

## **Zusammenfassung**

Tilman Rackwitz

Dr. med.

### **Integrative Proteom- und Transkriptomanalyse der zellulären Antwort auf Photonen- und Kohlenstoffionenbestrahlung**

Fach: Radiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Debus

Krebserkrankungen sind heutzutage neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in Industrienationen. In der aktuellen klinischen Therapie von Krebserkrankungen hat sich die Strahlentherapie neben der klassischen Tumor Chirurgie, der Chemotherapie und der Immuntherapie als eine der vier wichtigen Säulen in der Krebsbehandlung etabliert. Die Strahlentherapie nutzt die ionisierende Wirkung von Strahlen aus, um gezielt Schäden im Erbgut der Tumorzellen zu erzeugen und diese am Wachstum zu hindern.

Zu den molekularen Mechanismen der Strahlentherapie gab es in der Vergangenheit eine Vielzahl von Untersuchungen, die sich jedoch meist auf kurz nach der Bestrahlung auftretende Effekte wie DNA-Schäden konzentrierten. Es zeigte sich jedoch, dass auch langfristige Effekte wie die entstehende Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle bei der Therapie spielen. Deshalb hatte diese Dissertation zum Ziel, neben der frühen auch die späte zelluläre Reaktion nach der Bestrahlung mit Photonen sowie den neu etablierten Kohlenstoffionen sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene zu untersuchen.

Für alle Untersuchungen wurde eine humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzelllinie verwendet. Mithilfe von immunhistologischen Färbungen der Proteine 53BP1, einem bekannten Marker für DNA-Schäden, sowie ICAM1 als Surrogat für die inflammatorische Reaktion wurde eine Kinetik erstellt, um einen repräsentativen frühen und späten Zeitpunkt auszuwählen. Hierbei erwiesen sich zwei Stunden nach Bestrahlung als früher Zeitpunkt und sechs Tage nach Bestrahlung als später Zeitpunkt am besten geeignet.

Zu beiden Zeitpunkten wurde eine Untersuchung des Transkriptoms mithilfe eines Microarrays und eine Validierung mittels quantitativer Real-Time PCR durchgeführt. Die aus diesen Untersuchungen gewonnenen Daten wurden mithilfe von Analysesoftware für Hochdurchsatz-Daten statistisch ausgewertet. 783 Gene waren ausschließlich zum frühen Zeitpunkt, 777 Gene ausschließlich zum späten Zeitpunkt und 144 Gene zu beiden Zeitpunkten signifikant hochreguliert. Ein Vergleich anhand der funktionellen Gen-Ontologien ergab, dass zum frühen

Zeitpunkt vor allem Gene mit Bezug zur zellulären Stressreaktion angereichert waren, zum späten Zeitpunkt hingegen Veränderungen in Bezug auf die interzelluläre Kommunikation wie die Rezeptoraktivität überwogen.

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden zunächst die durch eine Proteomfraktionierung gewonnene nukleäre Fraktion sowie die Membranfraktion nach Bestrahlung mit Photonen massenspektrometrisch analysiert. Hier war besonders auffällig, dass zum späten Zeitpunkt in der Membranfraktion viele Proteine des Spliceosoms stark herunterreguliert waren.

Um die Proteomdaten mit den Transkriptomdaten besser vergleichen zu können, wurden im weiteren Verlauf Gesamtproteinlysate massenspektrometrisch nach Bestrahlung mit Photonen und Kohlenstoffionen zum frühen und späten Zeitpunkt untersucht. Da sich bei der Auswertung herausstellte, dass sowohl bei den Genexpressionsdaten als auch bei den Proteomdaten kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Kohlenstoffionen und den mit Photonen bestrahlten Proben bestand, wurde im weiteren Verlauf nicht mehr zwischen den beiden Bestrahlungsarten unterschieden.

Auf Proteomebene waren zum frühen Zeitpunkt überwiegend Proteine des Zytoskeletts wie die Actin- und Intermediärfilamente hochreguliert. Zum späten Zeitpunkt waren es Prozesse aus den Gebieten der Immunantwort, Zelladhäsion, Ausbildung von Blutgefäßen und apoptotische Prozesse, die zum frühen Zeitpunkt noch keine Rolle spielten. Hier zeigte sich ähnlich wie auf der Genexpressionsebene, dass vor allem zum späten Zeitpunkt die Veränderung der Zelladhäsion und die angiogenetischen Prozesse überwogen.

Ein Vergleich zwischen den Transkriptom- und Proteomdaten zum späten Zeitpunkt ergab, dass 838 mRNAs exklusiv im Transkriptom bzw. 157 Proteine exklusiv im Proteom signifikant hochreguliert waren. Es gab 83 Übereinstimmungen auf Transkriptom- und Proteomebene. Dort zeigten sich nochmals wichtige Mitspieler der Zelladhäsion wie ICAM1 und CD9 sowie mehrere Matrix-Metalloproteinasen wie MMP14, die für den Umbau der extrazellulären Matrix verantwortlich sind und so die Veränderungen des Zellmilieus nach Bestrahlung beeinflussen. Ebenfalls unter den Proteinen war die Kollagen XVIII NC1-Domäne (Endostatin), welche einen effektiven Inhibitor der Angiogenese darstellt und damit ein möglicher Kandidat für die Therapie von Tumoren ist.

Wie hier gezeigt wurde, bietet die integrative Analyse mittels Hochdurchsatzmethoden wie dem Microarray und der quantitativen Massenspektrometrie einen vielversprechenden Ansatz, um die zellulären Veränderungen, die nach einer Bestrahlung auftreten, besser zu verstehen.