dabei involvierten Signalwege und Signalkaskaden können als Ansatzpunkt für das bessere Verständnis der Zellantwort im Niedrigdosisbereich dienen. Noch wertvoller sind womöglich die Erkenntnisse, dass im Niedrigdosisbereich nach externer homogener γ-Bestrahlung (0,02 und 0,1 Gy) 105 exklusiv regulierte Gene detektiert wurden, da sie auf eine qualitativ unterschiedliche Zellantwort im Vergleich zu Hochdosisbestrahlung hinweisen.

Insgesamt konnte das Hauptziel dieses Arbeitspaketes, nämlich die Identifizierung von Marker-genen für retrospektive Dosisabschätzungen nach Niedrig- und Hochdosisbestrahlung, voll-ständig erreicht werden. Dabei wurden Markergene identifiziert, die geringe interindividuelle Genexpressionsunterschiede aufweisen und zudem strahlenspezifisch induziert werden. Alle gesetzten Ziele wurden erreicht.

Die Ergebnisse zu diesem Arbeitspaket sind in zwei peer-reviewed wissenschaftlichen Aufsätzen in strahlenforschungsrelevanten internationalen Journalen und in einer erfolg-reichen Dissertation („magna cum laude“) publiziert. Zusätzlich wurden 9 Poster-präsentationen zu diesem spezifischen Arbeitspaket angefertigt und die Kernergebnisse als Vorträge auf mehreren internationalen Tagungen präsentiert (Details siehe Punkt 6).

### 1.2 Können charakteristische Genexpressionsänderungen in lymphoblastoiden Zelllinien die Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten anzeigen?

Das Hauptziel dieses Arbeitspaketes war es, über Genexpressionsanalysen charakteristische Genexpressionsänderungen und robuste Gensignaturen in Jurkat-Zellen zu detektieren, mittels deren die Strahlenqualitäten „γ-Strahlung“, „α-Strahlung“ und „Auger-Elektronen“ eindeutig voneinander diskriminiert werden können und die gegebenenfalls in genexpressionsbasierten biodosimetrischen Verfahren Anwendung finden könnten. Hierzu sollten für die drei verwendeten Strahlenqualitäten Äqui-Effektdosen auf Basis der Apoptoseinduktion, der Mikrokernbildung und der γ-H2AX Foci-Bildung identifiziert werden. Für die notwendige Mikrodosimetrie der verwendeten Auger-Elektronen-Emitter (AEE) sollte die zelluläre *uptake*-Rate und die DNA-Einbaukinetiken bestimmt sowie 3D-Zellvermessungen durchgeführt werden.

Folgende Ergebnisse wurden in diesem Arbeitspaket erzielt:

- Erstmalig konnten Kandidatengene identifiziert werden, die mittels Genexpressionsänderung die Diskriminierung der drei Strahlenqualitäten γ-, α-Strahlung und AEE-Exposition erlauben: vier Gene für γ-Strahlung vs. $^{123}$I-UdR-Exposition (*PPP1R14C, TNFAIP8L1, DNAJC1* und *PRTFDC1*), jeweils ein Gen für γ-Strahlung vs. α-Strahlung (*KLF10)* bzw. α-Strahlung vs. $^{123}$I-UdR-Exposition (*TNFAIP8L1*)
- Die Regulationen der biologischen Prozesse bzw. Signalwege „Nukleosomenorganisation“, „Systemische Lupus erythematodes Signalweg“ sowie „Apoptoseregulation“ waren nach Exposition mit allen drei untersuchten Strahlenqualitäten signifikant verändert.

- Exklusiv waren nach γ-Bestrahlung die biologischen Prozesse bzw. Signalwege „Positive Regulation der DNA-Reparatur“, „Negative Zellzyklusregulation“, „Steroidmetabolismus und –biosynthese“ sowie „Antigenprozessierung und -präsentation“ signifikant reguliert.
- Nach $^{123}$I-UdR-Exposition waren exklusiv die biologischen Prozesse bzw. Signalwege „Zytokin-Zytokin-Rezeptorinteraktion“ und „Transkriptionsregulation“ signifikant reguliert.
- Nach α-Bestrahlung war exklusiv der „Kalziumsignalweg“ signifikant reguliert.
- Im Vergleich der drei untersuchten Strahlenqualitäten wurde bei gleicher absorbierter Strahlendosis Apoptose durch α-Bestrahlung am effektivsten induziert, während für die Mikrokernbildung keine strahlenqualitativen Unterschiede beobachtet wurden.
- Die mittlere γ-H2AX Signalintensität in Jurkat-Zellen war bei gleicher absorbierter Strahlendosis nach $^{123}$I-UdR-Exposition im Vergleich mit γ-Bestrahlung stark erhöht, während die mittlere γ-H2AX Signalintensität nach $^{123}$I-UdR- und α-Exposition vergleichbar stark ausgeprägt war.
- Erstmalig wurde in einem Zellsystem gezeigt, dass pro $^{123}$I-UdR-Zerfall im Mittel 0,16 γ-H2AX Foci gebildet werden. Die einzelnen Foci waren dabei bezüglich Größe und Signalintensität vergleichbar mit Foci γ-bestrahlter Zellen, so dass die postulierte Komplexität von DNA-Läsionen nach AEE-Exposition sich in der Morphologie der individuellen γ-H2AX Foci nicht abbildet.
- Für die durchflusszytometrische Analyse von γ-H2AX Signalen wurde eine innovative Auswertestrategie entwickelt und etabliert, die die Verteilung der zellulären γ-H2AX Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Strahlenqualität und vom Zellzyklus berücksichtigt.
- Die 3D-morphometrischen Vermessungen ergaben für Jurkat-Zellen ein mittleres Zell- bzw. Zellkernvolumen von 1400 ± 342 bzw. 667 ± 149 µm$^3$ und mittlere Zell- bzw. Zellkerndurchmesser von 13,9 ± 1,1 bzw. 10,8 ± 0,8 µm. Annähernd 94% der Zellen zeigten einen $^{123}$I-UdR-*Uptake* nach 20-stündiger Exposition. Die DNA-Inkorporation von $^{123}$I-UdR betrug dabei 94% bzw. 69% nach 20-stündiger Exposition bzw. nach 30-minütigem Puls-Labeling.

Alle gesetzten Primärziele wurden damit erreicht.

Aus der Vielzahl an wertvollen Einzelergebnissen in diesem Arbeitspaket war für die grundlegende Fragestellung insbesondere wichtig, ob überhaupt exklusiv regulierte Gene für die untersuchten Strahlenqualitäten identifizierbar sind. Die Untersuchungen zeigten, dass in Jurkat-Zellen nur 80 Gene gemeinsam reguliert, während 165, 318 bzw. 995 Gene nach Exposition mit $^{123}$I-UdR, α- bzw. γ-Strahlung exklusiv reguliert waren. Dabei waren 255, 105 bzw. 169 Gene nach Exposition mit α- und γ-Strahlung, α-Strahlung und $^{123}$I-UdR bzw. γ-Strahlung und $^{123}$I-UdR gemeinsam reguliert (siehe Abb. 5).

Für robuste Genmarker zur Diskriminierung von Strahlenqualitäten wurden im weiteren Verlauf des Projektes stringentere Bedingungen angelegt. Die weiterführenden Analysen zeigten nämlich, dass viele exklusiv signifikant regulierte Gene auch bei den beiden anderen untersuchten Strahlenqualitäten, dabei häufig nur sehr knapp unter der Signifikanzgrenze, in

gleicher Richtung, daher ähnlich, dereguliert waren. Daher wurden weitere Kriterien aufgestellt, so dass nur noch Gene als robuste Biomarker in Betracht gezogen wurden, die bei einer Strahlenqualität eine signifikante Deregulierung aufwiesen aber zugleich bei einer oder bei beiden anderen untersuchten Strahlenqualitäten, jeweils zu ihren eigenen unbestrahlten Kontrollen, keinerlei Regulierung oder gar eine gegensätzliche Regulierung aufzeigten.

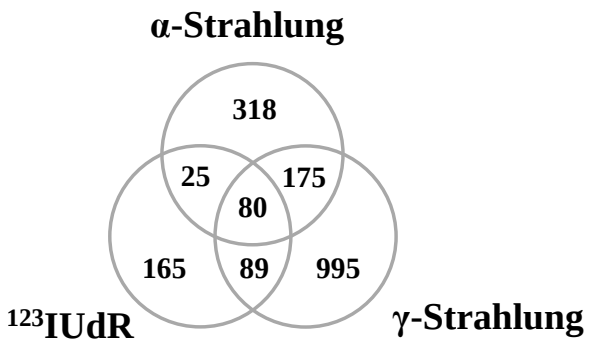


**Abb. 5: Anzahl der Gene, die nach Exposition mit allen drei Strahlenqualitäten gemeinsam bzw. exklusiv reguliert wurden (Venn-Diagramm);** M. Unverricht-Yeboah, Dissertationsschrift, 2015.

Unter Anlegung dieser stringenten Kriterien wurde beim Vergleich der Genexpressionsprofilen nach $^{123}$IUdR-Exposition und 6 h bzw. 24 h nach γ-Bestrahlung die Gene *DNAJC1* und *PRTFDC1 bzw. PPP1R14C* als robuste Kandidatengene identifiziert, die die Diskriminierung zwischen γ- vs. $^{123}$IUdR-Exposition zuließen. (Abb. 6 A-C). Des Weiteren wurde beim Vergleich der Genexpressionen 24 h nach γ- und α-Bestrahlung das Gen *KLF10* als Kandidatengen identifiziert, das die Diskriminierung zwischen γ-Strahlung vs. α-Strahlung robust erlaubt (Abb. 6 E).

Nach $^{123}$IUdR-Exposition und 6 h nach γ- bzw. α-Bestrahlung konnte *TNFAIP8L1* als robustes Kandidatengen identifiziert, welches die Diskriminierung sowohl von γ- vs. $^{123}$IUdR-Exposition als auch α- vs. $^{123}$IUdR-Exposition zuließ (Abb. 6 E).

Die Anzahl robuster Genmarker für die Diskriminierung der gewählten Strahlenqualitäten war somit wesentlich geringer, als die exklusiv regulierten Gene.

Erstmalig wurde ein Auger-Elektronen-Emitter sowohl mit Hoch-LET als auch Niedrig-LET Strahlung bezüglich Genexpression, Apoptoseinduktion, Mikrokern- und γ-H2AX Foci-Bildung vergleichend untersucht. Hierfür war eine eingehende mikrodosimetrische Betrachtung für die verwendeten Auger-Elektronen-Emitter unter Berücksichtigung der zellulären Aufnahmekinetiken, der intrazellulären Lokalisation sowie der Zellgeometrie notwendig, da nur so ein Vergleich der drei Strahlenqualitäten auf Basis der absorbierten Strahlendosis möglich war.

Aufgrund der geringen Anzahl der identifizierten Gene, die die Diskriminierung der verschiedenen Strahlenqualitäten erlauben, ist allerdings die Implementierung dieser Gene in genexpressionsbasierten Biodosimetrieverfahren nach unserer Einschätzung als schwierig zu erachten.

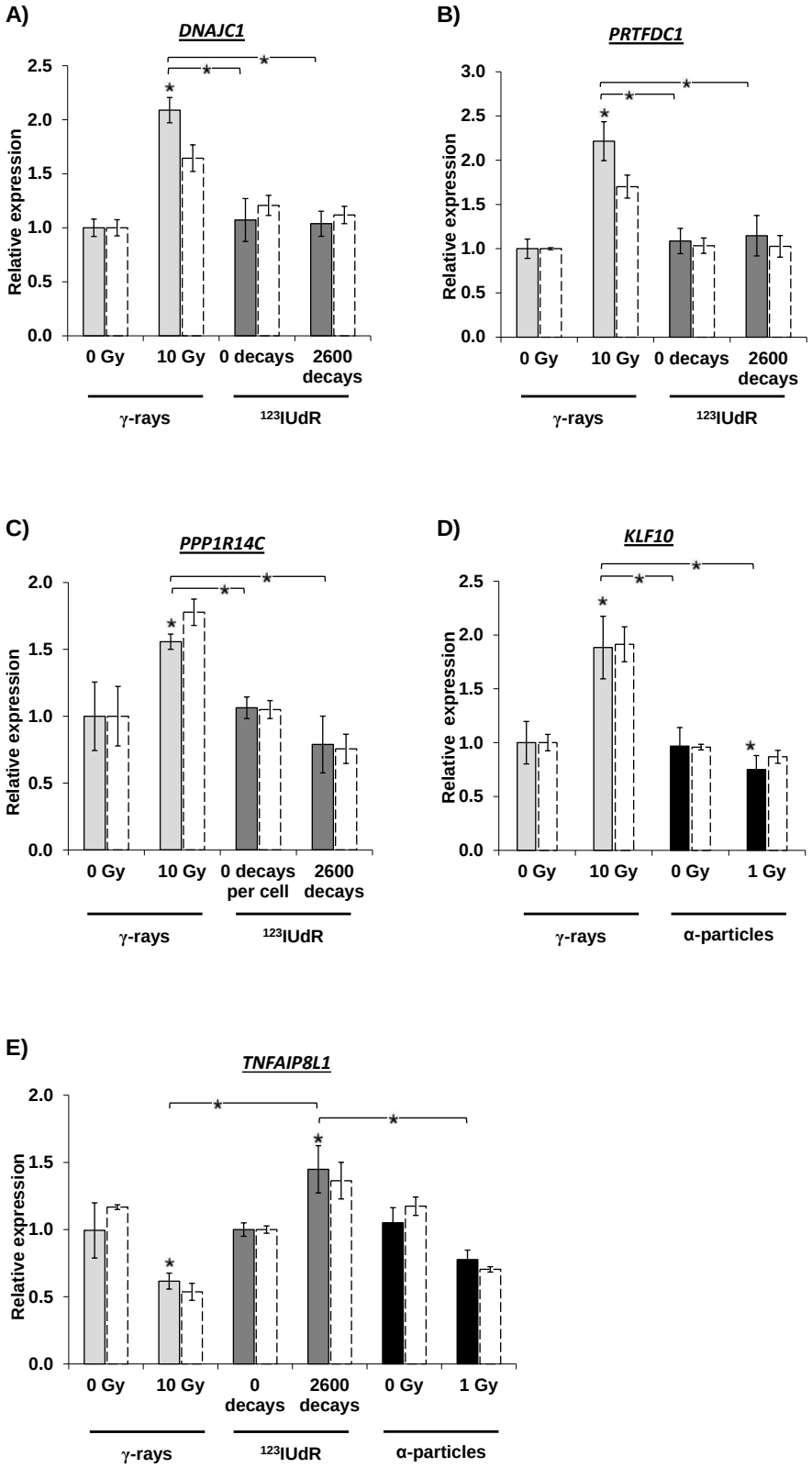


**Abb. 6: Genexpressionsprofile robuster Markergene zur Diskriminierung von Strahlenqualitäten.** A und B - DNAJC1 und PRTFDC1; $^{123}$I-UdR-Exposition versus γ-Bestrahlung 24 h nach Bestrahlungszeitpunkt; C - PPP1R14C, $^{123}$I-UdR-Exposition versus γ-Bestrahlung 6 h nach Bestrahlungszeitpunkt; D - KLF10, γ-Bestrahlung versus α-Bestrahlung; E - TNFAIP8L1, $^{123}$I-UdR-Exposition versus γ- und α-Bestrahlung. Die hell bzw. dunkelgrauen sowie schwarzen Balken zeigen die Daten der quantitativen real-time PCR im Vergleich zu den DNA-Microarray Daten (weiße Balken). (N=3, *p < 0.05); Unverricht-Yeboah et al. submitted to IJRB, 2015.

Ob die in der vorliegenden Arbeit gefundene Gensignatur zelltypspezifisch bzw. spezifisch für Jurkat-Zellen ist, bleibt spekulativ, da auch Unterschiede bzw. Modifikationen bezüglich der Microarray-Methode und -Auswertung ursächlich dafür verantwortlich sein könnten, dass die in dieser Arbeit in Jurkat-Zellen gefundene Gensignatur bisher nicht in den anderen wenigen Studien, die die Genexpression in Abhängigkeit von der Strahlenqualität untersuchten, beschrieben wurde (Sokolov et al. 2006a und b).

Die gewonnenen Erkenntnisse sind dennoch sehr wertvoll, da sie zeigen, dass die zelluläre Strahlenantwort auf Basis der Genexpression prinzipiell nicht nur bezüglich der Dosishöhe sondern auch bezüglich der Strahlenqualität signifikant unterschiedlich ist.

Die Ergebnisse dieses Projektteils sind ausführlich in einer Dissertation, die an der biologischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen eingereicht ist, niedergelegt und sie sind bislang in einem Fachartikel zur Publikation eingereicht. Zudem wurden > 10 Posterpräsentationen zu diesem spezifischen Arbeitspaket erzielt und die Kernergebnisse als Vorträge auf fünf internationalen Tagungen präsentiert (Details siehe Punkt 6).

1.3 Können Auger-Elektronen-Emitter (AEE) über geeignete Carriermoleküle gezielt an die DNA angelagert und hierüber eine Schädigung der Targetsequenz induzieren und inwieweit führt die Schädigung von funktional verschiedenen Bereichen des Chromatins zu unterschiedlichen Genexpressionsänderungen?

Die gezielte Exposition von Chromatinstrukturen mittels AEE sollte anhand von $^{125}$I-markierten DNA-Triplex-bildenden Oligonukleotiden (TFO), aber auch mittels DNA-inkorporiertem 5-$^{125}$I-2´-desoxyuridin ($^{125}$I-UdR) durchgeführt werden. Das Hauptziel dieses Arbeitspaketes bestand darin, verschiedene $^{125}$I-markierte TFO zu konstruieren, die spezifisch mit ihrer Target-Sequenz in der DNA-Doppelhelix über Wasserstoffbrücken stabile DNA-Triplexe bilden und daraufhin die induzierten DNA Schäden, die Zytotoxizität und deren Einfluss auf die Genexpression der angesteuerten Zielgene zu untersuchen. Die verwendeten TFO unterschieden sich dabei sowohl in der Qualität als auch in der Quantität der Zielsequenzen.

Folgende Ergebnisse wurden in diesem Arbeitspaket erzielt:

- Identifizierung von TFO Zielsequenzen und Verifikation der spezifischen Bindungseigenschaften. Dabei konnten von 26 getesteten TFO die DNA-Triplexbildung in vitro bei 11 TFO nachgewiesen und verifiziert werden.
- Etablierung der Synthese und Markierung von TFO mit $^{125}$I mit einer Markierungseffizienz von > 90%.
- Die Induktion von sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) durch $^{125}$I-markierte TFO an isolierten DNA-Fragmenten mit einer Effizienz von ~ 0,6 DSB/Zerfall.
- Anhand biokinetischer Analysen von fluorochrom-markierten TFO nach Transfektion in SCL-II Zellen konnte ein effektiver Transport in den Zellkern als auch eine Integrität der TFO von bis zu > 72 h nachgewiesen werden.
- Die Analyse der Schadensinduktion unterschiedlicher $^{125}$I-markierter TFO im zellulären System zeigte deutliche Schädigungen der DNA sowie eine deutliche Ver-

ringerung des Zellüberlebens, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung in Abhängigkeit der verwendeten TFO. ´

- $^{125}$I-markierte TFO zeigten eine vergleichbare Verringerung der Zellüberlebensrate pro Zerfall wie DNA-inkorporiertes $^{125}$IUdR und alle $^{125}$I-markierten TFO waren pro Dosis deutlich zytotoxischer als homogene γ- und ß-Bestrahlung (Faktor 3 – 4).
- Der Einfluss auf die Genexpression wurde bei drei TFO untersucht, deren Zielsequenzen im Bereich der Gene *GAPDH*, *BRCA1* und *BCL2* lagen. Es konnten sowohl signifikante Hoch- als auch Herabregulationen der Genexpression in diesen Zielgenen festgestellt werden.
- Für alle untersuchten $^{125}$I-markierten TFO konnte eine signifikant erhöhte Induktion von Mikrokernen als Maß für induzierte Chromosomenbrüche nachgewiesen werden.
- $^{125}$I-markierte TFO induzierten in SCL-II Zellen einen transienten $G_2$M Block.

Insgesamt konnte das Hauptziel dieses Arbeitspaketes, nämlich die DNA-Sequenzspezifische Induktion von DNA Schäden unter der Verwendung von $^{125}$I markierten TFO sowie die Analyse des Einflusses auf Überlebensrate, DNA DSB Induktion, Chromosomenschädigung und Genexpression, vollständig erreicht werden.

$^{125}$I markierte TFO sind prinzipiell geeignet, in unmittelbarer Nähe ihres Bindungsortes an der DNA einen Doppelstrangbruch einzuführen. Die über den Auger-Elektronen-Emitter $^{125}$I eingeführten lokalen DNA-Schäden scheinen von komplexer Natur, da sowohl Gen- als auch Zytotoxizität pro Dosis gegenüber Niedrig-LET-Strahlung um einen Faktor 3 – 4 erhöht ist.

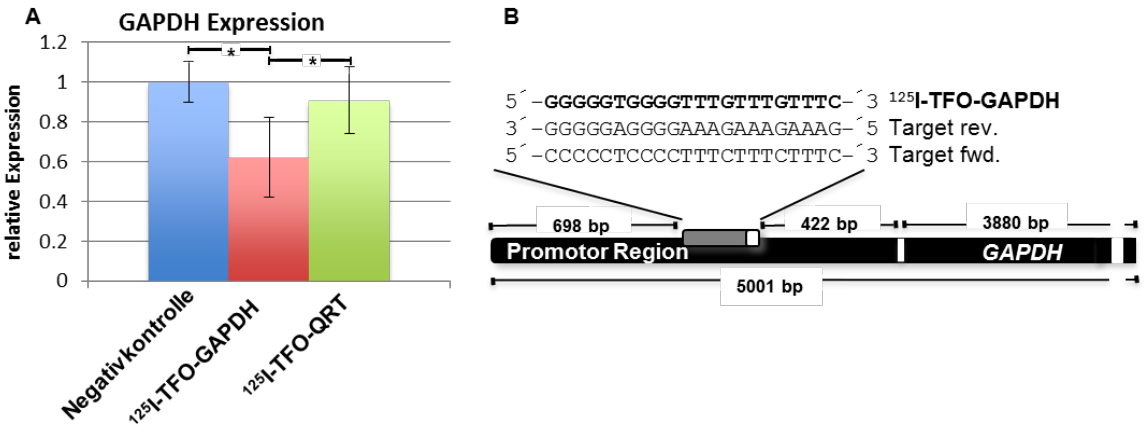


**Abb. 7: Expressionsänderungen durch TFO sowie TFO-Bindungsstelle im GAPDH Gen**
A - Relative Genexpression von *GAPDH* nach Transfektion mit $^{125}$I-TFO-GAPDH (n=7), $^{125}$I-TFO-QRT (n=3) und unmarkiertem TFO-GAPDH (n=3) als Negativkontrolle. Das I-125-markierte GAPDH-TFO verringerte signifikant die Genexpression von GAPDH. ($^{125}$I-TFO-GAPDH sowie ungelabeltes TFO-GAPDH (Negativkontrolle) bindet an eine singuläre Zielsequenz innerhalb des *GAPDH* Genes; $^{125}$I-TFO-QRT bindet an multiple Zielsequenzen innerhalb des humanen Genoms). B - Darstellung der *GAPDH* Zielsequenz und deren Lokus innerhalb des *GAPDH* Gens. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus n-unabhängigen Experimenten. (*p-Wert > 0,05); bp = Basenpaare. (Dahmen and Kriehuber, 2012).

Die Ergebnisse zu diesem Arbeitspaket sind in einem peer-reviewed wissenschaftlichen Aufsatz in einer strahlenforschungsrelevanten Zeitschrift und einer erfolgreichen Dissertation („magna cum laude“) publiziert. Ein weiterer Fachaufsatz ist zur Publikation eingereicht. Zusätzlich wurden > 10 Posterpräsentationen zu diesem Arbeitspaket erzielt, sowie die Kernergebnisse auf drei internationalen Tagungen als Vortrag präsentiert (siehe Punkt 6).

### 1.4 Wurden die übergeordneten Projektziele des Verbundvorhabens erreicht?

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten im Detail beschrieben, wurden folgende wichtige Hauptergebnisse in Bezug zu den übergeordneten Verbundprojektzielen erreicht:

- Mittels systembiologischen und bioinformatischen Ansätzen ist es gelungen, kleine Gensets in humanen peripheren Blutlymphozyten zu identifizieren, die unabhängig vom Zeitpunkt nach γ-Bestrahlung, erlauben, die Strahlendosis mit sehr guter Genauigkeit abzuschätzen und somit prinzipiell für die biodosimetrische Anwendung geeignet sind.
- Bereits niedrige Strahlendosen (20 und 100 mGy) bewirken in humanen peripheren Blutlymphozyten, im Vergleich zu Hochdosisbestrahlung (0,5 - 4 Gy), signifikante Genexpressionsänderungen, wobei 105 der 144 detektierten Gene ausschließlich nach Niedrigdosisexposition signifikant dereguliert waren, was auf eine exklusive Zellantwort im Niedrigdosisbereich hindeutet.
- Die Diskriminierung von Strahlenqualitäten scheint mittels Markergenen prinzipiell möglich zu sein, wobei eine robuste Implementierung in genexpressionsbasierten biodosimetrischen Verfahren weiterer Forschungsarbeit bedarf.
- DNA-assoziierte Auger-Elektronen-Emitter (AEE), für die bislang kein spezifischer Qualitätsfaktor definiert ist, bewirken charakteristische Genexpressionsänderungen. Zielgerichtet mittels AEE-markierten DNA-Triplex-bildende-Oligonukleotide induzieren sie lokale sequenzspezifische DNA-Doppelstrangbrüche, Genexpressionsänderungen in Target-Genen und besitzen eine sehr hohe Zyto- und Gentoxizität. Diese Eigenschaften machen sie zu einem geeigneten Werkzeug, um die Prozessierung von komplexen DNA-Läsionen zu untersuchen und hierüber die zellbiologischen Grundlagen für die Unterschiede in der zellulären Strahlensensitivität aufzuklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Teilprojekt 02NUK005A erzielten Ergebnisse maßgeblich dazu beigetragen haben, dass die übergeordneten Projektziele im Verbundvorhaben 02NUK005 erreicht wurden.

## 2. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Aufgrund von Stellenverfestigungen und der damit verbundenen zeitweisen Nichtbesetzung von Personalstellen im Projekt wurden Mittel für Personalkosten in Material/Verbrauch mit den Änderungsbescheiden vom 11.05.2010 und 30.05.2011 umgewidmet und die Laufzeit kostenneutral bis zum 31.12.2011 verlängert. In einer Aufstockung des Vorhabens wurden im Bescheid vom 05.12.2011 für das Vorhaben u.a. weitere Personalmittel bewilligt, so dass einer der im Projekt promovierten Doktoranden durch die bewilligte Wissenschaftlerstelle zwischenzeitlich als PostDoc finanziert werden konnte. Das Vorhaben wurde aufgrund von

Personalfluktuationen und den damit bedingten Verzögerungen im Projektablauf kostenneutral bis 31.12.2014 verlängert.

Insgesamt sind für die ganze Laufzeit geringfügig weniger Personalkosten angefallen, als vorab kalkuliert. Die abgerechneten Personalkosten unterschritten die Vorkalkulation dabei um € 3.552,81. Die tatsächlichen Materialkosten überschritten dagegen um € 4.541,89 die Vorkalkulation, was hauptsächlich durch die leicht angestiegenen Kosten für die DNA-Microarrays verursacht wurde. Die abgerechneten Reisekosten entsprachen nahezu der Vorkalkulation. Da die Vorkalkulation für die im Projekt in der Aufstockungsphase enthaltenen FE-Fremdleistungen die dafür abgerechneten Kosten um € 1.1345,46 überschritt, wurden die vorkalkulierten Gesamtkosten des Projektes 02NUK005A um insgesamt € 74,92 unterschritten.

Somit entsprachen die abgerechneten Kosten für das Gesamtprojekt nahezu exakt der eingereichten Vorkalkulation.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der durchgeführten Arbeiten

Die Personalmittel wurden für den Projektleiter, für einen Post-Doc, für einen in diesem Projekt promovierten Mitarbeiter, sowie für 2 Doktoranden verwendet. Alle durchgeführten Experimente waren in Anzahl und Ausführung für das Erreichen der gesetzten Ziele notwendig und angemessen.

Der Hauptteil der veranschlagten Kosten für Verbrauchsmaterial wurde für DNA-Microarray-Experimente verwendet. Um hier die Kosten zu minimieren, wurde dort, wo es wissenschaftlich vertretbar war und die Zielsetzung es erlaubte, mit gepoolten Proben gearbeitet, um die Anzahl an verwendeten Microarrays zu minimieren. Die Beschaffung von Radionukliden wurde stets aufgrund von akkuraten Versuchsplanungen so terminiert, dass, selbst bei Radionukliden mit sehr kurzer Halbwertzeit, die maximale Anzahl an Experimenten durchgeführt werden konnte.

Im Rahmen des Aufstockungszeitraums wurde zur Bearbeitung von Fragestellungen zur Analyse der individuellen Strahlensensitivität eine Fremdleistung durch Prof. E. Dikomey, Universitätsklinikum Eppendorf (02NUK005B) in Anspruch genommen. Hierbei wurden abschließende Analysen zu Markern für die individuelle Strahlensensitivität durchgeführt, die für das Erreichen der Hauptziele des Gesamtvorhabens notwendig waren.

Die beantragten Reisekosten wurden für die regelmäßigen Treffen zwischen den Projektteilnehmern sowie für den Besuch und die Präsentation der im Projekt erzielten Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen und Kongressen verwendet.

## 4. Voraussichtlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse

Um nach einem radiologischen Unfall mit vielen Betroffenen eine adäquate medizinische Versorgung zu gewährleisten, ist es notwendig, sehr schnell die individuelle Strahlendosis abzuschätzen, um hochdosisbestrahlte Individuen von nicht bis geringfügig bestrahlten Personen zuverlässig zu unterscheiden. Zusätzlich dienen die ermittelten individuellen Strahlendosen zur Abschätzung zukünftiger strahlungsassoziierter Gesundheitsrisiken. Dies ist besonders für geringfügig exponierte Personen von großer Bedeutung.

Die Bestimmung der Strahlendosis auf der Basis strahleninduzierter Genexpressionsänderungen bietet sehr viele Vorteile gegenüber herkömmlichen und etablierten Methoden der Biodosimetrie. Die erzielten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass es möglich ist, auf der Grundlage von Genexpressionsänderungen nach Bestrahlung, zuverlässige Vorhersagen über die individuelle Strahlendosis im hohen, mittleren aber vor allem im niedrigen Dosisbereich (20 mGy !) zu treffen. Die in diesem Projekt identifizierten Gensignaturen, die für biodosimetrische Applikationen geeignet sind, legen somit den Grundstein für die Entwicklung von biodosimetrischen Verfahren, mit denen eine schnelle, leicht automatisierbare und zuverlässige Abschätzung der individuellen Strahlendosis ermöglicht wird.

Die erzielten Resultate befeuern zudem die Durchführung weiterführender Untersuchungen, um die Übertragbarkeit der *ex vivo* generierten Ergebnisse auf *in vivo* Expositionssituationen zu überprüfen. Dies wäre ein weiterer wichtiger Schritt bei der Entwicklung von genexpressionsbasierten biodosimetrischen Verfahren.

## 5. Fortschritte auf dem Gebiet während der Durchführung der Arbeiten

Auf dem Gebiet des Vorhabens wurden keine relevanten Publikationen zur Berichterstattung veröffentlicht.

## 6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Die Ergebnisse sind in drei *peer-reviewed* Fachaufsätzen, in zahlreichen Vorträgen und Postern/Abstracts auf nationalen und internationalen Fachtagungen, sowie in drei Dissertationen publiziert. Es sind drei weitere Fachaufsätze eingereicht bzw. befinden sich bereits im Druck und drei weitere Manuskripte befinden sich in Anfertigung.

### *6.1 Peer-reviewed Publikationen: 3*

Boldt S, Knops K, Kriehuber R, Wolkenhauer O. A frequency-based gene selection method to identify robust biomarkers for radiation dose prediction, Int J Radiat Biol, Mar; 88(3), 267-76 (2012)

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry. Radiat Res. Oct;178(4):304-12 (2012)

Dahmen V, Kriehuber R. Cytotoxic effects and specific gene expression alterations induced by I-125-labeled triplex-forming oligonucleotides. Int J Radiat Biol. Dec; 88(12):972-9 (2012)

### *6.2 In print / submitted: 3*

Schmitz S, Oskamp D, Pomplun E, Kriehuber R. Chromosome aberrations induced by the Auger electron emitter Iodine-125 (Mutation Research, 2015; in print)

Dahmen V, Pomplun E, Kriehuber R. Iodine-125-labeled DNA-Triplex-forming oligonucleotides reveal increased cyto- and genotoxic effectiveness compared to Phosphorus-32 (submitted to Int. J Radiat. Biol., 2015)

Unverricht-Yeboah M, Giesen U, Kriehuber, R. Comparative gene expression analysis after exposure to $^{123}$I-iododeoxyuridine, γ- and α-irradiation – a possible tool for biodosimetry? (submitted to Int. J Radiat. Biol., 2015)

### *6.3 Dissertationsschriften: 3*

Knops, Katja, Genexpressionsanalysen in humanen peripheren Blutlymphozyten nach Bestrahlung - Grundlagen für biodosimetrische Applikationen, Dissertationsschrift; Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen, 2012.

Dahmen, Volker, I-125-labeled Triplex-Forming-oligonucleotides: Studies on intracellular distribution, cytotoxicity and on gene expression alterations of target genes, Dissertationsschrift; Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen, 2013.

Unverricht-Yeboah, Marcus, Analyse der Genexpression und Charakterisierung der biologischen Wirkung in der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten, Dissertationsschrift; Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen, 2015.

### *6.4 Vorträge: 21*

Kriehuber R, On a Systems Biology Approach to Radiation Biodosimetry and the Analysis of Individual Radiosensitivity, Öffentliche Veranstaltung des Kompetenzverbundes Strahlenforschung im Rahmen des 13th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research (GBS) 2010, Hamburg, (2010)

Knops K, Gene expression pattern analysis in human PBLs as a tool for radiation biodosimetry, EPRBioDose 2010, Mandelieu-La-Napoule, France, Abstract Book, p. 99 (2010)

Unverricht-Yeboah M, Quantification of γ-H2AX foci following α-particles and γ-rays in Jurkat cells. 3rd European IRPA Congress, Helsinki, Abstract Book p. 13, (2010)

Kriehuber R, Radiation-specific gene expression changes in human PBL after *ex vivo* irradiation suitable for biodosimetric applications, Bundesamt für Strahlenschutz, Kolloquienreihe Strahlenschutz und Umwelt, Neuherberg-Oberschleißheim, 05.Juli, invited talk (2011)

Kriehuber R, A comparative study on the cyto- and genotoxicity of I-123- and I-125-UdR in-vitro, 7$^{th}$ International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes 2011, Jülich, Germany, August 24$^{th}$ - 26$^{th}$ 2011, (2011)

Unverricht-Yeboah M, Quantification of γ-H2AX foci after exposure to I-123-iododeoxyuridine in comparison to γ- and α-irradiation. 7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes 2011, Jülich, Germany, August 24th - 26th 2011, Abstract Book, p. 27 (2011)

Kriehuber R, A Systems Biology Approach to Radiation Biodosimetry and the Analysis of Individual Radiosensitivity, Öffentliche Veranstaltung des Kompetenzverbundes Strahlenforschung im Rahmen des 14$^{th}$ Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research (GBS) 2011, Sept. 16$^{th}$, Rheinbach, (2011)

Kriehuber R, Gene expression analysis in human peripheral blood lymphocytes for biodosimetric applications after low and high dose gamma-irradiation, Jahrestagung des Fachverband für Strahlenschutz; 20. September, Karlsruhe, (2012)

Dahmen V, Influence of I-125 labeled TFO in SCL-II cells on cell survival, cell cycle and DSB induction. 39$^{th}$ Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Vietri sul Mare, Abstract Book, p. 112, (2012)

Kriehuber R, Entwicklung neuer Methoden für die Biodosimetrie: Analyse von Genexpressionsmuster in humanen peripheren Blutlymphozyten nach Hoch- und Niedrig-Dosisbestrahlung“; 108. Sitzung des Ausschusses „Strahlenrisiko" der SSK (Strahlenschutzkommission), BMU; 13. Februar 2013 in Bonn, invited talk, (2013)

Kriehuber R, A Systems Biology Approach to Radiation Biodosimetry and the Analysis of Individual Radiosensitivity, 1. Projektstatusgespräch zur BMBF-geförderten Nuklearen Sicherheits-forschung am KIT-Campus Nord, 6. und 7. März 2013**,** KIT, Karlsruhe (2013)

Kriehuber R, Gene expression analysis in low and high dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimety. Joint International Symposium on EPR Dosimetry and Dating and the International Conference on Biological Dosimetry 24-28 March 2013, Leiden – The Netherlands (2013)

Unverricht-Yeboah M, Analyse von Genexpressionsmuster zur Diskriminierung von Strahlenqualitäten, Fachverband für Strahlenschutz, 49. Sitzung des Arbeitskreis Strahlenbiologie und Strahlenwirkung, 04. April 2014, Jülich, (2014)

Schmitz S, Chromosome aberrations induced by the Auger emitter I-125. 11th International Symposium on Chromosomal Aberrations, Rhodes, Greece (2014)

Unverricht-Yeboah M, Gene expression analysis in Jurkat cells after exposure to I-123-iododeoxyuridine, γ-rays and α-particles. 41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Rhodes, Greece (2014)

Kriehuber R, Enhanced cyto- and genotoxic effects of Auger electron emitter-labeled DNA-Triplex forming Olgonucleotides *in vitro*, European Association of Nuclear Medicine, EANM´14, 18 – 22 October 2014 Gothenburg, Sweden (2014)

Kriehuber R, Gene expression analysis in low and high-dose-irradiated human PBL: Possible applications for radiation biodosimetry; 5$^{th}$ March 2015, invited talk, RENEB-Meeting, Rome, Italy (2015)

Kriehuber R, Biologische Indikatoren für eine Strahlenexposition - Entwicklung neuartiger Methoden für die biologische Dosimetrie; 64. Sitzung des AK Gesundheit, Arbeitssicherheit und Umwelt (AK HSE) der Helmholtzgemeinschaft Deutscher Forschungszentren, 28.-29.April 2015; invited talk, Jülich, (2015)

Unverricht-Yeboah M. Comparative analysis of gene expression data after exposure to Iodine-123 labeled 5-Iodo-2´-deoxyuridine, γ-rays and α-particles, 8th Auger Symposium, 22th May, Nara, Japan (2015)

Kriehuber R, Cyto- and genotoxic effects of Auger electron emitter-labeled DNA-Triplex-forming Olgonucleotides, 8th Auger Symposium, 22th May, Nara, Japan (2015)

Unverricht-Yeboah M, Does gene expression analysis allow the discrimination of radiation qualities? 15th International Congress of Radiation Research, 29th May, Kyoto, Japan (2015)

### *6.5 Abstracts/Poster: >40*

UNVERRICHT M, GIESEN U, KRIEHUBER R. Quantification of γ-H2AX foci following γ-rays and α-particles in Jurkat cells. 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Prag, Abstract Book, p. 18 (2009).

KNOPS K, BOLDT S, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Gene expression pattern analysis as a tool for radiation biodosimetry. 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Abstract Book, p. 55 (2009).

DAHMEN V, KRIEHUBER R. DNA-Triplex-forming-oligonucleotides as a tool to target specific DNA sequences. 12th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research – GBS 2009, Essen, Sept. 30th – Oct. 2nd, Abstract Book, p. 127 (2009).

KNOPS K, BOLDT S, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Gene expression pattern analysis in human PBLs as a tool for radiation biodosimetry, 12th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research –GBS 2009, Essen, Sept. 30th – Oct. 2nd, Abstract Book, p. 130 (2009)

UNVERRICHT M, GIESEN U, KRIEHUBER R. Quantification of γ-H2AX foci following γ-rays and α-particles in Jurkat cells. 12th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research (GBS), Essen, Sept. 30th – Oct. 2nd, Abstract book, p. 95, (2009)

BOLDT S, KNOPS K, KRIEHUBER R, WOLKENHAUER O. Expression Signatures Functioning as Radiation Biodosimeters. German Conference of Bioinformatics 2009, Halle, p. 47 (2009).

UNVERRICHT M, GIESEN U., KRIEHUBER R. Flowcytometrical analysis of radiation-induced gamma-H2AX foci. 19th Annual Conference of the German Society for Cytometry – Leipzig; p. 61 (2009).

DAHMEN V, KRIEHUBER R. DNA-Triplex-forming-oligonucleotides as a tool to target specific DNA sequences. Third European IRPA Congress, Helsinki, Finland, June 14th – June 18th, Abstract Book, p. 21 (2010)

UNVERRICHT M, GIESEN U, KÜMMERLE E, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Genotoxicity of I-123-iododeoxyuridine in vitro. 13th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research –GBS 2010, Hamburg, Sept 1st – Sept 2nd, Abstract Book, p. 46 (2010)

DAHMEN V, KRIEHUBER R. 125I-Labelled Triplex-forming-oligonucleotides: Studies on intracellular distribution and on gene expression alterations of target genes. 13. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Hamburg, Deutschland, Tagungsband; p. 43 (2010)

KNOPS K, BOLDT S, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Radiation responsive genes in human lymphocytes as a tool for radiation biodosimetry, 13. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), Hamburg, Deutschland, Tagungsband; p. 28 (2010)

DAHMEN V, KRIEHUBER R. Targeting specific DNA sequences with 125I-Labeled Triplex-forming-oligonucleotides. 38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (ERRS). Stockholm, Sweden, Abstract book; p. 168 (2010)

UNVERRICHT M, GIESEN U, KÜMMERLE E, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Genotoxicity of I-123-iododeoxyuridine in vitro. 38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, Sept 5th – Sept 9th, Abstract Book, p. 218 (2010)

BOLDT S, KNOPS K, KRIEHUBER R, WOLKENHAUER O. A p-value and fold-change-driven gene selection method for radiation dose prediction, EPRBioDose 2010, Mandelieu-La-Napoule, France, Abstract Book, p. 193 (2010)

BRZOZOWSKA K, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes and hTERT-RPE1 cell line after exposure to I-125-UdR. 7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes 2011, Jülich, Germany, August 24th - 26th 2011, Abstract Book, p. 44 (2011).

DAHMEN V, KRIEHUBER R. Cytotoxic effects and specific gene expression alterations induced by I-125-labelled Triplex-forming oligonucleotides. 7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes 2011, Jülich, Germany, August 24th - 26th 2011, Abstract Book, p.45 (2011)

OSKAMP D, JAEGER A, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Characterization of cell cycle perturbances in SCL-II cells after exposure to the auger electron emitter I-125. 7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes 2011, Jülich, Germany, August 24th - 26th 2011, Abstract Book, p.47 (2011).

UNVERRICHT-YEBOAH M, BOLDT S, GIESEN U, POMPLUN E, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Whole genome expression analysis in human Jurkat cells after exposure to I-123-iododeoxyuridine, γ-rays and α-particles. 7th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes 2011, Jülich, Germany, August 24th - 26th 2011, Abstract Book, p.48 (2011)

BRZOZOWSKA K, POMPLUN E. KRIEHUBER R. Chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes and hTERT-RPE1 cell line after exposure to the Auger electron emitter I-125. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, August 28th – September 1st 2011, Abstract Book, p. 152 (2011).

DAHMEN V, KRIEHUBER R. Iodine-125-labeled Triplex-forming Oligonucleotides: Studies on cytotoxicity of multi-binding-site TFOs and on specific gene expression alterations caused by single-binding-site TFOs. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, August 28th – September 1st 2011, Abstract Book, p. 250 (2011).

KRIEHUBER R, JAEGER A, KÜMMERLE E, OSKAMP D, UNVERRICHT-YEBOAH M, POMPLUN E. A comparative study on the cyto- and genotoxicity of I-123 and I-125-UdR in-vitro. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, August 28th – September 1st 2011, Abstract Book, p. 327 (2011).

KNOPS K, BOLDT S. WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Identification of radiation-specific gene expression changes in human PBL after ex vivo irradiation suitable for biodosimetric applications. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, August 28th – September 1st 2011, Abstract Book, p.84 (2011).

UNVERRICHT-YEBOAH M, BOLDT S, GIESEN U, POMPLUN E, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Gene expression analysis in Jurkat cells after exposure to I-123-iododeoxyuridine, γ-rays and α-particles. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, August 28th – September 1st 2011, Abstract Book, p. 220 (2011).

BRZOZOWSKA K, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes and hTERT-RPE1 cell line after exposure to the Auger electron emitter I-125. 14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Köln/Rheinbach, Abstract Book, p. 54 (2011)

DAHMEN V, KRIEHUBER R. Triplex-forming oligonucleotides as a carrier for Auger Electron Emitter: Studies in cytotoxicity and on specific gene expression alterations caused by I-125-labelled TFOs. 14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Köln/Rheinbach, Abstract Book, p. 55 (2011)

KNOPS K, BOLDT S, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Radiation-specific gene expression changes in human PBL after ex vivo irradiation suitable for radiation biodosimetry. 14th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Köln/Rheinbach, p. 95 (2011)

OSKAMP D, JAEGER A, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Characterization of cell cycle perturbances in SCL-II cells after exposure to the Auger electron emitter I-125. 14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Köln/Rheinbach, Abstract Book, p. 68 (2011)

UNVERRICHT M, BOLDT S, GIESEN U, POMPLUN E, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Whole genome expression analysis in human Jurkat cells after exposure to I-123-iododeoxyuridine, γ-rays and α-particles. 14th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Köln/Rheinbach, p. 119 (2011)

DAHMEN V, KRIEHUBER R. DNA-Triplex-forming-oligonucleotides as a tool to target specific DNA sequences. Third European IRPA Congress, Congress Proceedings, ISBN 978-952-478-551-8 published by STUK – Radiation and Nuclear Safety Authority, Finland and Nordic Society for Radiation Protection; 74-81 (2011)

KNOPS K, BOLDT S, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Time-dependent Gene Expression Analysis in Human Peripheral Blood Lymphocytes for Biodosimetric Applications after Low and High Dose Gamma-Irradiation. 13th International Congress of the International Radiation Protection Association (IRPA), Glasgow, UK, 13.-18. May 2012; p.76 (2012)

DAHMEN V, KRIEHUBER R. Cytotoxicity and induction of cell cycle arrest in SCL-II cells after transfection with I-125 labeled Triplex-Forming Oligonucleotides. 15. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, München, Abstract Book, p. 119 (2012)

UNVERRICHT-YEBOAH M, OSKAMP D, KRIEHUBER R. Characterization of cell cycle perturbances after exposure to I-123-iododeoxyuridine. 15th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, München, Abstract book p. 117, (2012)

KNOPS K, BOLDT S, WOLKENHAUER O, KRIEHUBER R. Gene expression analysis in human peripheral blood lymphocytes for biodosimetric applications after low and high dose gamma-irradiation. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Abstract Book, p. 136, (2012)

SCHMITZ S, OSKAMP D, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Analysis of 125I-induced chromosome aberrations 17th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research (GBS), Tübingen, Abstract Book p. 49 (2014)

DAHMEN V, REITER S, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Iodine-125-labeled DNA-Triplex-forming oligonucleotides show increased cyto- and genotoxic effectiveness compared to Phosphorus-32. 17th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Tübingen, Abstract book, p. 51 (2014)

UNVERRICHT-YEBOAH M, GIESEN U, POMPLUN E, KRIEHUBER, R. Comparative analysis of gene expression data after exposure to I-123-iododeoxyuridine, γ-rays and α-particles. 17th Annual Meeting of the German Society for Biological Radiation Research, Tübingen, Abstract book, p. 61 (2014)

DAHMEN V, REITER S, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Comparative study on the cyto- and genotoxicity of Auger electron- versus ß-emitter-labeled DNA-Triplex-forming oligonucleotide. 41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Rhodes, Greece, Abstract Book, p. 136 (2014)

UNVERRICHT-YEBOAH M, GIESEN U, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Genotoxicity of Iodine-123 labeled 5-Iodo-2´-deoxyuridine in comparison to high- and low-LET radiation. 8th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Processes, Nara, Japan (2015)

SCHMITZ S, OSKAMP D, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Chromosome aberrations induced by the Auger electron emitter I-125. 8th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and Medical Aspects of Auger Process, Nara, Japan, (2015)

UNVERRICHT-YEBOAH M, GIESEN U, POMPLUN E, KRIEHUBER, R. Genotoxicity of the Auger electron emitter I-123-iododeoxyuridine in comparison to high- and low-LET radiation. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan, May 25th – 29th; Abstract Book, p. 139 (2015).

DAHMEN V, REITER S, POMPLUN E, KRIEHUBER R. Iodine-125-labeled DNA-Triplex-forming oligonucleotides reveal enhanced cyto- and genotoxic effectiveness compared to Phosphorus-32. 15th International Congress of Radiation Research, Kyoto, Japan, May 25th – 29th; Abstract Book, p. 108 (2015).

## 7. Referenzen

Amundson, S. A., Do, K. T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. & Fornace, A. J., Jr. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. Radiat Res, 2000. 154, 342-346.

Boldt S, Knops K, Kriehuber R, Wolkenhauer O. A frequency-based gene selection method to identify robust biomarkers for radiation dose prediction, Int J Radiat Biol, 2012. Mar; 88(3), 267-76

Dahmen V, Kriehuber R. Cytotoxic effects and specific gene expression alterations induced by I-125-labeled triplex-forming oligonucleotides. Int J Radiat Biol., 2012, Dec; 88(12):972-9

Dahmen, Volker, I-125-labeled Triplex-Forming-oligonucleotides: Studies on intracellular distribution, cytotoxicity and on gene expression alterations of target genes, Dissertationsschrift; Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen, 2013. 1 – 110.

Kang, C. M., Park, K. P., Song, J. E., Jeoung, D. I., Cho, C. K., Kim, T. H., Bae, S., Lee, S. J. & Lee, Y. S. Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. Radiat Res, 2003.159, 312-319.

Knops, Katja, Genexpressionsanalysen in humanen peripheren Blutlymphozyten nach Bestrahlung - Grundlagen für biodosimetrische Applikationen, Dissertationsschrift; Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen, 2012. 1-148.

Knops K, Boldt S, Wolkenhauer O, Kriehuber R. Gene expression in low- and high-dose-irradiated human peripheral blood lymphocytes: possible applications for biodosimetry. Radiat Res. 2012. Oct;178(4):304-12

Panyutin, I. G. & Neumann, R. D.. Sequence-specific DNA breaks produced by triplex-directed decay of iodine-125. Acta Oncol, 1996. 35(7):817–823.

Panyutin, I. G.; Winters, T. A.; Feinendegen, L. E.; and Neumann R. D.. Development of DNA-based radiopharmaceuticals carrying Auger-electron emitters for anti-gene radiotherapy. Q J Nucl Med, 2000. 44(3):256–267.

Panyutin, I. V.; Sedelnikova, O. A.; Bonner, W. M.; Panyutin, I. G.; and Neumann, R. D. DNA damage produced by 125I-triplex-forming oligonucleotides as a measure of their successful delivery into cell nuclei. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1058:140–150.

Paul, S. & Amundson, S. A. Development of gene expression signatures for practical radiation biodosimetry. International journal of radiation oncology, biology, physics, 2008. 71, 1236-1244.

Sedelnikova, O. A.; Panyutin, I. G.; Luu, A. N.; Reed, M. W.; Licht, T.; Gottesman, M. M.; and R. D. Neumann. Targeting the human mdr1 gene by 125I-labeled triplex-forming oligonucleotides. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2000. 10(6):443–452.

Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P.; Panyutin, I.G.; and Bonner, W.M. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. Radiat Res, 2002. 158(4): p. 486-92.

Sedelnikova, O. A.; Panyutin, I. V.; Neumann, R. D.; Bonner W. M.; and Panyutin I. G.. Assessment of DNA damage produced by 125I-triplex-forming oligonucleotides in cells. Int J Radiat Biol, 2004. 80(11-12):927–931.

Sokolov, M., I.G. Panyutin, and R. Neumann, Genome-wide gene expression changes in normal human fibroblasts in response to low-let gamma-radiation and high-let-like (125)IUdR exposures. Radiation Protection Dosimetry, 2006a. 122(1-4): p. 195-201

Sokolov, M.V., N.A. Smimova, R.D. Camerini-Otero, R.D. Neumann, and I.G. Panyutin, Microarray analysis of differentially expressed genes after exposure of normal human fibroblasts to ionizing radiation from an external source and from DNA-incorporated iodine-125 radionuclide. Gene, 2006b. 382: p. 47-56.

Unverricht-Yeboah, Marcus, Analyse der Genexpression und Charakterisierung der biologischen Wirkung in der humanen T-Lymphom-Zelllinie Jurkat nach Exposition mit verschiedenen Strahlenqualitäten, Dissertationsschrift; Fakultät Biologie, Universität Duisburg-Essen, 2015. 1 – 143.

# Berichtsblatt

| | |
|---|---|
| 1. ISBN oder ISSN<br>geplant | 2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung)<br>Schlussbericht |
| 3. Titel<br>Biodosimetrie: Ein systembiologischer Ansatz für die Strahlenbiodosimetrie und die Analyse der individuellen Strahlensensitivität - Identifizierung charakteristischer Gen- und Protein¬expressionsmuster zum Zwecke der biologischen Dosimetrie | |
| 4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]<br>Kriehuber, Ralf | 5. Abschlussdatum des Vorhabens<br>31.12.2014 |
| | 6. Veröffentlichungsdatum<br>noch nicht bekannt |
| | 7. Form der Publikation<br>Bericht |
| 8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)<br>Forschungszentrum Jülich GmbH,<br>Geschäftsbereich Sicherheit und<br>Strahlenschutz, 52425 Jülich | 9. Ber. Nr. Durchführende Institution |
| | 10. Förderkennzeichen<br>02NUK005A |
| | 11. Seitenzahl<br>26 |
| 12. Fördernde Institution (Name, Adresse)<br><br>Bundesministerium für<br>Bildung und Forschung (BMBF)<br><br>53170 Bonn | 13. Literaturangaben<br>17 |
| | 14. Tabellen<br>2 |
| | 15. Abbildungen<br>7 |
| 16. Zusätzliche Angaben<br>- entfällt - | |
| 17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)<br>- entfällt - | |

18. Kurzfassung

Die Gen- und Proteinexpression in primären humanen Zellen und Zelllinien sollen mit dem Ziel hin untersucht und analysiert werden, Gen- und Proteinexpressionsmuster zu identifizieren, die es zum einen ermöglichen, die Dosis einer vorausgegangenen Strahlenexposition schnell und zuverlässig abzuschätzen und zum anderen erlauben, Aussagen über die Strahlenqualität zu treffen. Die Beschreibung und das Verständnis der Interaktion der beteiligten Signaltransduktionswege soll zudem erlauben, Schlüsselgene zu identifizieren, die eine zeitlich lang andauernde oder verzögert auftretende strahlendosis- und/oder strahlenqualitätsabhängige Expressionsänderung oder Aktivierungsänderung ihrer Genprodukte aufweisen und hierüber zu einem besseren Verständnis der molekularbiologischen Grundlagen der zellulären Strahlenwirkung führen. Ein spezielles Interesse gilt hier den Auger-Elektronen, deren biologische Wirkung bislang nicht adäquat in einem Qualitätsfaktor abgebildet ist, da die biologischen Wirkmechanismen weitgehend unverstanden und zudem konventionelle Dosimetriekonzepte nicht anwendbar sind. Die vergleichenden Untersuchungen verschiedener Strahlenqualitäten hinsichtlich der Veränderungen der Genexpression sollen somit auch zu einem besseren Verständnis der biologischen Wirkung von Auger-Elektronen-Emittern (AEE) führen. Mittels systembiologischen und bioinformatischen Ansätzen ist es gelungen, kleine Gensets in humanen Blutlymphozyten zu identifizieren, die unabhängig vom Zeitpunkt nach γ-Bestrahlung, erlauben, die Strahlendosis mit sehr guter Genauigkeit abzuschätzen und somit prinzipiell für die biodosimetrische Anwendung geeignet sind. Die Analyse, in welchen biologischen Prozessen und Signalwegen die deregulierten Gene verankert sind, ergab, dass, neben „strahlentypischen“ Prozessen, der Prozess „Nucleosome asembly“ involviert und die Signalwege „cytokine-cytokine receptor interaction“ sowie „systemic lupus erythema-tosus“ überrepräsentiert waren. Bereits niedrige Strahlendosen (20 und 100 mGy) bewirken in humanen Blutlymphozyten, im Vergleich zu Hochdosisbestrahlung (0,5 - 4 Gy), signifikante Genexpressionsänderungen, wobei 105 der 144 detektierten Gene ausschließlich nach Niedrigdosisexposition signifikant dereguliert waren, was auf eine exklusive Zellantwort im Niedrigdosisbereich hindeutet. Erstmalig konnten Kandidatengene identifiziert wer-den, die mittels Genexpressionsänderung die Diskriminierung der drei Strahlenqualitäten γ-, α-Strahlung und AEE-Exposition erlauben. DNA-assoziierte Auger Elektronen Emitter (AEE) bewirken charakteristische Genexpressionsänderungen. Zielgerichtet mittels AEE-markierten DNA-Triplex-bildenden-Oligonukleotiden induzieren sie lokale sequenzspezifische DNA Doppelstrangbrüche sowie Genexpressionsänderungen in Target-Genen und besitzen eine sehr hohe Zyto- und Gentoxizität.

| | |
|---|---|
| 19. Schlagwörter<br>- Biodosimetrie, - Genexppressionsänderungen nach Bestrahlung, - Auger-Elektronen-Emitter | |
| 20. Verlag<br>- entfällt - | 21. Preis<br>- entfällt - |