

**Medizinische Fakultät**

**der**

**Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Klinik Pädiatrie III

Hämatologie/Onkologie, Pulmologie und Kardiologie

Charakterisierung der Strahlensensitivität von Neuroblastomzellen in

Abhängigkeit vom TrkA / TrkB Status

-Identifizierung von Zielgenen durch Erstellung von  
Expressionsprofilen-

**I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Daniela Schneider, geb. Dobrzinski

aus Gladbeck

2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. A. Eggert

2. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. V. Jendrossek

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2010

**PUBLIKATIONEN:**

Schulte JH, **Dobrzinski D**, Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Schramm A, Stephan H, Klein-Hitpass L, Havers W, Pfeiffer P, Eggert A. Differential effects of TrkA or TrkB expression on DNA repair capacity might contribute to the genomic stability of SY5Y neuroblastoma cells. Vortrag, 17. Kind-Philipp-Tagung für Leukämieforschung, Wilsede, 09.-12.6.04. *Klinische Pädiatrie* 216, S. 209.

Schulte JH, **Dobrzinski D**, Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Schramm A, Stephan H, Klein-Hitpass L, Havers W, Pfeiffer P, Eggert A. Differential effects of TrkA or TrkB expression on DNA repair capacity might contribute to the genomic stability of SY5Y neuroblastoma cells. Vortrag, International Symposium "Advances in Neuroblastoma Research", Genua, Italien, 16.-19.6.04.

Schulte JH, **Dobrzinski D**, Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Schramm A, Stephan H, Klein-Hitpass L, Havers W, Pfeiffer P, Eggert A. Differential effects of TrkA or TrkB expression on DNA repair capacity might contribute to the genomic stability of SY5Y neuroblastoma cells. Posterpräsentation, SIOP (International Society of Pediatric Oncology) Meeting, Oslo, Norwegen, 16.-19.09.04. *Pediatric Blood & Cancer* 43, S. 382.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 DAS NEUROBLASTOM</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 DEFINITION .....	7
1.1.2 EPIDEMIOLOGIE .....	8
1.1.3 EMBRYOLOGIE .....	8
1.1.4 NEURONALE DIFFERENZIERUNG UND SIGNALWEGE DER NEUROTROPHINREZEPTOREN .....	8
1.1.5 DNA-INDEX.....	11
1.1.6 MYCN-AMPLIFIKATION .....	12
1.1.7 CHROMOSOMENVERÄNDERUNGEN .....	12
1.1.8 HISTOPATHOLOGIE .....	13
1.1.9 STADIENEINTEILUNG DES NEUROBLASTOMS .....	14
1.1.10 KLINIK.....	15
1.1.11 DIAGNOSTIK .....	16
1.1.12 PROGNOSE .....	17
1.1.13 THERAPIE.....	17
<b>1.2 FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 MATERIALIEN</b> .....	<b>22</b>
2.1.1 CHEMIKALIEN .....	22
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	23
2.1.3 GERÄTE.....	24
2.1.4 SONSTIGES MATERIAL.....	24
2.1.5 VERWENDETE SOFTWARE .....	24
2.1.6 VERWENDETE KITS .....	24
<b>2.2 METHODEN</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 ZELLKULTUR .....	25

2.2.2 ZÄHLEN DER ZELLEN MIT DEM COULTER COUNTER® .....	26
2.2.3 STIMULATION DER ZELLEN .....	26
2.2.4 BESTRAHLUNG .....	26
2.2.5 LYSIEREN DER ZELLEN.....	27
2.2.6 RNA-ISOLIERUNG.....	27
2.2.7 MICROARRAY-ANALYSE .....	28
2.2.8 STATISTISCHE ANALYSE DER GENCHIP ERGEBNISSE.....	29
3. ERGEBNISSE .....	31
3.1 BESTIMMUNG DER OPTIMALEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN FÜR SY5Y ZELLEN ZUR NACHFOLGENDEN BESTRAHLUNG.....	31
3.2 CHIP AUSWERTUNGEN .....	34
3.2.1 NORMALISIERUNG.....	34
3.2.1.1 LOW LEVEL ANALYSE .....	34
3.2.1.2 QUALITÄTSKONTROLLE .....	34
3.3 HIGH LEVEL ANALYSE .....	39
3.3.1 FILTERKRITERIEN FÜR DIE ANALYSE .....	39
3.3.2 GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN UNBESTRAHLTEN ZELLEN BEDINGT DURCH TRK- STATUS IN AN-UND ABWESENHEIT VON LIGANDEN (ANOVA) .....	39
3.3.3 GENEXPRESSIONSMUSTER IN UNBESTRAHLTEN ZELLEN IN ABWESENHEIT VON LIGANDEN .....	41
3.3.4 IDENTIFIKATION VON EXPRESSIONSUNTERSCHIEDEN IM ZEITVERLAUF NACH BESTRAHLUNG BEDINGT DURCH DEN TRK-STATUS IN ABWESENHEIT VON LIGANDEN .....	43
3.3.5 IDENTIFIKATION VON GENERELLEN TRK-STATUS UNABHÄNGIGEN GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN NACH BESTRAHLUNG IN AN- UND ABWESENHEIT VON LIGANDEN .....	44
3.3.6 IDENTIFIKATION TRK-STATUS SPEZIFISCHER GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN NACH BESTRAHLUNG IN AN-UND ABWESENHEIT VON LIGANDEN .....	46
4. DISKUSSION .....	47

<b>4.1 GENEXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN UNBESTRAHLTEN ZELLEN BEDINGT DURCH TRK-STATUS IN AN-UND ABWESENHEIT VON LIGANDEN.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 GENEXPRESSIONSMUSTER IN UNBESTRAHLTEN ZELLEN IN ABWESENHEIT VON LIGANDEN UND IDENTIFIKATION VON EXPRESSIONSUNTERSCHIEDEN IM ZEITVERLAUF NACH BESTRAHLUNG BEDINGT DURCH TRK-STATUS IN ABWESENHEIT VON LIGANDEN .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 IDENTIFIKATION VON GENERELLEN GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN NACH BESTRAHLUNG .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 IDENTIFIKATION TRK-STATUS SPEZIFISCHER GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN NACH BESTRAHLUNG.....</b>	<b>51</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>53</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>54</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>61</b>
<b>VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN.....</b>	<b>63</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>64</b>
<b>ANHANG 1.....</b>	<b>66</b>
<b>ANHANG 2.....</b>	<b>78</b>
<b>ANHANG 3.....</b>	<b>86</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>88</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Neuroblastom

#### 1.1.1 Definition

Bei einem Neuroblastom handelt es sich um einen embryonalen Tumor, der sich während der Embryonal- und Fetalperiode aus sympathoadrenergen Neuronen der Neuralleiste entwickelt. Erstmals wurde das Neuroblastom 1865 von Virchow beschrieben. Die Genese aus sympathischen Nervenzellen der Neuralleiste konnte 1891 von Marchand nachgewiesen werden. Der Begriff „Neuroblastom“ wurde aber erst 1910 von Wright geprägt (Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29, 1997).

In Abhängigkeit von ihrer histologischen Differenzierung werden drei neuroblastische Tumoren unterschieden: das Neuroblastom, das Ganglioneuroblastom und das Ganglioneurom als benigne differenzierte Form dieses Tumors (Shimada, H., 1984). Die Hauptlokalisation dieser Tumoren ist entlang der Ausdehnung des sympathischen Nervensystems im Hals-Thorax-Bereich, dem Abdomen, der Nebenniere und dem Becken.

Eine Besonderheit dieses Tumortyps sind die so genannten *in-situ* Tumoren, die erstmalig 1963 von Beckwith und Perrin nachgewiesen wurden (Beckwith, J.B., 1963). Diese müssen makroskopisch nicht imponieren und rufen keine klinischen Symptome hervor, sind histologisch aber nicht von einem Neuroblastom zu unterscheiden. Sie bilden sich im Laufe der Entwicklung komplett zurück und sind schließlich nicht mehr nachweisbar. Man geht davon aus, dass die Inzidenz von *in-situ* Neuroblastomen ungefähr 50mal höher ist als die Inzidenz klinisch symptomatischer Neuroblastome (Beckwith, J.B., 1968).

Tumoren, die klinisch symptomatisch werden, unterscheiden sich stark in ihrer Prognose und weiteren Entwicklung. Dabei sind vor allem drei klinische Verlaufsformen zu beobachten: die schnelle und lebensbedrohliche Progression, die Ausreifung zu einem Ganglioneuroblastom oder Ganglioneurom, sowie, ähnlich den *in-situ* Tumoren, die spontane Regression. Die Häufigkeit spontaner Regressionen ist beim Neuroblastom um ein Vielfaches höher als bei anderen Tumoren (Pritchard, J., 1994).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle maligne solide Tumor im Kindesalter (8-10% aller kindlichen Neoplasien). Der Tumor betrifft besonders Säuglinge und Kleinkinder. Pro Jahr treten ca. 6,1 Fälle /100.000 Säuglinge auf. 90% der Fälle werden in den ersten fünf Lebensjahren diagnostiziert. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung liegt bei ca. 18 Monaten. In der gesamten Bundesrepublik Deutschland treten jährlich ungefähr 150 Neuerkrankungen auf.

### **1.1.3 Embryologie**

Während der Embryonalperiode wandern die noch pluripotenten Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems aus der Neuralleiste aus. Diese Zellen differenzieren sich im Verlauf zu den definitiven Zellen des sympathischen Nervensystems. In der 6.-8. Woche wandern einige dieser Zellen in das spätere Retroperitoneum ein und bilden dort das prävertebrale, juxta-adrenale sympathische Gewebe sowie Anteile des Nebennierenmarks. Dabei handelt es sich, mit Ausnahme der Zellen des Nebennierenmarks, um sogenannte Paraganglien, die das embryonale sympathische Nervensystem darstellen. Nach der Geburt involuieren die Paraganglien, während die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks bis zum dritten Lebensjahr ihre größte Expansionsaktivität aufweisen. Man nimmt an, dass sich aus eben diesen, überall lokalisierten chromaffinen Zellen durch molekulargenetische Veränderungen Neuroblastome entwickeln. Dafür sprechen die typischen Lokalisationsorte der Neuroblastome, sowie phänotypische und molekulargenetische Gemeinsamkeiten von sympathischem Nervengewebe und Neuroblastomen.

### **1.1.4 Neuronale Differenzierung und Signalwege der Neurotrophinrezeptoren**

Bei der Ausdifferenzierung unreifer sympathischer Neuroblasten, aber auch während der Entwicklung von Neuroblastomen werden zelluläre Prozesse wie Apoptose und Differenzierung von neuronalen Wachstumsfaktoren, den Neurotrophinen, gesteuert. Dazu gehören der „nerve growth factor“ (NGF), sowie der „brain derived growth factor“ (BDNF), außerdem das Neurotrophin 3 (NT3) und



das Neurotrophin 4/5. Die Neurotrophine aktivieren als Liganden spezifisch bestimmte Rezeptoren aus der Trk (Tropomyosin-related Kinase)-Familie.

Bei der neuronalen Ausdifferenzierung des menschlichen Nervensystems sind die Tyrosinkinase-Rezeptoren für die Ausdifferenzierung zu Neuronen des Nebennierenmarks und zu sympathischen Ganglien und Neuronen zuständig. Der Aufbau aller Trk-Rezeptoren ist ähnlich: Der spezifische Ligand bindet an eine extrazellulär gelegene Domäne. Über seinen transmembranen Anteil ist der Rezeptor verankert. Dieser stellt gleichzeitig die Verbindung zur intrazellulären Kinasedomäne dar. Bindet der spezifische Ligand an die extrazelluläre Domäne, kommt es zur Dimerisation des Rezeptorproteins. Durch die Dimerisierung kommt es zur Autophosphorylierung spezifischer Aminosäuren. Diese Autophosphorylierung bewirkt die Signaltransduktion über die Phosphorylierung weiterer Adapter und „second messenger“ Proteine. Die Hauptsignalwege der Trk Rezeptoren sind der PI3K/Akt- und der Ras/MAPK/Erk Signalweg, die über das Adapterprotein Shc vermittelt werden, sowie der PLC $\gamma$ -Signalweg (Abb.1) ( Segal R., 2003)

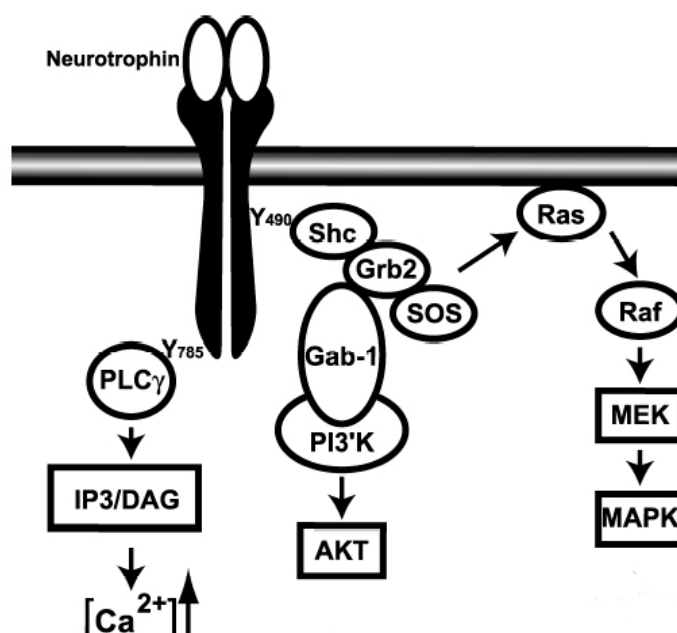


Abb.1: Signaltransduktion der Trk-Rezeptoren: Nach Ligandenbindung findet eine Dimerisierung und Autophosphorylierung der Neurotrophinrezeptoren der Trk-Familie statt. Die intrazelluläre Signaltransduktion wird über den PI3K/AKT, den Ras/MAPK/Erk und den PLC $\gamma$ -Signalweg vermittelt. Wichtig für die Aktivierung von PLC $\gamma$  bzw. des Adapterproteins Shc sind die Tyrosin-Reste Y490 und Y785 (Abb. angepasst aus Segal 2003)

**TrkA**, ein 140 kDa (kilo Dalton) großes Protein mit Tyrosinkinaseaktivität, bindet spezifisch **NGF** und wird häufig gemeinsam mit dem 75 kDa großen Protein p75NGFR, dem so genannten „low affinity nerve growth factor receptor“, exprimiert.

Eine hohe Expression von TrkA auf Neuroblastomzellen ist mit einer guten Prognose und mit einem niedrigen Erkrankungsstadium assoziiert (Abb. 2a) (Kogner, P., 1993, Nakagawara et al, 1993). Biologisch führt die Expression von TrkA zu einer Differenzierung und Wachstumshemmung der Zellen, zu einer Inhibition von Angiogenese oder zu vermehrter Apoptose der Zellen in Abwesenheit des Liganden (Abb.2b) (Eggert A. et al., 2000) (Eggert A. et al., 2002). Neben der Expression von TrkA findet sich auf anderen Neuroblastomzellen aber auch eine Expression von **TrkB** oder **TrkC**, die ebenfalls zur Trk-Rezeptorfamilie gehören (Abb. 2a). Diese beiden Rezeptoren können in ihrer vollen Form oder als trunkierte Rezeptoren, d.h. ohne Tyrosinkinaseaktivität, exprimiert werden. Eine hohe Expression des kompletten TrkB-Rezeptors findet sich vor allem auf biologisch und klinisch aggressiven Neuroblastomzellen und ist häufig mit einer Amplifikation des MYCN (Myelocytomatosis protein) -Onkogens und somit mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tanaka, T., 1995). Dabei kann man gleichzeitig eine **BDNF**- Expression beobachten, dies ist der spezifische Ligand für TrkB und bewirkt möglicherweise über einen auto- oder parakrinen Weg Wachstumsvorteile für den Tumor (Acheson A. et al., 1995), sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie (Abb. 2b) (Ho R. et al., 2002). Bei differenzierten Tumoren konnte eher die trunkierte Form des Rezeptors beobachtet werden. Die Expression von **TrkC** und seinem spezifischen Liganden NT3 (Neurotrophin 3) finden sich in Neuroblastomzellen fast ausschließlich in Zellen, die gleichzeitig TrkA exprimieren. Daher korreliert eine hohe TrkC-Expression mit guter Prognose und niedrigem Tumorstadium (Yamashiro et al, 1996, Ryden et al, 1996). Im Verlauf dieser Arbeit wird die biologische Funktion und Rolle von TrkC in Neuroblastomen vernachlässigt.

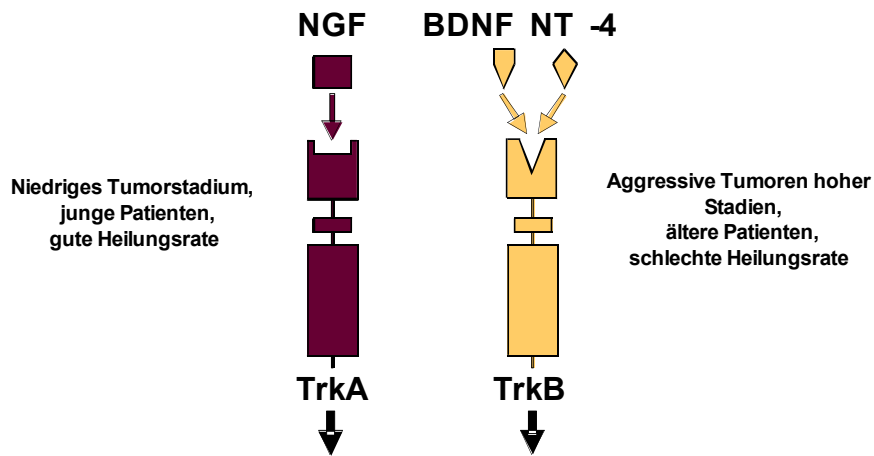


Abb. 2a: Klinische Bedeutung der Trk Rezeptoren A und B

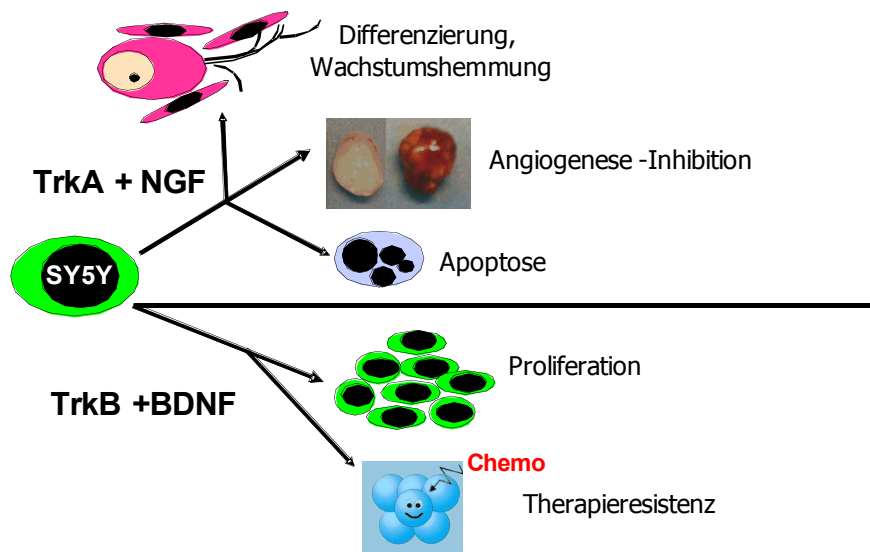


Abb. 2b: Biologische Bedeutung der Trk-Rezeptoren

### 1.1.5 DNA-Index

Ein weiterer prognostischer Faktor des Neuroblastoms ist der DNA (Desoxyribonucleinacid)-Gehalt der Tumorzellen. Dabei zeigen Säuglinge mit Tumoren mit diploidem und tetraploidem DNA-Gehalt häufig niedrigere

Tumorstadien. Aneuploider DNA-Gehalt ist hingegen mit fortgeschrittener Erkrankung verbunden (Look A. T. et al., 1984).

Treten aneuploide Tumoren bei älteren Kindern auf, zeigt sich dabei oft eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von strukturellen Veränderungen, wie z.B. Deletionen oder Genamplifikationen. Diese Patienten haben trotz der Aneuploidie keine günstige Prognose (Look A.T. et al., 1991).

### **1.1.6 MYCN-Amplifikation**

Eine MYCN-Genamplifikation findet sich bei ca. 25% aller Neuroblastome, während die restlichen Tumoren eine Einzelkopie des MYCN Gens (single-copy) aufweisen. Das Vorliegen einer MYCN-Amplifikation ist mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, einer raschen Tumorprogression und einer schlechten Prognose assoziiert (Brodeur G.M. et al., 1984). Die MYCN-Genamplifikation ist damit eine biologische Eigenheit einer Untergruppe aggressiver Neuroblastome. Besteht die MYCN-Amplifikation zum Diagnosezeitpunkt nicht, wird sie sich auch später nicht mehr entwickeln (Brodeur G.M. et al., 1987, Brodeur G.M. et al., 1997).

Hohe Spiegel an exprimierter MYCN RNA (Ribonucleinacid) bei fehlender MYCN-Amplifikation sind nicht prognostisch relevant für einen ungünstigen Krankheitsverlauf. Somit ist die Aussagekraft der reinen MYCN Expression bei fehlender MYCN-Amplifikation begrenzt (Cohn S.L. et al. 2000). Selten wird eine MYCN-Amplifikation in lokalisierten Tumoren gefunden. Auch in diesen Tumoren ist eine MYCN-Amplifikation dann häufig mit einer ungünstigen Prognose verbunden.

### **1.1.7 Chromosomenveränderungen**

In ca. 30-50% der primären Neuroblastome findet sich eine charakteristische zytogenetische Abnormalität, nämlich der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 (Brodeur G.M. et al., 1977). Betroffen ist die Region 1p36.2 – 1p36.3 (White P.S. et al., 1995). Auch die 1p Deletion geht mit einer schlechten Prognose einher. Desweiteren besteht bei diesen Tumoren häufig gleichzeitig eine MYCN-Amplifikation, ein diploider DNA-Gehalt, ein fortgeschrittenes

Tumorstadiumstadium und ein Patientenalter von über einem Jahr (Takeda O. et al., 1996). Es wird vermutet, dass der Verlust oder die Inaktivierung eines oder mehrerer bislang unbekannter Tumorsuppressorgene an diesem Locus eine kritische Rolle für die Progression eines Neuroblastoms spielen (Maris J.M. et al., 1995, Brodeur G.M. et al., 1997).

### **1.1.8 Histopathologie**

Als prognostische Kriterien für das Neuroblastom werden unterschiedliche histologische Klassifikationen herangezogen, wobei am häufigsten die Klassifikation nach Shimada verwendet wird (Shimada H. et al., 1984). Sie basiert auf dem Alter des Patienten und den folgenden histologischen Merkmalen: An- oder Abwesenheit von Schwannzell-Stroma, Grad der Differenzierung und Mitose-Karyorrhesis Index, welcher durch die Anzahl der Mitosen und Karyorrhesis pro 5000 Zellen definiert ist.

Das typische Neuroblastom besteht aus kleinen blauen uniformen Zellen mit hyperchromatischem Kern und nur wenig Zytoplasma. Das ausdifferenzierte Ganglioneurom besteht aus reifen Ganglienzellen und Schwannzellen. Das Ganglioneuroblastom enthält mehr als 50% Schwannzellstroma und histopathologische Merkmale, die sowohl das typische Neuroblastom als auch das reife Ganglioneurom widerspiegeln. Das Neuroblastom zählt zu den klein-blau-rundzelligen Tumoren, zu denen auch andere Tumoren des Kindesalters gezählt werden, wie z.B. das Ewing-Sarkom, Primitiv Neuroektodermale Tumoren und das Rhabdomyosarkom. Die immunhistologische Charakterisierung beruft sich vor allem auf das Vorhandensein der Neuronspezifischen Enolase (NSE), Neurofilament und Synaptophysin (Principles and Practices of Pediatric Oncology, 3.Edition, Chapter 29, 1997).

### 1.1.9 Stadieneinteilung des Neuroblastoms

Die Ausbreitung der Erkrankung wird als wichtiges klinisches Prognosekriterium herangezogen. Die Stadieneinteilung, die aktuell in Deutschland verwendet wird, erfolgt nach den internationalen INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System), das auf der Evans-Klassifikation beruhend fünf klinische Stadien definiert (Evans E. et al., 1971; Brodeur G. et al., 1993).

1	Tumor ist auf seinen Ursprungsort begrenzt Kein Lymphknotenbefall Vollständige chirurgische Entfernung möglich
2a	Tumor infiltriert Umgebung, keine Mittellinienüberschreitung Kein Lymphknotenbefall Keine vollständige chirurgische Entfernung möglich
2b	Tumor infiltriert Umgebung, keine Mittellinienüberschreitung Lymphknotenbefall Keine vollständige chirurgische Entfernung möglich
3	Tumor überschreitet Mittellinie Regionale Lymphnoten können beiderseits befallen sein
4	Disseminierung des Tumors in entfernte Lymphknoten: Hämatogene Fernmetastasen
4S	Sonderstellung, da nur Säuglinge betroffen: Lokalisierte Primärtumor mit Metastasierung beschränkt auf Leber, Haut und / oder Knochenmark Keine radiologisch nachweisbaren Fernmetastasen

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach den INSS-Kriterien

Aufgrund dieser Stadieneinteilung wird über den weiteren Therapieverlauf entschieden.

Beim Stadium 1 handelt es sich um lokalisierte, also auf ihren Ursprungsort begrenzte Tumoren, die durch Operation makroskopisch komplett entfernbar sind.

Bei Tumoren des Stadium 2 handelt es sich um unilateral begrenzte Tumoren, das heißt, sie haben in ihrer Ausdehnung die als Mittellinie definierte Wirbelsäule nicht überschritten. Dabei werden die Untergruppen 2a und 2b unterschieden. Diese Unterteilung richtet sich nach dem jeweiligen Lymphknotenbefall. Im Stadium 2a sind ipsi- und kontralaterale Lymphknoten histologisch frei von Tumorzellen, wohingegen im Stadium 2b die regionalen, ipsilateralen Lymphknoten befallen sind, während die kontralateralen Lymphknoten noch tumorfrei sind.

Tumoren des Stadium 3 sind dadurch definiert, dass sie nicht mehr resektabel sind und die Mittellinie deutlich überschritten haben. Außerdem zeigen sie einen ausgedehnten regionalen Lymphknotenbefall. Im Stadium 4 liegt bereits eine disseminierte Erkrankung mit Fernmetastasen vor. Das Neuroblastom metastasiert auf lymphogenem und hämatogenem Weg in Knochen, Knochenmark, Leber und Haut. Typisch ist auch die Lokalisation von Metastasen in der knöchernen Orbita. Selten finden sich Metastasen in der Lunge oder im Gehirn. Hirnmetastasen werden gewöhnlich als Manifestation eines Rezidivs oder als Endstadium der Erkrankung betrachtet.

Eine Sonderstellung bei der Stadieneinteilung nimmt das Stadium 4S ein. Es betrifft ausschließlich Säuglinge und zeichnet sich durch einen lokalisierten Primärtumor bei gleichzeitiger Metastasierung in Leber, Haut und Knochenmark aus (Neuroblastomstudie NB 97, Fassung vom 30.04.1997). Es findet sich allerdings nie eine Knochen-Metastasierung. Im Gegensatz zu den meist im höheren Kindesalter diagnostizierten Tumoren des Stadiums 4 zeigen diese Tumoren trotz Metastasierung einen gutartigen Verlauf mit einer hohen Rate an Spontanregressionen und Überlebensraten von > 90%.

#### **1.1.10 Klinik**

Die klinischen Symptome der Kinder richten sich nach der Lokalisation des Tumors, sowie nach dem bereits vorhandenen Ausbreitungs-, bzw.

Metastasierungsgrad des Tumors. So kann es bei grenzstrangnahen Tumoren zu neurologischen Ausfällen bis hin zur Querschnittssymptomatik, bei abdominellen Tumoren zu Harntransportstörungen durch Kompression der ableitenden Harnwege und zu gastrointestinalen Symptomen kommen und bei Tumoren mit thorakaler Lokalisation stehen Atembeschwerden im Vordergrund.

Außerdem kann es zu einer Kompression des Rückenmarks mit entsprechenden neurologischen Ausfällen kommen, da sich der Tumor aufgrund der räumlichen Nähe zur Wirbelsäule durch neurale Foramina in den Spinalkanal ausbreiten kann.

### **1.1.11 Diagnostik**

Zur Diagnostik des Neuroblastoms werden histologische Untersuchungen des Tumorgewebes, eventuell der Nachweis typischer Tumorzellnester im Knochenmark, bildgebende Verfahren und laborchemische Untersuchungen herangezogen. Als bildgebende Verfahren werden die Sonographie, Computer- und Magnetresonanztomographie und als besonderes Verfahren die Szintigraphie mit Metajodbenzylguanidin angewendet. Bei diesem besonderen Verfahren reichert sich das Metajodbenzylguanidin in katecholaminproduzierenden Geweben und somit besonders in den Neuroblastomzellen des Tumorgewebes an. Mit dieser Methode können sowohl der Primärtumor als auch eventuell schon vorhandene Metastasen spezifisch dargestellt werden (Neuroblastomstudie, BFM-NB 2004). Bei der Bestimmung der Laborparameter berücksichtigt man ebenfalls den Umstand, dass ca. 90% aller Neuroblastome katecholaminproduzierende Tumoren sind. Die Abbauprodukte Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure, sowie der Metabolit Dopamin sind im Falle einer Erkrankung in erhöhten Konzentrationen im Urin und im Serum nachweisbar. Außerdem werden die Neuronspezifische Enolase (NSE), ein für das Nervensystem spezifisches Protein, die Laktatdehydrogenase (LDH), und das Ferritin bestimmt, und als Parameter zur Verlaufskontrolle, sowie als prognostische Kriterien genutzt (Evans A.E. et al., 1987).

In den meisten Fällen wird die Diagnose eines Neuroblastoms im Säuglings- und Kleinkindalter gestellt, wobei ca. 90% der Kinder jünger als 6 Jahre sind.



### **1.1.12 Prognose**

Patienten mit den lokalisierten Stadien 1 bis 3, aber auch Patienten im Stadium 4S haben deutlich bessere Überlebenschancen als Patienten im Stadium 4. Im Säuglingsalter haben Patienten sowohl mit lokalisierter, als auch mit metastasierender Erkrankung bessere Überlebenschancen (Neuroblastomstudie, BFM-NB 2004).

Aus molekulargenetischer Sicht zeigt sich bei Tumoren mit einem DNA-Index  $>1$  eine bessere Prognose als bei einem DNA-Index  $=1$  (Look A.T. et al., 1984).

Der beste molekulargenetische Parameter zur Bestimmung der Prognose ist aber die MYCN-Amplifikation. MYCN-amplifizierte Tumoren zeigen häufiger einen rasch progredienten Krankheitsverlauf und gehen mit schlechter Prognose einher (Brodeur G.M. et al., 1984; Brodeur G.M. et al., 1997). Ebenfalls prognostisch ungünstig sind ein Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1, hohe Serum-Ferritin-Werte, sowie eine hohe Neuronenspezifische Enolase. Assoziiert mit einer großen Tumormasse und einem hohen Zellumsatz ist außerdem ein hoher LDH-Spiegel (Maris J.M. et al., 1995; Ambros I.M. et al., 1996; Brodeur G.M. et al., 1997; Evans A.E. et al., 1987).

Weitere für die Prognose entscheidende Parameter sind die Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA und TrkB. Während die Expression von TrkA mit günstiger Tumorbilologie und guter Prognose einhergeht, beinhaltet die Expression von TrkB typischerweise ein aggressives biologisches Tumorverhalten mit einer verstärkten Tendenz zur Progression und Metastasierung. Dieses Verhalten ist in mehreren Studien nachgewiesen worden (Brodeur, G. M., A. Nakagawara, et al., 1997 ; Matsumoto, K., R. K. Wada, et al., 1995 ; Eggert, A., N. Ikegaki, et al., 2000).

### **1.1.13 Therapie**

Die Therapie des Neuroblastoms erfolgt risikoadaptiert nach den Vorgaben der aktuellen nationalen Neuroblastomstudie (BFM-NB 2004). Als Risikofaktoren werden das Patientenalter bei Diagnosestellung, das Tumorstadium und die MYCN-Amplifikation berücksichtigt.

Risikogruppe	Charakteristika
Beobachtungspatienten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine MYCN-Amplifikation</li> <li>- Säuglinge im Stadium 1-3 oder 4S</li> <li>- Kinder &lt; 2 Jahre und Stadium 1,2 oder 3</li> </ul>
Standardrisikopatienten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine MYCN-Amplifikation</li> <li>- Säuglinge mit schwerer Symptomatik durch Primärtumor oder Metastasen</li> <li>- Kinder <math>\geq</math> 2 Jahre mit Stadium 3</li> </ul>
Hochrisikopatienten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- MYCN- Amplifikation vorhanden ( alle Stadien)</li> <li>- alle Kinder mit Stadium 4 ( außer 4S )</li> </ul>

Tabelle 2: Risikostratifizierung laut Neuroblastomstudie NB 2004

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung des Neuroblastoms umfassen die chirurgische Resektion, Polychemotherapie, Bestrahlung von Knochenmetastasen oder des Primärtumors, sowie eine autologe Stammzelltransplantation.

Die chirurgische Therapie bietet abhängig vom Diagnosezeitpunkt sowohl diagnostische als auch therapeutische Funktionen. Das Ziel der primären Operation ist die Diagnosesicherung, die Gewinnung von Tumormaterial, besonders für histologische und biologische Untersuchungen, die intraoperative Betrachtung der Tumorausdehnung, sowie die möglichst komplette Tumorentfernung. Bei solchen Patienten, die der Beobachtungsgruppe angehören, ist die alleinige operative Versorgung ein kurativer Ansatz. Beobachtungspatienten werden postoperativ nach einem halben Jahr einem Re-Staging zugeführt, und ggf. einer erneuten Operation zugeführt.

Nach Biopsie-Ergebnis werden alle weiteren Patienten in die zugehörigen Risikogruppen eingeteilt und dann einer Chemotherapie zugeführt, wobei sich

diese in Abhängigkeit von Stadium und Risikogruppe unterscheiden. Meist werden 4-6 Zyklen der Chemotherapie durchgeführt.

Die geeignete Therapieform zur Behandlung von Neuroblastomen mit mittlerem oder hohem Risiko ist die Chemotherapie. Als Chemotherapeutika eignen sich vor allem Cyclophosphamid, Doxorubicin, Cisplatin und Etoposid. Um die Zytotoxizität und die unerwünschten Nebenwirkungen möglichst zu minimieren, werden die entsprechenden Medikamente in einer Kombinationstherapie in verschiedenen Zyklen verabreicht. Damit erreicht man synergistische Effekte, sowie eine Dosisreduktion der Einzelstoffe der Medikamente.

Für Patienten der Hochrisikogruppe besteht außerdem die Option einer Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation. Dabei werden Stammzellen des Patienten aus dem peripheren Blut gesammelt und anschließend eine Hochdosischemotherapie verabreicht, wobei im Hinblick auf die nachfolgende autologe Stammzelltransplantation auf die enorme Knochenmarkstoxizität der Hochdosischemotherapie keine Rücksicht mehr genommen werden muss (Neuroblastomstudie NB 97; Berthold F. et al., 2000).

Die dritte Säule in der Therapie des Neuroblastoms besteht aus der Bestrahlung. Auch hier ist die Behandlung abhängig vom Alter des Patienten, dem Tumolvolumen und der Lokalisation des Tumors. Dementsprechend werden Dosen von 15 bis 30 Gy (Gray) verwendet (Brodeur G., 1997). Hauptsächlich wird die Bestrahlung im Stadium 3 angewandt, in dem ein als inoperabel geltender Tumor durch Bestrahlung verkleinert wird und so einer Operation zugeführt werden kann. Nach einer kompletten Tumorentfernung kann im Stadium 2 eine postoperative kombinierte Radiochemotherapie indiziert sein, die jedoch im Stadium 4 vorwiegend palliative Zwecke erfüllt. Die Möglichkeit der lokalen Radiatio ergibt sich für Primärtumoren bei Hochrisikopatienten, die nach 6 Blöcken einer Chemotherapie und nach einer Zweitoperation noch Tumorreste aufweisen (Neuroblastomstudie NB 97). Ebenso werden verbliebene Knochenmetastasen lokal bestrahlt. Als experimentelle Therapieform wird z.Zt. an einzelnen Zentren die Möglichkeit einer intraoperativen Bestrahlung des Primärtumors bei Hochrisikopatienten getestet.

Einen besonderen Stellenwert für das Ansprechen von Neuroblastomzellen auf Bestrahlung scheint die Expression von Trk-Rezeptoren zu haben. In einem

Zellkulturmodell wiesen Neuroblastomzellen, die stabil mit dem TrkA Rezeptor transduziert wurden eine erhöhte Strahlenresistenz auf, während Neuroblastomzellen mit hoher TrkB Expression ein verbessertes Ansprechen auf Bestrahlung zeigten. Wurden jedoch TrkB-exprimierende Neuroblastome zusätzlich mit ihrem spezifischen Liganden BDNF stimuliert, so erhöhte sich die Strahlenresistenz (Hilder, G., persönliche Mitteilung, 2004).

## 1.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, erste Einblicke in die molekularen Mechanismen einer zuvor beobachteten Trk-Rezeptor vermittelten Strahlentherapieresistenz von Neuroblastomzellen zu erhalten. Zu diesem Zweck sollten die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und ihre stabilen Transduktanten SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB in An- und Abwesenheit des jeweiligen spezifischen Liganden NGF oder BDNF mit einer Kobaltquelle bestrahlt werden. Anschließend sollten im Zeitverlauf nach Bestrahlung mRNA (messenger Ribonucleinacid) Expressionsprofile der Zellen unter Verwendung von Microarrays der Firma Affymetrix® erstellt werden. Ich vermutete, dass sich aus der Analyse dieser mRNA Expressionsprofile nicht nur erste Anhaltspunkte für mögliche Zielgene der Bestrahlungswirkung ergäben, sondern auch Hinweise auf potentielle Mechanismen der Strahlentherapieresistenz von Neuroblastomzellen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

RPMI 1640	Gibco, England Kat. Nr.: E15-840
Trypsin/EDTA	PAA Linz, Österreich Kat. Nr.: L11-004
Penicillin/Streptomycin	Gibco, England Kat. Nr.: 15140-122
Genitacin	PAA Linz, Österreich P11-012
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom KG Berlin, Deutschland Kat.Nr.: S 0115
Trizol Reagent	Invitrogene, USA Kat. Nr.: 15596-026
Isopropanol	Sigma, Deutschland Kat.Nr.: I 9516
Chloroform	Merck Darmstadt, Deutschland Kat. Nr.: 1.02447.0500
Essigsäure	J.T.Baker Devanter, Holland Kat. Nr.: 6052
RNase-freies Wasser	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004
RLT-Puffer	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004

RW 1-Puffer	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004
DNase-1-Stock	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004
RDD-Puffer	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004
RPE-Puffer	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004
NGF	Promega
BDNF	Promega

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

PP-Röhrchen 50ml	Greiner Frickenhausen, Deutschland Kat.Nr.: 227261
6- well Platten	BD-Falcon N.Y., USA Kat. Nr.: 353224
Eppendorf Safe-lock tubes 2,0 ml	Eppendorf, Deutschland Kat. Nr.: 0030120094
Eppendorf Safe-lock tubes 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland Kat. Nr.: 0030120086
Falcon® Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Becton –Dickinson N.Y., USA Kat. Nr.: 353136

### 2.1.3 Geräte

Coulter Counter	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Brutschrank	IBS, Gerätetyp Shellab Seriennr.: 0600202
Rotixa 50S	Hettich, Mülheim a.d. Ruhr Deutschland
Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products
Photometer	Eppendorf, Deutschland

### 2.1.4 Sonstiges Material

Zellschaber	BD Falcon Kat. Nr.: 353086
Affymetrix GenChip®	Affymetrix, Santa Clara, USA
Human Genome U133 Set	
Complete GenChip® Expression 3`-Amplification Reagents	Affymetrix, Santa Clara, USA
QIAGEN mini Säule	RNeasy Micro-Kit, QIAGEN Kat. Nr. 74004

### 2.1.5 Verwendete Software

Microarray Suite 5.0	Affymetrix
R Statistical Language	R Project
Spotfire Decision Site 7.0	Spotfire

### 2.1.6 Verwendete Kits

Qiagen RNeasy Mini-Kit	QIAGEN
------------------------	--------



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Für die *in vitro* Versuche dieser Dissertation wurde die humane Neuroblastomzelllinie SY5Y (Biedler et al. 1976; Biedler et al. 1978) verwendet. Außerdem wurden retroviral transduzierte SY5Y-Sublinien mit stabiler Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA, TrkB und der Leervektorkontrolle SY5Y-Vec (Eggert et al. 2002) benutzt.

Zur Anzucht der Zellen wurden diese in sterilen Zellkulturflaschen mit 75cm<sup>2</sup> Bodenfläche bei 37 °C , 80%-iger Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5% im Brutschrank gezüchtet. Alle 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums.

Die Zusammensetzung des Mediums war:

- 500ml RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640
- + 50 ml FCS (fetales Kälberserum)
- + 5 ml Penicillin/ Streptomycin
- +10 µl Genitacin pro ml Medium

Die Mediumwechsel, sowie alle weiteren Manipulationen an den Zellen wurden an sterilen Werkbänken in einem separaten Raum für Zellkulturen vorgenommen. Auf steriles Arbeiten wurde hierbei besonderen Wert gelegt. In regelmässigen Abständen wurden die Proben einem Test auf Befall mit Mykoplasmen unterzogen.

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen gesplittet, dabei wurde nach Entfernung des Mediums ca. 5ml Trypsin 0,2% auf die Zellen gegeben. Dadurch lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen. Anschließend wurden sie in ein 15ml Greiner-Röhrchen mit 5ml vorbereitetem Medium gegeben. Danach erfolgte die Zentrifugierung der Zellen für ca. 5 Minuten bei 800g. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet nach Resuspendierung mit 2ml Medium in einer neuen Zellkulturflasche angesetzt.

Gleichzeitig wurden Zellen in 6-Well-Platten angezüchtet und zu verschiedenen Zeitpunkten durch den Coulter Counter® gezählt, um Wachstumskinetiken, sowohl der stimulierten als auch der unstimulierten Zellen erstellen zu können. Dieses Vorgehen diente dazu, eine gewünschte Konfluenz von maximal 80%, die die

Zellen in den Kulturflaschen erreichen sollten, nicht zu überschreiten, da ansonsten durch entstehende Zell-Zell-Kontakte das Ergebnis verfälscht werden könnte. Der Zustand der Zellen und die bereits erreichte Konfluenz wurde täglich durch Betrachtung der Zellen mit dem Lichtmikroskop kontrolliert.

### **2.2.2 Zählen der Zellen mit dem Coulter Counter®**

Nach dem Splitten der Zellen wurden 100µl der Zellsuspension entnommen und in 9,9 ml einer isotonen Lösung gegeben. Diese wurde dann in den Coulter Counter® gegeben, der die Anzahl der enthaltenen Zellen pro ml ermittelte. Beruhend auf diesen Zahlen wurden anschließend Wachstumskinetiken erstellt und die Ergebnisse in den unten folgenden Excel-Tabellen graphisch dargestellt.

### **2.2.3 Stimulation der Zellen**

Zur Stimulation der Zellen mit ihren spezifischen Liganden wurde 24h vor dem Bestrahlungstermin pro 20ml Medium 200µl des Liganden NGF (=100ng/ml) für SY5Y TrkA-Zellen, bzw. 40µl des Liganden BDNF (=50ng/ml) für SY5Y TrkB-Zellen hinzugegeben. Vor dem Stimulieren der Zellen mit ihren entsprechenden Liganden wurde ein Mediumwechsel wie oben beschrieben vorgenommen. Die Zellen verblieben danach bis zum Bestrahlungstermin im Brutschrank.

### **2.2.4 Bestrahlung**

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in der Strahlenklinik des Universitätsklinikums Essen mittels einer Kobaltquelle mit einer Dosis von 6 Gy. Anschließend wurden die Zellen sofort, bzw. in Abständen von 1h, 4h, 10h und 24h lysiert und bei -80°C eingefroren. Der Transport der Zellen erfolgte vorsichtig in einer Styroporbox unter Vermeidung von Stößen und möglichst ohne allzu große Vermischung des Mediums, um die Zellen während des Transportes nicht zu beschädigen.

### **2.2.5 Lysieren der Zellen**

Zur Lysierung der Zellen wurde das Medium zuerst abgesaugt und anschließend 3ml Trizol Reagent zu den Zellen hinzugegeben. Nach einer Einwirkzeit des Trizols von ca. 3 Minuten wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus der Zellkulturflasche abgeschabt und je 1,5ml dieser Zellsuspension in je zwei 2ml Safe lock tubes überführt und bei -80°C eingefroren.

### **2.2.6 RNA-Isolierung**

Die bei -80°C eingefrorenen Proben wurden zunächst langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zentrifugierung der Proben für 5 Minuten bei 12000g, um unlösliches Material zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen transferiert. 500µl Chloroform wurden hinzugegeben und die Probe vorsichtig geschüttelt, nicht gevortext, um die Zellen nicht zu beschädigen. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 2-3 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut bei 12000g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere, ungefärbte Phase wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt und mit 500µl Isopropanol vermischt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde sie für 10 Minuten bei 12000g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, danach nochmals 5 Minuten bei 12000g und 4°C zentrifugiert und anschließend getrocknet. Dann wurde das Pellet in 50µl Rnase-freiem Wasser ca. 20 Minuten lang auf Eis gelöst und die Konzentration mit einem Photometer gemessen. Nun wurden maximal 45µl RNA entnommen und 400µl RLT-Puffer zugegeben, der 10µl Mercaptoethanol/ml Puffer enthält. Nach dem Mischen wurde 250µl 100% Ethanol zugegeben und erneut gemischt. Dann wurde das Gemisch auf eine QIAGEN Mini-Säule geladen und für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und wieder 2 Minuten lang bei 8000g zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Auch dieser Durchlauf wurde verworfen. Dann wurde die DNase auf die Proben gegeben. Dazu wurden 10 µl DNase-Stocklösung mit 70µl RDD-Puffer vermischt und auf die Membran der Säule geladen. Danach wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Nun wurde

350 µl RW1-Puffer hinzugegeben und für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues 2ml Eppendorfröhrchen gestellt. Anschließend wurde 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und bei 8000g zentrifugiert, der Durchlauf verworfen, 500 µl Ethanol zugegeben, wiederum bei 8000g zentrifugiert und der Durchlauf ebenfalls verworfen. Dann wurde für 5 Minuten bei 12000g die Säule trocken zentrifugiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorfröhrchen gestellt. Um die RNA aus der Säule zu lösen, wurden 14 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde für 2 Minuten bei 12000g zentrifugiert. Der RNA Gehalt und die Reinheit wurden dann mit dem Photometer gemessen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

### **2.2.7 Microarray-Analyse**

Ziel der Microarray-Analyse ist es, mit Hilfe von sogenannten Gen-Chips die verschiedenen Expressionsprofile der jeweiligen Zelllinien miteinander zu vergleichen. Diese Chips bestehen aus Trägermembranen, die wiederum aus Glas oder aus Silikon bestehen und an deren Oberfläche sich eine große Anzahl an Gen-Sonden, die aus cDNA (complementary Desoxyribonucleinacid)-Fragmenten bestehen, befinden. Nach der RNA-Isolation aus den entsprechenden Proben, wird diese (laut Anweisungen und Protokollen des Herstellers) in biotinylierte cRNA (complementary Ribonucleinacid) umgeschrieben. Diese einzelnen cRNA-Stücke binden sich im Rahmen der Hybridisierung der Genchips an ihre komplementären Sonden. Danach erfolgt die Zugabe eines an Streptomycin gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes auf die Chips und das Streptomycin verbindet sich mit dem Biotin. Dadurch lassen sich die Sonden identifizieren, an die sich cRNA gebunden hat. Die unterschiedlichen Farbintensitäten für jede Gen-Sonde können dann mit einem speziellen Lesegerät erkannt und ausgewertet werden. Die weitere Auswertung der Genchips erfolgte mit speziellen Statistik-Programmen.

Die unten stehende Abbildung zeigt den Ablauf der Hybridisierung, bzw. den Ablauf eines Gen-Chip Experimentes (Abbildung von Affymetrix®).

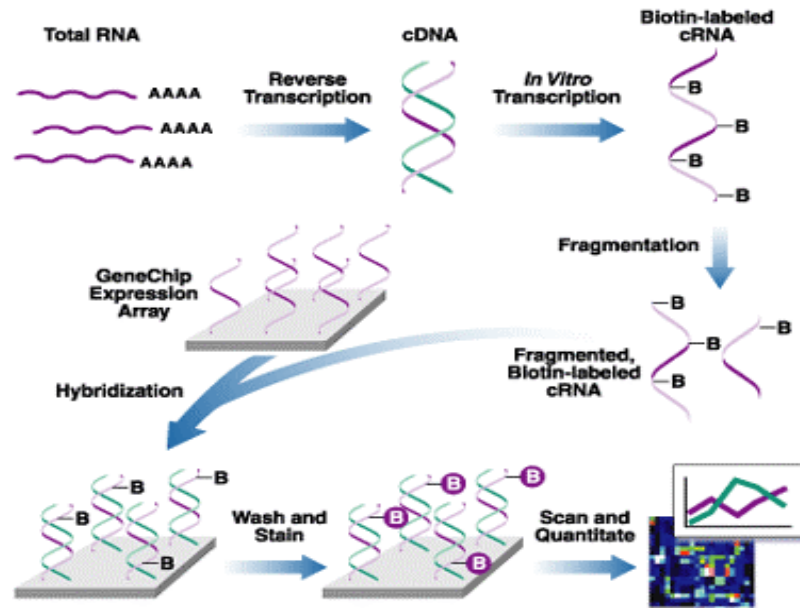


Abb 3: Ablauf der Hybridisierung ( Affymetrix® )

### 2.2.8 Statistische Analyse der Genchip Ergebnisse

Die Auswertung der Affymetrix Microarray-Daten erfolgte mit dem Statistik-Programm R und dem dazugehörigen speziell zur Auswertung von Microarray-Daten entwickelten Bioconductor Softwarepaket ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org); [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Zur Umwandlung der Rohintensitäten in Expressionswerte wurde der an die Affymetrix-Software angelehnte Algorithmus des „Affy“ Moduls verwendet; zur Normalisierung wurden die Verfahren MAS5.0 (Micro Array Suite 5) (dem in der von Affymetrix mitgelieferten Software verwendeten Verfahren nachempfundenen), RMA (Robust Multi Array) (Izary et al.) und VSN (varianznormalisierende Stabilisierung) (Huber et al., Bioinformatics, 2002,18 Suppl1:S 96-104) verwendet.

Bei der MAS 5.0 Normalisierung wurde auf eine Zielintensität von 100 relativen Einheiten skaliert. Zur Qualitätskontrolle wurden sowohl R/Bioconductor, als auch die Qualitätskontrolle von MAS5.0 (Affymetrix) herangezogen und vor allem die Werte Noise, Scale Factor, Background, Number Present, sowie das 5': 3'-Verhältnis der GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) der einzelnen Proben verglichen.

In der weiteren Analyse wurden Gene als exprimiert gewertet, wenn in einer Zeitreihe mindestens zwei Mal der Expressionswert  $> 400$  relative Einheiten betrug und auch in der Computeranalyse als „anwesend“ gewertet wurden.

Zur explorativen Analyse wurde ein „Multi-Dimensional-Scaling“ durchgeführt. Hierbei wurde Spotfire Decision Site (7.0) zur Visualisierung der mit R errechneten Werte verwendet.

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde eine ANOVA (Analysis of Variance)-Analyse mit Tukey post-hoc Test verwendet. Um gleiche Varianzen der einzelnen Gruppen zu gewährleisten, wurden hierzu die VSN normalisierten Werte zugrunde gelegt. Außerdem wurden Gene nur dann als differentiell exprimiert gewertet, wenn mindestens eine absolute Expressionsdifferenz von 400 Einheiten vorlag und die relative Expressionsänderung mindestens  $2^{1,5}$  betrug.

Differentiell exprimierte Gene wurden mittels des „Geneplotter“ Moduls in R als sogenannte Heatmap dargestellt. Hierbei wurde die Reihenfolge der Gene durch hierarchisches Clustern dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen für SY5Y Zellen zur nachfolgenden Bestrahlung

Für sämtliche Analysen wurden die humane Neuroblastomzelllinie SY5Y und ihre stabil transduzierten Sublinien SY5Y-TrkA, SY5Y-TrkB und SY5Y-vec (Leervektorkontrolle) verwendet. Um für die weiteren Versuche den Zeitpunkt einer optimalen Konfluenz der jeweiligen Zellen abschätzen zu können, wurden zunächst Wachstumskurven aller Zelllinien in An- und Abwesenheit des jeweiligen Liganden erstellt. Hierzu wurden die entsprechenden Zelllinien in Zellkulturschalen kultiviert und alle 2-3 Tage, wie oben beschrieben, mit frischem Medium versorgt. Anschließend wurden die Zellen in 6-well-Platten transferiert, wobei jeweils eine Platte mit 25.000 Zellen bestückt wurde. Jede Zelllinie wurde dann in An- und Abwesenheit des jeweiligen Liganden kultiviert. Im Zeitverlauf von 0-120h wurde alle 24h ein Feld der 6-well-Platte geerntet und die Zellen im Coulter Counter gezählt. Die graphische Auswertung der entsprechenden Wachstumskurven ist in den Abb. 4 - 6 dargestellt. Dabei zeigen die Grafiken die Zunahme der absoluten Zellzahl pro Feld in Abhängigkeit von der Zeit.

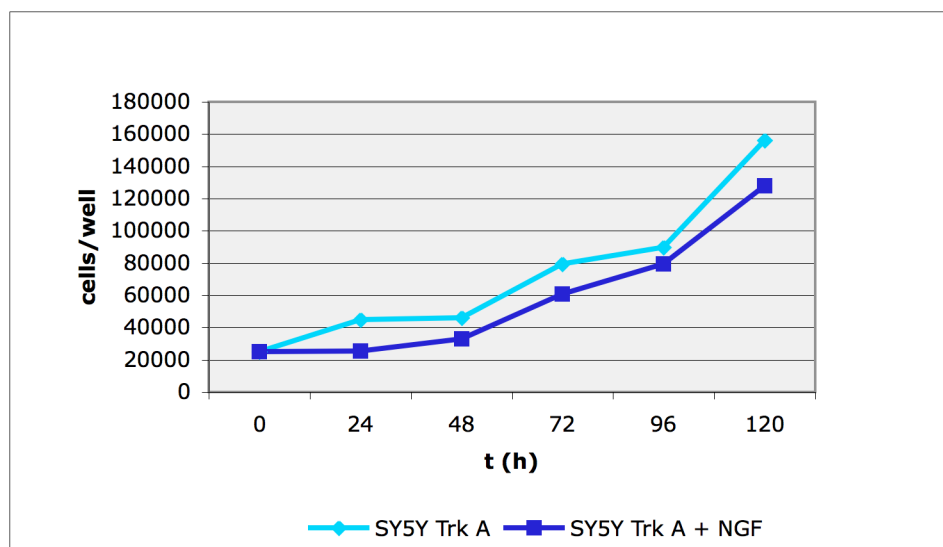


Abb.4: Wachstumskurve von SY5Y-TrkA-Zellen mit und ohne den spezifischen Liganden (NGF).

Auf der y-Achse sind die pro Feld gezählten absoluten Zellzahlen aufgetragen, auf der x-Achse der Zeitverlauf zum Zeitpunkt der Lyse der Zellen

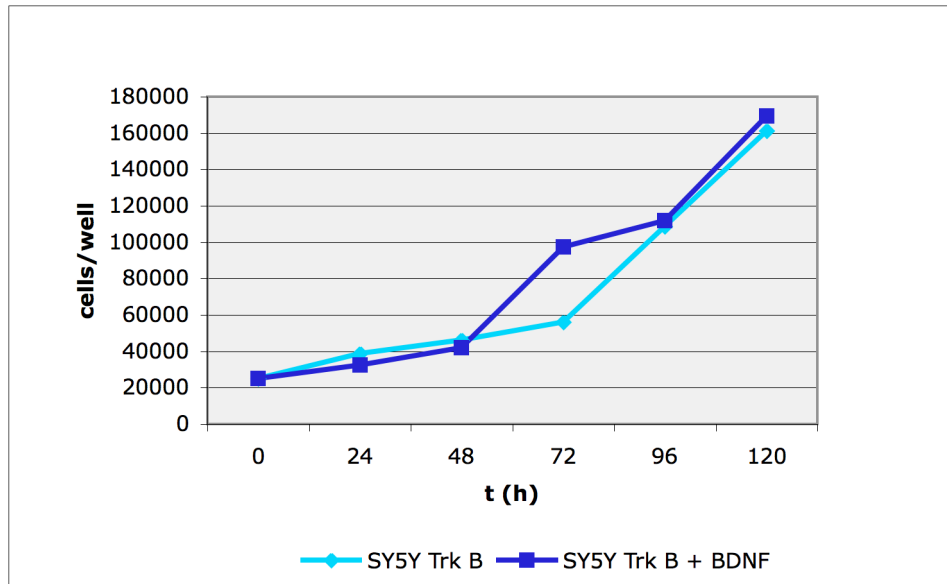


Abb.5: Wachstumskurve von SY5Y-TrkB-Zellen mit und ohne den spezifischen Liganden (BDNF). Auf der y-Achse sind die pro Feld gezählten absoluten Zellzahlen aufgetragen, auf der x-Achse der Zeitverlauf zum Zeitpunkt der Lyse der Zellen

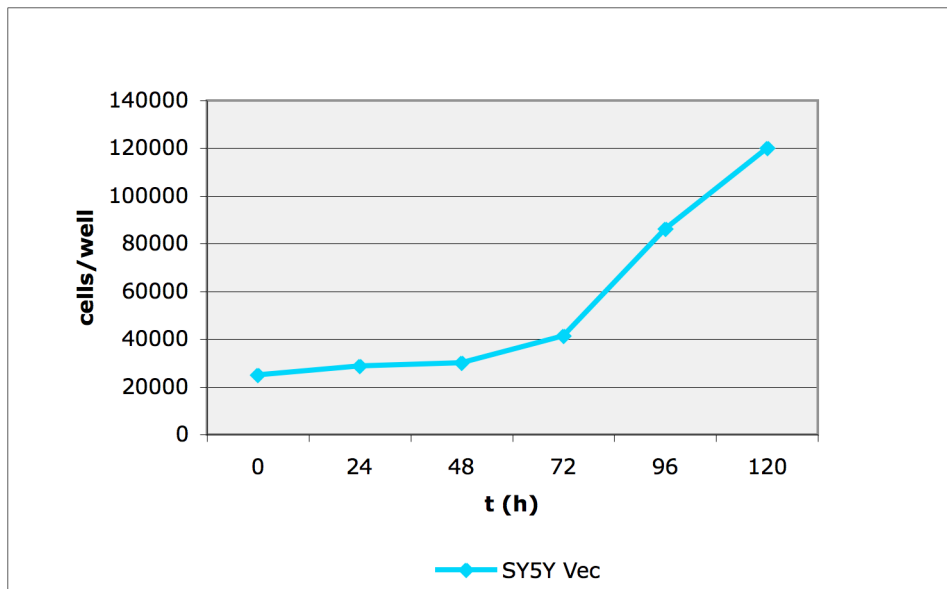


Abb.6: Wachstumskurve von SY5Y-Vec-Zellen ohne Zugabe eines Liganden (Leervektorkontrolle). Auf der y-Achse sind die pro Feld gezählten absoluten Zellzahlen aufgetragen, auf der x-Achse der Zeitverlauf zum Zeitpunkt der Lyse der Zellen



Auf der Basis der Wachstumskurven ermittelte ich für eine optimale, 70-80%ige Konfluenz der Zellen zum Versuchszeitpunkt die initiale Aussaat von 25.000 Zellen pro Zellkulturflasche, sowie eine Inkubationszeit von 72h. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten alle Zelllinien in An- und Abwesenheit des Liganden ein langsames, gleichmäßiges Wachstum, während nach Erreichen des 72 Stunden-Wertes das Wachstum exponentiell anstieg, so dass hier in den Zellkulturflaschen eine höhere Konfluenz als die erwünschten 70% erreicht wurde.

Um die Zellen für die Bestrahlung vorzubereiten, wurden die entsprechenden Zellen in den Kulturschalen erneut kultiviert und in einer Zellzahl von 25.000 Zellen/T75-Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden für 48h mit täglichem Mediumwechsel inkubiert. Sie wurden unter dem binokularen Mikroskop täglich betrachtet und nach Wachstum, Konfluenz und Aussehen beurteilt, um eventuelle Schädigungen oder Verunreinigungen der Zellen sofort zu erkennen und zu beseitigen, da diese die Ergebnisse der Studie verfälschen würden. Nach 48h erfolgte bei der Hälfte der Zellen eine Aktivierung durch Zusatz des jeweiligen spezifischen Liganden (NGF für SY5Y-TrkA, BDNF für SY5Y-TrkB) für weitere 24h. Die nicht-aktivierten Kontrollzellen wurden gleichzeitig mit frischem Medium ohne Ligandzusatz versorgt. Die Bestrahlung erfolgte anschließend nach insgesamt 72h Kultur mit 6 Gy am Kobaltgerät. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben und mittels Photometer auf ihre Reinheit kontrolliert. RNA-Proben ausreichender Qualität (OD 260/280-Werte  $>1,8$  und  $< 2,0$ ) wurden in cDNA umgeschrieben und auf U95A mRNA Microarrays der Firma Affymetrix hybridisiert wie in Material und Methoden, Abschnitt 2.2.7 beschrieben. Als nächstes erfolgte die statistische Analyse der Genchip-Ergebnisse gemäß Abschnitt 2.2.8.

## 3.2 Chip Auswertungen

### 3.2.1 Normalisierung

#### 3.2.1.1 Low Level Analyse

Für die Low Level Analyse der Microarray Daten wurden 3 verschiedene statistische Methoden angewandt, nämlich RMA (Robust Multichip Average) (Irizarry et al., 2003), die R-Implementation des MAS5.0 Algorithmus und VSN (Varianznormalisierende Stabilisierung) (Huber et al.). All diese Verfahren dienen dazu, aus Bildpunkten Expressionswerte zu berechnen.

#### 3.2.1.2 Qualitätskontrolle

Zuerst erfolgte die visuelle Kontrolle der Scans nach Array-Hybridisierung, wobei sich kein Scan als fehlerhaft zeigte. Bei der Betrachtung der Expressionswerte als Histogramm sieht man, dass alle Werte ähnlich waren und keine Ausreisser vorlagen (Abb. 7).

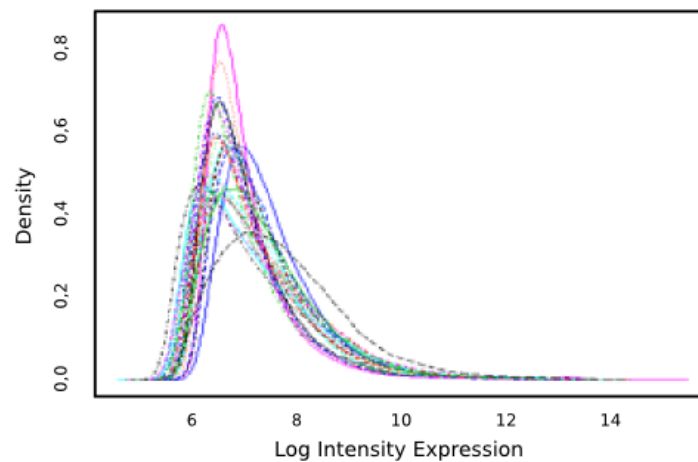


Abb.7: Expressionswerte der Affymetrix-Chips als Histogramm; auf der x-Achse ist die Intensität der Sonden auf dem entsprechenden Genchip dargestellt, die Werte auf der y-Achse zeigen die Dichte an, d.h. wie viele Gene die entsprechende Intensität aufweisen

Auch die Boxplots der Roh-Intensitäten zeigten eine gleichmässige Verteilung der Werte (Abb.8). Es fanden sich minimale Schwankungen, die im Normbereich lagen und keine Relevanz haben.

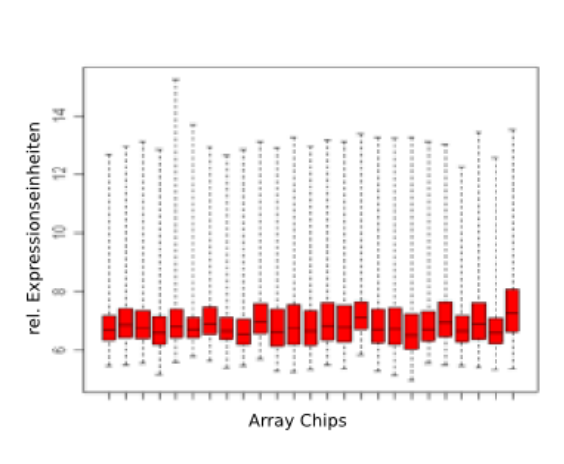


Abb.8: Boxplot der Roh-Intensitäten: Auf der x-Achse sind die einzelnen Chips nominal aufgetragen, auf der y-Achse die relativen Expressionseinheiten

Zur zusätzlichen Qualitätskontrolle wurde MAS5.0 verwendet, wobei besonderes Augenmerk auf folgende Werte gelegt wurde: Noise (Raw Q) und Background. Beides sind Maße der unspezifischen Fluoreszenz auf dem entsprechenden Chip. Außerdem wurden Number Present (%P) (Zahl der exprimierten Gene) und die GAPDH 5'/3' Ratio betrachtet. Letztere ist besonders wichtig, da sie anzeigt, ob die RNA einen Abbau und damit mangelhafte Qualität aufweist. Dieses war bei den vorliegenden Werten nicht der Fall, es lag also eine gute Qualität der Proben vor. Alle Chips zeigten akzeptable Werte, alle Qualitätskriterien lagen im Rahmen.

		Noise (RawQ)	Scale Factor	Background Avg.	Number present	GAPDH
SY5Y-Vec	0h	2,72	28,686	56,51	41,50%	0,86
	1h	2,78	25,19	56,06	39,60%	0,84
	4h	2,87	21,793	57,42	45,30%	0,96
	10h	2,56	33,028	49,45	39,30%	0,91
	24h	2,86	24,756	55,93	41,40%	0,76
SY5Y-TrkA in Abwesenheit des Liganden	0h	2,93	43,339	64,46	34,20%	1,04
	1h	2,98	18,63	63,02	46,40%	0,84
	4h	2,94	30,523	59,99	42,00%	0,86
	10h	2,6	31,479	52,71	40,80%	0,85
	24h	2,97	20,297	63,48	42,60%	0,88
SY5Y-TrkA in Anwesenheit des Liganden (NGF)	0h	2,33	15,393	47,01	48,80%	0,93
	1h	2,31	13,347	46	48,40%	0,88
	4h	2,31	19,296	48,77	45,70%	0,91
	10h	2,46	14,999	52,38	47,30%	0,87
	24h	2,44	16,13	50,03	46,90%	0,88
SY5Y-TrkB in Abwesenheit des Liganden	0h	3,15	17,335	67,69	44,60%	1,2
	1h	2,49	16,669	48,36	47,50%	1,09
	4h	2,32	19,319	45,86	44,40%	0,96
	10h	2,22	17,535	42,61	49,80%	1,1
	24h	2,65	18,753	55,29	47,20%	1,18
SY5Y-TrkB in	0h	2,56	19,799	54,77	40,80%	1,02

Anwesenheit des Liganden (BDNF)						
	1h	2,77	37,21	53,55	36,80%	0,83
	4h	2,52	14,251	52,6	45,20%	1,46
	10h	2,59	32,299	51,5	41,20%	1,56
	24h	2,62	9,932	53,66	49,40%	0,9

Tab.3: Qualitätskontrolle MAS5.0: Die erste Spalte zeigt die untersuchte Zellreihe an, in der zweiten Spalte steht der Untersuchungszeitpunkt. Noise: Hintergrundrauschen, also wieviel unspezifisches Leuchten findet sich auf dem Chip; Scale Factor: Faktor, mit dem die Genexpression des Genchips multipliziert wurde, um alle Chips auf das gleiche Niveau von 1000 Expressionseinheiten zu bringen; Background Avg.: Hintergrundleuchten (anders berechnet als Noise); Number present: Prozentanteil der Gene, die als exprimiert gewertet wurden; GAPDH: Mass für die Integrität der RNA

Danach wurden 3 Normalisierungsverfahren überprüft und miteinander verglichen, nämlich MAS5 (Abb.9), RMA (Abb.10) und VSN (Abb.11).

3.2.2 MAS5 (Abb.9): Man sah ein gleichmässiges Bild, es waren keine Schwankungen oder Ausreisser erkennbar. Der Median lag bei allen Proben auf einer Linie und sowohl die Quartile als auch die Interquartile schwankten nur minimal, was im tolerablen Bereich lag.

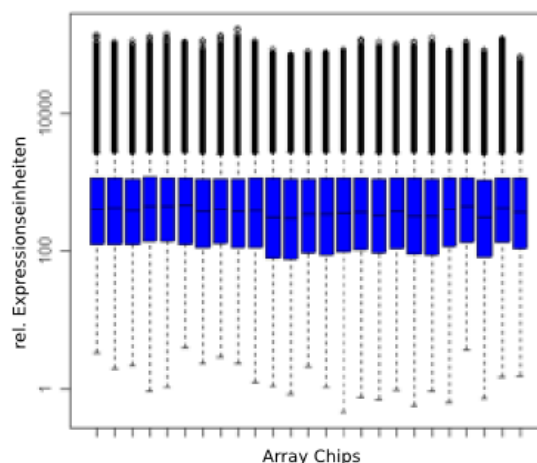


Abb.9: Normalisierungsverfahren MAS5 als Boxplot dargestellt: Auf der x-Achse sind die einzelnen Chips nominal aufgetragen, auf der y-Achse die relativen Expressionseinheiten.

3.2.3 RMA (Abb.10): Es waren keine Ausreisser oder Schwankungen erkennbar:

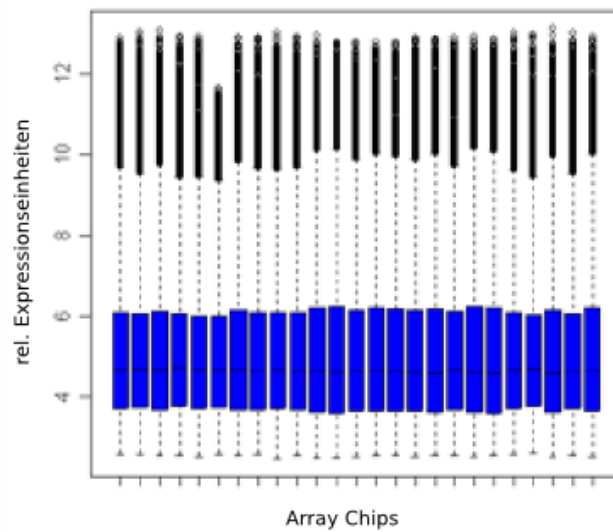


Abb.10: Normalisierungsverfahren RMA als Boxplot dargestellt: Auf der x-Achse sind die einzelnen Chips nominal aufgetragen, auf der y-Achse die relativen Expressionseinheiten

3.2.4 VSN (Abb.11): Dargestellt ist eine suffiziente Skalierung der Chips, wobei die individuellen Eigenheiten der angewandten Verfahren zum Vorschein kamen. Große Schwankungen traten nicht auf, d.h. es waren keine Ausreisser feststellbar:

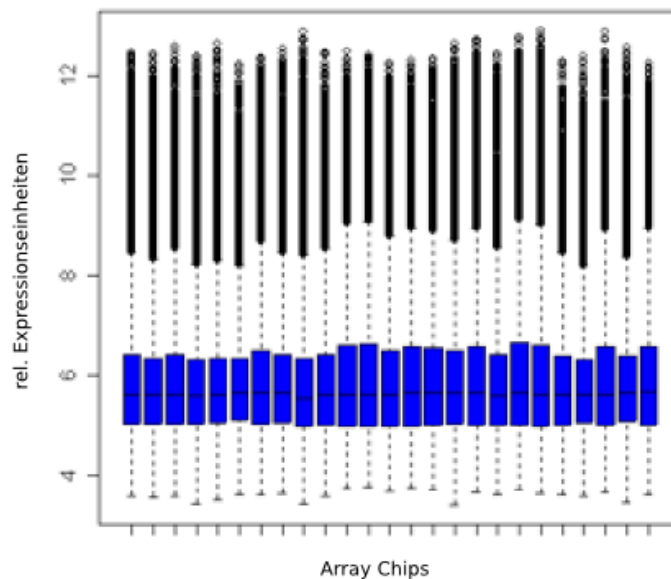


Abb.11: Normalisierungsverfahren VSN als Boxplot dargestellt: Auf der x-Achse sind die einzelnen Chips nominal aufgetragen, auf der y-Achse die relativen Expressionseinheiten

### **3.3 High Level Analyse**

#### **3.3.1 Filterkriterien für die Analyse**

Nach Normalisierung und Qualitätskontrolle der Array-Daten erfolgte die sogenannte „High Level Analyse“. Zunächst wurden nicht exprimierte Gene von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Hierbei wurde zuerst eine Präfilter-Analyse durchgeführt, d.h. alle Gene, die nicht mindestens 2 Present calls aufweisen (d.h. von der Entscheidungsmatrix des Programms MAS5 als exprimiert gewertet werden) und deren MAS5 Expressionshöhe nicht mindestens  $2 \times \geq 400$  relative Expressionseinheiten aufwies, wurden ausgeschlossen. Danach wurden 22.215 Gene von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Hiervon wiesen 15.399 Gene nur eine MAS5 Expressionshöhe von  $< 2 \times 400$  relativen Expressionseinheiten auf, 13.249 Gene wiesen  $< 2$  Present calls auf und 12.550 Gene fielen aufgrund beider Kriterien durch den Filter.

#### **3.3.2 Genexpressionsunterschiede in unbestrahlten Zellen bedingt durch Trk-Status in An- und Abwesenheit von Liganden (ANOVA)**

Für diese weitere statistische Analyse wurden nur die 12.550 oben genannten exprimierten Gene verwendet (Voraussetzung für ANOVA). Als weiteres Qualitätskriterium sollten alle Subgruppen die gleichen Varianzen aufweisen. Dieses wurde durch die vorhergehende VSN-Normalisierung bereits erfüllt. Als zusätzliche Verfahren wurden noch die Multiple Testing Korrektur, ein Full-Change-Filter und ein Post Hoc Tukey Test angewandt.

1301 Gene unterschieden sich dabei laut ANOVA mit Multiple Testing Korrektur auf dem Signifikanzniveau  $p \leq 0,01$ . Von diesen 1301 Genen passierten 961 den FC-Filter, d.h. sie unterschieden sich mehr als  $2^{1,5}$ -fach voneinander. Nachfolgend sind diese Gene in Form eines hierarchischen Clusters in einer sogenannten Heatmap dargestellt (Abb.12):

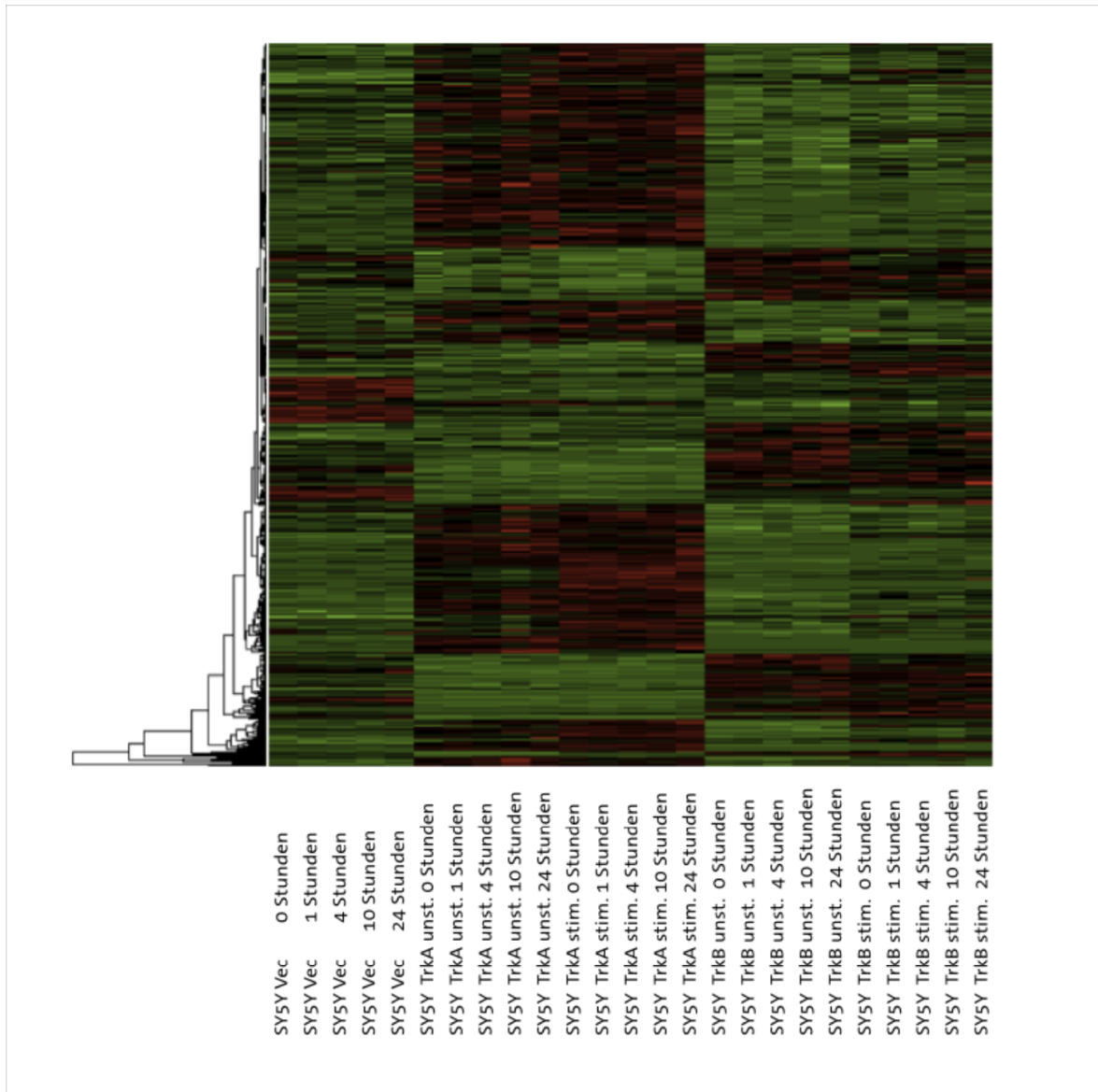


Abb.12: Hierarchisches Cluster (Heatmap) der Genexpressionsänderungen (n= 961, horizontale Zeilen) in unbestrahlten Zellen bedingt durch Trk-Status in An- und Abwesenheit von Liganden. Gene mit verminderter Expression sind in grün, mit vermehrter Expression in rot dargestellt. Die vertikalen Zeilen entsprechen den angezeigten Zelllinien und den Untersuchungszeitpunkten.

Bei der Betrachtung der Heatmap fällt auf, dass sich die einzelnen Zelllinien stark voneinander unterscheiden. Rot angefärbte Bereiche bedeuten hoch regulierte, also vermehrt exprimierte Gene, während die grünen Bereiche herunterregulierte, also nicht vermehrt exprimierte Gene bedeuten.

Es liessen sich drei grosse "Blöcke" auf dem Bild erkennen: Zuerst stellten sich die SY5Y-Vec Zellen separat dar, dann die ligand-aktivierten und nicht ligand-



aktivierten SY5Y-TrkA Zellen und in einem dritten Block die ligand-aktivierten und nicht ligand-aktivierten SY5Y-TrkB Zellen. Hierbei wiesen SY5Y-TrkA Zellen große Expressionsunterschiede im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien auf. SY5Y-Vec und SY5Y-TrkB Zellen zeigten hingegen ein relativ ähnliches Expressionsmuster. Ligand-induzierte Unterschiede waren sowohl bei SY5Y-TrkA als auch bei SY5Y-TrkB Zellen nur gering. Somit hatte die Expression der unterschiedlichen Trk-Rezeptoren nach Transduktion eine sehr deutliche Wirkung auf das Genexpressionsmuster der jeweiligen Zellen, während die zusätzliche Aktivierung des Rezeptors durch die Anwesenheit des exogen zugeführten Liganden nur einen geringen Effekt hatte.

### **3.3.3 Genexpressionsmuster in unbestrahlten Zellen in Abwesenheit von Liganden**

Um zunächst bestrahlungs- und ligandunabhängige Expressionsmuster der transduzierten Sublinien zu definieren, wurde die Genexpression in SY5Y-Vec, SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB Zellen vor Bestrahlung und ohne Ligandzugabe verglichen. Hierzu wurden die Werte aus der initial angewandten ANOVA benutzt, die im post hoc Test als unterschiedlich angenommen wurden. In dieser Analyse wurden zwischen den drei Sublinien 519 Gene als differentiell exprimiert identifiziert, die in folgender Heatmap dargestellt sind (Abb.13):

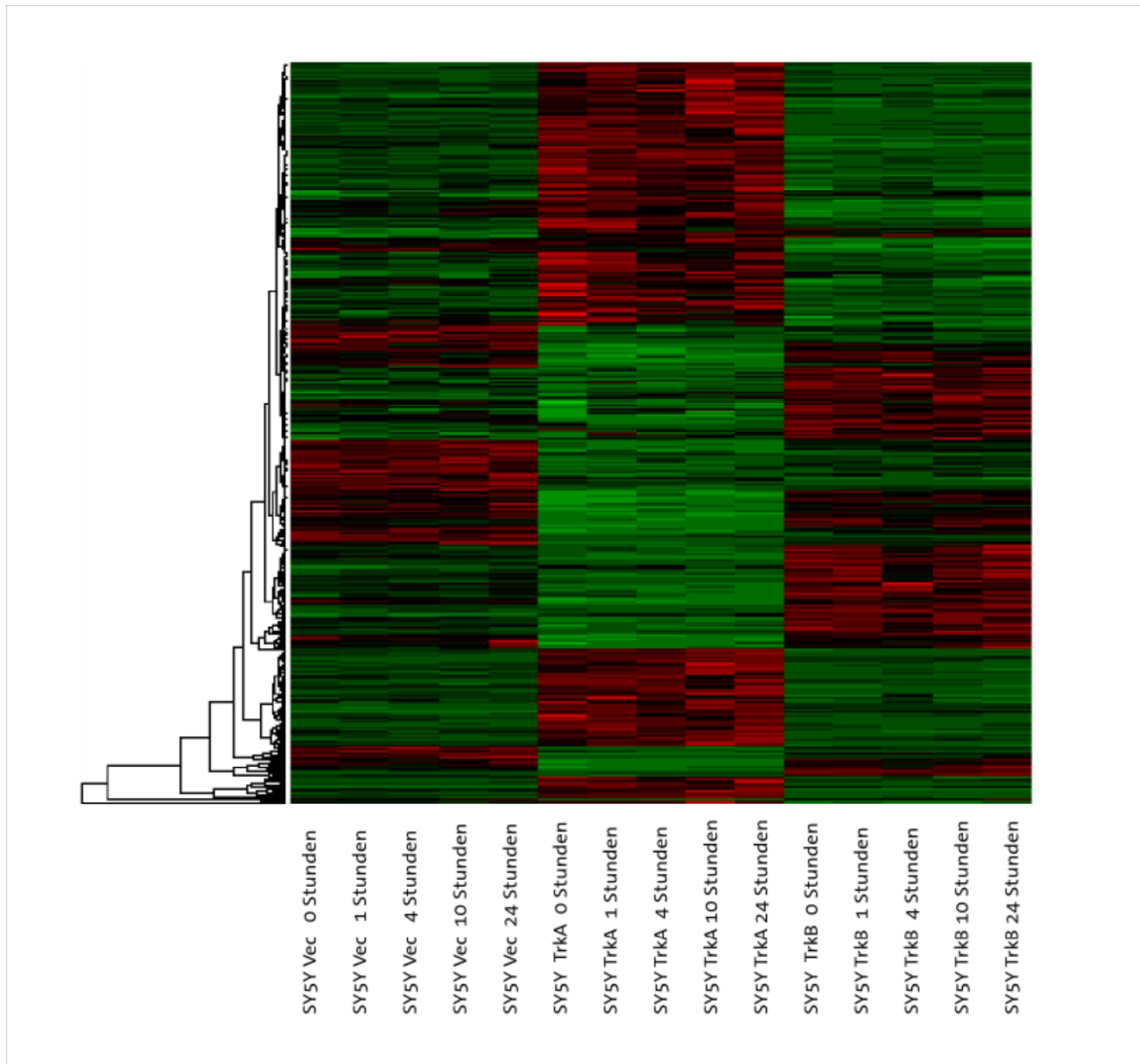


Abb.13: Hierarchisches Cluster (Heatmap) der Genexpressionsänderungen in unbestrahlten Zellen in Abwesenheit von Liganden (n= 519, horizontale Zeilen). Die entsprechenden Gene finden sich im Anhang 1. Gene mit verminderter Expression sind in grün, mit vermehrter Expression in rot dargestellt. Die vertikalen Zeilen entsprechen den angezeigten Zelllinien und den Untersuchungszeitpunkten.

Bei der Betrachtung des Bildes imponieren drei vollkommen verschiedene Genexpressionsmuster. Die grüne Farbe in dem Bild gibt an, dass Gene herunterreguliert, also nicht vermehrt exprimiert, wurden, während rot ein Hochregulieren, also eine vermehrte Expression von Genen bedeutet. Es stellt sich also eindrücklich dar, dass sich die Zelllinien bereits unabhängig von der Bestrahlung deutlich voneinander unterscheiden. Um die Gene, in denen sich die Zelllinien voneinander unterscheiden zu analysieren, wurden sie in einer Tabelle dargestellt (siehe Anhang 1).

Aus der Tabelle (siehe Anhang 1) ist ersichtlich, dass insbesondere in SY5Y-TrkA Zellen Gene vermehrt exprimiert wurden, die an der Regulation der DNA-Reparatur beteiligt sind. Besonderes Augenmerk wurde hier auf das Gen XRCC4 gelegt (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4). Als Hinweis auf eine reduzierte Wachstumsaktivität der Zellen fand sich hingegen kaum eine Expression von Zellzyklusgenen in SY5Y-TrkA Zellen.

### **3.3.4 Identifikation von Expressionsunterschieden im Zeitverlauf nach Bestrahlung bedingt durch den Trk-Status in Abwesenheit von Liganden**

In diesem Abschnitt wurde analysiert, welche Gene in SY5Y-Vec, SY5Y-TrkA oder in SY5Y-TrkB Zellen im Zeitverlauf als Antwort auf Bestrahlung reguliert werden: Dabei stellten sich 218 Gene dar (siehe Anhang 2).

In SY5Y-TrkA Zellen stellte sich eine Induktion der Expression von p21 als klassisches DNA-Reparaturgen dar. Weiterhin zeigte sich eine hohe Expression von CFLAR (Caspase 8 und FADD- like apoptosis regulator), welches eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielt, sowie von MCM4 (minichromosome maintenance deficient 4). Außerdem fand sich eine hohe Expression des „damage-specific DNA binding protein“. Des Weiteren wurde eine vermehrte Expression des Gens GADD45A (growth-arrested and DNA-damage-inducible, alpha) nachgewiesen.

Das Gen Foxo3A (forkhead box 3A), welches höchstwahrscheinlich als Trigger für Apoptose durch Genexpression von für den Zelltod wichtigen Genen funktioniert, war ebenfalls vermehrt exprimiert (Liu JW et al., Oncogene, 24:2020-31, 2005).

Mit Hilfe eines Venn-Diagrammes (Abb.14) wurde nun in der Übersicht dargestellt, wieviele dieser 218 exprimierten Gene in allen drei Gruppen reguliert sind (3), wieviele nur in SY5Y-TrkA und SY5Y-Vec (6), wieviele exklusiv in SY5Y-TrkB (48), wieviele exklusiv nur in SY5Yvec (49) und wieviele nur in SY5Y-TrkA reguliert sind (107):

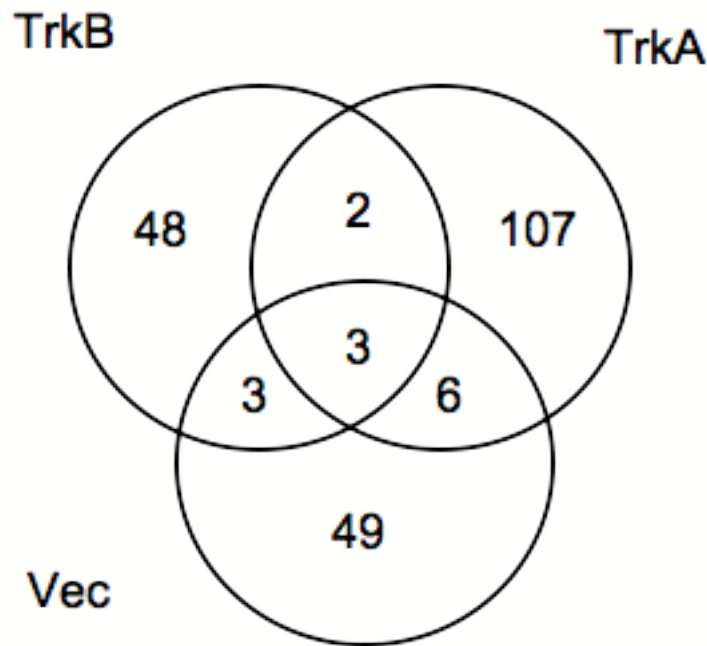


Abb.14: Venn-Diagramm zur Darstellung der Kinetik der exprimierten Gene, d.h. wie viele Gene werden im Zeitverlauf nach Bestrahlung in den Zelllinien SY5Y-TrkA, SY5Y-TrkB und SY5Y-Vec reguliert.

Das dargestellte Diagramm zeigt, dass eine höhere Anzahl an Genen ausschließlich in SY5Y-TrkA Zellen reguliert ist, nämlich mehr als das doppelt so viele wie in den anderen Zelllinien, was darauf schließen lässt, dass SY5Y-TrkA offenbar stärker auf Bestrahlung reagiert als SY5Y-TrkB oder SY5Y-Vec Zellen. Bei den letzteren Zelllinien lagen die exprimierten Gene in der Anzahl sehr dicht beieinander, so dass keine grossen Unterschiede auffielen. Auch bei den Schnittmengen der Gene zeigte sich wieder die höhere Anzahl bei SY5Y-TrkA Zellen, nämlich dabei, welche Gene nur in SY5Y-TrkA und in SY5Y-Vec reguliert wurden.

### 3.3.5 Identifikation von generellen Trk-Status unabhängigen Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Liganden

Bei diesem Verfahren wurden nur Prefilter Gene berücksichtigt, sowie Multiple Testing Korrektur und Post Hoc Tukey test.

Die Darstellung der Genexpressionsveränderungen stellt sich in Form des hierarchischen Clusters in einer sogenannten Heatmap dar (Abb.15):

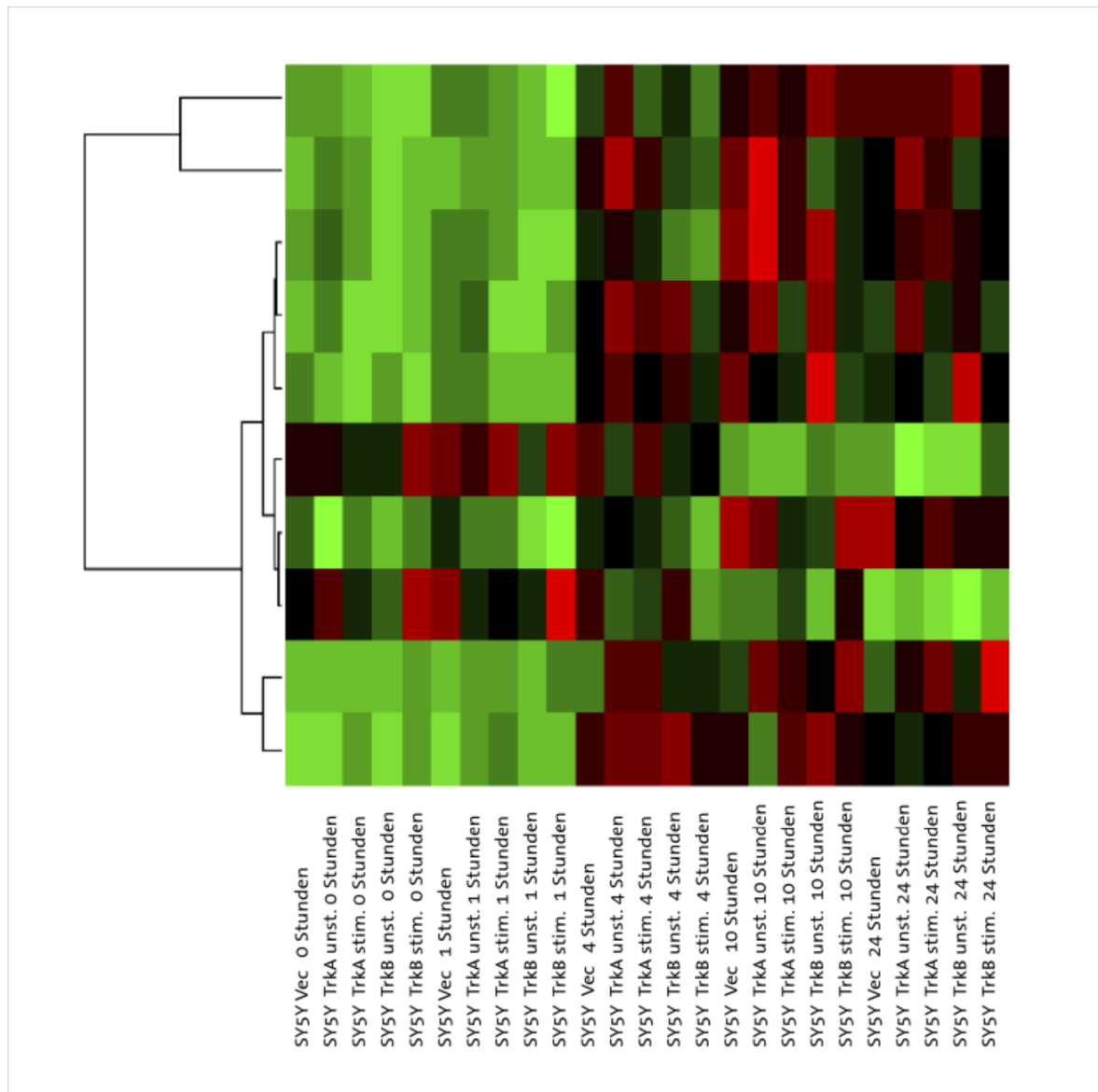


Abb.15: Hierarchisches Cluster (Heatmap) der generellen Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung (n= 10, horizontale Zeilen). Die entsprechenden Gene finden sich in Anhang 3. Gene mit verminderter Expression sind in grün, mit vermehrter Expression in rot dargestellt. Die vertikalen Zeilen entsprechen den angezeigten Zelllinien und den Untersuchungszeitpunkten.

In der so identifizierten Genliste (siehe Anhang 3) wurden nun Expressionsunterschiede in den verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung beurteilt. Dabei ließen sich die größten Expressionsunterschiede in allen drei

Zelllinien 4h nach Bestrahlung nachweisen: Zu diesem Zeitpunkt wurden vorwiegend Gene induziert, die zuvor niedrige Expressionswerte aufwiesen.

Interessanterweise zeigten sich in dieser Analyse Expressionsunterschiede in zahlreichen Genen, die an der Regulation des Zellzyklus und/oder dem p53-Signalweg beteiligt sind. Repräsentative Beispiele, die in allen drei Zelllinien reguliert erschienen, sind das Gen p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), das im Zeitverlauf nach 4h besonders hoch exprimiert wurde. Ebenso zeigt sich das Gen p53, welches p21 induziert (Bunz et al., *Science*, 1998 Nov 20;282(5393):1497-501); (Su et al., *Lung Cancer*, 40: 259-266, 2003), in seiner Expression hochreguliert. Weiterhin wurden die Gene DDB2 (damage-specific DNA binding protein 2) und Cyclin E2 4h nach Bestrahlung deutlich vermehrt exprimiert. DDB2 ist an der Regulierung von p53 beteiligt und die DDB2-Expression wird ihrerseits durch p53 reguliert (Itoh T et al., *Mol Cell Biol.*, 23: 7540-7553, 2003). Cyclin E2 interagiert mit p21 (Orend G et al., *Oncogene*, 16: 2575-2583, 1998).

### **3.3.6 Identifikation Trk-Status spezifischer Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Liganden**

Dabei wurden als Kriterien für die MAS5 Werte folgende ausgewählt:  $FC \log_2 \geq 2^{1,5}$  und Differenz  $\geq 400$  in Doppelbestimmungen, d.h. wenn sich die Gene mindestens verdoppeln, werden sie differentiell exprimiert. Dieses wurde für alle transduzierten Sublinien angewandt. Hierbei wurden für SY5Y-Vec 61 differentiell exprimierte Gene nachgewiesen, für SY5Y-TrkA in Abwesenheit von NGF 9 Gene und in Anwesenheit von NGF 118 Gene, sowie für SY5Y-TrkB in Abwesenheit von BDNF 56 Gene und in Anwesenheit von BDNF 117 Gene differentiell exprimiert (Daten nicht gezeigt).

## **4. Diskussion**

In dieser Studie sollten mRNA Microarrayprofile erstellt und analysiert werden, um erste Anhaltspunkte für die molekularen Mechanismen der Trk-Rezeptor vermittelten Strahlenresistenz von Neuroblastomzellen zu erhalten. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der regulierten Gene als Antwort auf Bestrahlung in den Zelllinien SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB gelegt. Im Folgenden werden nun die verschiedenen Einzelfragestellungen diskutiert.

### **4.1 Genexpressionsunterschiede in unbestrahlten Zellen bedingt durch Trk-Status in An- und Abwesenheit von Liganden**

Um die Genexpressionsunterschiede in unbestrahlten Zellen bedingt durch Trk-Status in An- und Abwesenheit von den jeweiligen spezifischen Liganden zu veranschaulichen, wurden in dieser Fragestellung drei Zelllinien, nämlich SY5Y-Vec, SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB untersucht. Alle Zelllinien waren unbestrahlt, SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB wurden sowohl im ligand-aktivierten als auch im ligand-inaktivierten Zustand betrachtet. Graphisch erfolgte die Darstellung der Ergebnisse durch hierarchisches Clustern in Form einer sogenannten Heatmap (siehe Abb. 12, Seite 40). Diese Analyse ergab, dass sich die drei untersuchten Zelllinien deutlich voneinander unterscheiden. Demgegenüber soll nun die Betrachtung der einzelnen Zelllinien in ihrem jeweiligen ligand-aktivierten und ligand-inaktivierten Zustand stehen: Hier zeigte sich, dass die alleinige Stimulation der Zelllinien mit den spezifischen Liganden keine auffallenden Änderungen im Expressionsmuster mit sich brachte, so dass man davon ausgehen kann, dass der Trk-Status auch ohne Aktivierung durch exogene Liganden eine Geninduktion, bzw. Genregulation hervorruft (im Einklang mit früheren Befunden, Schulte et al., Oncogene 2005).

#### **4.2 Genexpressionsmuster in unbestrahlten Zellen in Abwesenheit von Liganden und Identifikation von Expressionsunterschieden im Zeitverlauf nach Bestrahlung bedingt durch Trk-Status in Abwesenheit von Liganden**

Bei dieser Fragestellung geht es um die Expressionsunterschiede in den unbestrahlten Zelllinien SY5Y-Vec, SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB in Abwesenheit ihrer spezifischen Liganden, sowie um die Expressionsunterschiede im Zeitverlauf nach Bestrahlung bedingt durch Trk-Status.

Das Genexpressionsmuster in unbestrahlten Zellen wurde durch hierarchisches Clustern in einer Heatmap dargestellt (siehe dazu Abb. 13 auf Seite 42). Bei Betrachtung dieser imponieren drei sich deutlich voneinander unterscheidende Zelllinien. Besonders auffällig war die Ähnlichkeit der Zelllinien SY5Y-Vec und SY5Y-TrkB, während die Zelllinie SY5Y-TrkA ein völlig unterschiedliches Genexpressionsmuster zeigt. Im Anhang 1 können die exprimierten Gene als Tabelle dargestellt genauer betrachtet werden. Besonderes Augenmerk fiel hier auf die hohe Expression des Gens XRCC4 (x-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 4), welches besonders stark in den TrkA-transduzierten Zellen exprimiert wurde. Diese Daten sind im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen zur prognostisch günstigen Rolle des TrkA-Rezeptors: G. M. Brodeur (1997) sowie A. Eggert (2000), konnten zeigen, dass eine hohe Expression von TrkA in Neuroblastomzellen mit einer für die Patienten günstigen Prognose einhergeht. J.H. Schulte et al. (2004) zeigten darüberhinaus, dass Neuroblastomzellen mit hoher TrkA-Expression eine hohe chromosomale Stabilität aufweisen, die zumindest teilweise auf die Induktion des Gens XRCC4 als DNA-Reparaturgen zurückzuführen ist (Schulte et al., 2008). Durch Strahlung induzierte Doppelstrangbrüche der DNA können offensichtlich durch die Anwesenheit von XRCC4 besser repariert werden. Ob die hohe Expression von XRCC4 auch direkt eine erhöhte Strahlenresistenz der Zellen bedingt, muss in weiterführenden funktionellen Studien geklärt werden.

Nach Bestrahlung der oben genannten Zelllinien wurde untersucht, welche Gene als Antwort auf die Bestrahlung exprimiert wurden, d.h. welche Gene sich durch die erfolgte Bestrahlung änderten. Dabei stellten sich 218 Gene dar, die in tabellarischer Form im Anhang dargestellt sind (siehe Anhang 2). Die aus meiner Sicht für diese Studie besonders relevanten Gene werden im Folgenden diskutiert.



Eine besonders hohe Expression der jeweiligen verschiedenen Gene zeigte sich in SY5Y-TrkA. Zuerst soll hier p21 erwähnt werden, welches als klassische Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche exprimiert wird (Bunz et al., Science. 1998 Nov 20;282(5393):1497-501); (Hattinger CM et al., J Histochem Cytochem, 50:81-89, 2002).

Weiterhin zeigte sich eine hohe Expression von CFLAR (Caspase 8 und FADD-like apoptosis regulator), welches eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielt. MCM4 (minichromosome maintenance deficient 4), ein wichtiges Gen für die Replikation des eukaryotischen Genoms und höchstwahrscheinlich an der Bereitstellung von anderen Proteinen, die mit DNA-Replikation zusammenhängen, beteiligt (Yu et al., J Mol Biol. 340: 1197-206, 2004), zeigt sich außerdem stark exprimiert. MCM4 liegt auf Chromosom 8 neben PRKDC/DNA-PK (DNA-dependent protein kinase Catalytic subunit), einer DNA-aktivierten Proteinkinase, die bei der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielt (Connelly et al., Genomics, 47:71-83, 1998).

Außerdem fand sich eine hohe Expression von DDB2 (damage-specific DNA binding protein 2). Dieses spielt als DNA-Reparaturgen eine große Rolle, z.B. in der Ätiologie von Xeroderma pigmentosum, einer durch UV-Strahlung induzierten Hauterkrankung.

Desweiteren ist das Gen GADD45A (growth-arrested and DNA-damage-inducible, alpha) stark exprimiert, welches zu einer Gruppe von Genen gehört, deren Transkriptionshöhe aufgrund von Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen oder aufgrund von wachstumsverhaltenden Bedingungen (in diesem Fall Bestrahlung) ansteigt (Daino K et al., Radiat Res. 157: 478-82, 2002) (Carrier F et al., J Biol Chem, 269:32672-7, 1994) und die Proliferation an G1 und G2-Kontrollpunkten als Antwort auf DNA-Schäden blockiert (Korabiowski M et al, Histol Histopathol. 17: 805-11, 2002). Die durch DNA-Schäden induzierte Transkription dieses Genes wird sowohl durch einen p53-abhängigen als auch durch einen p53-unabhängigen Mechanismus vermittelt (Smith ML et al. Science, 266: 1376-80, 1994). Die Induktion von p53 ist hier als funktionell anzusehen, da p53 das bereits oben beschriebene p21 induziert.

Foxo3A (forkhead box 3A), welches höchstwahrscheinlich als Trigger für Apoptose durch Genexpression von für den Zelltod wichtigen Genen funktioniert, zeigt sich ebenfalls vermehrt exprimiert (Liu JW et al., *Oncogene*, 24:2020-31, 2005).

Zur besseren Visualisierung der Ergebnisse wurde die Anzahl der sich ändernden Gene in einem Venn-Diagramm dargestellt (s. Abb. 14 S. 44): Dieses soll zeigen, wieviele Gene in allen 3 Zelllinien (SY5Y-TrkA, SY5Y-Vec, SY5Y-TrkB) reguliert werden, und wieviele Gene in den Schnittmengen der jeweiligen Zelllinien reguliert wurden. In dem Diagramm fällt auf, dass eine höhere Anzahl an Genen exklusiv in SY5Y-TrkA reguliert ist, nämlich mehr als das Doppelte als bei den anderen Zelllinien. Bei SY5Y-TrkB und SY5Y-Vec liegen die exprimierten Gene in der Anzahl sehr dicht beieinander, so dass keine grossen Unterschiede auffallen. Auch bei den Schnittmengen der Gene zeigt sich wieder die höhere Anzahl bei SY5Y-TrkA und SY5Y-Vec.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass SY5Y-TrkA transduzierte Zellen offenbar stärker auf Bestrahlung reagieren als SY5Y-TrkB oder SY5Y-Vec Transduktanten. Dieses bezieht sich nicht nur auf die unbestrahlte Genausstattung (Vorhandensein von XRCC4), sondern SY5Y-TrkA transduzierte Zellen zeigen darüber hinaus eine stärkere Reaktion der Genexpressionsprofile auf die Bestrahlung.

#### **4.3 Identifikation von generellen Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung**

Bei der Diskussion dieser Frage zeigte sich, dass als Antwort auf Bestrahlung der untersuchten Zelllinien eine Regulation in Form von erhöhter Genexpression erst nach ca. 4 Stunden auftritt. Die nach diesem Zeitraum exprimierten Gene zeigten sich als sogenannte „klassische“ Gene, die bei DNA-Doppelstrangbrüchen, in diesem Fall durch Bestrahlung induziert, auftreten. So stellte sich z.B. das Gen p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) dar, welches als eines der klassischen Gene als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche auftritt. (Bunz et al., *Science*. 1998 Nov 20;282(5393):1497-501); (Hattinger CM et al., *J Histochem Cytochem*, 50:81-89, 2002).

Außerdem wird das Gen p53 induziert, welches in diesem Fall als funktionell exprimiert anzusehen ist, da es p21 induziert (Bunz et al., Science. 1998 Nov 20;282(5393):1497-501); (Su et al., Lung Cancer, 40: 259-266, 2003).

Weiterhin wird das DNA-Reparatur assoziierte Gen DDB2 (damage-specific DNA binding protein 2) deutlich exprimiert, welches in der Ätiologie von z.B. Xeroderma pigmentosum, einer durch UV- Strahlung induzierten Hauterkrankung, vorkommt. DDB2 ist an der Regulation von p53 beteiligt und die DDB2- Expression wird ihrerseits von p53 reguliert. (Itoh T et al., Mol Cell Biol., 23: 7540-7553, 2003).

Außerdem stellt sich das Cyclin E2 dar, welches mit dem bereits erwähnten p21 interagiert (Orend G et al., Oncogene, 16: 2575-2583, 1998).

So wird in diesem Teil der Studie gezeigt, dass der durch Strahlung induzierte DNA-Schaden von den Zellen wahrgenommen wird. Dieses zeigt sich durch die Aktivierung von p53 und wird außerdem in der vermehrten Expression von p21 deutlich, wodurch der p53-Signalweg aktiviert wird.

#### **4.4 Identifikation Trk-Status spezifischer Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung**

Bei der Untersuchung dieses Punktes in dieser Arbeit zeigte sich, dass die Genexpressionsveränderungen nach Bestrahlung abhängig sind von der An-oder Abwesenheit der jeweiligen spezifischen Liganden. So exprimierten die mit ihrem Liganden transfizierten SY5Y-TrkB Zellen fast doppelt so viele Gene, wie die nicht transfizierten Vergleichszellen, nämlich 117 Gene bei Anwesenheit des Liganden BDNF und 56 Gene bei Abwesenheit von BDNF. Außerdem zeigten die Trk transduzierten Zelllinien ein höheres Expressionsmuster nach der Bestrahlung als die nicht transduzierte Leervektorkontrolle SY5Yvec.

Mit den jeweiligen Liganden transfizierte Zellen zeigen also nach Bestrahlung eine vermehrte Genexpression, während Zellen in Abwesenheit des spezifischen Liganden nach Bestrahlung nicht vermehrt Gene exprimieren. So ist die individuelle Antwort der Zellen auf Bestrahlung sowohl abhängig von der An- oder Abwesenheit ihrer spezifischen Liganden, als auch vom Trk-Status der Zellen.

Die funktionelle Bedeutung der einzelnen identifizierten Gene für die Antwort der Neuroblastomzellen auf Bestrahlung sowie ihr Einfluss auf die Strahlenresistenz von Neuroblastomzellen muss nun in weiterführenden funktionellen Studien geprüft werden.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten mRNA Microarrayprofile an einem Neuroblastomzellkulturmodell erstellt und analysiert werden, um erste Anhaltspunkte für die molekularen Mechanismen der Tropomyosin-related Kinase (Trk) - Rezeptor vermittelten Strahlenresistenz von Neuroblastomzellen zu erhalten. Besonderes Augenmerk wurde auf die Unterschiede und Gemeinsamkeiten regulierter Gene als Antwort auf Bestrahlung in den Zelllinien SY5Y-TrkA und SY5Y-TrkB gelegt. Identifizierte Expressionsunterschiede wurden bezogen auf den Trk-Status der entsprechenden Zelllinien (SY5Y-Vec, SY5Y-TrkB und SY5Y-TrkA) mit und ohne Stimulation durch deren jeweilige Liganden, Nerve Growth Factor (NGF) für SY5Y-TrkA, bzw. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) für SY5Y-TrkB mittels Analysis of Variance (ANOVA) Test statistisch analysiert. Diese Genmuster wurden miteinander verglichen. Die entsprechenden Zelllinien waren zunächst in unbestrahltem Zustand. Anschließend wurden Genexpressionsveränderungen im Zeitverlauf nach Bestrahlung abhängig vom Trk-Status der Zelllinien und in An- und Abwesenheit der Liganden untersucht. So sollten erste Hinweise für Mechanismen der unterschiedlichen Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien gefunden werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf DNA-Reparaturgene gelegt. Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Der basale Trk-Rezeptor Expressionsstatus von SY5Y-Neuroblastomzellen führt zu größeren Expressionsunterschieden in Form von Geninduktion oder Genregulation als die zusätzliche exogene Aktivierung der Rezeptoren durch ihre spezifischen Liganden BDNF für SY5Y-TrkB bzw. NGF für SY5Y-TrkA, die lediglich eine geringe Änderung im Expressionsmuster bewirkt.
2. Die stabile Expression des TrkA-Rezeptors vermittelt auch in Abwesenheit des spezifischen Liganden NGF eine gewisse Resistenz gegenüber Bestrahlung. Ursache hierfür könnte die Herauf-Regulation bestimmter DNA-Reparaturgene sein, vor allem des Gens X-ray repair cross complementing 4 (XRCC4), das an der chromosomalen Stabilität TrkA-tragender Neuroblastomzellen beteiligt sein könnte.
3. Da in SY5Y-TrkA Zellen auch das klassische DNA-Reparaturgen p21 stark induziert wird, vermutete ich eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität dieser Zellen, die in nachfolgenden Studien mittlerweile auch nachgewiesen werden konnte.

## Literaturverzeichnis

1. Acheson, A., Conover, J.C., Fandi, J.P. (1985):

A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death.

Nature 374, 450-453.

2. Ambros, I.M., Zellner, A., Roald, B., Amann, G., Ladenstein, R., Printz, D., Gardner, H., Ambros, P.F. (1996):

Role of ploidy, chromosome1p, and schwann cells in the maturation of neuroblastoma.

N.Engl. J.Med. 334, 1505-1511

3. Beckwith, J., Perrin, E. (1963):

In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors.

Am.J.Pathol.431, 1089ff.

4. Berthold, F., Hero, B. (2000):

Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach.

Drugs 59, 1261-1277.

5. Brodeur, G.M., Sekhon, G.S., Goldstein, M.N. (1977):

Chromosomal aberrations in human neuroblastomas

Cancer 40, 2256-2263.

6. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1984):

Amplification of n-myc in untreated neuroblastoma correlates with advanced disease stage.

Science 224, 1121-1124.

7. Brodeur, G.M., Hayes, F.A., Green, A.A. ( 1987):

Consistent n-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients.

Cancer Res. 47, 4248-4253.

8. Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castleberry, R.P., De Bernade, B., Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F. (1993):

Revision of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment.

J.Clin.Oncol. 11, 1466-1477.

9. Brodeur, G.M., Maris, J.M., Yamashiro, D.J., Hogarty, M.D., White, P.S. (1997):

Biology and genetics of human neuroblastomas

J.Pediat. Hemat. Oncol. 19, 93-101.

10. Bunz, F., Dutriax, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1998):

Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage.

Science 282, 1497-501.

11. Connelly, M.A., Zhang, H., Kieleczawa, J., Anderson, C.W. (1998):

The promoters for human DNA-PKcs (PRKDC) and MCM4: divergently transcribed genes located at chromosome 8 band q11.

Genomics. 47, 71-83.

12. Cohn, S.L., London, W.B., Huang, D., Katzenstein, H.M., Salwan, H.R., Reinhart, T., Madafiglio, J., Marshall, G.M., Norris, M.D., Haber, M. (2000):

Mycn expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified mycn.

J.of Clin.Oncol. Vol.18, No.21, 3604-3613.

13. Cohn, S.L., Look, A.T., Joshi, V.V., Holbrook, J.T., Salwan, H., Chagnovich, D., Chesler, L., Rowe, S.T., Valentine, M.B., Komuro, H., Castleberry, R.P., Bowman, L.C., Rao, P.V., Seeger, R.C., Brodeur, G.M. (1995):

Lack of correlation of n-myc gene amplification with prognosis in localized neuroblastoma: a pediatric oncology study group.

Cancer Res. 55, 721-726.

14. Cohen, P.S., Seeger, R.C., Triche, T.J., Israel, M.A. (1998):

Detection of n-myc gene expression in neuroblastoma tumors by in situ hybridisation.

Am.J.Pathol. 131, 391-397.

15. Carrier, F., Smith, M.L., Bae, I., Kilpatrick, K.E., Lansing, T.J., Chen, C.Y., Engelstein, M., Friend, S.H., Henner, W.D., Gilmer, T.M.(1994):

Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein.

J Biol Chem. 269,32672-7.

16.Daino, K., Ichimura, S., Neno, M.( 2002) :

Early induction of CDKN1A (p21) and GADD45 mRNA by a low dose of ionizing radiation is due to their dose-dependent post-transcriptional regulation.

Radiat Res.157,478-82.

17. Evans, A.E., D'Angio, G.J., Randolph, J. (1971):

A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group  
Cancer 27, 374-378.

18. Evans, A.E., D'Angio, G.J., Propert, K., Anderson, J., Hann, H-W.L. (1987):

Prognostic factors in neuroblastoma

Cancer 59, 1853-1859.

19. Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X.G., Brodeur, G.M. (2000):

Prognostic and biological role of neurotrophin receptor trka and trkb in neuroblastoma.

Klin Padiatr. 212, 200-205.

20. Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X., Chou, T.T., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Brodeur, G.M. (2000):

Molecular dissection of trka signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells.

Oncogene 19, 2043-2051.

21. Hattinger, C.M., Jochemsen, A.G., Tanke, H.J., Dirks, R.W. ( 2002):



Induction of p21 mRNA synthesis after short-wavelength UV light visualized in individual cells by RNA FISH.

J. Histochem. Cytochem. 50, 81-9.

22. Hecht, M., Schulte, J. H., Eggert, A., Wilting, J., Schweigerer, L. (2005):

The neurotrophin receptor trkb cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness.

Carcinogenesis 26, 2105-2115

23. Ho, R., Eggert, A., Hishiki, J., Minturn, J.E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A., M., Evans, A., Brodeur, G., M. (2002):

Resistance to chemotherapy mediated by trkb in neuroblastoma.

Cancer Res. 62, 6462-6466

22. Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., Vingron, M. (2002):

Bioinformatics 18, 96-104

24. Itoh, T., O'Shea, C., Linn, S. (2003):

Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53.

Mol Cell Biol. 23, 7540-53.

25. Kogner, P., Barbany, G., Dominici, C., Castello, M.A., Raschella, G., Persson, H. (1993):

Coexpression of messenger rna for trk protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis.

Cancer Res. 53, 2044-2055.

26. Korabiowska, M., Cordon-Cardo, C., Betke, H., Schlott, T., Kotthaus, M., Stachura, J., Brinck, U. (2002):

GADD153 is an independent prognostic factor in melanoma: immunohistochemical and molecular genetic analysis.

Histol Histopathol. 17, 805-11.

27. Look, A.T., Hayes, F.A., Nitschke, R., Mc Williams, N.B., Green, A.A. (1984):

Cellular dna content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma.

N.Engl.J.Med.311, 231ff.

28. Look, A.T., Hayes, F.A., Shuster, J.J., Douglas, E.C., Castleberry, R.P., Brodeur, G.M. (1991):

Clinical relevance of tumorcell ploidy and n-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a pediatric oncology study group.

J.Clin. Oncol. 9, 581ff.

29. Liu, J.W., Chandra, D., Rudd, M.D., Butler, A.P., Pallotta, V., Brown, D., Coffey, P.J., Tang, D.G.(2005):

Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS.

Oncogene.24,2020-31.

30. Maris, J.M., White, P.S., Beltinger, C.P., Sulmann, E.P., Castleberry, R.P., Shuster, J.J., Look, A.T., Brodeur, G.M. (1995):

Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma.

Cancer Res.55, 4644-4669.

31. Neuroblastomstudie NB97, Fassung vom 30.04.1997

32. Orend, G., Hunter, T., Ruoslahti, E. (1998):  
Cytoplasmic displacement of cyclin E-cdk2 inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 in anchorage-independent cells.

Oncogene. 16,2575-83.

33. Pritchard, J., Hickman, J.A. (1994):

Why does stage 4s neuroblastomas regress spontaneously?

The Lancet 344, 869-870.

34. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3. Edition, Chapter 29,761-797

Lippincott-Raven

35. Segal, R. (2003):

Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations

Annu Rev Neurosci 26, 299-330

36. Shimada, H., Catten, J., Newton, W.A., Sachs, N., Hamoud, A.B., Chiba, T., Marsden, H.B., Misugi, K. (1984):

Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastoma.

J.Natl.Can. Inst.73,405-413

37. Su, L., Sai, Y., Fan, R., Thurston, S.W., Miller, D.P., Zhou, W., Wain, J.C., Lynch, T.J., Liu, G., Christiani, D.C. (2003):

P53 (codon 72) and P21 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21.

Lung Cancer. 40,259-66.

38. Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr.(1994):

Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science.266,1376-80.

39. Takeda, O., Hanaka, M., Uehara, T., Maseki, N., Sakashita, A., sakurai, M., Kanda, N., Arai, Y., Kaneko, Y. (1996):

An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on1p in neuroblastomas.

British J.Cancer 74, 1620-1626.

40. Tanaka, T., Hiyama, E., Sugimoto, T., Sawada, T., Tanabe, M., Ida, N. ( 1995):

Trka gene expression in neuroblastoma is the clinical significance of an immunohistochemical study.

Cancer 76, 1086-1095.

41. White, P.S., Maris, J.M., Beltinger, C. (1995):

A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within 1p36.2-.3.

Proc.Natl. Acad.Sci.USA 92, 5520-5524.

42. Yu, Z., Feng, D., Liang, C.( 2004):

Pairwise interactions of the six human MCM protein subunits.

J Mol Biol.340,1197-206.

**Abkürzungsverzeichnis**

NB	Neuroblastom
LDH	Laktatdehydrogenase
NSE	Neuron-spezifische Enolase
ZNS	Zentrales Nervensystem
INSS	International Neuroblastoma Staging System
NGF	Nerve Growth Factor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
FCS	Fetal Calf Serum
FBS	Fetal Bovine Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
Trk	Tropomyosin-related Kinase
XRCC4	X-ray repair cross complementing 4
DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonucleinacid
ANOVA	Analysis of Variance
MAS	Micro Array Suite
NT3	Neurotrophin 3
NGFR	Nerve growth factor receptor
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
Gy	Gray
VSN	Varianznormalisierende Stabilisierung
RMA	Robust Multi Array
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
MYC	Myelocytomatosis protein
RT	Reverse Transkriptase
PBS	Phosphate Buffered Saline
cRNA	complementary ribonucleic acid
h	Stunde
log	Logarithmus
FC	Fold Change
Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
CFLAR	Caspase 8 und FADD like apoptosis regulator
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
MCM4	Minichromosome Maintenance deficient 4
GADD 45A	Growth Arrested and DNA-damage- inducible alpha
DDB2	Damage- specific DNA binding protein 2
UV	ultraviolett
PRKDC/DNA-PK	DNA-dependent protein kinase Catalytic subunit
g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
kDa	kilo Dalton
PP	Polypropylen

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Neuroblastoms .....	14
Tabelle 2: Risikostratifizierung laut Neuroblastomstudie NB 2004 .....	18
Tabelle 3: Qualitätskontrolle MAS5.0 .....	36
Abb 1: Signaltransduktion der Trk Rezeptoren .....	9
Abb 2a: Klinische Bedeutung der Trk Rezeptoren A und B.....	11
Abb 2b: Biologische Bedeutung der Trk Rezeptoren .....	11
Abb 3: Ablauf der Hybridisierung ( Affymetrix® ).....	29
Abb.4: Wachstumskurve SY5Y TrkA mit und ohne Ligand (NGF) .....	31
Abb.5:Wachstumskurve SY5Y TrkB mit und ohne Ligand (BDNF).....	32
Abb.6: Wachstumskurve SY5Y Vec.....	32
Abb.7: Expressionswerte der Chips als Histogramm .....	34
Abb.8: Boxplots der Roh-Intensitäten.....	35
Abb.9: Normalisierungsverfahren MAS5 als Boxplot dargestellt .....	37
Abb.10: Normalisierungsverfahren RMA als Boxplot dargestellt.....	38
Abb.11: Normalisierungsverfahren VSN als Boxplot dargestellt .....	38
Abb.12: Genexpressionsunterschiede in unbestrahlten Zellen bedingt durch Trk- Status und An-und Abwesenheit von Liganden (Heatmap).....	40
Abb.13: Genexpressionsmuster in unbestrahlten Zellen in Abwesenheit von Liganden (Heatmap) .....	42
Abb.14: Venn-Diagramm zur Darstellung der Kinetik der exprimierten Gene .....	44
Abb.15: Generelle Expressionsveränderungen nach Bestrahlung (Heatmap).....	45

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben:

Frau Professor Dr. med. Angelika Eggert: Für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in ihrem Labor und für konstruktive Kritik und Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Alexander Schramm: Seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung und der Erarbeitung der angewandten Methoden, sowie Diskussionen und Ratschläge haben tatkräftig zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. med. Johannes H. Schulte: Für seine tatkräftige Unterstützung besonders bei der statistischen Auswertung der Daten in dieser Arbeit und für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Durchführung der Arbeiten im Labor gebührt ihm an dieser Stelle mein besonderer Dank.

Die Mitarbeiter des Onkologischen Labors der Universitätskinderklinik Essen: Für die Bereitstellung der Laborgeräte, die kooperative Zusammenarbeit, sowie die freundlich entgegengebrachte Atmosphäre.

Herrn Groneberg aus der Strahlenklinik des Universitätsklinikums Essen: Für die Möglichkeit der Bestrahlung der Zelllinien am Kobaltgerät.

Herrn Priv. Doz. Dr. Ludger Klein-Hitpass: Für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Gen-Chips.



Meinen Eltern Angelika und Erwin Dobrzinski, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben.

Meinem Ehemann Jochen Schneider für die Unterstützung bei der Korrektur und Ratschlägen zum Layout dieser Arbeit, sowie für die entgegengebrachte Geduld.

Meinen Kindern Eva und Karl, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit auch in schwierigen Zeiten immer wieder zum Lachen gebracht haben.

Danke!

## Anhang 1

Anhang1: Tabelle der Genexpressionsänderungen in unbestrahlten Zellen in Abwesenheit von Liganden. In der 1. Spalte stellt sich die laufende Nummer des Genes dar. In der 2. Spalte die Affymetrix ID, in der 3. Spalte die Unigene ID. Es folgen spaltenweise der Gennamen, das zugehörige Gensymbol und die entsprechenden Untersuchungszeitpunkte. Die Ergebnisse sind in relativen Expressionseinheiten angegeben. Besonders hervorzuhebende Gene sind in gelber Farbe hinterlegt.

Nr	Affymetrix ID	UnigenelD	Gen	GenSymbol	SYSY VEC 0 Stunden	SYSY TK4 0 Stunden	SYSY TK8 0 Stunden
1	200637_s_at	5792	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PTPRF	713	1028	242
2	200665_s_at	6678	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	1689	7168	1686
3	200790_at	4953	ornithine decarboxylase 1	ODC1	9835	29534	7286
4	200872_at	6281	S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	S100A10	7402	15930	579
5	200878_at	2034	endothelial PAS domain protein 1	EPAS1	212	45	1587
6	200897_s_at	23022	palladin	KIAA0992	1151	4655	3217
7	200907_s_at	23022	palladin	KIAA0992	263	1691	1282
8	200917_s_at	6734	signal recognition particle receptor ('docking protein')	SRPR	1629	1773	385
9	201012_at	301	annexin A1	ANXA1	201	8578	41
10	201116_s_at	1363	carboxypeptidase E	CPE	3104	381	1369
11	201117_s_at	1363	carboxypeptidase E	CPE	3025	77	1668
12	201125_s_at	3693	integrin, beta 5	ITGB5	662	4395	1363
13	201185_at	5654	protease, serine, 11 (IGF binding)	PRSS11	507	2329	407
14	201242_s_at	481	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	8622	1825	3186
15	201243_s_at	481	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	6814	1610	3986
16	201289_at	3491	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	263	1614	188
17	201315_x_at	10581	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	IFITM2	547	3242	563
18	201430_s_at	1809	dihydropyrimidinase-like 3	DPYSL3	2087	2770	532
19	201506_at	7045	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	TGFB1	492	1014	83
20	201539_s_at	2273	four and a half LIM domains 1	FHL1	666	3183	539
21	201559_s_at	25932	chloride intracellular channel 4	CLIC4	2452	6282	329
22	201578_at	5420	podocalyxin-like	PODXL	1345	5869	443
23	201581_at	56255	hypothetical protein DJ971N18.2	DJ971N18.2	4217	910	2496
24	201590_x_at	302	annexin A2	ANXA2	26492	48380	7737
25	201647_s_at	950	scavenger receptor class B, member 2	SCARB2	2655	4269	857
26	201688_s_at	7163	tumor protein D52	TPD52	1666	330	304
27	201689_s_at	7163	tumor protein D52	TPD52	1040	66	210
28	201718_s_at	2037	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	EPB41L2	150	958	41
29	201719_s_at	2037	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	EPB41L2	296	1526	302
30	201744_s_at	4060	lumican	LUM	3804	13	808
31	201852_x_at	1281	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	COL3A1	299	15015	372
32	201887_at	3597	interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	543	2471	499
33	201888_s_at	3597	interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	106	1538	106
34	202007_at	4811	nidogen (enactin)	NID	20	556	1051

35	202036_s_at	6422	secreted frizzled-related protein 1	SFRP1	248	2202	230
36	202037_s_at	6422	secreted frizzled-related protein 1	SFRP1	1775	3383	52
37	202071_at	6385	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	SDC4	350	1559	783
38	202085_at	9414	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	TJP2	453	17475	331
39	202242_at	7102	transmembrane 4 superfamily member 2	TM4SF2	1000	26	205
40	202275_at	2539	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	519	1741	293
41	202289_s_at	10579	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	TACC2	1256	845	162
42	202342_s_at	23321	tripartite motif-containing 2	TRIM2	1028	534	2535
43	202350_s_at	4147	matrilin 2	MATN2	139	1105	127
44	202381_at	8754	a disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	ADAM9	977	4996	1509
45	202391_at	10409	brain abundant, membrane attached signal protein 1	BASP1	1821	710	192
46	202409_at	256867	NA	NA	2085	125	1618
47	202449_s_at	6256	retinoid X receptor, alpha	RXRA	404	1306	317
48	202507_s_at	6616	synaptosomal-associated protein, 25kDa	SNAP25	1683	365	464
49	202508_s_at	6616	synaptosomal-associated protein, 25kDa	SNAP25	1621	138	618
50	202517_at	1400	collapsin response mediator protein 1	CRMP1	6742	577	4987
51	202565_s_at	6840	supervillin	SVIL	211	1295	131
52	202575_at	1382	cellular retinoic acid binding protein 2	CRABP2	2257	487	4640
53	202576_s_at	11269	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19	DDX19	822	82	1125
54	202598_at	6284	S100 calcium binding protein A13	S100A13	792	4469	614
55	202599_s_at	8204	nuclear receptor interacting protein 1	NRIP1	860	879	44
56	202625_at	4067	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	LYN	2070	495	2496
57	202626_s_at	4067	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	LYN	1509	415	2465
58	202628_s_at	5054	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	140	1773	122
59	202668_at	1948	ephrin-B2	EFNB2	874	169	1862
60	202712_s_at	1159	creatine kinase, mitochondrial 1 (ubiquitous)	CKMT1	2221	263	577
61	202718_at	3485	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	166	2185	1898
62	202719_s_at	26136	testis derived transcript (3 LIM domains)	TES	1104	82	793
63	202765_s_at	2200	fibrillin 1 (Marfan syndrome)	FBN1	46	1312	278
64	202766_s_at	2200	fibrillin 1 (Marfan syndrome)	FBN1	386	5039	2016
65	202822_at	4026	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	LPP	40	1483	138
66	202920_at	287	ankyrin 2, neuronal	ANK2	4304	1028	1288
67	202921_s_at	287	ankyrin 2, neuronal	ANK2	2345	670	284
68	202936_s_at	6662	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	SOX9	426	3063	54
69	202981_x_at	6477	seven in absentia homolog 1 (Drosophila)	SIAH1	1047	2024	4200
70	202992_at	730	complement component 7	C7	265	1169	14570
71	202994_s_at	25814	like mouse brain protein E46	E46L	603	144	1053
72	203000_at	11075	stathmin-like 2	STMN2	19768	132	15709
73	203001_s_at	11075	stathmin-like 2	STMN2	15742	511	9220
74	203002_at	51421	angiominin like 2	AMOTL2	577	1763	141
75	203060_s_at	9060	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	PAPSS2	772	596	134
76	203131_at	5156	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	PDGFRA	456	310	3188
77	203139_at	1612	death-associated protein kinase 1	DAPK1	1248	70	1033
78	203166_at	10428	craniofacial development protein 1	CFDP1	1286	621	2639
79	203242_s_at	10611	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	LIM	1101	1713	88

80	203243_s_at	10611	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	LIM	1845	4182	675
81	203283_s_at	9653	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	HS2ST1	364	1339	243
82	203304_at	25805	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)	BAMBI	1533	599	4360
83	203325_s_at	1289	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	58	1106	257
84	203391_at	2286	FK506 binding protein 2, 13kDa	FKBP2	1242	1836	455
85	203408_s_at	6304	special AT-rich sequence binding protein 1 (binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNA's)	SATB1	2413	72	3710
86	203413_at	4753	NEL-like 2 (chicken)	NELL2	4399	718	934
87	203424_s_at	3488	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	323	110	5524
88	203440_at	1000	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	CDH2	7166	15000	2616
89	203441_s_at	1000	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	CDH2	3906	8884	850
90	203474_at	10788	IQ motif containing GTPase activating protein 2	IQGAP2	115	2987	346
91	203476_at	7162	trophoblast glycoprotein	TPBG	573	5033	1244
92	203499_at	1969	EphA2	EPHA2	723	1985	62
93	203570_at	4016	lysyl oxidase-like 1	LOXL1	2343	4339	687
94	203574_at	4783	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NFIL3	639	2021	446
95	203666_at	6387	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	CXCL12	208	1643	272
96	203705_s_at	8324	frizzled homolog 7 (Drosophila)	FZD7	21	790	506
97	203706_s_at	8324	frizzled homolog 7 (Drosophila)	FZD7	260	1708	1198
98	203735_x_at	8496	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	PPFIBP1	777	3978	623
99	203736_s_at	8496	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	PPFIBP1	361	2873	163
100	203821_at	1839	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	DTR	483	3181	131
101	203824_at	7103	transmembrane 4 superfamily member 3	TM4SF3	237	9440	708
102	203880_at	10063	COX17 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	COX17	3212	857	373
103	203928_x_at	4137	microtubule-associated protein tau	MAPT	1089	71	561
104	203929_s_at	4137	microtubule-associated protein tau	MAPT	869	180	852
105	204011_at	10253	sprouty homolog 2 (Drosophila)	SPRY2	5930	7648	1620
106	204035_at	7857	secretogranin II (chromogranin C)	SCG2	9554	16852	1259
107	204042_at	10810	WAS protein family, member 3	WASF3	1807	22	1263
108	204059_s_at	4199	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	ME1	533	166	1109
109	204062_s_at	9706	unc-51-like kinase 2 (C. elegans)	ULK2	18	190	464
110	204086_at	23532	preferentially expressed antigen in melanoma	PRAME	7072	993	6674
111	204105_s_at	4897	neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	3503	74	1239
112	204135_at	11259	downregulated in ovarian cancer 1	DOC1	566	1553	312
113	204140_at	8460	tyrosylprotein sulfotransferase 1	TPST1	2535	8023	1544
114	204142_at	55556	rTS beta protein	HSRTSBETA	583	25	206
115	204151_x_at	1645	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 120-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	AKR1C1	1896	1593	7111
116	204224_s_at	2643	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	GCH1	4433	1157	4698
117	204239_s_at	4826	neuronatin	NNAT	4121	777	1611
118	204257_at	3995	fatty acid desaturase 3	FADS3	440	967	210
119	204260_at	1114	chromogranin B (secretogranin 1)	CHGB	8938	655	2935
120	204301_at	9920	KIAA0711 gene product	KIAA0711	544	20	560
121	204338_s_at	5999	regulator of G-protein signalling 4	RGS4	5420	22199	2018
122	204412_s_at	4744	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	NEFH	1416	318	324
123	204417_at	2581	galactosylceramidase (Krabbe disease)	GALC	390	835	129
124	204463_s_at	1909	endothelin receptor type A	EDNRA	158	334	1022

125	204464_s_at	1909	endothelin receptor type A	EDNRA	114	1689	3536
126	204465_s_at	9118	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	INA	5026	516	1065
127	204471_at	2596	growth associated protein 43	GAP43	4847	183	1164
128	204513_s_at	9844	engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, <i>C. elegans</i> )	ELMO1	1304	246	917
129	204517_at	5480	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	PPIC	1590	8300	1970
130	204518_s_at	5480	peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)	PPIC	1239	5461	828
131	204589_at	9891	AMP-activated protein kinase family member 5	ARK5	352	1314	181
132	204602_at	22943	dickkopf homolog 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	DKK1	12690	725	21507
133	204619_s_at	1462	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	380	579	1918
134	204620_s_at	1462	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	539	1432	4528
135	204697_s_at	1113	chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	CHGA	3905	396	1247
136	204723_at	55800	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	SCN3B	918	41	111
137	204729_s_at	6804	syntaxin 1A (brain)	STX1A	1304	182	288
138	204743_at	29114	neuronal protein	NP25	1936	102	1517
139	204811_s_at	9254	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	CACNA2D2	3993	657	1726
140	204850_s_at	1641	doublecortin lissencephaly, X-linked (doublecortin)	DCX	386	42	1718
141	204920_at	1373	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	CPS1	131	1009	419
142	204953_at	9892	synaptosomal-associated protein, 91kDa homolog (mouse)	SNAP91	503	28	467
143	204955_at	8406	sushi-repeat-containing protein, X-linked	SRPX	168	3085	172
144	205013_s_at	135	adenosine A2a receptor	ADORA2A	551	35	548
145	205018_s_at	10150	muscleblind-like 2 ( <i>Drosophila</i> )	MBNL2	983	1587	186
146	205022_s_at	1112	checkpoint suppressor 1	CHES1	578	34	1246
147	205052_at	549	AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase	AUH	1046	7293	1004
148	205071_x_at	7518	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	XRCC4	284	2228	91
149	205072_s_at	7518	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	XRCC4	442	1503	318
150	205110_s_at	2258	fibroblast growth factor 13	FGF13	3279	953	9997
151	205113_at	4741	neurofilament 3 (150kDa medium)	NEF3	1706	237	380
152	205150_s_at	9865	KIAA0644 gene product	KIAA0644	498	1699	168
153	205151_s_at	9865	KIAA0644 gene product	KIAA0644	762	1554	358
154	205184_at	2786	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	GNG4	4175	1040	1531
155	205197_s_at	538	ATPase, Cu <sup>++</sup> transporting, alpha polypeptide (Menkes syndrome)	ATP7A	892	774	3162
156	205229_s_at	1690	coagulation factor C homolog, cochliri ( <i>Limulus polyphemus</i> )	COCH	12	580	1217
157	205268_s_at	119	adducin 2 (beta)	ADD2	1116	75	919
158	205304_s_at	3764	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	KCNJ8	140	79	565
159	205311_at	1644	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	DDC	14238	50	15245
160	205350_at	1381	cellular retinoic acid binding protein 1	CRABP1	151	629	972
161	205381_at	10234	leucine rich repeat containing 17	LRRC17	174	10486	784
162	205399_at	9201	doublecortin and CaM kinase-like 1	DCAMKL1	1030	2248	450
163	205463_s_at	5154	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA	283	649	34
164	205472_s_at	1602	dachshund homolog ( <i>Drosophila</i> )	DACH	798	820	71
165	205483_s_at	9636	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	G1P2	1510	2529	377
166	205493_s_at	10570	dihydropyrimidinase-like 4	DPYSL4	1020	289	1299
167	205515_at	8492	protease, serine, 12 (neurotrypsin, molopsin)	PRSS12	4210	4758	940
168	205534_at	5099	BH-protocadherin (brain-heart)	PCDH7	52	2032	31
169	205535_s_at	5099	BH-protocadherin (brain-heart)	PCDH7	18	636	73
170	205547_s_at	6876	transgelin	TAGLN	265	1276	143

171	205609_at	284	angiotensinogen 1	ANGPT1	20	105	662
172	205630_at	1392	corticotropin releasing hormone	CRH	3715	154	1178
173	205673_s_at	25954	NA	NA	803	330	1664
174	205678_at	8120	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit	AP3B2	835	68	486
175	205862_at	9687	GREB1 protein	GREB1	940	270	1210
176	205923_at	5649	reelin	RELN	2636	21802	741
177	205934_at	5334	phospholipase C-like 1	PLCL1	252	618	46
178	205938_at	22843	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)	PPM1E	943	54	316
179	206001_at	4852	neuropeptide Y	NPY	16405	125	2283
180	206013_s_at	51412	actin-like 6	ACTL6	892	47	214
181	206045_s_at	8715	nucleolar protein 4	NOL4	655	160	1290
182	206050_s_at	6050	ribonuclease/angiogenin inhibitor	RNH	2699	4225	975
183	206066_s_at	5889	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)	RAD51C	2841	1154	374
184	206084_at	5801	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	PTPRR	1188	2802	311
185	206104_at	3670	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)	ISL1	15963	2386	12467
186	206167_s_at	395	Rho GTPase activating protein 6	ARHGAP6	233	1836	183
187	206172_at	3598	interleukin 13 receptor, alpha 2	IL13RA2	1435	3928	12
188	206232_s_at	9331	UDP-Gal	B4GALT6	667	1391	307
189	206290_s_at	6000	regulator of G-protein signalling 7	RGS7	1748	521	54
190	206315_at	9244	cytokine receptor-like factor 1	CRLF1	1409	2569	504
191	206332_s_at	3428	interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	1198	3933	133
192	206343_s_at	3084	neuregulin 1	NRG1	390	1669	146
193	206450_at	1621	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monoxygenase)	DBH	4495	45	4756
194	206542_s_at	6595	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	SMARCA2	76	23	503
195	206577_at	7432	vasoactive intestinal peptide	VIP	2220	1169	241
196	206609_at	9947	melanoma antigen, family C, 1	MAGEC1	238	50	4991
197	206626_x_at	6756	synovial sarcoma, X breakpoint 1	SSX1	190	4594	207
198	206627_s_at	6756	synovial sarcoma, X breakpoint 1	SSX1	24	912	44
199	206631_at	5732	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	PTGER2	1346	587	2453
200	206718_at	4004	LIM domain only 1 (rhombotin 1)	LMO1	1458	50	1115
201	206950_at	6335	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	SCN9A	263	2329	141
202	207009_at	8929	paired-like homeobox 2b	PHOX2B	9142	114	6353
203	207012_at	4325	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	MMP16	211	49	658
204	207050_at	781	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1	CACNA2D1	1762	1976	387
205	207069_s_at	4091	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 6 (Drosophila)	MADH6	110	1501	1839
206	207074_s_at	6570	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1	SLC18A1	575	61	953
207	207076_s_at	445	argininosuccinate synthetase	ASS	736	1299	37
208	207172_s_at	1009	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	CDH11	245	1378	1607
209	207173_x_at	1009	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	CDH11	579	3913	6963
210	207183_at	2842	G protein-coupled receptor 19	GPR19	1220	53	242
211	207260_at	54738	FEV protein	HSRNAFEV	1609	177	1062
212	207714_s_at	871	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	SERPINH1	706	6402	2641
213	207747_s_at	55715	docking protein 4	DOK4	1060	459	2659
214	207808_s_at	5627	protein S (alpha)	PROS1	1592	3381	763

215	207819_s_at	5244	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	ABCB4	592	37	931
216	207949_s_at	3382	islet cell autoantigen 1, 69kDa	ICA1	2339	356	835
217	208116_s_at	4121	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	MAN1A1	1467	4591	474
218	208178_x_at	7204	triple functional domain (PTPRF interacting)	TRIO	1198	4579	888
219	208212_s_at	238	anaplastic lymphoma kinase (Ki-1)	ALK	2250	131	1133
220	208378_x_at	2250	fibroblast growth factor 5	FGF5	61	2626	211
221	208427_s_at	1993	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)	ELAVL2	963	34	40
222	208456_s_at	22800	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	RRAS2	601	1380	305
223	208605_s_at	4914	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	NTRK1	129	5484	265
224	208621_s_at	7430	villin 2 (ezrin)	VIL2	919	1548	338
225	208622_s_at	7430	villin 2 (ezrin)	VIL2	1882	3057	650
226	208650_s_at	934	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	106	11	2243
227	208651_x_at	934	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	119	716	6387
228	208789_at	284119	polymerase I and transcript release factor	PTRF	198	3334	66
229	208790_s_at	284119	polymerase I and transcript release factor	PTRF	269	874	17
230	208791_at	1191	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	CLU	752	6267	152
231	208792_s_at	1191	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	CLU	850	3121	335
232	208816_x_at	304	annexin A2 pseudogene 2	ANXA2P2	3641	5120	781
233	208860_s_at	546	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	ATRX	692	937	3253
234	208944_at	7048	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	TGFB2	319	1609	902
235	208949_s_at	3958	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	LGALS3	468	2833	267
236	208965_s_at	3428	interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	514	1743	15
237	208966_x_at	3428	interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	1273	3830	171
238	209013_x_at	7204	triple functional domain (PTPRF interacting)	TRIO	1624	7685	1576
239	209030_s_at	23705	immunoglobulin superfamily, member 4	IGSF4	1486	84	1180
240	209031_at	23705	immunoglobulin superfamily, member 4	IGSF4	3436	525	3476
241	209032_s_at	23705	immunoglobulin superfamily, member 4	IGSF4	1227	182	884
242	209082_s_at	80781	collagen, type XVIII, alpha 1	COL18A1	403	1812	466
243	209106_at	8648	nuclear receptor coactivator 1	NCOA1	363	1465	656
244	209122_at	123	adipose differentiation-related protein	ADFP	2419	845	4088
245	209129_at	7205	thyroid hormone receptor interactor 6	TRIP6	52	1278	224
246	209147_s_at	8611	phosphatidic acid phosphatase type 2A	PPAP2A	762	2266	219
247	209163_at	1534	cytochrome b-561	CYB561	6718	1313	7634
248	209167_at	2824	glycoprotein M6B	GPM6B	534	33	1899
249	209169_at	2824	glycoprotein M6B	GPM6B	688	77	1015
250	209170_s_at	2824	glycoprotein M6B	GPM6B	783	202	1016
251	209184_s_at	8660	insulin receptor substrate 2	IRS2	3681	285	3028
252	209185_s_at	8660	insulin receptor substrate 2	IRS2	11200	727	11054
253	209213_at	873	carbonyl reductase 1	CBR1	1379	98	604
254	209267_s_at	64116	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	SLC39A8	73	107	1119
255	209277_at	7980	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	1299	325	2260
256	209278_s_at	7980	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	3468	33	3333
257	209287_s_at	10602	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	CDC42EP3	2746	1378	529
258	209291_at	3400	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	178	1919	12
259	209292_at	3400	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	59	781	11

260	209353_s_at	23309	SIN3 homolog B, transcriptional regulator (yeast)	SIN3B	1953	53	1806
261	209386_at	4071	transmembrane 4 superfamily member 1	TM4SF1	182	7756	327
262	209387_s_at	4071	transmembrane 4 superfamily member 1	TM4SF1	36	5568	25
263	209465_x_at	5764	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	PTN	1259	9455	334
264	209466_x_at	5764	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	PTN	2201	17043	668
265	209505_at	7025	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	NR2F1	1717	22	1842
266	209560_s_at	8788	della-like 1 homolog (Drosophila)	DLK1	40079	48	33034
267	209570_s_at	27065	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence	D4S234E	816	294	2079
268	209581_at	11145	HRAS-like suppressor 3	HRASLS3	2134	1981	48
269	209582_s_at	4345	antigen identified by monoclonal antibody MRC OX-2	MOX2	196	497	1189
270	209583_s_at	4345	antigen identified by monoclonal antibody MRC OX-2	MOX2	383	328	2647
271	209598_at	10687	paraneoplastic antigen MA2	PNMA2	3448	242	2333
272	209602_s_at	2625	GATA binding protein 3	GATA3	2867	1138	6804
273	209603_at	2625	GATA binding protein 3	GATA3	1075	1274	4445
274	209627_s_at	26031	oxysterol binding protein-like 3	OSBPL3	1376	1034	226
275	209687_at	6387	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	CXCL12	215	1543	435
276	209690_s_at	55715	docking protein 4	DOK4	486	83	1814
277	209691_s_at	55715	docking protein 4	DOK4	1255	734	6590
278	209699_x_at	1646	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2 bile acid binding protein 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	AKR1C2	1048	1303	5565
279	209710_at	2624	GATA binding protein 2	GATA2	7777	1260	11378
280	209737_at	9863	atrophin-1 interacting protein 1	AIP1	595	87	1213
281	209747_at	7043	transforming growth factor, beta 3	TGFB3	119	1403	697
282	209755_at	23057	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2	NMNAT2	2845	139	360
283	209765_at	8728	a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)	ADAM19	640	1141	264
284	209771_x_at	934	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	688	955	18064
285	209821_at	90865	chromosome 9 open reading frame 26 (NF-HEV)	C9orf26	123	943	24
286	209840_s_at	54674	leucine rich repeat neuronal 3	LRRN3	3011	657	7652
287	209841_s_at	54674	leucine rich repeat neuronal 3	LRRN3	4632	602	13863
288	209849_s_at	5889	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)	RAD51C	3225	140	878
289	209960_at	3082	hepatocyte growth factor (hepapoietin A scatter factor)	HGF	309	6885	387
290	209961_s_at	3082	hepatocyte growth factor (hepapoietin A scatter factor)	HGF	370	4390	341
291	209988_s_at	429	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila)	ASCL1	11916	2441	8059
292	209994_s_at	5243	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	ABCB1	2175	392	1699
293	210078_s_at	7881	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	KCNAB1	285	43	593
294	210095_s_at	3486	insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	386	6839	1908
295	210105_s_at	2534	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	3425	664	3293
296	210123_s_at	1139	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7	CHRNA7	2718	324	1239
297	210221_at	1136	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	CHRNA3	10175	2351	14089
298	210247_at	6854	synapsin II	SYN2	1622	2253	320
299	210273_at	5099	BH-protocadherin (brain-heart)	PCDH7	145	1264	150
300	210298_x_at	2273	four and a half LIM domains 1	FHL1	1477	4026	421
301	210310_s_at	2250	fibroblast growth factor 5	FGF5	22	1081	22
302	210311_at	2250	fibroblast growth factor 5	FGF5	71	1095	153
303	210315_at	6854	synapsin II	SYN2	938	1280	124
304	210353_s_at	6530	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	SLC6A2	315	434	1318



305	210385_s_at	51752	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	ARTS-1	272	597	118
306	210393_at	8549	G protein-coupled receptor 49	GPR49	1574	7791	1646
307	210394_x_at	6759	synovial sarcoma, X breakpoint 4	SSX4	202	1724	151
308	210427_x_at	302	annexin A2	ANXA2	25051	47328	8458
309	210445_at	2172	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	FABP6	540	26	1050
310	210495_x_at	2335	fibronectin 1	FN1	2717	406	6287
311	210497_x_at	6757	synovial sarcoma, X breakpoint 2	SSX2	184	2257	297
312	210512_s_at	7422	vascular endothelial growth factor	VEGF	1350	729	4013
313	210519_s_at	1728	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	263	1803	974
314	210547_x_at	3382	islet cell autoantigen 1, 69kDa	ICA1	4653	504	1364
315	210675_s_at	5801	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	PTPRR	2989	6858	594
316	210729_at	4887	neuropeptide Y receptor Y2	NPY2R	166	15	477
317	210754_s_at	4067	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	LYN	1395	443	2373
318	210755_at	3082	hepatocyte growth factor (hepapoietin A scatter factor)	HGF	256	4327	452
319	210764_s_at	3491	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	76	1199	216
320	210813_s_at	7518	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	XRCC4	334	1652	343
321	210829_s_at	23635	single-stranded DNA binding protein 2	SSBP2	428	3414	603
322	210904_s_at	3597	interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	35	1838	357
323	210946_at	8611	phosphatidic acid phosphatase type 2A	PPAP2A	414	1886	394
324	210993_s_at	4086	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 1 (Drosophila)	MADH1	703	3593	419
325	210997_at	3082	hepatocyte growth factor (hepapoietin A scatter factor)	HGF	168	2423	33
326	210998_s_at	3082	hepatocyte growth factor (hepapoietin A scatter factor)	HGF	39	3403	42
327	211161_s_at	NA	NA	NA	428	9124	394
328	211203_s_at	1272	contactin 1	CNTN1	1847	145	730
329	211379_x_at	8706	UDP-Gal	B3GALT3	50	39	528
330	211404_s_at	334	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	APLP2	2132	4076	964
331	211587_x_at	1136	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	CHRNA3	3957	1197	6398
332	211612_s_at	3597	interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	235	2029	300
333	211681_s_at	10611	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	LIM	495	1284	16
334	211719_x_at	2335	fibronectin 1	FN1	2574	134	7135
335	211737_x_at	5764	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	PTN	2183	14741	494
336	211772_x_at	1136	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	CHRNA3	4598	485	4102
337	211828_s_at	23043	TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	249	955	36
338	211926_s_at	4627	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	MYH9	1374	2810	652
339	211959_at	3488	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	618	175	10875
340	211986_at	195	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	AHNAK	2978	13920	5030
341	212056_at	23199	KIAA0182 protein	KIAA0182	382	750	3155
342	212057_at	23199	KIAA0182 protein	KIAA0182	461	619	3970
343	212124_at	57178	retinoic acid induced 17	RAI17	4401	1548	7110
344	212135_s_at	493	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	ATP2B4	264	2037	37
345	212136_at	493	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	ATP2B4	208	2150	21
346	212143_s_at	3486	insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	249	4357	563
347	212154_at	6383	syndecan 2 (heparan sulfate proteoglycan 1, cell surface-associated, fibroglycan)	SDC2	2289	105	1066
348	212158_at	6383	syndecan 2 (heparan sulfate proteoglycan 1, cell surface-associated, fibroglycan)	SDC2	1652	22	1217
349	212171_x_at	7422	vascular endothelial growth factor	VEGF	725	234	1686

350	212190_at	5270	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	SERPINE2	377	2161	618
351	212203_x_at	10410	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	IFITM3	310	2130	402
352	212298_at	8829	neuropilin 1	NRP1	56	1886	62
353	212398_at	5962	radixin	RDX	1383	1803	284
354	212464_s_at	2335	fibronectin 1	FN1	1455	135	5088
355	212472_at	9645	flavoprotein oxidoreductase MICAL2	MICAL2	382	870	175
356	212473_s_at	9645	flavoprotein oxidoreductase MICAL2	MICAL2	174	1465	56
357	212488_at	1289	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	116	2632	51
358	212489_at	1289	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	41	2392	24
359	212526_at	23111	spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome)	SPG20	14	584	58
360	212551_at	10486	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	CAP2	657	1684	184
361	212573_at	23052	KIAA0830 protein	KIAA0830	857	1996	338
362	212589_at	22800	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	RRAS2	534	2605	521
363	212616_at	29962	hypothetical protein BC022889	BC022889	494	607	2545
364	212646_at	23180	raft-linking protein	RAFTLIN	1690	97	2040
365	212655_at	23174	BDG-29 proten	BDG29	1386	446	2808
366	212667_at	6678	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	1015	4285	866
367	212670_at	2006	elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome)	ELN	59	1597	117
368	212706_at	10156	RAS p21 protein activator 4	RASA4	229	491	1367
369	212713_at	4239	microfibrillar-associated protein 4	MFAP4	409	1077	2137
370	212730_at	23336	desmuslin	DMN	662	1751	2990
371	212741_at	4128	monoamine oxidase A	MAOA	1528	92	1613
372	212750_at	26051	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	PPP1R16B	543	69	768
373	212761_at	6934	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	2951	13358	4767
374	212762_s_at	6934	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	608	3455	931
375	212915_at	23024	likely ortholog of mouse semaF cytoplasmic domain associated protein 3	SEMACAP3	156	2400	285
376	212928_at	26516	ribosomal protein S5 pseudogene 1	RPSP5P1	2126	1217	6256
377	212930_at	490	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1	ATP2B1	594	1528	337
378	213069_at	57493	HEG homolog	HEG	197	1104	782
379	213106_at	10396	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1	ATP8A1	291	159	637
380	213107_at	23043	TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	758	1597	214
381	213109_at	23043	TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	394	1175	207
382	213150_at	3206	homeo box A10	HOXA10	1005	795	71
383	213201_s_at	7138	troponin T1, skeletal, slow	TNNT1	814	2355	302
384	213238_at	57205	ATPase, Class V, type 10D	ATP10D	688	2319	357
385	213241_at	10154	plexin C1	PLXNC1	390	1004	213
386	213245_at	107	adenylate cyclase 1 (brain)	ADCY1	1922	204	2709
387	213248_at	221362	hypothetical protein LOC221362	LOC221362	726	142	1766
388	213329_at	23380	formin binding protein 2	FNBP2	529	144	830
389	213342_at	10413	Yes-associated protein 1, 65kDa	YAP1	344	648	47
390	213371_at	11155	LIM domain binding 3	LDB3	423	497	17
391	213373_s_at	841	caspace 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	209	1103	167
392	213422_s_at	84308	hypothetical protein MGC3047	MGC3047	306	521	1337
393	213478_at	23254	KIAA1026 protein	KIAA1026	125	1011	550
394	213484_at	151521	NA	NA	1514	77	1445

395	213503_x_at	302	annexin A2	ANXA2	23375	43688	7512
396	213609_s_at	23544	seizure related 6 homolog (mouse)-like	SEZ6L	516	54	35
397	213689_x_at	6125	ribosomal protein L5	RPL5	828	8667	357
398	213725_x_at	283824	hypothetical protein LOC283824	LOC283824	247	3356	165
399	213802_at	8492	protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin)	PRSS12	4596	9959	1830
400	213847_at	5630	peripherin	PRPH	4729	819	987
401	213849_s_at	5521	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	PPP2R2B	1024	2842	398
402	213865_at	131566	endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein	ESDN	196	2314	21
403	213880_at	8549	G protein-coupled receptor 49	GPR49	3797	15481	11292
404	213894_at	23249	KIAA0960 protein	KIAA0960	2501	379	2628
405	213920_at	23316	cut-like 2 (Drosophila)	CUTL2	989	242	3491
406	214053_at	NA	NA	NA	520	2597	346
407	214156_at	25924	myosin VIIA and Rab interacting protein	MYRIP	959	1287	169
408	214218_s_at	139202	NA	NA	122	39	2899
409	214240_at	51083	galanin	GAL	103	246	514
410	214374_s_at	8496	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	PPFIBP1	284	1451	173
411	214432_at	478	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide	ATP1A3	804	33	404
412	214451_at	7021	transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)	TFAP2B	3369	34	2714
413	214505_s_at	2273	four and a half LIM domains 1	FHL1	1800	4704	541
414	214544_s_at	8773	synaptosomal-associated protein, 23kDa	SNAP23	606	1439	321
415	214608_s_at	2138	eyes absent homolog 1 (Drosophila)	EYA1	2534	239	2181
416	214761_at	23090	OLF-1/EBF associated zinc finger gene	OAZ	1741	525	4428
417	214769_at	1183	chloride channel 4	CLCN4	499	47	544
418	214791_at	93349	hypothetical protein BC004921	LOC93349	722	850	176
419	214811_at	23504	RIM binding protein 2	KIAA0318	1212	119	3040
420	214913_at	9508	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 3	ADAMTS3	226	2035	352
421	214920_at	221981	hypothetical protein LOC221981	LOC221981	1899	70	3133
422	215034_s_at	4071	transmembrane 4 superfamily member 1	TM4SF1	39	2667	52
423	215076_s_at	1281	collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	COL3A1	747	15887	602
424	215195_at	5578	protein kinase C, alpha	PRKCA	1504	1552	377
425	215303_at	NA	NA	NA	386	891	215
426	215446_s_at	4015	lysyl oxidase	LOX	759	176	86
427	215501_s_at	11221	dual specificity phosphatase 10	DUSP10	508	2071	397
428	215646_s_at	1462	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	260	733	1433
429	215707_s_at	5621	prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia)	PRNP	450	1074	268
430	215715_at	6530	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	SLC6A2	443	242	2539
431	215716_s_at	490	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1	ATP2B1	1169	2744	532
432	215867_x_at	164	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	AP1G1	320	1902	377
433	216033_s_at	2534	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	369	42	1041
434	216035_x_at	6934	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	873	5124	1195
435	216037_x_at	6934	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	860	6108	1324
436	216044_x_at	374993	NA	NA	594	8670	260
437	216255_s_at	2918	glutamate receptor, metabotropic 8	GRM8	1000	29	64
438	216379_x_at	91749	KIAA1919	KIAA1919	418	884	16136
439	216438_s_at	7120	thymosin-like 6	TMSL6	8349	1353	6650

440	216442_x_at	2335	fibronectin 1	FN1	2617	378	7706
441	216511_s_at	6934	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	861	5815	1008
442	216594_x_at	1645	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	AKR1C1	1395	877	4387
443	216611_s_at	6530	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	SLC6A2	860	113	4327
444	216804_s_at	10611	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	LIM	1090	1819	432
445	216963_s_at	2596	growth associated protein 43	GAP43	1476	314	662
446	216992_s_at	2918	glutamate receptor, metabotropic 8	GRM8	503	24	60
447	217234_s_at	7430	villin 2 (ezrin)	VIL2	1025	1953	485
448	217621_at	56342	peter pan homolog (Drosophila)	PPAN	737	63	3372
449	217762_s_at	11031	RAB31, member RAS oncogene family	RAB31	73	1935	99
450	217764_s_at	11031	RAB31, member RAS oncogene family	RAB31	327	2855	21
451	218162_at	56944	HNOEL-iso protein	HNOEL-iso	670	2179	435
452	218273_s_at	54704	protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	PPM2C	650	1679	320
453	218292_s_at	51422	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	PRKAG2	354	768	104
454	218313_s_at	51809	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	GALNT7	444	1980	2112
455	218325_s_at	11083	death associated transcription factor 1	DATF1	219	153	973
456	218368_s_at	51330	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	TNFRSF12A	866	3820	178
457	218424_s_at	55240	dudulin 2	TSAP6	629	1225	244
458	218457_s_at	1788	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	DNMT3A	1076	119	275
459	218499_at	51765	Mst3 and SOK1-related kinase	MST4	4152	18723	4597
460	218530_at	29109	formin homology 2 domain containing 1	FHOD1	168	107	989
461	218599_at	9985	REC8-like 1 (yeast)	REC8L1	2652	209	3092
462	218623_at	51617	HMP19 protein	HMP19	7352	132	2828
463	218638_s_at	10417	spondin 2, extracellular matrix protein	SPON2	496	2186	300
464	218816_at	55227	leucine rich repeat containing 1	LRRC1	557	1018	80
465	218820_at	56967	chromosome 14 open reading frame 132	C14orf132	2100	990	5158
466	218858_at	64798	DEP domain containing 6	DEPDC6	16	1173	33
467	218980_at	80206	formin homology 2 domain containing 3	FHOD3	445	49	1380
468	219142_at	65997	hypothetical protein MGC2827	MGC2827	1847	767	3175
469	219196_at	29106	secretogranin III	SCG3	1658	20	351
470	219201_s_at	57045	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	TWSG1	451	1464	306
471	219211_at	11274	ubiquitin specific protease 18	USP18	972	954	68
472	219213_at	58494	junctional adhesion molecule 2	JAM2	1336	55	1515
473	219257_s_at	8877	sphingosine kinase 1	SPHK1	177	1158	582
474	219279_at	55619	dedicator of cytokinesis 10	DOCK10	564	8	210
475	219288_at	57415	HT021	HT021	2838	377	1253
476	219295_s_at	26577	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	PCOLCE2	521	711	78
477	219301_s_at	26047	contactin associated protein-like 2	CNTNAP2	17	1117	183
478	219304_s_at	80310	platelet derived growth factor D	PDGFD	962	2669	322
479	219427_at	79633	hypothetical protein FLJ23056	FLJ23056	413	2023	1683
480	219463_at	24141	chromosome 20 open reading frame 103	C20orf103	1934	150	1382
481	219506_at	79630	hypothetical protein FLJ23221	FLJ23221	93	1636	645
482	219529_at	9022	chloride intracellular channel 3	CLIC3	369	1054	106
483	219558_at	79572	ATPase family homolog up-regulated in senescence cells	AFURS1	1817	2991	590
484	219654_at	9200	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member a	PTPLA	1035	2599	459

485	219682_s_at	6926	T-box 3 (ulnar mammary syndrome)	TBX3	2063	154	3180
486	219806_s_at	56935	FN5 protein	FN5	3781	672	272
487	219872_at	51313	hypothetical protein DKFZp434L142	DKFZp434L142	329	997	192
488	219908_at	27123	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	DKK2	558	6618	254
489	219973_at	79642	hypothetical protein FLJ23548	FLJ23548	364	2768	131
490	219985_at	9955	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	HS3ST3A1	102	1442	40
491	220133_at	54959	APin protein	APIN	371	3643	517
492	220138_at	9421	heart and neural crest derivatives expressed 1	HAND1	5038	398	6688
493	220316_at	64067	neuronal PAS domain protein 3	NPAS3	245	1246	18
494	220386_s_at	27436	echinoderm microtubule associated protein like 4	EML4	7533	2816	1631
495	220500_s_at	11159	RAB, member of RAS oncogene family-like 2A	RABL2A	774	996	176
496	220952_s_at	54477	phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	PEPP2	532	2740	868
497	221234_s_at	60468	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	BACH2	709	225	934
498	221236_s_at	81551	stathmin-like 4	STMN4	980	571	2415
499	221584_s_at	3778	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	KCNMA1	1535	1597	65
500	221728_x_at	139202	NA	NA	265	57	6537
501	221731_x_at	1462	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	815	2027	5019
502	221760_at	4121	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	MAN1A1	2079	10807	1724
503	221776_s_at	29117	bromodomain containing 7	BRD7	896	453	2376
504	221840_at	5791	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	PTPRE	869	1851	252
505	221881_s_at	25932	chloride intracellular channel 4	CLIC4	1358	2859	70
506	221884_at	2122	ecotropic viral integration site 1	EVI1	371	70	820
507	221969_at	5079	paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator protein)	PAX5	1332	83	409
508	222095_s_at	148753	hypothetical protein MGC16664	MGC16664	1509	62	1885
509	222101_s_at	8642	protocadherin 16 dachsous-like (Drosophila)	PCDH16	1462	220	2839
510	222154_s_at	26010	DNA polymerase-transactivated protein 6	DNAFTP6	720	3677	1298
511	222162_s_at	9510	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	425	480	2007
512	222227_at	7776	zinc finger protein 236	ZNF236	50	22	632
513	266_s_at	934	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	148	95	4634
514	33767_at	4744	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	NEFH	1641	22	685
515	35147_at	23263	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like	MCF2L	960	102	1380
516	38037_at	1839	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	DTR	311	1208	91
517	41512_at	88455	ankyrin repeat domain 13	ANKRD13	355	56	481
518	47550_at	11178	leucine zipper, putative tumor suppressor 1	LZTS1	804	23	464
519	57715_at	51063	hypothetical protein LOC51063	LOC51063	585	147	1304

## Anhang 2

Anhang 2: Tabelle der Gene, die im Zeitverlauf als Antwort auf Bestrahlung reguliert werden. In der 1. Spalte findet sich die laufende Nummer des Gens. Es folgen spaltenweise die Affymetrix ID, die Unigene ID, der Genname und das zugehörige Gensymbol und die entsprechenden Untersuchungszeitpunkte. Die Ergebnisse sind angegeben in relativen Expressionseinheiten.

Nr	Affymetrix ID	Unigene ID	Gen	Gen Symbol	SY5Y VEC 0 Stunden	SY5Y VEC 1 Stunden	SY5Y VEC 4 Stunden	SY5Y VEC 10 Stunden	SY5Y VEC 24 Stunden	SY5Y TRKA 0 Stunden	SY5Y TRKA 1 Stunden	SY5Y TRKA 4 Stunden	SY5Y TRKA 10 Stunden	SY5Y TRKA 24 Stunden	SY5Y TRKB 0 Stunden	SY5Y TRKB 1 Stunden	SY5Y TRKB 4 Stunden	SY5Y TRKB 10 Stunden	SY5Y TRKB 24 Stunden
1	201048_x_at	5870	RAB6A, member RAS oncogene family	RAB6A	1953	1249	1079	893	1326	612	635	545	408	852	238	310	942	191	19
2	201211_s_at	1654	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	DDX3X	7522	5061	8551	4380	5446	4304	4462	5506	2009	3448	683	1560	6834	878	928
3	201236_s_at	7832	BTG family, member 2	BTG2	480	928	1683	1834	1156	805	985	2607	2604	2405	221	333	2435	2565	1898
4	201404_x_at	5690	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	PSMB2	1003	1372	539	1254	455	746	846	1013	667	424	1036	1028	121	620	672
5	201446_s_at	7072	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1	2086	2368	2000	2637	2690	2557	2684	2270	511	2168	3147	3022	3517	3830	3361
6	201448_at	7072	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1	2133	1898	1593	1345	1893	1751	2071	1840	404	1648	3014	3473	1742	3357	4106
7	201449_at	7072	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1	1287	1378	1172	1196	1341	1074	1047	1050	190	879	1721	1992	1048	1675	1476
8	201467_s_at	1728	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NQO1	113	73	77	81	61	192	845	1122	1580	1506	446	423	90	282	583
9	201559_s_at	25932	chloride intracellular channel 4	CLIC4	2452	2170	2748	1950	1951	6282	6445	5182	3844	5918	329	750	3049	407	361
10	201625_s_at	3638	insulin induced gene 1	INSIG1	436	664	449	132	32	369	306	605	330	85	348	548	569	210	203
11	201668_x_at	4082	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	2194	3920	2399	2280	2110	3037	2928	2665	2079	2791	671	763	3207	457	650
12	201767_s_at	60528	elcA homolog 2 (E. coli)	ELAC2	695	93	546	196	845	946	438	731	724	575	592	828	660	934	756
13	201830_s_at	10276	neuroepithelial cell transforming gene 1	NET1	1733	1350	1615	1470	1150	906	619	706	133	181	1903	1889	2031	1718	1714
14	201961_s_at	10193	ring finger protein 41	RNF41	504	452	289	526	548	222	1007	630	1601	726	606	716	64	536	513
15	201978_s_at	9812	KIAA0141 gene product	KIAA0141	821	502	775	753	662	73	662	766	1333	911	875	1150	1077	875	1097
16	202284_s_at	1026	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	2927	3143	15626	20640	14158	5236	4911	24278	28868	23487	950	1379	9498	8842	9274
17	202286_s_at	4070	tumor-associated calcium signal transducer 2	TACSTD2	72	885	1097	682	506	1021	521	693	32	253	52	18	19	32	82
18	202307_s_at	6890	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	TAP1	66	511	296	42	343	50	500	842	1699	839	63	160	135	261	62
19	202319_at	26054	SUMO-1-specific protease	SUSP1	764	646	328	340	304	929	618	445	68	352	403	251	208	628	501
20	202345_s_at	2171	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	53	682	747	298	94	300	574	252	40	283	15	118	29	133	21
21	202533_s_at	1719	dihydrofolate reductase	DHFR	1059	895	669	1241	436	679	780	954	426	30	528	481	462	384	296
22	202762_at	9475	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	ROCK2	952	766	947	936	772	1701	1443	765	61	911	788	1068	453	522	600

23	202841_x_at	11054	opioid growth factor receptor	OGFR	1713	1376	1508	1821	1170	221	1757	1030	1673	1421	1010	1457	1117	1208	1453
24	202859_x_at	3576	interleukin 8	IL8	211	292	71	861	154	117	191	127	263	301	37	146	276	335	36
25	202863_at	6672	nuclear antigen Sp100	SP100	798	367	390	303	224	227	956	1034	1207	990	244	246	365	178	268
26	202873_at	528	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C, isoform 1	ATP6V1C1	315	700	767	645	676	759	386	736	430	471	243	298	1133	326	52
27	202917_s_at	6279	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	256	2503	3141	803	265	2191	1463	2624	10	37	146	94	1213	379	51
28	202971_s_at	8445	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	DYRK2	517	588	640	266	576	632	619	636	77	537	503	433	459	310	421
29	203000_at	11075	stathmin-like 2	STMN2	19768	16276	16926	14916	22534	132	783	714	1130	1445	15709	13877	9738	11124	17228
30	203021_at	6590	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoprotease)	SLPI	85	426	2434	2053	686	2594	474	644	139	404	66	120	279	153	275
31	203049_s_at	9652	KIAA0372	KIAA0372	1544	1512	1516	1272	1743	1177	1149	968	155	1225	1939	1921	1145	1858	1532
32	203060_s_at	9060	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	PAPSS2	772	712	561	1207	90	596	636	781	531	982	134	29	149	119	69
33	203081_at	56998	catenin, beta interacting protein 1	CTNNBIP1	651	630	385	702	734	62	598	769	827	896	595	649	535	862	740
34	203122_at	51112	tetratricopeptide repeat domain 15	TTC15	954	839	916	935	717	840	638	681	1196	645	911	868	136	970	935
35	203155_at	9869	SET domain, bifurcated 1	SETDB1	1549	990	670	1013	922	242	1043	1422	1152	1470	1448	1545	1477	1572	1434
36	203234_at	7378	uridine phosphorylase 1	UPP1	564	621	559	550	645	108	1039	671	1062	1052	34	30	54	50	30
37	203243_s_at	10611	LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	LIM	1845	1772	889	734	1842	4182	3840	2312	1347	2562	675	477	33	669	786
38	203318_s_at	7707	zinc finger protein 148 (pHZ-52)	ZNF148	1219	507	741	801	1122	1647	506	769	104	679	1043	1079	932	974	942
39	203332_s_at	3635	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa	INPP5D	228	119	202	1095	1223	115	131	619	904	427	220	211	249	999	1331
40	203409_at	1643	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	DDB2	1054	1240	1986	3278	2097	1474	1133	2363	4010	2617	490	404	1289	3658	2492
41	203448_s_at	7013	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	TERF1	663	732	490	604	1251	573	533	569	126	549	1265	998	496	1363	1072
42	203535_at	6280	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100A9	597	878	2408	617	33	527	705	878	53	24	170	43	63	83	229
43	203604_at	9658	zinc finger protein 516	ZNF516	541	209	106	842	439	420	366	280	225	564	621	467	658	948	694
44	203612_at	705	bystin-like	BYSL	991	940	1137	1251	95	490	703	869	652	569	891	990	1112	476	749
45	203651_at	9765	zinc finger, FYVE domain containing 16	ZFYVE16	968	943	827	576	1042	1450	1054	884	147	743	1445	1597	942	1857	1870
46	203678_at	22909	KIAA1018 protein	KIAA1018	723	886	819	1321	836	948	563	640	124	617	894	1186	872	1133	1130
47	203725_at	1647	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	1658	1900	5108	5031	3396	3090	5634	9820	6070	7503	680	869	6094	4415	3775
48	203803_at	51449	prenylcysteine oxidase 1	PCYOX1	281	54	761	525	466	835	532	721	478	837	432	362	309	224	271
49	203965_at	10868	ubiquitin specific protease 20	USP20	407	529	539	517	398	259	339	460	458	503	656	540	68	485	576
50	204057_at	3394	interferon consensus sequence binding protein 1	ICSBP1	559	210	78	184	946	208	185	345	394	156	230	54	258	300	58
51	204067_at	6821	sulfite oxidase	SUOX	758	687	400	696	856	120	557	516	1103	857	1101	803	518	1015	875
52	204079_at	8459	tyrosylprotein sulfotransferase 2	TPST2	551	690	375	741	427	165	830	909	947	1227	440	592	523	572	493
53	204268_at	6273	S100 calcium binding protein A2	S100A2	331	3177	1656	462	764	1219	2549	2487	3125	2300	251	35	13	148	238
54	204336_s_at	10287	regulator of G-protein signalling 19	RGS19	723	1112	519	1061	857	530	323	1034	1001	555	151	593	122	802	621

55	204396_s_at	2869	G protein-coupled receptor kinase 5	GRK5	498	194	394	377	978	103	626	652	646	624	425	585	613	687	937
56	204419_x_at	3048	hemoglobin, gamma G	HBG2	370	476	106	344	317	434	197	614	297	157	723	71	2156	1826	227
57	204774_at	2123	ecotropic viral integration site 2A	EVI2A	372	126	83	278	97	567	23	100	553	265	230	176	237	140	209
58	204780_s_at	355	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	28	360	702	783	654	536	314	1113	361	504	83	21	514	704	897
59	204781_s_at	355	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	585	269	709	701	459	115	580	1351	675	771	42	43	496	778	650
60	204822_at	7272	TTK protein kinase	TTK	1212	1439	587	1662	1155	918	1765	593	77	650	1829	1982	908	1455	2391
61	204848_x_at	3047	hemoglobin, gamma A	HBG1	44	173	173	112	49	60	86	41	62	296	466	108	1080	1111	41
62	204919_at	11272	proline rich 4 (lacrimal)	PROL4	685	762	3894	1870	769	4976	726	577	887	544	678	678	552	511	403
63	204971_at	1475	cystatin A (stefin A)	CSTA	52	961	2581	443	310	847	459	845	97	171	66	21	321	176	110
64	205010_at	54552	hypothetical protein FLJ10613	FLJ10613	578	410	246	616	357	461	169	338	322	257	1371	1724	298	1573	1713
65	205034_at	9134	cyclin E2	CCNE2	640	617	566	281	557	777	554	268	48	173	989	986	755	471	210
66	205046_at	1062	centromere protein E, 312kDa	CENPE	639	419	422	107	277	925	478	79	21	110	1404	929	94	699	976
67	205283_at	2218	Fukuyama type congenital muscular dystrophy (fukutin)	FCMD	611	849	719	228	483	487	644	574	13	488	405	615	477	843	627
68	205543_at	22824	heat shock protein (hsp110 family)	APG-1	1515	1859	2519	4161	3359	66	570	997	975	940	537	553	1110	3150	2009
69	205562_at	10557	ribonuclease P (38kD)	RPP38	854	866	850	960	971	123	824	952	808	1217	450	782	978	473	767
70	205595_at	1830	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	DSG3	158	997	888	190	175	637	516	523	393	234	52	277	27	155	191
71	205601_s_at	3215	homeo box B5	HOXB5	430	640	102	418	855	524	483	438	248	479	488	414	425	199	285
72	205759_s_at	6820	sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1	SULT2B1	76	231	98	682	600	314	379	559	337	406	284	299	166	229	280
73	205990_s_at	7474	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	270	392	394	36	169	110	999	787	675	890	174	274	26	202	162
74	206027_at	6274	S100 calcium binding protein A3	S100A3	266	156	244	416	331	157	645	715	1297	781	57	97	355	175	33
75	206081_at	9187	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1	SLC24A1	36	69	244	76	47	177	124	57	532	158	305	208	26	730	478
76	206237_s_at	3084	neuregulin 1	NRG1	39	30	44	141	85	61	713	499	543	963	77	17	68	20	36
77	206364_at	9928	kinesin family member 14	KIF14	1354	1314	585	848	1142	1154	1169	183	69	338	1698	1234	812	1073	1943
78	206565_x_at	10571	SMA3	SMA3	939	326	587	161	67	186	298	444	103	82	470	543	416	473	587
79	206835_at	6779	statherin	STATH	35	376	1542	867	35	3301	103	17	29	183	29	156	66	7	10
80	207029_at	4254	KIT ligand	KITLG	226	184	740	1088	996	18	39	190	275	172	239	209	459	154	208
81	207165_at	3161	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	HMMR	2290	2646	1115	725	1603	1811	1770	289	154	1217	2320	2564	654	1115	3781
82	207621_s_at	10400	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	PEMT	1058	595	730	145	594	605	708	512	996	712	781	733	1207	650	604
83	207695_s_at	3547	immunoglobulin superfamily, member 1	IGSF1	669	760	650	833	615	141	661	849	643	710	428	251	476	277	570
84	207780_at	1539	cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 2	CYLC2	204	420	307	283	121	697	19	241	263	84	28	148	29	178	14
85	207783_x_at	54789	NA	NA	78446	23417	21031	59920	72925	60759	69122	91711	87626	82178	85957	78162	30932	84100	2662
86	207813_s_at	2232	ferredoxin reductase	FDXR	563	753	1040	1906	1050	664	476	1715	5709	2261	191	248	1045	2320	1559
87	208094_s_at	81576	hypothetical protein MGC10471	MGC10471	717	68	618	862	1028	566	444	471	1360	738	643	576	656	585	653



88	208259_x_at	3444	interferon, alpha 7	IFNA7	270	775	79	609	68	574	268	236	354	328	57	279	113	79	401
89	208300_at	5794	protein tyrosine phosphatase, receptor type, H	PTPRH	527	896	475	117	897	294	502	390	782	554	316	256	724	354	245
90	208485_x_at	8837	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	540	521	92	697	534	643	340	545	391	500	402	344	485	302	372
91	208579_x_at	54145	H2B histone family, member S	H2BFS	178	529	318	982	712	62	548	649	1586	668	787	923	1195	1014	2177
92	208651_x_at	934	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	119	111	689	596	314	716	288	238	426	105	6387	7189	7120	4171	4638
93	208859_s_at	546	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	ATRX	448	463	623	640	809	708	667	135	53	370	1653	1377	865	1162	2101
94	208930_s_at	3609	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	ILF3	1709	1550	2385	2111	1368	829	1344	1703	1768	988	465	323	2183	377	342
95	209052_s_at	7468	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	WHSC1	587	679	758	722	133	744	649	665	853	591	282	341	678	444	185
96	209113_s_at	10362	high-mobility group 20B	HMG20B	304	108	69	343	445	915	775	44	598	923	243	260	692	505	291
97	209116_x_at	3043	hemoglobin, beta	HBB	407	231	200	1703	18	1037	74	348	936	200	953	34	2072	1048	1176
98	209138_x_at	3535	immunoglobulin lambda locus	IGL@	1079	19	754	506	900	1064	21	1124	93	34	35	44	55	47	39
99	209158_s_at	9266	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2 (cytohesin-2)	PSCD2	635	735	750	357	486	142	730	715	788	907	701	583	931	596	722
100	209297_at	6453	intersectin 1 (SH3 domain protein)	ITSN1	402	135	397	105	239	989	771	649	739	338	751	329	73	655	606
101	209450_at	55644	O-sialoglycoprotein endopeptidase	OSGEP	608	480	675	100	87	433	529	341	749	288	599	267	262	239	341
102	209534_x_at	11214	A kinase (PRKA) anchor protein 13	AKAP13	693	148	369	929	550	483	639	321	415	610	503	783	93	782	710
103	209642_at	699	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1	1781	1655	1218	967	1682	1248	1304	278	184	586	1334	1529	665	843	1560
104	209680_s_at	3833	kinesin family member C1	KIFC1	2454	1788	548	946	1125	1779	1135	637	414	100	1599	1750	873	1457	1269
105	210405_x_at	8795	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	921	780	1450	1956	2059	390	626	1796	2473	1963	78	433	1478	515	264
106	210461_s_at	3983	actin binding LIM protein 1	ABLIM1	99	632	975	1150	803	796	871	765	699	704	222	550	828	502	648
107	210649_s_at	8289	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	ARID1A	783	757	608	194	72	145	336	255	482	582	838	1320	826	875	932
108	210655_s_at	2309	forkhead box O3A	FOXO3A	1166	1006	871	680	1145	40	641	493	920	435	533	820	1500	881	738
109	210780_at	2100	estrogen receptor 2 (ER beta)	ESR2	28	526	51	170	542	645	454	279	284	350	212	275	266	163	107
110	210867_at	4850	CCR4-NOT transcription complex, subunit 4	CNOT4	122	268	165	46	176	864	33	52	198	138	219	86	37	49	25
111	210962_s_at	10142	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	AKAP9	978	1149	1169	1230	1151	1112	1099	855	94	774	2898	3213	1084	3726	2796
112	211316_x_at	8837	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	592	750	444	584	1133	913	741	867	129	620	939	645	442	840	837
113	211456_x_at	4496	metallothionein 1H	MT1H	554	1262	1041	1121	829	74	925	1224	1577	861	1033	516	1022	534	391
114	211514_at	25778	dusty protein kinase	DustyPK	20	104	128	218	39	538	16	503	272	49	34	82	69	145	34
115	211852_s_at	8455	attractin	ATRN	899	122	404	503	1059	191	1203	1170	1071	988	263	390	846	610	733
116	211896_s_at	1634	decorin	DCN	151	384	439	629	289	470	40	442	262	710	882	457	550	379	437
117	211973_at	285843	NA	NA	497	678	666	1338	940	88	597	812	863	962	897	725	1083	930	814
118	212061_at	23350	U2-associated SR140	SR140	882	878	560	805	864	1338	913	490	57	715	1526	1698	832	1485	1247

			protein																
119	212105_s_at	1660	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DHX9	1686	2121	2674	2492	2417	1536	1755	1998	998	1265	321	260	2676	32	73
120	212141_at	4173	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)	MCM4	2563	2555	2596	1446	1509	2556	1936	1874	618	329	2460	2458	2815	1192	778
121	212280_x_at	23192	autophagin-1	APG4B	504	1049	990	1046	741	1498	476	615	794	1055	968	808	122	857	1262
122	212417_at	9522	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	1102	1144	1020	1103	1859	1216	1038	1140	223	987	1043	905	875	861	700
123	212494_at	23371	tensin like C1 domain-containing phosphatase	TENC1	430	720	153	851	247	758	651	128	677	678	547	401	121	346	305
124	212585_at	114882	oxysterol binding protein-like 8	OSBPL8	2036	1988	2056	1381	1525	1393	2221	1492	246	1198	2473	2415	1559	2966	2446
125	212596_s_at	10042	high-mobility group protein 2-like 1	HMG2L1	751	502	879	83	512	444	745	580	643	905	903	1128	1108	1310	1180
126	212647_at	6237	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	RRAS	411	240	166	514	364	783	439	81	1194	1028	76	196	148	171	58
127	212705_x_at	57104	transport-secretion protein 2.2	TTS-2.2	390	167	510	271	199	199	846	446	1978	995	551	216	699	705	612
128	212737_at	2760	GM2 ganglioside activator protein	GM2A	804	963	800	888	704	783	858	1078	1641	1579	876	778	139	863	1278
129	212827_at	3507	immunoglobulin heavy constant mu	IGHM	1137	691	289	149	142	33	140	26	143	25	106	307	337	353	264
130	212932_at	22930	RAB3 GTPase-ACTIVATING PROTEIN	RAB3GAP	839	48	470	605	708	641	522	823	255	174	535	648	377	986	680
131	213188_s_at	84864	MYC induced nuclear antigen	MINA	1139	1425	1383	1379	1284	1012	915	1050	218	1037	1463	1273	834	1328	1132
132	213212_x_at	23015	golgin-67	GOLGIN-67	891	827	1329	856	1226	1159	939	991	169	680	1670	1556	856	1426	1278
133	213293_s_at	10346	tripartite motif-containing 22	TRIM22	156	245	262	399	430	29	89	314	511	599	218	126	357	1170	1083
134	213437_at	22902	rap2 interacting protein x	RIPX	729	61	506	187	149	588	738	480	642	1045	982	1183	139	1050	1475
135	213461_at	11051	cleavage and polyadenylation specific factor 5, 25 kDa	CPSF5	1587	1434	1660	2002	1640	1733	1253	645	802	1200	652	799	3390	738	397
136	213515_x_at	3047	hemoglobin, gamma A	HBG1	428	91	195	276	52	193	19	101	265	223	587	58	1909	1715	388
137	213534_s_at	23178	PAS domain containing serine/threonine kinase	PASK	604	464	701	925	492	1067	616	511	373	35	568	677	427	451	470
138	213540_at	10470	DNA segment on chromosome 6 (unique, pseudogene) 2723 expressed sequence	D6S2723E	500	1047	737	876	154	122	741	864	1845	1215	829	682	763	660	359
139	213616_at	25941	chromosome 18 open reading frame 10	C18orf10	698	741	851	624	300	104	523	536	828	719	578	586	523	504	575
140	213930_at	9140	APG12 autophagy 12-like (S. cerevisiae)	APG12L	340	699	492	1150	934	911	713	704	148	820	500	692	604	494	705
141	213975_s_at	4069	lysozyme (renal amyloidosis)	LYZ	169	34	1000	414	78	1017	82	305	11	8	15	6	33	84	54
142	214001_x_at	6204	ribosomal protein S10	RPS10	644	612	412	755	991	105	565	724	792	551	791	485	657	682	960
143	214007_s_at	5756	PTK9 protein tyrosine kinase 9	PTK9	1283	1752	1833	1329	1984	2311	3085	1655	496	1890	351	416	1303	346	29
144	214107_x_at	376425	NA	NA	760	1256	1113	755	1715	1716	1326	1221	1187	1373	978	110	1194	527	470
145	214196_s_at	1200	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2, late infantile (Jansky-Bielschowsky disease)	CLN2	569	133	348	41	579	148	497	473	505	823	407	144	456	261	312
146	214273_x_at	8131	chromosome 16 open reading frame 35	C16orf35	563	109	445	553	533	36	441	312	761	223	512	328	404	310	509
147	214336_s_at	1314	coatomer protein complex,	COPA	1950	3027	2742	3417	3842	3020	3075	3133	4315	4184	370	258	3128	218	281

subunit alpha																			
148	214513_s_at	1385	cAMP responsive element binding protein 1	CREB1	801	749	852	186	715	574	607	459	421	415	711	500	989	624	71
149	214660_at	3672	integrin, alpha 1	ITGA1	1750	1105	1465	1652	1622	840	712	287	34	590	522	531	357	395	489
150	214674_at	10869	ubiquitin specific protease 19	USP19	521	522	542	565	503	83	455	610	950	593	630	327	558	478	380
151	214677_x_at	28831	immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3	1729	36	620	810	532	978	71	1579	41	28	26	17	41	20	43
152	214678_x_at	7543	zinc finger protein, X-linked	ZFX	689	490	397	226	666	94	746	821	91	622	671	494	440	640	573
153	214703_s_at	23324	mannosidase alpha class 2B member 2	KIAA0935	305	51	400	520	89	106	645	593	921	667	418	424	345	350	443
154	214707_x_at	7840	Alstrom syndrome 1	ALMS1	152	991	958	1081	1522	587	582	562	539	1205	1715	1057	450	902	1679
155	214760_at	26152	zinc finger protein 337	ZNF337	718	695	1098	917	866	134	602	1235	1376	1468	1270	1039	966	1418	1487
156	214825_at	374514	NA	NA	1871	1952	1683	1979	2097	166	924	980	873	910	1347	1464	773	1228	1296
157	214829_at	10157	aminoadipate-semialdehyde synthase	AASS	603	290	503	642	389	751	707	479	40	496	959	1128	458	753	408
158	214836_x_at	339726	NA	NA	1542	122	638	1848	1220	1206	298	1181	484	227	140	279	369	157	298
159	215089_s_at	8241	RNA binding motif protein 10	RBM10	1572	1091	1291	1208	241	1155	724	351	1213	552	1315	1522	1146	1290	879
160	215121_x_at	3535	immunoglobulin lambda locus	IGL@	1185	41	502	645	470	1037	27	724	332	31	85	46	59	27	26
161	215411_s_at	10757	NA	NA	1015	1185	987	664	1041	71	350	790	1266	989	336	55	377	237	268
162	215439_x_at	NA	NA	NA	610	709	678	440	959	682	1049	928	537	1208	1920	1816	427	2052	1878
163	215532_x_at	57615	zinc finger protein 492	ZNF492	499	413	405	388	610	976	212	206	141	19	632	483	442	476	455
164	215599_at	11039	SMA4	SMA4	85	258	9	33	304	110	101	133	25	127	709	782	94	1031	602
165	215719_x_at	355	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	30	48	542	410	625	334	354	1022	487	736	12	9	413	341	418
166	215735_s_at	4913	nth endonuclease III-like 1 (E. coli)	NTHL1	251	471	469	251	127	898	478	22	626	522	725	585	723	890	621
167	216026_s_at	5426	polymerase (DNA directed), epsilon	POLE	777	908	741	447	530	140	668	907	676	564	491	532	703	758	433
168	216132_at	NA	NA	NA	148	22	86	79	55	722	68	302	65	115	72	136	76	27	140
169	216497_at	3178	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRPA1	475	689	337	604	672	911	547	339	31	345	838	647	584	686	406
170	217022_s_at	283650	hypothetical protein MGC27165	MGC27165	721	17	709	1298	44	1165	15	1074	26	17	36	11	22	14	19
171	217232_x_at	3043	hemoglobin, beta	HBB	505	554	310	2341	483	1402	585	622	1298	374	1567	362	2446	1465	1459
172	217390_x_at	NA	NA	NA	514	109	181	808	560	232	221	261	203	376	305	196	108	67	321
173	217542_at	84825	hypothetical protein MGC5370	MGC5370	264	429	369	740	547	311	116	863	380	408	218	177	728	1126	861
174	217579_x_at	NA	NA	NA	796	947	914	943	742	859	527	230	336	364	750	749	149	614	734
175	217627_at	126231	zinc finger protein 573	ZNF573	498	559	333	561	950	540	654	696	103	567	1300	896	816	1329	1315
176	218202_x_at	65080	mitochondrial ribosomal protein L44	MRPL44	895	964	1337	1099	1121	1596	845	867	1066	878	1264	815	663	676	154
177	218346_s_at	27244	sestrin 1	SESN1	1519	1496	2634	3917	2435	986	1458	3524	2835	2809	1141	894	3420	5147	4661
178	218372_at	55090	mediator subunit 25	MED25	650	485	663	591	711	82	561	741	944	204	588	456	1078	529	528
179	218400_at	4940	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	OAS3	793	1005	1181	848	824	38	288	549	884	1089	456	579	761	422	443
180	218442_at	7268	tetratricopeptide repeat domain 4	TTC4	936	1100	744	87	932	715	503	677	1433	636	586	764	804	1096	1091
181	218476_at	10585	protein-O-mannosyltransferase 1	POMT1	746	596	74	851	679	995	633	489	1347	1015	459	532	720	504	562

182	218525_s_at	55662	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	HIF1AN	610	485	684	579	358	103	1148	758	870	1181	756	873	622	799	724
183	218573_at	28986	APR-1 protein	MAGEH1	768	818	929	982	770	92	615	734	553	806	765	1159	1118	1740	828
184	218584_at	79600	hypothetical protein FLJ21127	FLJ21127	899	580	683	727	772	246	1086	1474	1398	1447	497	909	800	970	1010
185	218609_s_at	318	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	NUDT2	434	560	984	81	410	327	397	70	426	466	616	523	609	409	419
186	218627_at	55332	hypothetical protein FLJ11259	FLJ11259	531	743	752	1311	1348	115	492	779	1170	805	269	257	591	653	895
187	218630_at	54903	hypothetical protein FLJ20345	FLJ20345	685	647	712	448	407	51	1074	957	1081	689	534	718	837	905	934
188	218649_x_at	9147	serologically defined colon cancer antigen 1	SDCCAG1	1062	1364	1389	1021	1672	1576	1737	916	126	949	2409	2076	775	2765	2477
189	218705_s_at	28966	sorting nexin 24	SNX24	932	860	665	525	449	127	877	1196	882	826	837	430	479	585	616
190	218839_at	23462	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	HEY1	3503	3644	1914	2916	6289	1020	1204	1229	1260	1921	1357	1185	208	965	945
191	218859_s_at	51575	chromosome 20 open reading frame 6	C20orf6	488	297	612	962	794	789	1026	451	96	402	965	686	436	867	668
192	218865_at	64757	hypothetical protein FLJ22390	FLJ22390	1559	1335	1341	1129	571	253	645	943	1004	280	1061	1060	202	1022	842
193	218916_at	79724	hypothetical protein FLJ23436	FLJ23436	937	64	722	768	583	585	711	633	607	674	488	149	413	186	561
194	218933_at	79029	hypothetical protein MGC5347	MGC5347	373	535	403	75	80	545	483	71	326	74	354	243	176	482	363
195	218990_s_at	6707	small proline-rich protein 3	SPRR3	56	246	3555	100	192	1008	353	1355	28	62	246	108	19	34	174
196	219116_s_at	55208	chromosome 13 open reading frame 17	C13orf17	510	895	834	522	101	414	418	322	339	439	965	929	1049	1090	1072
197	219143_s_at	54913	RNase P protein subunit p25	Rpp25	713	1136	663	732	932	83	724	125	342	640	320	403	258	272	252
198	219216_at	54465	ETAA16 protein	ETAA16	535	188	477	407	525	497	681	515	65	516	466	492	257	730	470
199	219523_s_at	55714	odd Oz/Ten-m homolog 3	ODZ3	301	277	267	490	296	117	549	666	722	562	465	426	300	338	103
200	219555_s_at	55839	uncharacterized bone marrow protein BM039	BM039	949	1010	1121	948	168	719	1114	981	795	307	1479	1379	1554	897	1053
201	219643_at	53353	low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors)	LRP1B	39	85	38	21	220	340	725	464	7	1047	5	18	21	95	81
202	219918_s_at	259266	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	ASPM	4213	4632	1886	1921	2188	2593	2039	588	225	579	6036	5506	1349	4614	6998
203	219951_s_at	55184	chromosome 20 open reading frame 12	C20orf12	465	307	392	243	347	613	619	489	44	481	461	554	468	550	517
204	220145_at	79884	hypothetical protein FLJ21159	FLJ21159	99	167	52	337	289	48	697	699	105	231	908	814	471	709	640
205	220462_at	80034	TGF-beta induced apoptosis protein 2	TAIP-2	534	568	409	101	537	68	228	295	187	48	765	624	108	591	664
206	220588_at	55653	breast carcinoma amplified sequence 4	BCAS4	525	889	674	742	75	794	793	426	981	620	279	139	435	541	433
207	221196_x_at	79184	c6.1A	C6.1A	132	995	873	996	729	845	512	590	614	795	1309	1073	689	643	521
208	221487_s_at	2029	endosulfine alpha	ENSA	957	647	1013	1033	1273	137	779	606	896	623	669	553	847	495	395
209	221521_s_at	51659	DNA replication complex GINS protein PSF2	Pfs2	1137	1304	1350	759	667	768	1047	674	713	130	1689	1922	1475	1459	1296
210	221577_x_at	9518	growth differentiation factor 15	GDF15	606	324	2087	3331	3067	768	1119	7016	8330	5592	385	426	4495	5265	4227
211	221634_at	118433	ribosomal protein L23a pseudogene 7	RPL23AP7	619	938	688	1338	890	85	672	910	655	1558	952	1178	716	1294	855
212	221651_x_at	3514	immunoglobulin kappa	IGKC	3598	151	3382	2675	2505	1717	88	3603	121	119	68	367	129	217	52

constant																			
213	221671_x_at	3514	immunoglobulin kappa constant	IGKC	3370	95	2861	2100	2181	1749	120	3786	123	130	88	209	108	42	66
214	222064_s_at	80755	hypothetical protein MGC2744	MGC2744	478	753	869	863	605	527	566	46	780	469	774	750	1078	655	393
215	222115_x_at	84656	cytokine-like nuclear factor n-pac	N-PAC	1302	844	597	1547	1555	1830	1249	1047	1694	737	603	605	1334	867	32
216	222252_x_at	56893	chromosome 1 open reading frame 6	C1orf6	356	948	347	761	441	634	122	481	195	517	1268	848	114	686	1052
217	37549_g_at	27241	parathyroid hormone-responsive B1 gene	B1	666	729	57	260	503	425	450	642	232	639	917	511	694	742	517
218	38157_at	1797	dom-3 homolog Z (C. elegans)	DOM3Z	848	1327	700	949	1143	161	870	776	1318	1209	1386	1003	577	1292	1016

## Anhang 3

Anhang 3: Tabelle der generellen Expressionsveränderungen nach Bestrahlung. In der 1. Zeile befindet sich die Affymetrix ID, in der 2. Zeile die Unigene ID, es folgen zeilenweise der Genname und das zugehörige Gensymbol, sowie die entsprechenden Untersuchungszeitpunkte. Die Ergebnisse sind in relativen Expressionseinheiten angegeben.

Affymetrix ID	201236_s_at	202284_s_at	203409_at	203696_s_at	211814_s_at	218007_s_at	218346_s_at	218627_at	219099_at	221577_x_at
<b>Unigene ID</b>	7832	1026	1643	5982	9134	51065	27244	55332	57103	9518
<b>Gen</b>	BTG family, member 2	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	cyclin E2	ribosomal protein S27-like	sestrin 1	hypothetical protein FLJ11259	chromosome 12 open reading frame 5	growth differentiation factor 15
<b>Gen Symbol</b>	BTG2	CDKN1A	DDB2	RFC2	CCNE2	RPS27L	SESN1	FLJ11259	C12orf5	GDF15
<b>SY5Y VEC 0 Stunden</b>	480	2927	1054	1816	611	14363	1519	531	1249	606
<b>SY5Y VEC 1 Stunden</b>	928	3143	1240	2083	862	14781	1496	743	1449	324
<b>SY5Y VEC 4 Stunden</b>	1683	15626	1986	2028	688	19702	2634	752	4798	2087
<b>SY5Y VEC 10 Stunden</b>	1834	20640	3278	1208	365	26117	3917	1311	4394	3331
<b>SY5Y VEC 24 Stunden</b>	1156	14158	2097	1286	184	29671	2435	1348	4236	3067
<b>SY5Y TrKA unstim. 0 Stunden</b>	805	5236	1474	1871	764	13165	986	115	1337	768
<b>SY5Y TrKA unstim. 1 Stunden</b>	985	4911	1133	1930	541	14557	1458	492	1934	1119
<b>SY5Y TrKA unstim. 4 Stunden</b>	2607	24278	2363	1537	401	29657	3524	779	5802	7016
<b>SY5Y TrKA unstim. 10 Stunden</b>	2604	28868	4010	1136	333	29690	2835	1170	2644	8330
<b>SY5Y TrKA unstim. 24 Stunden</b>	2405	23487	2617	914	250	29732	2809	805	3722	5592
<b>SY5Y TrKA stim. 0 Stunden</b>	247	4711	906	1676	538	11376	765	521	2042	805
<b>SY5Y TrKA stim. 1 Stunden</b>	373	4888	967	2260	597	13895	942	457	2323	1095
<b>SY5Y TrKA stim. 4 Stunden</b>	2152	17743	1999	2032	477	17346	2652	744	5561	7207
<b>SY5Y TrKA stim. 10 Stunden</b>	1218	17272	2741	1130	434	25655	2441	699	5167	6393
<b>SY5Y TrKA stim. 24 Stunden</b>	1412	16788	2940	1059	172	29232	2034	1048	4213	7833
<b>SY5Y TrkB unstim. 0 Stunden</b>	221	950	490	1597	392	10089	1141	269	1470	385
<b>SY5Y TrkB unstim. 1 Stunden</b>	333	1379	404	1564	509	10702	894	257	1664	426

<b>SY5Y TrkB unstim.</b>										
<b>4 Stunden</b>	2435	9498	1289	1655	679	21572	3420	591	6333	4495
<b>SY5Y TrkB unstim.</b>										
<b>10 Stunden</b>	2565	8842	3658	1307	219	33101	5147	653	6207	5265
<b>SY5Y TrkB unstim.</b>										
<b>24 Stunden</b>	1898	9274	2492	1032	117	33557	4661	895	4837	4227
<b>SY5Y TrkB stim.</b>										
<b>0 Stunden</b>	529	1676	665	2189	963	8774	797	445	2039	1368
<b>SY5Y TrkB stim.</b>										
<b>1 Stunden</b>	719	1825	447	2198	1068	6762	1044	111	1551	1698
<b>SY5Y TrkB stim.</b>										
<b>4 Stunden</b>	1190	8194	1015	1709	311	16321	2481	338	4401	4434
<b>SY5Y TrkB stim.</b>										
<b>10 Stunden</b>	1453	12386	2008	1213	628	29583	2171	1347	4347	8571
<b>SY5Y TrkB stim.</b>										
<b>24 Stunden</b>	1175	13013	2052	1470	219	25684	2755	938	4757	11362

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten