

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur differentiellen Genexpression  
von humanen Tumor- und Normalzellen nach  
Behandlung mit antitumoralen Agenzien**

Vergleich der molekularen Effekte von Zytostatika,  
targetspezifischen Inhibitoren und siRNAs

Marion Hirt  
aus  
Fürstenfeldbruck

2005

### Erklärung

Diese Dissertation wurde außerhalb der Fakultät (§13 Absatz 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998) von Herrn Prof. Dr. Georg-Burkhard Kreße betreut. Die Arbeit wird von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät vertreten.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 06.06.2005

.....

Dissertation eingereicht am 25.07.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel
2. Gutachter: Prof. Dr. Georg-Burkhard Kreße

Mündliche Prüfung am 22.09.2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Analyse der Wirkmechanismen antitumoraler Agenzien.....	1
1.2 Zytostatika und targetspezifische antitumorale Wirkstoffe .....	1
1.3 Modellantagonisten .....	3
1.4 Zielsetzung .....	4
1.5 Literaturverzeichnis Kapitel 1 .....	4
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>5</b>
2.1 Reagenzien und Kits.....	5
2.1.1 Reagenzien mit allgemeinem Verwendungszweck .....	5
2.1.1.1 Lösungsmittel .....	5
2.1.1.2 Säuren.....	5
2.1.1.3 Salze .....	5
2.1.1.4 Puffersubstanzen, Detergenzien u. ä.....	5
2.1.2 Reagenzien und Kits für zellbiologische Experimente.....	6
2.1.2.1 Zellmodelle .....	6
2.1.2.2 Zellkulturmedien und -reagenzien.....	6
2.1.2.3 Reagenzien für Proliferationstests .....	6
2.1.2.4 Transfektionsagenzien .....	6
2.1.2.5 Reagenzien für durchflusszytometrische Analysen .....	6
2.1.2.6 Zytostatika .....	7
2.1.2.7 Niedermolekulare targetspezifische Inhibitoren .....	8
2.1.2.8 siRNAs .....	8
2.1.3 Reagenzien und Kits für molekularbiologische Experimente .....	10
2.1.3.1 Reagenzien für die RNA-Isolierung.....	10
2.1.3.2 Reagenzien zur Probenpräparation für die Chiphybridisierung .....	10
2.1.3.3 Puffer für die Affymetrix-Analysen.....	11
2.1.3.4 Färbelösungen für die Affymetrix-Analysen .....	12
2.1.3.5 Reagenzien für die Reverse Transkription und Real-Time-PCR .....	12
2.1.3.6 Reagenzien für die Proteinanalytik .....	13
2.2 Verbrauchsmaterial .....	15
2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial .....	15
2.2.1.1 Reaktionsgefäße aus Kunststoff .....	15

2.2.1.2	Verbrauchsmaterial zur Herstellung von Puffern und Lösungen .....	15
2.2.1.3	Pipettenspitzen.....	15
2.2.2	Verbrauchsmaterial für bestimmte Anwendungen .....	15
2.2.2.1	Verbrauchsmaterial für die Zellkultur .....	15
2.2.2.2	Verbrauchsmaterial für die Real-Time-PCR .....	16
2.2.2.3	Verbrauchsmaterial für Affymetrix-Analysen.....	16
2.2.2.4	Verbrauchsmaterial für die Proteinanalytik .....	16
2.3	Geräte .....	17
2.3.1	Allgemeine Geräte.....	17
2.3.1.1	Pipetten und Pipettierhilfen .....	17
2.3.1.2	Sonstige Geräte .....	17
2.3.2	Geräte für bestimmte Anwendungen.....	17
2.3.2.1	Geräte für die Zellkultur.....	17
2.3.2.2	Geräte für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen .....	18
2.3.2.3	Geräte für die Real-Time-PCR.....	18
2.3.2.4	Geräte für Affymetrix-Analysen.....	18
2.3.2.5	Geräte für die Proteinanalytik.....	18
2.3.2.6	Geräte für die Durchflusszytometrie.....	18
2.4	Software .....	19
2.4.1	Auswertungssoftware .....	19
2.4.2	Gerätespezifische Software .....	19
2.4.2.1	Software für die Durchflusszytometrie .....	19
2.4.2.2	Software für die Real-Time-PCR.....	19
2.4.2.3	Software für Affymetrix-Analysen.....	19
2.4.2.4	Software für spektrophotometrische Bestimmungen .....	19
2.5	Zellbiologische Methoden.....	20
2.5.1	Kultur humaner Tumorzelllinien.....	20
2.5.2	Kultur humaner Brustepithelzellen (HMECs).....	20
2.5.3	Zytotoxizitätsbestimmungen .....	20
2.5.3.1	WST-1-Test.....	20
2.5.3.2	CellTiter-Glo-Test.....	22
2.5.4	Behandlung mit Zytostatika und niedermolekularen targetspezifischen Inhibitoren .....	22
2.5.5	Zellzyklusanalyse .....	23
2.5.6	Apoptosetest .....	25
2.5.7	siRNA-Transfektion .....	27
2.5.7.1	Transfektion mit Lipofectamine 2000 .....	27
2.5.7.2	Transfektion mit Oligofectamine.....	28
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	30



2.6.1	RNA-Arbeiten allgemein .....	30
2.6.2	RNA-Isolierung .....	30
2.6.3	Probenaufarbeitung für die Hybridisierung auf Affymetrix GeneChip® Arrays.....	31
2.6.3.1	cDNA-Synthese und -Aufreinigung .....	31
2.6.3.2	In-vitro-Transkription der cDNA in biotinmarkierte cRNA und cRNA-Aufreinigung .....	31
2.6.3.3	cRNA-Fragmentierung .....	32
2.6.4	Hybridisierung auf Affymetrix GeneChip® Arrays.....	32
2.6.5	Waschen und Färben der GeneChip® Arrays .....	33
2.6.6	Signaldetektion.....	33
2.6.7	Reverse Transkription und Real-Time-PCR .....	34
2.6.7.1	Reverse Transkription .....	34
2.6.7.2	Real-Time-PCR am LightCycler® Instrument.....	34
2.6.8	Proteinanalytik .....	36
2.6.8.1	Gewinnung von Zelllysaten für die Proteinanalytik .....	36
2.6.8.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration.....	36
2.6.8.3	Gelelektrophorese und Western Blot .....	37
2.6.8.4	Messung der Enzymaktivität .....	38
2.7	Analyse der Genexpressionsdaten.....	39
2.7.1	Einführung.....	39
2.7.2	Beurteilung der Chipqualität .....	40
2.7.3	Beurteilung der RNA-Qualität .....	40
2.7.4	Datenauswertung mittels RACE-A .....	41
2.7.4.1	Übersicht .....	41
2.7.4.2	Wichtige Parameter der RACE-A-Analyse.....	41
2.7.4.3	Standardfilterkriterien .....	42
2.7.4.4	Filterkriterien für substanzspezifische Effekte.....	43
2.7.5	Hierarchisches Clustern und Darstellung in Heat Maps.....	44
2.7.6	Funktionelle Analyse der deregulierten Gene .....	44
2.8	Literaturverzeichnis Kapitel 2.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und theoretischer Hintergrund.....</b>	<b>46</b>
3.1	Das p53-MDM2-Netzwerk .....	46
3.1.1	p53 als Transkriptionsfaktor und proapoptotischer Effektor.....	46
3.1.2	Mutationen von p53 in humanen Tumoren .....	47
3.1.3	Biologische Wirkungen von p53 und seinen Zielproteinen .....	48
3.1.4	Regulation der p53-Aktivität.....	49
3.1.5	p53 und Zytostatika .....	50
3.1.6	Autoregulatorische Feedbackschleife zwischen p53 und MDM2.....	50

3.1.7	MDM2 – Struktur und enzymatische Eigenschaften.....	51
3.1.8	Modulation der MDM2-Aktivität.....	52
3.1.9	p53-unabhängige Funktionen von MDM2 .....	53
3.1.10	Inhibition der Interaktion zwischen p53 und MDM2.....	54
3.2	Zytostatikabehandlung der verschiedenen Zellmodelle .....	56
3.2.1	Einleitung .....	56
3.2.2	Zellmodelle.....	56
3.2.3	Zytostatika .....	57
3.2.3.1	Adriamycin (Doxorubicin-HCl).....	57
3.2.3.2	Camptothecin .....	58
3.2.3.3	Cisplatin.....	59
3.2.3.4	Etoposid .....	59
3.2.3.5	5-Fluorouracil .....	60
3.2.3.6	Taxol (Paclitaxel).....	61
3.2.4	Zytotoxizitätstests zur Ermittlung der IC80-Werte .....	62
3.2.5	Beurteilung der Zellmorphologie nach Zytostatikaexposition .....	64
3.2.6	Western Blot zum Nachweis von p53 nach Zytostatikabehandlung .....	65
3.2.7	Genexpressionsanalyse nach Zytostatikaexposition – zahlenmäßige Betrachtung .....	68
3.2.7.1	Gesamtübersicht .....	68
3.2.7.2	Vergleich der Zytostatikawirkungen innerhalb der Zellsysteme.....	69
3.2.7.3	Vergleich der Wirkungen einzelner Zytostatika in verschiedenen Zellsystemen.....	73
3.2.8	Funktionelle Analyse der in der Genexpressionsanalyse identifizierten „gemeinsamen“ Gene .....	76
3.2.8.1	Differenzielle Expression von p53-Targets .....	77
3.2.8.1.1	p53-regulierbare Targets, die auch in Zellen mit mutantern p53 differenziell exprimiert waren.....	77
3.2.8.1.2	Beispiele wichtiger Effektoren der p53-abhängigen Antwort auf die Zytostatikaexposition .....	80
3.2.8.1.3	Auswertung der Literatur zur p53-abhängigen transkriptionellen Regulation.....	85
3.2.8.2	Deregulation von Genprodukten mit Funktionen in Zellzyklus, Proliferation und DNA-Damage-Response .....	87
3.2.8.2.1	G1/S-Progression .....	89
3.2.8.2.2	DNA-Replikation .....	91
3.2.8.2.3	DNA-Damage-Response .....	94
3.2.8.2.3.1	Zelluläre Kontrollpunkte (Checkpoints) .....	94
3.2.8.2.3.2	DNA-Reparaturmechanismen .....	99
3.2.8.2.4	G2/M-Progression und Mitose .....	104
3.2.8.2.5	Darstellung der differentiellen Expression von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen in Form von Heat Maps.....	106
3.2.8.2.6	Transkriptionelle Regulation von Zellzyklusprogression und DNA-Damage-Response .....	109
3.2.8.2.7	Zusammenhang mit der zellulären Seneszenz .....	111
3.2.8.3	Deregulation von Genen, die Effektoren der RNA-Prozessierung kodieren.....	112

3.2.8.4	Differenzielle Expression von Zytokinen und zytokinresponsiven Transkripten .....	117
3.2.8.5	Differenzielle Expression von Adhäsionsmolekülen .....	122
3.2.8.6	Repression der Unfolded Protein Response.....	125
3.2.8.7	Deregulation von Genen mit Funktionen in Migration, Invasion und Metastasierung .....	129
3.2.8.8	Differenzielle Expression von pro- und antiapoptotischen Effektoren .....	130
3.2.9	Zytostatikaspezifische Effekte auf die Genexpression.....	133
3.2.9.1	Im Vergleich zu den übrigen Zytostatika geringere Effekte einzelner Substanzen .....	133
3.2.9.2	Substanzspezifisch deregulierte Gene .....	134
3.2.9.2.1	5-FU-spezifische Veränderungen der globalen Genexpression.....	135
3.2.9.2.2	Taxol-spezifische Effekte in HT-29-Zellen.....	141
3.3	Spezifische Inhibition von Zielmolekülen durch RNAi und niedermolekulare Hemmstoffe.....	143
3.3.1	Einleitung .....	143
3.3.2	Positiv- und Negativkontrollen in RNAi-Experimenten .....	144
3.3.3	Hemmung von Cholinkinase .....	145
3.3.3.1	Einleitung.....	145
3.3.3.2	RNAi gegen Cholinkinase .....	146
3.3.3.2.1	Zelllinien.....	147
3.3.3.2.2	Silencing von ChoK auf Transkriptionsebene.....	147
3.3.3.2.3	Silencing von ChoK auf Proteinebene .....	148
3.3.3.2.4	Reduktion der Enzymaktivität von ChoK .....	149
3.3.3.2.5	Effekte auf die Zellzahl und -morphologie .....	150
3.3.3.2.6	Quantifizierung der Effekte auf die Zellproliferation und -viabilität .....	151
3.3.3.2.7	Effekte auf die Zellzyklusverteilung .....	151
3.3.3.2.8	Genexpressionsanalyse von HT-29-Zellen nach siRNA-Transfektion .....	152
3.3.3.2.9	Untersuchung des Cholinkinase-Inhibitors MN58 .....	155
3.3.4	RNAi gegen MDM2.....	158
3.3.4.1	Einleitung.....	158
3.3.4.2	Zelllinien .....	158
3.3.4.3	MDM2-siRNAs und Kontroll-siRNAs .....	158
3.3.4.4	Nachweis des Silencings von MDM2.....	159
3.3.4.4.1	Silencing auf mRNA-Ebene .....	159
3.3.4.4.2	Silencing auf Protein-Ebene .....	162
3.3.4.5	Optimierung der siRNA-Konzentration.....	164
3.3.4.6	Morphologische Effekte des MDM2-Silencings .....	164
3.3.4.7	Proliferationstests nach MDM2-Silencing .....	167
3.3.4.8	Zellzyklusanalyse nach MDM2-Silencing.....	169
3.3.4.9	Apoptosetest nach MDM2-Silencing.....	171
3.3.4.10	p53-Western Blot .....	172
3.3.4.11	Differenzielle Genexpression nach MDM2-Silencing in MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen.....	173
3.3.4.11.1	Bestätigung eines effizienten Silencings von MDM2 auf mRNA- und Proteinebene .....	173

3.3.4.11.2	Bestätigung der p53-Aktivierung im Western Blot.....	175
3.3.4.11.3	Übersicht über die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse.....	175
3.3.4.11.3.1	Bestätigung des MDM2-Silencings durch Chip-Daten.....	175
3.3.4.11.3.2	Vergleich der Negativkontrollen.....	176
3.3.4.11.3.3	Zahlenmäßige Betrachtung der Affymetrix-Daten.....	177
3.3.4.11.3.4	Auswahl funktioneller und spezifischer siRNAs.....	179
3.3.4.11.3.5	Off-Target-Effekte von M8.....	179
3.3.4.11.4	Test von Stealth-RNAs.....	180
3.3.4.12	Genexpressionsanalyse von HCT-116-Zellen nach Transfektion mit MDM2-siRNAs.....	182
3.3.5	Inhibition der MDM2-Funktion durch den spezifischen Hemmstoff R206-0270.....	186
3.3.5.1	Ermittlung von Inhibitionskurven für R206-0270.....	187
3.3.5.2	Effekte von MDM2-Inhibitor und Kontrollsubstanz auf die Zellmorphologie.....	187
3.3.5.3	Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit MDM2-Inhibitor und Kontrollsubstanz.....	188
3.3.5.4	p53-Western Blot.....	189
3.3.5.5	Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit MDM2-Inhibitor und Kontrollsubstanz.....	190
3.3.6	Vergleich der Genexpressionsdaten von MDM2-Inhibitor und -siRNAs.....	192
3.3.6.1	Zahlenmäßige Betrachtung der RNAi- und Inhibitor-Daten aus den Affymetrix-Experimenten....	192
3.3.6.2	Funktionelle Analyse der von den MDM2-siRNAs und/oder dem MDM2-Inhibitor modulierten..... Gene.....	192
3.3.6.2.1	Häufung von p53-Targets unter den durch MDM2-siRNAs und/oder den Inhibitor deregulierten Genen.....	193
3.3.6.2.2	Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen.....	197
3.3.6.2.3	Differenzielle Expression von Adhäsions- und Zytoskelettgenen.....	201
3.3.6.2.4	Weitere durch M5 und M6 deregulierte Gene.....	203
3.3.6.2.5	Vergleich der durch MDM2-Silencing und -Inhibition hervorgerufenen differenziellen Gen- expression mit den Effekten von Zytostatika.....	204
3.4	Literaturverzeichnis Kapitel 3.....	205
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>214</b>
4.1	Folgerungen aus der differenziellen Expression nach Zytostatikabehandlung.....	214
4.1.1	Beurteilung der substanzspezifischen und -übergreifenden Effekte.....	214
4.1.2	p53-abhängige differenzielle Genexpression nach Zytostatikabehandlung.....	216
4.1.3	Repression von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen.....	219
4.1.4	Hinweise auf die Induktion von Seneszenz.....	220
4.1.5	Repression der RNA-Prozessierungsmaschinerie.....	221
4.1.6	Differenzielle Expression von Immunantwortgenen.....	221
4.1.7	Differenzielle Expression von Adhäsionsgenen.....	222
4.1.8	Repression von Effektoren der Unfolded Protein Response.....	223
4.1.9	Differenzielle Expression von Genen mit invasions- und apoptoseassoziierten Funktionen.....	223

4.2	Bewertung der im Vergleich aus RNAi- und Inhibitor-Daten erhaltenen Ergebnisse .....	225
4.2.1	Diskussion der Cholinkinase-Ergebnisse .....	225
4.2.2	Diskussion der MDM2-Ergebnisse .....	226
4.3	Validität der verwendeten Experiment- und Auswertungsstrategien.....	230
4.3.1	Eignung der für die Analyse der Microarray-Daten verwendeten Auswertungsmethodik .....	230
4.3.2	Relevanz der Ergebnisse für die Tumorthherapie .....	231
4.3.3	Eignung der verwendeten Methode für die Charakterisierung von Substanzen hinsichtlich ihres Wirkmechanismus und ihrer Spezifität .....	232
4.4	Literaturverzeichnis Kapitel 4 .....	234
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>236</b>
<b>6</b>	<b>Appendix: Gentabellen.....</b>	<b>239</b>
6.1	Übersicht .....	239
6.2	Gentabellen und zugehörige Legenden .....	239
6.3	Literaturverzeichnis Kapitel 6.....	316

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

<b>Abkürzung<sup>1</sup></b>	<b>Bedeutung</b>
2D	zweidimensional
5FU, 5-FU, F	5-Fluorouracil
A	Adenin
Adr, A	Adriamycin
ALAS	$\delta$ -Aminolävulinatsynthase
APC	anaphase promoting complex
ATP	Adenosintriphosphat
BASC	BRCA1-associated genome surveillance complex
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	cell adhesion molecule
Cam, C	Camptothecin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
CDKI	CDK-Inhibitor
cDNA	copy DNA
CDP	Cytidindiphosphat
CH <sub>2</sub> -THF	5,10-Methylentetrahydrofolsäure
Cho	Cholin
ChoK	Cholinkinase
Cis, P	Cisplatin
CJM	cell junction molecule
cRNA	copy RNA
C-terminal	carboxyterminal
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	death-inducing signaling complex
DMF	Dimethylformamid

---

<sup>1</sup> Gensymbole sind im Abkürzungsverzeichnis i. A. nicht aufgeführt. Die Übersetzung eines Gensymbols in den vollen Namen des Gens ist entweder dem Haupttext oder den im Appendix (Kapitel 6) befindlichen Gentabellen zu entnehmen.

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
EG	Entrez Gene ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene</a> )
Eg5	Eg5-siRNA
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)tetraessigsäure
EJC	exon-exon junction complex
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERCC	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group
Eto, E	Etoposid
FA	Fanconi-Anämie
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FdUMP	5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat
FdUTP	5-Fluorodesoxyuridintriphosphat
FKS	fötales Kälberserum
FLUOS	Fluorescein
FUMP	5-Fluorouridinmonophosphat
FUTP	5-Fluorouridintriphosphat
GTP	Guanidintriphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HEPES-BSS	HEPES-buffered saline solution
HMEC	Human Mammary Epithelial Cells
HUGO	Human Genome Organization
IAP	inhibitor of apoptosis protein

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
IC50	inhibitorische Konzentration 50%
IC80	inhibitorische Konzentration 80%
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IR	ionisierende Strahlung
ISG	interferon-stimulated gene
IVT	In-vitro-Transkription
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Luci	Luciferase-GL3 siRNA
MAPK	mitogen activated protein kinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
miRNA	microRNA
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMR	Mismatchreparatur
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Non-homologous end-joining
NMD	Nonsense-mediated decay
NPC	nuclear pore complex
Ns	Non-silencing control siRNA
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung carcinoma)
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
Oligo(dT)	Oligo-Desoxythymidin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCho	Phosphorylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PolyA	Polyadenosin
pre-RC	präreplikativer Komplex (pre-replicative complex)
PVDF	Polyvinylidenfluorid



<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
R270	MDM2-Inhibitor R206-0270
R402	Kontrollsubstanz R206-0402
RACE-A	Roche Affymetrix Chip Experiment–Analysis
RFC	replication factor C
RLU	relative Lumineszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPA	replication protein A
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription und anschließende PCR
SA	Streptavidin
SAM	substrate adhesion molecule
SAPE	Streptavidin-R-Phycoerythrin
SCF-Komplex	SKP/CUL/F-Box-Protein-Komplex
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom (small cell lung carcinoma)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Laurylsulfat)
sec	Sekunde
Ser	Serin
siRNA	small interfering RNA
SMN	survival of motor neurons
snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tax, T	Taxol
Thr	Threonin
TJP	tight junction protein
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNS	Trypsin neutralizing solution
tRNA	Transfer-RNA
U	Uridin
Unbeh	unbehandelte Kontrolle

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
UPR	Unfolded Protein Response
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolette Strahlung
XPC	xeroderma pigmentosum complementation group
XRCC	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells
Z	Zytostatikum

# 1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen in den Ländern der westlichen Welt nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Trotz beträchtlicher Fortschritte in der Heilungsrate und bei der Überlebenszeit nach der Diagnose maligner Neoplasien besteht nach wie vor ein großer Bedarf an neuen Therapieoptionen, die die Progression und Metastasierung des Tumors hemmen und idealerweise zu einer kompletten Remission führen, gleichzeitig aber mit möglichst geringen Nebenwirkungen verbunden sein sollten. Gerade der Arzneistofftherapie, die neben chirurgischen Eingriffen und Bestrahlungsregimes die dritte tragende Säule der Krebsbehandlung darstellt, wird aufgrund zunehmender Erkenntnisse über tumorrelevante Signalwege ein großes Potenzial für Verbesserungen zugeschrieben.

## 1.1 Analyse der Wirkmechanismen antitumoraler Agenzien

Um in ihrer Wirksamkeit und Verträglichkeit optimierte Therapien entwickeln zu können, ist es von essenzieller Bedeutung, die Mechanismen bereits etablierter und neuer antitumoraler Arzneistoffe möglichst umfassend zu analysieren und die molekularen Ursachen ihrer erwünschten und unerwünschten Wirkungen zu verstehen. Mit den klassischen Methoden der Molekularbiologie lassen sich diese Effekte aber nur begrenzt erfassen, da mit vertretbarem Aufwand maximal einige Dutzend Zielmoleküle, seien es mRNAs oder Proteine, auf Veränderungen ihrer Expression, ihrer Aktivität usw. untersucht werden können. Bis vor kurzem war dadurch die Auswahl der zu analysierenden Moleküle a priori auf diejenigen beschränkt, auf die ein Einfluss der Substanz aufgrund ihres postulierten Wirkmechanismus zu erwarten war.

Mittlerweile stehen diverse Technologien zur Verfügung, die Einblicke in die globalen Auswirkungen eines Agens eröffnen und die Analyse ganzer biologischer Netzwerke ermöglichen. Auf Transkriptebene sind dies hauptsächlich Oligonukleotid- und cDNA-Microarrays, auf Proteinebene können u. a. massenspektrometrische Analysen, 2D-Gelelektrophoresen und neuerdings auch Antikörper-Arrays eingesetzt werden. Gerade im onkologischen Forschungsbereich besitzt diese Herangehensweise großen Wert, da die an Tumorentstehung, -progression und -metastasierung beteiligten Signalwege eine ungeheure Komplexität und Vernetzung aufweisen.

## 1.2 Zytostatika und targetspezifische antitumorale Wirkstoffe

Das zur Therapie maligner Tumoren zur Verfügung stehende Wirkstoffspektrum konnte in den letzten Jahren um eine Reihe von Substanzen mit spezifischem Angriffspunkt erweitert werden. Lange Zeit standen hauptsächlich zytotoxische Agenzien zur Verfügung, die durch direkte DNA-Schädigung oder durch Eingriff in basale zelluläre Vorgänge wie DNA-Replikation und Mitose zu Wachstumsarrest oder Apoptose führen, jedoch wenig Spezifität für Tumorzellen besitzen und entsprechend gravierende Nebenwirkungen hervorrufen. Die Forschungsaktivitäten sowohl von Pharmaunternehmen als auch akademischen Einrichtungen konzentrieren sich deshalb verstärkt auf die Identifikation sog. „targetspezifischer“ Wirkstoffe, von denen

man sich einen gezielteren Eingriff ins Tumorgeschehen und geringere Effekte auf gesunde Zellen und Gewebe erwartet.

Die Angriffspunkte oder „Targets“ dieser Agenzien können in direkten Zusammenhang mit Proliferation, Migration und Metastasierung gebracht werden und sind häufig in Krebszellen übermäßig aktiv, u. a. aufgrund von Genamplifikation oder aberranter transkriptioneller Regulation. Beispiele derartiger Onkogene, für die bereits spezifische Inhibitoren bzw. antagonistisch wirkende Antikörper zur Verfügung stehen, sind die Rezeptoren der *epidermal growth factor*-Familie EGFR (Inhibitor Erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>)) und HER2 (Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)), das BCR-ABL-Fusionsprotein (Inhibitor Imatinibmesylat (Glivec<sup>®</sup>)) und der Wachstumsfaktor VEGF (Antikörper Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>)).

Konventionelle Zytostatika werden gemeinhin als unspezifische Agenzien betrachtet, da sie massiv mit grundlegenden, für Wachstum und Überleben der Zelle notwendigen Prozessen interferieren. Eine Selektivität für Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen besteht nur insoweit, als diese häufig weniger schnell oder gar nicht proliferieren und sich zudem aufgrund besserer Nährstoff- und Sauerstoffversorgung rascher von zytotoxischen Angriffen erholen können. Außerdem wurde postuliert, dass Normalzellen die durch Zytostatika hervorgerufenen Schäden am Genom besser rückgängig machen können, da sie über intakte Kontrollpunkt- und Reparaturmechanismen verfügen, während diese Maschinerie in Tumorzellen im Verlauf der malignen Transformation häufig inaktiviert worden ist [1].

Im Gegensatz zu diesem breiten und ungerichteten Angriff klassischer Zytostatika geht man bei targetspezifischen Agenzien davon aus, dass sie viel subtiler ins zelluläre Geschehen eingreifen und präzise einen definierten zellulären Signalweg aktivieren oder ausschalten.

Falls dieses Bild stimmt, sollte man bei der Analyse der globalen molekularen Effekte fundamentale Unterschiede zwischen „unspezifischen“ Zytostatika und targetspezifischen Substanzen beobachten können.

Obwohl den konventionellen Zytostatika ein derartiger Mangel an Spezifität zugeschrieben wird, sind sie in der Therapie dennoch nicht beliebig austauschbar, sondern es gibt Tumorarten und -subtypen, die besser auf bestimmte Wirkstoffe ansprechen als auf andere. Dies legt nahe, dass eben doch Unterschiede zwischen ihnen bestehen, die sich auch auf molekularer Ebene erkennen lassen sollten. Es existiert bereits eine Reihe von Studien, in denen die Effekte einzelner antitumoraler Substanzen auf Transkriptionsebene mit DNA-Microarrays analysiert wurden und die von charakteristischen Expressionsmustern berichten [2-10]. Auf der anderen Seite gibt es nur sehr wenige Untersuchungen, die mehrere Zytostatika auf ihre Beeinflussung der globalen Genexpression hin verglichen haben [11-13]. In diesen konnten trotz der Unterschiede im Wirkmechanismus substanzielle Übereinstimmungen, teilweise sogar extrem große Ähnlichkeiten zwischen den Agenzien beobachtet werden.

### 1.3 Modellantagonisten

Auch bei den Substanzen, die gezielt für die Inhibition eines Targets entwickelt wurden, besteht die Möglichkeit, dass sie zusätzliche unbekannte Angriffspunkte haben und somit breitere Effekte erzeugen als erwartet. Um die Spezifität eines Wirkstoffs einschätzen zu können, ist es deshalb wertvoll, ein Modellsystem zur Verfügung zu haben, welches die Einflüsse eines idealen Inhibitors simuliert. Bis vor kurzem wurden zu diesem Zweck hauptsächlich Knock-out- oder dominant-negative Ansätze verwendet, deren Etablierung jedoch mit erheblichem Aufwand verbunden ist. Die Entwicklung der Antisense-Technologie eröffnete zwar prinzipiell die Chance, ein Target mit einfacher Methodik transient auszuschalten, die Identifizierung funktioneller Oligonukleotidsequenzen erwies sich jedoch als problematisch. Durch die Entdeckung des RNA-Interferenz-(RNAi-)Mechanismus und seiner Anwendungsmöglichkeiten in der Forschung innerhalb der letzten Jahre kann man nun aber innerhalb kurzer Zeit und mit verhältnismäßig niedrigem Arbeitseinsatz einen spezifischen Knock-down der Ziel-mRNA und des zugehörigen Proteins bewerkstelligen.

Hat man eine siRNA zur Verfügung, die zum effizienten Abbau des erwünschten Transkripts führt und dadurch die Bildung des Zielproteins verhindert, sollte man nach globaler Analyse der differentiellen Genexpression eine Signatur erhalten, die nahezu einem perfekten Inhibitor entspricht. Auf der Grundlage dieser Daten sollte es dann möglich sein, die Spezifität einer Leitsubstanz einzuschätzen und zu optimieren, bis sich ihr Genexpressionsmuster an das des Modellinhibitors siRNA angleicht. In Abb. 1-1 ist diese Vorgehensweise schematisch dargestellt.

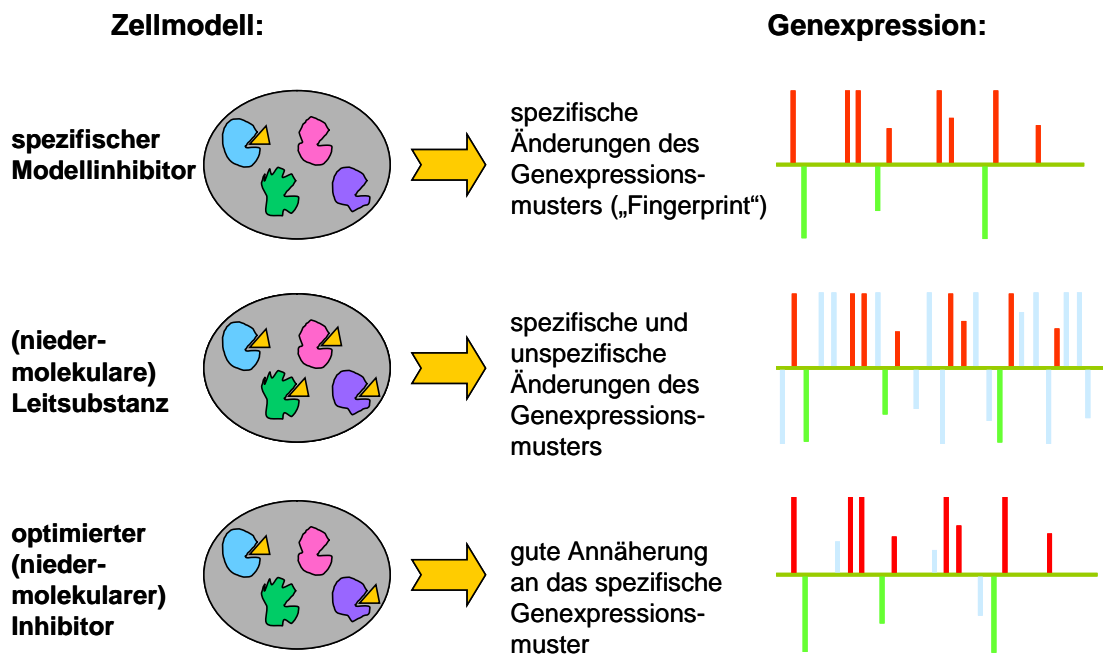


Abb. 1-1: Der Weg von einem Modellantagonisten zu einem optimierten Inhibitor: Annäherung der Genexpressionsmuster.

## 1.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht einerseits darin, gängige Zytostatika hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die globale Genexpression zu charakterisieren und zu vergleichen und auf diesem Weg Gemeinsamkeiten und substanzspezifische Effekte zu identifizieren. Durch die Verwendung verschiedener Zellsysteme sowohl tumoralen als auch nicht-transformierten Ursprungs, die sich auch hinsichtlich des Mutationsstatus des Tumorsuppressor-Gens p53 unterscheiden, wird der Einfluss dieser Parameter auf das substanzabhängige Genexpressionsmuster überprüft. Zum anderen werden gegen ein definiertes Zielmolekül gerichtete Inhibitoren in ähnlicher Weise auf ihre molekularen Effekte hin untersucht. Hierbei wird ihre Spezifität auf den Prüfstand gestellt, indem ihre Wirkungen einerseits mit denen der Zytostatika, andererseits mit RNAi-vermittelten Veränderungen auf Genexpressionsebene verglichen werden. Diese Analysen geben auch Aufschluss darüber, ob die verbreiteten Vorstellungen eines klaren Gegensatzes zwischen toxischen Chemotherapeutika einerseits und targetspezifischen Agenzien andererseits berechtigt sind, und eröffnen zudem die Möglichkeit, die Eignung der RNAi-Technologie als Modellsystem einer idealen Inhibition kritisch zu überprüfen.

## 1.5 Literaturverzeichnis Kapitel 1

1. Pommier, Y., *Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints*. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2004. 4(5): p. 429-34.
2. Dan, S. and T. Yamori, *Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 280(3): p. 861-7.
3. Wang, Y., et al., *Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology*. *FEBS Lett*, 1999. 445(2-3): p. 269-73.
4. Makino, K., D. Yu, and M.C. Hung, *Transcriptional upregulation and activation of p55Cdc via p34(cdc2) in Taxol-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2001. 20(20): p. 2537-43.
5. Kudoh, K., et al., *Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray*. *Cancer Res*, 2000. 60(15): p. 4161-6.
6. Chang, B.D., et al., *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(1): p. 389-94.
7. Zhou, Y., et al., *Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects*. *Cancer Res*, 2002. 62(6): p. 1688-95.
8. Tao, W., et al., *Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34+ cells treated with etoposide*. *Exp Hematol*, 2003. 31(3): p. 251-60.
9. Maxwell, P.J., et al., *Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling*. *Cancer Res*, 2003. 63(15): p. 4602-6.
10. Bani, M.R., et al., *Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts*. *Mol Cancer Ther*, 2004. 3(2): p. 111-21.
11. Brachat, A., et al., *A microarray-based, integrated approach to identify novel regulators of cancer drug response and apoptosis*. *Oncogene*, 2002. 21(54): p. 8361-71.
12. Troester, M.A., et al., *Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer*. *Cancer Res*, 2004. 64(12): p. 4218-26.
13. Li, Y., et al., *Gene expression profiling revealed novel mechanism of action of Taxotere and Furtulon in prostate cancer cells*. *BMC Cancer*, 2005. 5(1): p. 7.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Kits

#### 2.1.1 Reagenzien mit allgemeinem Verwendungszweck

##### 2.1.1.1 Lösungsmittel

DMSO	Sigma
DMF	Fluka
Ethanol p. A.	Merck
Ethanol techn.	Merck
Methanol	J.T. Baker
2-Propanol	Riedel-de Haën

H<sub>2</sub>O: Soweit nicht näher bezeichnet, wurde entionisiertes, autoklaviertes Wasser verwendet.

##### 2.1.1.2 Säuren

Essigsäure min. 99,8 %	Riedel-de Haën
Salzsäure 25 %	Merck

##### 2.1.1.3 Salze

CaCl <sub>2</sub>	Merck
Kaliumacetat	Merck
Laurylsulfat (SDS)	Sigma
Magnesiumacetat	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Merck
NaCl	Merck
NaF	Sigma
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	Sigma

##### 2.1.1.4 Puffersubstanzen, Detergenzien u. ä.

Glycerin	Merck
Nonidet P40	Fluka
Titriplex III (EDTA)	Merck
Trizma Base	Sigma
Tris-HCl	Roche

Triton X-100

Roche

## 2.1.2 Reagenzien und Kits für zellbiologische Experimente

### 2.1.2.1 Zellmodelle

A549	NCI / Roche-interne Zellbank
HCT-116	NCI / Roche-interne Zellbank
HT-29	NCI / Roche-interne Zellbank
MCF-7	NCI / Roche-interne Zellbank
MDA-MB-231	NCI / Roche-interne Zellbank
NCI/ADR-RES	NCI / Roche-interne Zellbank
HMEC, Lot # 6F0227	Cambrex

### 2.1.2.2 Zellkulturmedien und -reagenzien

RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX I	Invitrogen (Gibco)
Fötales Rinderserum, zertifiziert (hitzeinaktiviert)	Invitrogen (Gibco)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2	Invitrogen (Gibco)
Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA * 4 Na)	Invitrogen (Gibco)
Trypan Blue Stain 0,4 %	Invitrogen (Gibco)
MEGM BulletKit	Cambrex
Trypsin-EDTA (für HMEC-Kultur)	Cambrex
HEPES Buffered Saline Solution (HEPES-BSS)	Cambrex
Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	Cambrex
DMSO Hybri-Max Ampullen, sterilfiltriert	Sigma
Opti-MEM I (Kat. # 31985-047)	Invitrogen (Gibco)

### 2.1.2.3 Reagenzien für Proliferationstests

Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega

### 2.1.2.4 Transfektionsagenzien

Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Oligofectamine	Invitrogen

### 2.1.2.5 Reagenzien für durchflusszytometrische Analysen

FACSFlow	BD Biosciences
----------	----------------



FACSSafe	BD Biosciences
FACSRinse	BD Biosciences
Destilliertes H <sub>2</sub> O (Zellkultur-getestet)	Invitrogen (Gibco)
Propidiumiodid	Sigma
RNase A	Calbiochem
BSA Fraction V, fatty acid free	Roche
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche

#### RNase A-Stammlösung

RNase A wurde in destilliertem H<sub>2</sub>O (Zellkultur-getestet) zu einer Konzentration von 2.500 U/ml gelöst. Durch 15 min Erhitzen auf 99°C wurden möglicherweise enthaltene DNasen inaktiviert. Aliquots der Stammlösung wurden bei -20°C gelagert.

#### PI-Stammlösung

Propidiumiodid-(PI)-Festschubstanz wurde in destilliertem H<sub>2</sub>O (Zellkultur-getestet) zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Stammlösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

#### PI-Färbepuffer

100 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM CaCl<sub>2</sub>

0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 % BSA Fraction V, fatty acid free

0,1 % Nonidet P40

sterilfiltriert, Lagerung bei Raumtemperatur

Direkt vor der Verwendung wurde dem Puffer PI-Stammlösung in einem Verhältnis von 1:50 zugesetzt. Die entstehende PI-Endkonzentration betrug 20 µg/ml.

#### **2.1.2.6 Zytostatika**

Camptothecin	Sigma
cis-Platin(II)diammindichlorid (Cisplatin)	Sigma
Doxorubicinhydrochlorid (Adriamycin)	Sigma
Etoposid	Sigma
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma
Paclitaxel (Taxol)	Sigma

Aus den Festsubstanzen wurden Stammlösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt und in Aliquots bei -20°C gelagert. Als Lösungsmittel für Camptothecin, Etoposid, 5-FU und Taxol diente DMSO, für Adriamycin wurde Wasser verwendet und Cisplatin wurde in DMF gelöst.

### 2.1.2.7 Niedermolekulare targetspezifische Inhibitoren

#### Cholinkinaseinhibitor

MN58

Zur Verfügung gestellt von Prof. J. C. Lacal, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid; die Festsubstanz wurde in 0,9 %iger NaCl-Lösung zu einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst.

#### MDM2-Inhibitoren

aktiver MDM2-Inhibitor R206-0270

Roche-interne Substanzbibliothek

inaktive Kontrollsubstanz R206-0402

Roche-interne Substanzbibliothek

Aus den Substanzen wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.1.2.8 siRNAs

In allen Fällen ist die Sequenz von Sense- und Antisensestrang der siRNA angegeben<sup>2</sup>.

#### Cholinkinase-siRNAs

**C1:**

Dharmacon

5' GGCCGAGAGAAUUCUGAAAdTdT 3' (sense)  
3' dTdTCCGGCUCUCUUAAGACUUU 5' (antisense)

**C2:**

Dharmacon

5' GCAAGGUUUGAUGCCUAAUdTTdT 3' (sense)  
3' dTdTTCGUUCCAAACUACGGAUAA 5' (antisense)

**C3:**

Dharmacon

5' CUCCAUCUCCAGUUGUAAUdTTdT 3' (sense)  
3' dTdTGAGGUAGAGGUCAACAUA 5' (antisense)

#### MDM2-siRNAs

**M1:**

Qiagen

5' UCAGCAGGAAUCAUCGGACdTdT 3' (sense)  
3' dTdTAGUCGUCCUUAGUAGCCUG 5' (antisense)

<sup>2</sup>Die Targetsequenz auf der mRNA entspricht den 19 Nukleotiden des doppelsträngigen Anteils der siRNA. Es gilt als gesichert, dass die Basenüberhänge nicht zur Erkennung der Ziel-mRNA beitragen. Die Stealth-RNAs sind 25mere ohne Überhänge.

**M2:** Qiagen

5' CGCCACAAAUCUGAUAGUAdTdT 3' (sense)  
 3' dTdTGCGGUGUUUAGACUAUCAU 5' (antisense)

**M3:** Qiagen

5' UCUACAGGGACGCCAUCGAdTdT 3' (sense)  
 3' dTdTAGAUGUCCCUGCGGUAGCU 5' (antisense)

**M5 (Teil des MDM2-siGENOME-Sets):** Dharmacon

5' GGAGUAUUGUUGUGAAAGAUU 3' (sense)  
 3' UUCCUCUAUACAACACUUUCU 5' (antisense)

**M6 (Teil des MDM2-siGENOME-Sets):** Dharmacon

5' CCACAAAUCUGAUAGUAUUUU 3' (sense)  
 3' UUGGUGUUUAGACUAUCAUAA 5' (antisense)

**M7 (Teil des MDM2-siGENOME-Sets):** Dharmacon

5' GAUGAGGUAUAUCAAGUUAAU 3' (sense)  
 3' UUCUACUCCAUAUAGUUCAAU 5' (antisense)

**M8 (Teil des MDM2-siGENOME-Sets):** Dharmacon

5' GGAAGAAACCCAAGACAAAUU 3' (sense)  
 3' UUCCUUCUUUGGGUUCUGUUU 5' (antisense)

**M9 (Stealth-RNA):** Invitrogen

5' UGAAAGGGAAGAAACCCAAGACAAA 3' (sense)  
 3' ACUUUCCCUUCUUUGGGUUCUGUUU 5' (antisense)

**M10 (Stealth-RNA):** Invitrogen

5' GCUCUGUGUGUAAUAAGGGAGAUAU 3' (sense)  
 3' CGAGACACACAUUAUCCUCUAUA 5' (antisense)

Positivkontroll-siRNA**Eg5-siRNA (Weil et al. [1]) :** Dharmacon, Qiagen

5' CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT 3' (sense)  
 3' dTdTGACUUCUGGACUUCUGUUA 5' (antisense)

Negativkontroll-siRNAs**Luciferase-GL3 siRNA (Elbashir et al. [2]):** Qiagen

5' CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT 3' (sense)  
 3' dTdTGAAUGCGACUCAUGAAGCU 5' (antisense)

**Non-silencing control siRNA:**

Qiagen

5' UUCUCCGAACGUGUCACGUDtdT 3' (sense)  
 3' dTdTAAAGAGGCUUGCACAGUGCA 5' (antisense)

Herstellung von siRNA-Stammlösungen

5x siRNA Buffer	Dharmacon
5x Universal Buffer	Dharmacon
siRNA Suspension Buffer	Qiagen

Die siRNAs der verschiedenen Anbieter wurden jeweils nach Herstellervorschrift gelöst. Im Fall von Dharmacon und Qiagen wurde dazu der mitgelieferte Puffer verwendet, während die von Invitrogen gelieferten siRNAs bereits die notwendigen Salze enthalten und nur in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert werden müssen. Der 5x siRNA Buffer und der inzwischen nicht mehr erhältliche 5x Universal Buffer<sup>3</sup> wurden mit RNase-freiem Wasser auf eine 1x Konzentration verdünnt. Qiagen schreibt vor, dass die im siRNA Suspension Buffer gelöste siRNA 1 min auf 90°C und dann 60 min auf 37°C erhitzt werden soll.

Die Puffervolumina wurden stets so gewählt, dass sich eine Endkonzentration von 20 µM siRNA ergab. Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**2.1.3 Reagenzien und Kits für molekularbiologische Experimente****2.1.3.1 Reagenzien für die RNA-Isolierung**

2-Mercaptoethanol	Sigma
QIAshredder	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
RNaseZAP	Sigma
RNeasy Mini Kit	Qiagen

**2.1.3.2 Reagenzien zur Probenpräparation für die Chiphybridisierung**

Microarray cDNA Synthesis Kit	Roche
Microarray RNA Target Synthesis Kit (T7)	Roche
Microarray Target Purification Kit	Roche
Biotin-16-UTP	Roche
Kontroll-Oligonukleotid B2	Affymetrix
100x staggered Kontroll-cRNAs	Affymetrix
Biotinylated Anti-Streptavidin (Goat)	Vector Laboratories

<sup>3</sup> Zusammensetzung des 5x Universal Buffers: 100 mM KCl, 30 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

Bovine Serum Albumin (BSA, 50 mg/ml)	Invitrogen
DEPC-treated H <sub>2</sub> O	Ambion
EDTA 0,5 M	Sigma
Goat IgG	Sigma
Herring Sperm DNA	Promega
MES Sodium Salt	Sigma
MES Monohydrat	Sigma
NaCl 5 M, RNase-frei	Ambion
SSPE Buffer (20x)	Invitrogen
Streptavidin, recombinant	Roche
Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (SAPE)	Molecular Probes
Surfact-Amps 20	Perbio (Pierce)

### 2.1.3.3 Puffer für die Affymetrix-Analysen

#### 5x Fragmentierungspuffer

4 ml 1 M-Trisacetat pH 8,1  
 (wässrige Lösung der freien Tris-Base,  
 pH-Einstellung mittels Eisessig)  
 0,64 g Magnesiumacetat  
 0,98 g Kaliumacetat  
 mit DEPC- H<sub>2</sub>O ad 20 ml  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei Raumtemperatur

#### 2x MES-Puffer

8,3 ml 12x MES-Puffer  
 17,7 ml 5 M NaCl  
 4,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
 0,1 ml Tween-20 10 %  
 19,9 ml DEPC-H<sub>2</sub>O  
 Lagerung bei 4°C

#### Stringenter Waschpuffer

83,3 ml 12x MES-Puffer  
 5,2 ml 5 M NaCl  
 1,0 ml Tween-20 10 %  
 910,5 ml H<sub>2</sub>O  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

#### 12x MES-Puffer

35,2 g MES-Monohydrat (freie Säure)  
 96,65 g MES-Natriumsalz  
 mit DEPC-H<sub>2</sub>O ad 500 ml  
 pH sollte bei 6,5–6,7 liegen  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

#### 2x Stain-Puffer

41,7 ml 12x MES-Puffer  
 92,5 ml 5 M NaCl  
 2,5 ml Tween-20 10 %  
 112,8 ml H<sub>2</sub>O  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

#### Nicht-stringenter Waschpuffer

300 ml 20x SSPE  
 1 ml Tween-20 10 %  
 699 ml H<sub>2</sub>O  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei Raumtemperatur

### 2.1.3.4 Färbelösungen für die Affymetrix-Analysen

<u>SA Solution</u>	<u>Antibody Solution</u>	<u>SAPE Stain Solution</u>
270 µl H <sub>2</sub> O	266,4 µl H <sub>2</sub> O	270 µl H <sub>2</sub> O
300 µl 2x Stain-Puffer	300 µl 2x Stain-Puffer	300 µl 2x Stain-Puffer
24 µl BSA (50 mg/ml)	24 µl BSA (50 mg/ml)	24 µl BSA (50 mg/ml)
6 µl Streptavidin, recombinant	6 µl Goat IgG	6 µl SAPE
	3,6 ml Biotinylated Anti-Streptavidin (Goat)	

### 2.1.3.5 Reagenzien für die Reverse Transkription und Real-Time-PCR

First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche
LightCycler® h-Housekeeping Gene Selection Set	Roche
LightCycler® h-ALAS Housekeeping Gene Set	Roche
LightCycler® Color Compensation Set	Roche

<u>Cholinkinase-Primer</u>	MWG
forward Primer (ChoK-F)	5' AGTCAATCAGCAGGAATCATCG 3'
reverse Primer (ChoK-R)	5' GCACTTTCCGAGGCTCATCA 3'

<u>MDM2-Primer</u>	TIB-Molbiol
forward Primer (mdm2_S)	5' AGTCAATCAGCAGGAATCATCG 3'
reverse Primer (mdm2_R)	5' TACACACAGAGCCAGGCTT 3'

Die Primer wurden in H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 10 µM gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

<u>Cholinkinase-Hybridisierungssonden</u>	TIB-Molbiol
Green-ChoK	5' CATGCTGTTCCAGTGCTCCCTACC-Fluorescein 3'
Red-ChoK	5' LC Red705-GACACCACAGCCACCCTTGGT-Phosphat 3'

<u>MDM2-Hybridisierungssonden</u>	TIB-Molbiol
mdm2_FL	5' TGTACAAGGTCCTTTTGATCACTCCC-Fluorescein 3'
mdm2_LC	5' LC Red640-CCTTCAAGGTGACACCTGTTCTCACTCA-Phosphat 3'

Die Hybridisierungssonden wurden in H<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 4 µM gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.1.3.6 Reagenzien für die Proteinanalytik

#### Allgemeine Reagenzien

Aprotinin	Roche
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
β-Glycerophosphat	Aldrich
Leupeptin	Sigma
Natriumfluorid	Fluka
Pefabloc SC	Roche

#### Lysepuffer Labor Local

50 mM Tris-HCl pH 7,4
0,25 % Nonidet P40
0,25 % SDS
150 mM NaCl
10 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
50 mM NaF
<i>direkt vor Verwendung frisch zugeben:</i>
10 µg/ml Aprotinin
15 mM β-Glycerophosphat
1 mM Pefabloc

#### NP40-Lysepuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,0
120 mM NaCl
0.5 % Nonidet P40
10 % Glycerin
<i>direkt vor Verwendung frisch zugeben:</i>
10 µg/ml Aprotinin
5 mM DTT
1 mM EGTA
50 µg/ml Leupeptin
2 mM Pefabloc

#### Proteinkonzentrationsbestimmung

Micro BCA Protein Assay Reagent Kit	Perbio (Pierce)
-------------------------------------	-----------------

#### SDS-Gelelektrophorese

NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
MagicMark Western Protein Standard	Invitrogen
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen
High-Range Rainbow Molecular Weight Markers	Amersham Biosciences

Western Blotting

NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	Roche
Restore Western Blot Stripping Buffer	Perbio (Pierce)

0,25 % Gelatine in NET-Puffer

150 mM NaCl  
5 mM EDTA  
50 mM Tris-HCl pH 7,5  
0,05 % Triton X-100  
0,25 % Gelatine (unter Erwärmen lösen)

Primärantikörper

β-Actin (AC-15) (Maus, monoklonal)	Abcam
MDM2 (SMP14) (Maus, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology
p53 (DO-1) (Maus, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-p53 (Ser15) Antibody (Kaninchen, polyklonal)	Cell Signaling

Sekundärantikörper

Anti-Mouse IgG-POD aus Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	
Anti-Rabbit IgG-POD aus Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	
Anti-Mouse Shp X Ms IgG-HRP (AQ328P)	Chemicon



## 2.2 Verbrauchsmaterial

### 2.2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial

#### 2.2.1.1 Reaktionsgefäße aus Kunststoff

PCR SoftStrips 0,2 ml	Biozym
Reaktionsgefäße, RNase-frei, steril, 1,6 ml	Biozym
Reaktionsgefäße, amber, 1,6 ml	Biozym
Reaktionsgefäße Safe-Lock, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf
Collection Tubes, 2,0 ml	Qiagen
BLUE MAX Polypropylene Tubes, 15 und 50 ml	BD Biosciences
BLUE MAX Polystyrene Tubes, 15 ml	BD Biosciences

#### 2.2.1.2 Verbrauchsmaterial zur Herstellung von Puffern und Lösungen

Glaswaren	Schott
Bottle Top Filter PES	Nalgene
Stericup 0,22 µM, GV Durapore Membran	Millipore

#### 2.2.1.3 Pipettenspitzen

epT.I.P.S.	Eppendorf
Aerosol-resistant Pipette Tips	Roche
SafeSeal Tips	Biozym
Pipettenspitzen, aerosolresistent	Rainin
Gel Loading Tips	Invitrogen
Combitips plus Biopur	Eppendorf

### 2.2.2 Verbrauchsmaterial für bestimmte Anwendungen

#### 2.2.2.1 Verbrauchsmaterial für die Zellkultur

Cellstar Tissue Culture Flasks, Filter Cap	Greiner Bio-one
Falcon Tissue Culture Flasks, Vented Cap	BD Biosciences
Falcon Multiwell Plates	BD Biosciences
Microplatte weiß (Lumineszenz)	Greiner Bio-one
Cryoware Cryogenic Vials	Nalgene
Erlenmeyer Flasks Polycarbonate	Corning (Costar)

Serological Pipets	BD Biosciences
Reagent Reservoir Polystyrene 50 ml	Corning (Costar)
Cell Scraper	Corning (Costar)
Falcon Polystyrene Tubes 6 ml (FACS-Röhrchen)	BD Biosciences

### 2.2.2.2 Verbrauchsmaterial für die Real-Time-PCR

LightCycler® Sample Capillaries	Roche
---------------------------------	-------

### 2.2.2.3 Verbrauchsmaterial für Affymetrix-Analysen

GeneChip® HG-U133A	Affymetrix
GeneChip® Test3	Affymetrix

### 2.2.2.4 Verbrauchsmaterial für die Proteinanalytik

#### SDS-Gelelektrophorese

NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 10 well	Invitrogen
NuPAGE 4–12 % Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 10 well	Invitrogen

#### Western Blot

Invitrolon PVDF/Filter Paper Sandwiches	Invitrogen
Hybond-ECL Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences
Sponge Pad for Blot Module	Invitrogen
Hybridization Bags	Roche

## 2.3 Geräte

### 2.3.1 Allgemeine Geräte

#### 2.3.1.1 Pipetten und Pipettierhilfen

Pipetman P (verschiedene Modelle)	Gilson
Pipet-Lite LTS-Pipette 1000 µl	Rainin
Mehrkanalpipette Research 10 µl	Eppendorf
Multipette pro	Eppendorf
Pipetboy, Pipetboy acu	Integra

#### 2.3.1.2 Sonstige Geräte

Tischzentrifuge 5415c	Eppendorf
Labofuge 400e	Heraeus
Schüttler 3017	GFL
Vortex	Heidolph
SpeedVac Concentrator	Savant
Waagen	Sartorius
Alu-Rack für PCR-Reaktionsgefäße	DE Tech
Kühlblock Labtop Coller Jr	Nalgene
Wasserbad Precitherm PFV	Boehringer Mannheim
GeneAmp PCR System 2400 und 9600	Perkin Elmer
ThermoStat plus	Eppendorf
Kühlschrank	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	GFL

### 2.3.2 Geräte für bestimmte Anwendungen

#### 2.3.2.1 Geräte für die Zellkultur

Brutschrank BBD6220	Heraeus (Kendro)
Laminar-Flow-Werkbank	BDK
N <sub>2</sub> -Tank Chronos	Messer
Hämazytometer Neubauer Bright-Line	Optik Labor
Hämazytometer Deckgläser	Superior

mechanisches Zählgerät	IVO
Mikroskop Labovert	Leitz
Plattenschüttler MS2/4 digital	IKA
Megafuge 3.0 R	Heraeus (Kendro)
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene

### 2.3.2.2 Geräte für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen

Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Quarzküvette 10 mm	Hellma
Ultra microvolume cell with black walls, 5–7 µl	Amersham Biosciences
Spectrafluor Plus	Tecan

### 2.3.2.3 Geräte für die Real-Time-PCR

LightCycler® Instrument	Roche
LightCycler® Carousel Centrifuge	Roche

### 2.3.2.4 Geräte für Affymetrix-Analysen

Heizschrank	Memmert
Rotor REAX2	Heidolph
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix
GeneChip® Scanner	Affymetrix

### 2.3.2.5 Geräte für die Proteinanalytik

XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen
XCell II Blot Module	Invitrogen
PowerEase 500 Power Supply	Invitrogen
Schweißgerät Polystar 242	Rische + Herfurth
Lumi-Imager F1	Roche

### 2.3.2.6 Geräte für die Durchflusszytometrie

FACSCalibur	BD Biosciences
FACScan	BD Biosciences

## 2.4 Software

### 2.4.1 Auswertungssoftware

- Roche-interne Anwendung RACE-A (Roche Affymetrix Chip Experiment-Analysis)
- MS Excel
- XLfit 3 (MS Excel Add-In)
- Spotfire DecisionSite
- Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

### 2.4.2 Gerätespezifische Software

#### 2.4.2.1 Software für die Durchflusszytometrie

CellQuest, CellQuest Pro

BD Biosciences

ModFit LT

BD Biosciences

#### 2.4.2.2 Software für die Real-Time-PCR

LightCycler® Software 3.5

Roche

LightCycler® Relative Quantification Software

Roche

#### 2.4.2.3 Software für Affymetrix-Analysen

Microarray Suite 5.0

Affymetrix

GeneChip® Operating Software 1.0

Affymetrix

#### 2.4.2.4 Software für spektrophotometrische Bestimmungen

XFluor 4

Tecan

## 2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.5.1 Kultur humaner Tumorzelllinien

Die Zelllinien A549, HCT-116, HT-29, MCF-7 und MDA-MB-231 wurden in RPMI1640-Medium mit Gluta-max I unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Feuchte kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage bei ca. 70–80 % Konfluenz passagiert. Hierbei wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend angewärmtes Trypsin-EDTA (Firma Invitrogen) zugegeben. Dessen Einwirken wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt, sobald ein Großteil der Zellen abgeschwommen war. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämazytometers bestimmt. Die Vitalität der Zellen wurde durch Färbung mit Trypanblau überprüft.

Zur langfristigen Lagerung von Zellaliquots wurden diese in FKS mit 7,5 % DMSO in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### 2.5.2 Kultur humaner Brustepithelzellen (HMECs)

Für die Kultur humaner Brustepithelzellen (HMECs, *human mammary epithelial cells*) wurde mit den Komponenten des MEGM-Bullet Kits supplementiertes MEBM-Medium verwendet, die Brutschrankeinstellungen entsprachen den unter 2.5.1 beschriebenen. Am Tag nach der Passage und an jedem zweiten Tag wurde, wie vom Hersteller angegeben, das Medium gewechselt. Die Zellen wurden bei 60–80 % Konfluenz subkultiviert. Zum Waschen wurde HEPES-BSS verwendet, dann wurden die Zellen durch mehrminütige Einwirkung von Trypsin-EDTA (Firma Cambrex) vom Substrat abgelöst. Zum Neutralisieren des Trypsins wurde TNS zugegeben. Die Zellzahl wurde mittels Hämazytometer bestimmt, unter Zusatz von Trypanblau zur Unterscheidung vitaler und toter Zellen. Pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche wurden 2.500 Zellen ausgesät.

Für die Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die HMECs in Wachstumsmedium mit 10 % FKS und 10 % DMSO aufgenommen.

### 2.5.3 Zytotoxizitätsbestimmungen

#### 2.5.3.1 WST-1-Test

Zur Quantifizierung des proliferationshemmenden Effekts von Zytostatika, niedermolekularen Cholinkinase- und MDM2-Inhibitoren und von verschiedenen siRNAs wurde das WST-1-Reagenz verwendet. Dieser Test beruht auf der Oxidation eines schwach roten Tetrazoliumsalzes zu einem dunkelroten Formazansalz, die durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert wird. Die Menge an gebildetem Formazan ist der Enzymaktivität und somit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur direkt proportional.

Der Test wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- gewünschte Zellzahl in 96-Well-Platten (für Zytostatika- und Inhibitortests) bzw. in 24-Well-Platten (für siRNA-Transfektionen) aussäen
- außenliegende Wells als Verdunstungsschutz mit PBS befüllen
- mehrere Wells mit reinem Medium ohne Zellen befüllen (Leerwerte)
- 24 h nach der Aussaat Substanzen zugeben bzw. Transfektion durchführen, jeweils 4–5 gleichbehandelte Wells (Replikate)
- parallel unbehandelte und vehikelbehandelte bzw. „mock-transfizierte“ (s. 2.5.7) Zellen mitführen
- Behandlungsdauer im Fall von Zytostatika und Inhibitoren 5 Tage, im Fall der siRNAs 2–3 Tage
- am Ende des Behandlungszeitraums WST-1-Reagenz zugeben: 10 % des im Well vorliegenden Volumens, z. B. 10 µl zu 100 µl pro Well einer 96-Well-Platte
- durch Hin- und Herbewegen der Platte oder auf dem Plattenschüttler mischen
- Inkubation im Brutschrank für 1–3 h
- Absorptionsmessung im Spektrophotometer Spectrafluor Plus:  
Messwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm

Vom Mittelwert der Absorption der zusammengehörigen Replikate ( $abs$ ) wird jeweils der Mittelwert der Absorption der Leerwerte ( $abs$  (blank)) abgezogen und auf diesem Weg die korrigierte Absorption  $abs_{korr}$  berechnet:

$$abs_{korr} = abs - abs(\text{blank})$$

Die residuale Proliferationsaktivität nach einer bestimmten Behandlung wird angegeben, indem der Quotient aus der korrigierten Absorption der behandelten Wells und der der Kontrollwells gebildet wird:

$$\% \text{ Proliferationsaktivität} = \frac{abs_{korr}(\text{behandelt})}{abs_{korr}(\text{Kontrolle})} * 100\%$$

Für die Zytostatika und die Inhibitoren wurden zudem Inhibitionskurven erstellt und mittels XLfit 3 die IC50- und IC80-Werte berechnet, also diejenigen Konzentrationen, bei denen das Wachstum relativ zur Kontrolle um 50 bzw. 80 % gehemmt war.

Die prozentuale Inhibition wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{1 - abs_{korr}(\text{behandelt})}{abs_{korr}(\text{Kontrolle})} * 100\%$$

Das in XLfit 3 zugrunde gelegte Modell ist das einer sigmoidalen einseitigen Dosis-Antwort-Kurve, beruhend auf der Gleichung

$$y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

x = Substanzkonzentration, y = % Inhibition, A = minimaler y-Wert, B = maximaler y-Wert, C = IC50, D = Steigungsfaktor

Für jede Tumorzelllinie wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert der IC50- bzw. IC80-Werte aus mindestens drei Analysen berechnet.

### 2.5.3.2 CellTiter-Glo-Test

Als Alternative zum WST-1-Test kann dieser lumineszenzbasierte Viabilitätstest verwendet werden. Es ließ sich feststellen, dass er im Allgemeinen deutlichere Reduktionen der Messwerte behandelter Proben relativ zur Kontrolle als der WST-1-Test liefert, was häufig besser mit der lichtmikroskopisch zu beobachtenden Verringerung der Zellzahl und apoptotischen Veränderungen der Zellen korreliert. Deshalb wurde gegen Ende der Doktorarbeit dieser Test verwendet, um die proliferationshemmende Wirkung von siRNAs zu bestimmen.

Der CellTiter-Glo-Test erfasst nach Lyse der Zellen freigesetztes intrazelluläres ATP als Maß für die metabolische Aktivität und Viabilität. Die Lumineszenzreaktion beruht auf der Umsetzung von Luciferin in Oxyluciferin, die durch eine thermostabile Luciferase katalysiert wird und  $Mg^{2+}$ -Ionen und ATP erfordert. Die messbare Menge an ATP korreliert sehr gut mit der Zellzahl.

Protokoll:

- Aussaat, Kontrollen und Leerwerte wie beim WST-1-Test (2.5.3.1)
- Verwendung opakwandiger Zellkulturplatten, um Streuung der emittierten Lumineszenz in Nachbarkells zu verhindern
- CellTiter-Glo-Reagenz nach Herstellerangaben rekonstituieren
- am Ende des Behandlungszeitraums die Zellkulturplatten 30 min auf Raumtemperatur äquilibrieren
- CellTiter-Glo-Reagenz zugeben: 25 % des im Well vorliegenden Volumens, z. B. 150  $\mu$ l zu 600  $\mu$ l Medium pro Well einer 24-Well-Platte
- 2 min auf dem Plattenschüttler mischen
- 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Lumineszenz am Spektrophotometer Spectrafluor Plus aufnehmen
- Einstellungen: maximum dynamic range, Gain 150
- Berechnung der residualen Proliferationsaktivität wie beim WST-1-Test

### 2.5.4 Behandlung mit Zytostatika und niedermolekularen targetspezifischen Inhibitoren

Für die Behandlung der verschiedenen Tumorzellen mit Zytostatika oder niedermolekularen Cholinase- bzw. MDM2-Inhibitoren wurden die Zellen mit der in Tab. 2-1 angegebenen Zelldichte ausgesät. Am nächsten Tag wurde eine Vorverdünnung der jeweiligen Substanz zugegeben. Diese Vorverdünnungen in Wachstumsmedium wurden aus einer Stammlösung geeigneter Konzentration hergestellt, wobei bei den Substanzen mit hydrophoben Eigenschaften, die in DMSO- oder DMF-Stammlösungen vorlagen, darauf geachtet wurde, dass bei der Verdünnung in wässrigem Medium keine Präzipitate entstanden (langsames



Zupipettieren unter Rühren). Bei der Behandlung mit MDM2-Inhibitoren wurden die Zellen in Wachstumsmedium mit normaler Serumkonzentration (10 %) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und der Inhibitor bzw. die Kontrollsubstanz in Medium mit 2,5 % Serum zugegeben.

<b>A549</b>	2,67x 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 24 h-Zytostatikabehandlung 8x 10 <sup>3</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 72 h-Zytostatikabehandlung
<b>HCT-116</b>	5,2x 10 <sup>3</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 48 h-Behandlung mit MDM2-Inhibitoren
<b>HT-29</b>	1,9x 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 24 h-Zytostatikabehandlung 9,3x 10 <sup>3</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 72 h-Zytostatikabehandlung in der Arbeitsgruppe Lacal durchgeführter Versuchsansatz: 2.67x 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 30 h-Behandlung mit Cholinkinaseinhibitor
<b>MCF-7</b>	2,67x 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 24 h-Zytostatikabehandlung 8x 10 <sup>3</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 72 h-Zytostatikabehandlung 2x 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 48 h-Behandlung mit MDM2-Inhibitoren
<b>MDA-MB-231</b>	2,67x 10 <sup>4</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 24 h-Behandlung mit Zytostatika und Cholinkinaseinhibitor 8x 10 <sup>3</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 72 h- Behandlung mit Zytostatika und Cholinkinaseinhibitor
<b>NCI/ADR-RES</b>	7,8x 10 <sup>3</sup> Zellen/cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche für 48 h-Behandlung mit MDM2-Inhibitoren

Tab. 2-1: Zellzahlen der Tumorzelllinien bei der Aussaat für die Behandlung mit Zytostatika und niedermolekularen Inhibitoren.

Im Fall der HMECs wurde ein abgewandeltes Protokoll für die Zytostatikabehandlungen verwendet, da diese Zellen nur dann optimal wachsen, wenn sie mit einer definierten, sehr geringen Zelldichte ausgesät werden und das Medium regelmäßig gewechselt wird:

#### 24 h-Zytostatikabehandlung von HMECs

2,5x 10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Mediumwechsel am Tag nach der Aussaat und dann an jedem zweiten Tag, Volumen des Mediums in Abhängigkeit von der Zelldichte gemäß Standardprotokoll (s. 2.5.2); Zytostatikazugabe 6 Tage nach der Aussaat, Ernte am darauf folgenden Tag.

#### 72 h-Zytostatikabehandlung von HMECs

2,5x 10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Mediumwechsel am Tag nach der Aussaat, Zytostatikazugabe 3 Tage nach der Aussaat unter Mediumwechsel, nach weiteren 2 Tagen Zugabe von frischem zytostatikahaltigen Medium, Ernte am darauf folgenden Tag; Volumen des Mediums in Abhängigkeit von der Zelldichte gemäß Standardprotokoll (s. 2.5.2).

### 2.5.5 Zellzyklusanalyse

Zur Untersuchung der Zellzyklusverteilung von behandelten und unbehandelten Zellen wurden durchflusszytometrische Messungen nach DNA-Färbung mittels Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Der verwendete

Färbepuffer ermöglicht das Eindringen von PI in die Zelle, wo dieses in stöchiometrischem Verhältnis an doppelsträngige DNA bindet. Aus der Fluoreszenzintensität einer Zelle kann man deshalb darauf schließen, ob sie einen einfachen (2 N, entsprechend G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase), doppelten (4 N, entsprechend G<sub>2</sub>/M-Phase) oder dazwischen liegenden (S-Phase) Chromosomensatz enthält. Zelltrümmer mit einem DNA-Gehalt < 2 N werden in der Sub-G<sub>1</sub>-Population (Debris) erfasst.

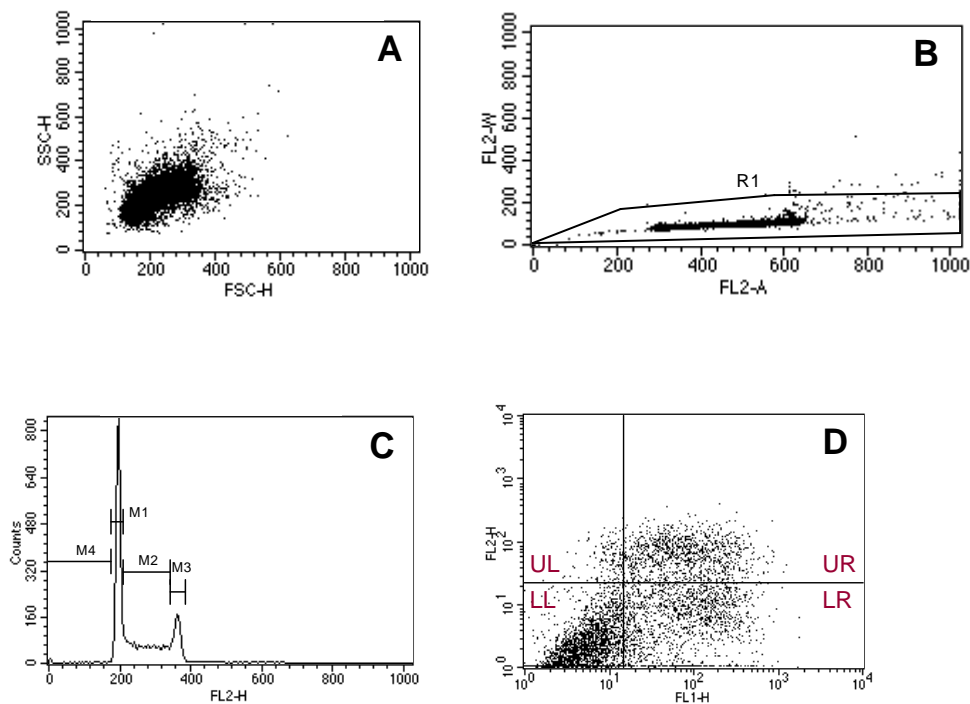
Nach der gewünschten Behandlungs- bzw. Transfektionsdauer wurden die Zellen geerntet und nach unten stehenden Protokollen gefärbt und analysiert.

#### Protokoll für die Zellfärbung mittels PI

- Überstand von den Zellen abnehmen und in FACS-Röhrchen überführen
- Zellen mit PBS (bzw. im Fall von HMECs mit HEPES-BSS) waschen, dieses in dasselbe FACS-Röhrchen transferieren
- Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA und mehrminütige Inkubation ablösen, gut resuspendieren und ebenfalls in dasselbe FACS-Röhrchen überführen
- zentrifugieren (5 min/1.000 rpm), Überstand möglichst vollständig absaugen
- Zellpellet aus ca.  $5 \times 10^5$  Zellen in 10 µl RNase A-Lösung resuspendieren und 0,5 ml PI-Färbepuffer zugeben. Für andere Zellzahlen die Volumina entsprechend umrechnen.
- 30 min auf Eis oder bei 4°C färben lassen

#### Protokoll für die Analyse am Durchflusszytometer FACSCalibur oder FACScan mit Hilfe der Gerätesoftware CellQuest Pro bzw. CellQuest

- Messung in Fluoreszenzkanal 2 (FL2)
- Aufnahme von Dot Plots zur Überprüfung der Homogenität der Zellpopulation:  
x-Achse: FSC (forward scatter), y-Achse: SSC (sideward scatter)  
Beispiel siehe Abb. 2-1A
- Aufnahme von Dot Plots zur Dublettendiskrimination:  
x-Achse: FL2-A (Fläche FL2-Peak), y-Achse: FL2-W (Breite FL2-Peak)  
Beispiel siehe Abb. 2-1B
- Aufnahme von Histogrammen zur Analyse der Zellzyklusverteilung:  
x-Achse: FL2-H (Höhe FL2-Peak), y-Achse: Counts (Zahl der Ereignisse)  
Beispiel siehe Abb. 2-1C
- Es wurden stets 20.000 Ereignisse aufgezeichnet.
- Die resultierenden DNA-Histogramme wurden mit Hilfe der Software ModFit LT analysiert. Diese führt ein Fitting durch, um den prozentualen Anteil der sich überlagernden Zellzyklusphasen zu ermitteln.



**Abb. 2-1: Beispieldiagramme aus der durchflusszytometrischen Analytik.**

**A:** Dot Plot zur Überprüfung der Homogenität der Zellpopulation.

**B:** Dot Plot zur Dublettendiskrimination: Nur die eingezeichnete Region (R1) wird für die Analyse berücksichtigt. Die am rechten Rand oberhalb der Region auflaufenden Signale stammen von Zellklumpen und werden ausgeschlossen.

**C:** DNA-Histogramm zur Analyse der Zellzyklusverteilung. Die Zuordnung der eingezeichneten Regionen zu den Zellzyklusphasen ist wie folgt: M1 = G0/G1-Phase, M2 = S-Phase, M3 = G2/M-Phase, M4 = Debris.

**D:** Dot Plot für den Apoptosetest. Bedeutung der Quadranten: LL (*lower left*) = vitale Zellen, UL (*upper left*) = nekrotische Zellen, UR (*upper right*) = nekrotische oder spät-apoptotische Zellen, LR (*lower right*) = apoptotische Zellen.

## 2.5.6 Apoptosetest

Der Anteil apoptotischer Zellen nach siRNA-Transfektion oder Kontrollbehandlung wurde mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Staining Kits ermittelt.

Annexin V bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phosphatidylserin, welches während früherer Stadien der Apoptose von der Innen- an die Außenseite der Plasmamembran transloziert. Aufgrund der Konjugation mit Fluorescein (FLUOS) kann gebundenes Annexin V durchflusszytometrisch erfasst werden. Da nekrotische Zellen aufgrund des Verlusts ihrer Membranintegrität ebenfalls Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche tragen, muss mit Propidiumiodid gefärbt werden, welches unter den angewandten Bedingungen nur in nekrotische Zellen eindringt und in die DNA interkaliert. Durch Einteilung des aufgenommenen Dot Plots in Quadranten können vitale, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden werden.

Die Färbung und Analyse am Durchflusszytometer wurde nach unten stehenden Vorgaben durchgeführt:

### Protokoll für die Zellfärbung mittels Annexin-V-FLUOS und PI

- Überstand von den Zellen abnehmen und in FACS-Röhrchen überführen

- Zellen mit PBS (bzw. im Fall von HMECs mit HEPES-BSS) waschen, dieses in dasselbe FACS-Röhrchen transferieren
- Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA und mehrminütige Inkubation ablösen, gut resuspendieren und ebenfalls in dasselbe FACS-Röhrchen überführen
- zentrifugieren (5 min/1.000 rpm), Überstand möglichst vollständig absaugen
- für  $5 \times 10^5$  Zellen 100  $\mu$ l Wachstumsmedium mit 2 mM  $\text{CaCl}_2$  zugeben (bei abweichender Zellzahl Volumen entsprechend anpassen) und vorsichtig resuspendieren
- 2  $\mu$ l des Annexin-V-FLUOS labeling reagent zugeben, mischen
- 2  $\mu$ l der Propidium iodide solution zugeben, mischen
- 10-20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- für die Geräteeinstellung sind darüber hinaus notwendig:
  - unbehandelte, ungefärbte Zellen (kein Annexin-V-FLUOS, kein PI)
  - apoptotische/nekrotische, Annexin-V-FLUOS-gefärbte Zellen (kein PI zugeben)
  - apoptotische/nekrotische, PI-gefärbte Zellen (kein Annexin-V-FLUOS zugeben)
  - apoptotische/nekrotische, doppelt gefärbte Zellen (PI und Annexin-V-FLUOS zugeben)

#### Protokoll für die Analyse am Durchflusszytometer FACSCalibur mit Hilfe der Gerätesoftware CellQuest Pro

- Messung in Fluoreszenzkanal 1 (FL1) und 2 (FL2)
- FL1 erfasst Fluorescein, FL2 erfasst PI; jedoch überlappen die beiden Emissionsspektren, weshalb elektronisch kompensiert werden muss
- Aufnahme von Dot Plots zur Überprüfung der Homogenität der Zellpopulation:
  - x-Achse: FSC (forward scatter), y-Achse: SSC (sideward scatter)
- Aufnahme von Dot Plots zur Unterscheidung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen:
  - x-Achse: FL1-H (Höhe FL1-Peak), y-Achse: FL2-H (Höhe FL2-Peak)
  - Beispiel siehe Abb. 2-1D
- Die unbehandelten, ungefärbten Zellen dienen zur Ermittlung der Autofluoreszenz. Die Geräteparameter werden so eingestellt, dass ihre Signale im linken unteren Quadranten (LL) zu liegen kommen.
- Als Positivkontrolle für die Einstellung der Kompensation wurden mit Eg5-siRNA transfizierte Proben verwendet. Diese enthalten nach 48 und 72 h schon zahlreiche Zellen in frühen und späten Stadien der Apoptose und Zelltrümmer, die durch PI erfasst werden. Mit Hilfe der einfach und doppelt gefärbten Positivkontrollen werden die Geräteparameter so eingestellt, dass die Populationen in den gewünschten Quadranten zu liegen kommen.
- Die Daten wurden über die von der Software CellQuest Pro ausgegebenen Quadrantenstatistik quantitativ ausgewertet.

## 2.5.7 siRNA-Transfektion

Die Transfektion mit siRNAs wurde für jede verwendete Zelllinie hinsichtlich der Parameter Zelldichte, Art und Menge des Transfektionsagens und Arbeiten im serumfreien oder serumhaltigen Milieu optimiert. Zudem wurde die Konzentration der verwendeten siRNAs auf die niedrigstmögliche noch optimal wirksame Konzentration herabtitriert.

In aller Regel wurden die Transfektionen in 24-Well- oder 6-Well-Platten durchgeführt.

Für die verschiedenen Transfektionsagenzien und Zelllinien ergaben sich die folgenden optimierten Transfektionsprotokolle:

### 2.5.7.1 Transfektion mit Lipofectamine 2000

#### Aussaat

- HT-29-Zellen: Aussaat von  $2 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium (24-Well-Maßstab) bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen in 2,4 ml Medium (6-Well-Maßstab) am Vorabend der Transfektion
- MCF-7-Zellen: Aussaat von  $4 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium (24-Well-Maßstab) bzw.  $1,9 \times 10^5$  Zellen in 2,4 ml Medium (6-Well-Maßstab) am Vorabend der Transfektion
- NCI/ADR-res-Zellen: Aussaat von  $2 \times 10^4$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium (24-Well-Maßstab) bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen in 2,4 ml Medium (6-Well-Maßstab) am Vorabend der Transfektion

#### Transfektion

- pro Well: 1  $\mu$ l Lipofectamine 2000 und 49  $\mu$ l Opti-MEM (24-Well-Maßstab) bzw. 4,8  $\mu$ l Lipofectamine 2000 und 235,2  $\mu$ l Opti-MEM (6-Well-Maßstab) vorsichtig durch Pipettieren mischen, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro Well: optimiertes Volumen siRNA (s.u.) mit Opti-MEM auf 50  $\mu$ l (24-Well-Maßstab) bzw. 240  $\mu$ l (6-Well-Maßstab) ergänzen, vorsichtig durch Pipettieren mischen
- als Ausgangspunkt wurde jeweils eine siRNA-Konzentration von 33 nM verwendet, entsprechend einem Volumen von 1  $\mu$ l der 20  $\mu$ M-Stammlösung für den 24-Well-Maßstab bzw. 4,8  $\mu$ l für den 6-Well-Maßstab
- Lipofectamine 2000-Vormischung zur siRNA-Verdünnung hinzugeben, vorsichtig durch Pipettieren mischen, 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- je 100 bzw. 480  $\mu$ l der siRNA-Lipid-Komplexe tropfenweise zu den im Wachstumsmedium befindlichen Zellen hinzupipettieren, durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platten untermischen
- für die „Mock“-Kontrolle 50 bzw. 240  $\mu$ l Opti-MEM mit dem gleichen Volumen Lipofectamine 2000-Vormischung kombinieren, nach 20 min Inkubation zu den Zellen geben
- für die unbehandelte Kontrolle 100 bzw. 480  $\mu$ l Opti-MEM zu den Zellen geben

- die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen überprüfen und nach der gewünschten Inkubationszeit für sekundäre Tests ernten

#### Für das Lipofectamine 2000-Protokoll optimierte siRNA-Konzentrationen

- Cholinkinase-siRNAs:  
C1, C2 und C3 – jeweils 10 nM
- MDM2-siRNAs:  
M1, M3, M7 – jeweils 33 nM (nicht optimiert, da siRNAs nicht funktionell)  
M2 – 33 nM  
M5, M6, M8, M9 und M10 – jeweils 5 nM
- Kontroll-siRNAs:  
Eg5-siRNA – 33 nM  
Luciferase-siRNA, Non-silencing control-siRNA – Konzentration wurde in Anlehnung an die optimierte Konzentration der targetspezifischen siRNAs gewählt, d. h. 10 nM für die Cholinkinase-Experimente, 5 nM für die MDM2-Experimente

### **2.5.7.2 Transfektion mit Oligofectamine**

#### Aussaat

- MDA-MB-231-Zellen: Aussaat von  $1 \times 10^4$  Zellen in 535  $\mu$ l Medium (24-Well-Maßstab) bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen in 2,6 ml Medium (6-Well-Maßstab) am Vorabend der Transfektion
- HCT-116-Zellen: Aussaat von  $1 \times 10^4$  Zellen in 535  $\mu$ l Medium (24-Well-Maßstab) bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen in 2,6 ml Medium (6-Well-Maßstab) am Vorabend der Transfektion

#### Transfektion

- pro Well: 1  $\mu$ l Oligofectamine und 14  $\mu$ l Opti-MEM (24-Well-Maßstab) bzw. 4,8  $\mu$ l Oligofectamine und 67,2  $\mu$ l Opti-MEM (6-Well-Maßstab) vorsichtig durch Pipettieren mischen, 7–10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- pro Well: optimiertes Volumen siRNA (s.u.) mit Opti-MEM auf 50  $\mu$ l (24-Well-Maßstab) bzw. 240  $\mu$ l (6-Well-Maßstab) ergänzen, vorsichtig durch Pipettieren mischen
- als Ausgangspunkt wurde jeweils eine siRNA-Konzentration von 100 nM verwendet, entsprechend einem Volumen von 3  $\mu$ l der 20  $\mu$ M-Stammlösung für den 24-Well-Maßstab bzw. 14,4  $\mu$ l für den 6-Well-Maßstab
- Oligofectamine-Vormischung zur siRNA-Verdünnung hinzugeben, vorsichtig durch Pipettieren mischen, 20–25 min bei Raumtemperatur inkubieren
- je 65 bzw. 312  $\mu$ l der siRNA-Lipid-Komplexe tropfenweise zu den in Wachstumsmedium befindlichen Zellen hinzupipettieren, durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen der Platten untermischen

- für die „Mock“-Kontrolle 15 bzw. 72 µl Opti-MEM mit 50 bzw. 240 µl Oligofectamine-Vormischung kombinieren, nach 20 min Inkubation zu den Zellen geben
- für die unbehandelte Kontrolle 65 bzw. 312 µl Opti-MEM zu den Zellen geben
- die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen überprüfen und nach der gewünschten Inkubationszeit für sekundäre Tests ernten

#### Für das Oligofectamine-Protokoll optimierte siRNA-Konzentrationen

- Cholinkinase-siRNAs:  
C1, C2 und C3 – jeweils 100 nM
- MDM2-siRNAs:  
M1, M3, M7 – jeweils 100 nM (nicht optimiert, da siRNAs nicht funktionell)  
M2, M5, M6, M8, M9 und M10 – jeweils 10 nM
- Kontroll-siRNAs:  
Eg5-siRNA – 100 nM  
Luciferase-siRNA, Non-silencing control-siRNA – Konzentration wurde in Anlehnung an die optimierte Konzentration der targetspezifischen siRNAs gewählt, d. h. 100 nM für die Cholinkinase-Experimente, 10 nM für die MDM2-Experimente

*Anm. 1.:* Einige der im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden vor der Optimierung der siRNA-Konzentrationen durchgeführt, sodass hier sämtliche siRNAs noch mit 33 bzw. 100 nM eingesetzt wurden. Dies ist in den jeweiligen Bildbeschriftungen angegeben.

*Anm. 2:* Bei der Optimierung der siRNA-Konzentration war zunächst unklar, ob ein bestimmtes Verhältnis von siRNA-Molekülen zum Volumen an Transfektionsagens beibehalten werden muss, um ideale Transfektionsbedingungen zu gewährleisten. Deshalb wurde bei Verwendung geringerer siRNA-Konzentrationen als der Startkonzentration von 33 bzw. 100 nM die siRNA-Molarität mit der Negativkontroll-siRNA gegen Luciferase aufgefüllt (d. h. beispielsweise wurden bei Oligofectamine-Transfektion mit 10 nM targetspezifischer siRNA noch 90 nM Luciferase-siRNA zugegeben). Ein Vergleich der „Knock-down“-Effizienz auf mRNA-Ebene bewies aber, dass kein Unterschied zwischen Proben bestand, bei denen zusätzlich zur targetspezifischen siRNA Luciferase-siRNA eingesetzt worden war, und solchen, die nur mit einem reduzierten Volumen an targetspezifischer siRNA transfiziert worden waren. Deshalb wurde bei den nachfolgenden Versuchen auf die Ergänzung der siRNA-Konzentration mittels Luciferase-siRNA verzichtet.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 RNA-Arbeiten allgemein

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurden folgende Maßnahmen ergriffen:

- Verwendung eines für RNA reservierten Pipettensatzes, mit dem keine RNase pipettiert wurde
- Verwendung gestopfter, aerosolresistenter Pipettenspitzen
- Glaswaren und Metallobjekte wurden bei 180°C gebacken.
- Reaktionsgefäße aus Kunststoff wurden aus der Originalverpackung direkt in gebackene Bechergläser abgefüllt.
- Die Arbeitsfläche wurde mit RNase Zap vorbehandelt.
- Während der RNA-Arbeiten wurden stets Handschuhe getragen, diese wurden häufig gewechselt.

### 2.6.2 RNA-Isolierung

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden die Zellen ohne vorheriges Abtrypsinieren direkt in der Zellkulturflasche bzw. -platte lysiert. Hierbei wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und dann 2-Mercaptoethanol-haltiger RLT-Puffer zugegeben. Zur Homogenisierung der Lysate wurden QIAshredder verwendet. Nachfolgend wurde die Gesamt-RNA mittels des RNeasy Mini Kits gemäß Herstellerangaben isoliert.

Sofern die Probe für eine RT-PCR-Analyse bestimmt war, wurde sie nach Vorschrift im Kitprotokoll einem DNase-Verdau unter Verwendung des RNase-free DNase Sets unterzogen.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration im Eluat bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot in geeignetem Verhältnis mit Wasser verdünnt und am Photometer vermessen. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die RNA-Ausgangskonzentration  $c$  nach folgender Formel errechnet:

$$c = OD_{260} * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} * f$$

mit  $OD_{260}$ : Absorption bei 260 nm,  $f$  = Verdünnungsfaktor

Zudem wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm bestimmt, um Aufschluss über das Ausmaß der Proteinverunreinigung zu erhalten. Idealerweise liegt der Wert  $OD_{260}/OD_{280}$  bei 2,0. Werte oberhalb von 1,7 sind akzeptabel und wurden in aller Regel erreicht.

Im Anschluss wurde die RNA bei -80°C gelagert.



## 2.6.3 Probenaufarbeitung für die Hybridisierung auf Affymetrix GeneChip® Arrays

### 2.6.3.1 cDNA-Synthese und -Aufreinigung

10 µg Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des Microarray cDNA Synthesis Kits nach Herstellerangaben in doppelsträngige cDNA übersetzt. Für die Erststrangsynthese dient hierbei ein Oligo(dT)-Primer, der ein T7-Promotorelement enthält, welches für die später folgende In-vitro-Transkription mittels T7-RNA-Polymerase genutzt werden kann.

Direkt anschließend wurde die cDNA unter Verwendung des Microarray Target Purification Kits gemäß Herstellervorschrift gereinigt und dann bei -20°C gelagert.

### 2.6.3.2 In-vitro-Transkription der cDNA in biotinmarkierte cRNA und cRNA-Aufreinigung

Die cDNA wurde mit dem Microarray RNA Target Synthesis Kit (T7) gemäß den Angaben im Kitprotokoll in markierte Antisense-cRNA umgesetzt. Hierbei wurde neben normalen unmarkierten Ribonukleotiden biotinyliertes UTP (Biotin-16-UTP) verwendet, das für die spätere Detektionsreaktion auf dem Affymetrix-Chip vonnöten ist.

Im Reaktionsmix waren die NTPs in folgenden Konzentrationen enthalten:

ATP, CTP, GTP: jeweils 5 mM

UTP: 3,75 mM

Biotin-16-UTP: 1,25 mM

Unmittelbar im Anschluss an die In-vitro-Transkription (IVT) wurde die cRNA-Aufreinigung durchgeführt, wobei folgendes modifiziertes Protokoll des RNeasy Mini Kits zum Einsatz kam:

- zu den 20 µl aus der IVT-Reaktion 80 µl RNase-freies Wasser zugeben
- 350 µl 2-Mercaptoethanol-haltigen RLT-Puffer zugeben, mischen, kurz zentrifugieren
- 250 µl abs. Ethanol zugeben und durch Pipettieren mischen
- Probe auf ein RNeasy Mini-Säulchen aufgeben  
zentrifugieren: 15 sec/10.000 rpm (8.000 g)
- Zentrifugat erneut auf dasselbe Säulchen aufgeben, zentrifugieren  
Zentrifugat und Sammelröhrchen verwerfen, neues Sammelröhrchen aufstecken
- mit dem RPE-Puffer-Waschschritt gemäß Kitprotokoll fortfahren

Die cRNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt wie unter 2.6.2 beschrieben.

Anschließend wurde die cRNA bei -80°C gelagert oder unmittelbar in die Fragmentierungsreaktion eingesetzt.

### 2.6.3.3 cRNA-Fragmentierung

Vor der Hybridisierung auf Affymetrix-Chips müssen die cRNA-Stränge in Fragmente von ca. 35–200 Basenpaaren Länge zerlegt werden, um optimal an die Oligonukleotidsonden auf der Chipoberfläche binden zu können.

Protokoll:

- Reaktionsmischung:
  - 20 µg biotinylierte cRNA in einem Volumen von max. 32 µl
  - 8 µl 5x Fragmentierungspuffer
  - DEPC-H<sub>2</sub>O ad 40 µl
- Inkubation: 35 min/95°C
- bei -80°C lagern oder unmittelbar Hybridisierungsmix herstellen

### 2.6.4 Hybridisierung auf Affymetrix GeneChip® Arrays

Der Mix für die Hybridisierung auf den Affymetrix GeneChip® Expressionsarray muss eine geeignete Salzkonzentration und den passenden pH-Wert besitzen, um eine optimale Bindung der cRNA-Fragmente an die Oligonukleotid-Sonden zu gewährleisten.

Zudem müssen Kontrolloligonukleotide und Reagenzien für die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen enthalten sein. Dies sind im Einzelnen:

- *Kontroll-Oligonukleotid B2 (biotinyliert)*: Das Oligonukleotid bindet an Kontrollsequenzen auf dem Chip und erzeugt dadurch Randbegrenzungen, ein schachbrettartiges Muster in den Ecken und ein Kreuz in der Mitte des Chips. Diese Strukturen dienen der Positionierung des Lasers und werden als Fixpunkte für ein Gitter verwendet, das die Zuordnung der Bildpunkte zu den Probe Sets (s. 2.6.4) ermöglicht.
- *Kontroll-cRNAs (biotinyliert)*: Die Hybridisierungskontrollen sind von den Genen BioB, BioC und BioD aus dem Biotin-Syntheseweg in E. Coli und Cre aus dem Rekombinase-Gen des Bakteriophagen P1 abgeleitet. Man verwendet eine 100fach konzentrierte Kontrolllösung mit gestaffelten Konzentrationen, bezeichnet als „100x staggered“. Diese Kontrollen dienen der Abschätzung der absoluten Expressionshöhe von RNA-Transkripten, da sie in definierter Molarität im Hybridisierungsmix enthalten sind.
- Heringsperma-DNA und acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA) dienen der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf dem Chip.

Der Reaktionsmix für die Hybridisierung auf Affymetrix GeneChip® Arrays wurde im Wesentlichen gemäß den Angaben von Affymetrix hergestellt.

Die Komponenten des Hybridisierungsmix und ihre Volumina sind im Folgenden angegeben:

- 30 µl fragmentierte cRNA (entspricht 15 µg)
- 3 µl Kontroll-Oligonukleotid B2
- 3 µl 100x staggered Kontroll-cRNAs
- 3 µl Herring Sperm DNA (10 mg/ml)
- 3 µl BSA (50 mg/ml)
- 150 µl 2x MES-Puffer
- 108 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Um vorab sicherzustellen, dass die RNA-Qualität ausreichend für eine aussagekräftige Messung ist, können die Proben zunächst auf den Test3-Chip hybridisiert werden, welcher vor allem Auskunft über die sogenannte 3'/5'-Ratio (s. 2.7.3) gibt.

Die eigentliche Datenerhebung wurde dann mittels Affymetrix HG-U133A-Arrays durchgeführt.

Die Prähybridisierung der Chips und die Probenhybridisierung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Auf den HG-U133A-Chip wurden 200 µl Hybridisierungsmix aufgegeben, entsprechend 10 µg fragmentierter cRNA. Nach 16 h Inkubation bei 45°C wurden die Chips mit nicht-stringentem Waschpuffer befüllt und entweder direkt an der Fluidics-Station gewaschen und gefärbt oder vorher noch einige Stunden im Kühlschrank gelagert.

### 2.6.5 Waschen und Färben der GeneChip® Arrays

Das Waschen und Färben der Chips an der GeneChip® Fluidics Station 450 wurde gemäß Affymetrix-Protokollen durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Färbelösungen (SA Solution, Antibody Solution und SAPE Stain Solution für HG-U133A- bzw. nur SAPE Stain Solution für Test3-Chips) ist unter 2.1.3.4 angegeben.

Die an der Fluidics-Station ablaufenden Softwareprotokolle waren EukGE-ws2-v4 für HG-U133A- und Micro-first-1v1 für Test3-Chips.

### 2.6.6 Signaldetektion

Die mit dem Fluoreszenzfarbstoffkonjugat Streptavidin-R-Phycoerythrin (SAPE) angefärbten Chips wurden am GeneChip® Scanner vermessen. Dies erzeugt eine Bilddatei (.dat), die innerhalb der Affymetrix-Software in ein Datenformat (.chp) prozessiert wird. Die .chp-Dateien dienen als Grundlage für die weitere Analyse durch die Roche-interne Software RACE-A (s. 2.7.4).

## 2.6.7 Reverse Transkription und Real-Time-PCR

Für die relative Quantifizierung der Ziel-mRNAs wurde eine *Two-Step-RT-PCR*, also eine zweistufige Reaktion aus Reverser Transkription und anschließender Real-Time-PCR, durchgeführt.

### 2.6.7.1 Reverse Transkription

Der First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) oder der Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit dienen zur reversen Transkription von Gesamt-RNA, die während der Aufreinigung einem DNase-Verdau unterzogen worden war, in einzelsträngige cDNA; hierbei wurden die Herstellerangaben befolgt. Die entstandene cDNA wurde entweder direkt in die Real-Time-PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

### 2.6.7.2 Real-Time-PCR am LightCycler® Instrument

Am LightCycler® Gerät kann die Zunahme des PCR-Produkts „online“, d. h. während des Fortschreitens der Amplifikation, mitverfolgt werden. Dies ermöglicht eine sehr präzise Quantifizierung der Ausgangsmenge an cDNA.

Zur Bestimmung der Transkriptspiegel von Cholinkinase und MDM2 wurde das PCR-Produkt durch sequenzspezifische Hybridisierungssonden detektiert. Diese sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein bzw. LC Red 640 oder 705 markiert und ihre Sequenzen sind so gewählt, dass die Farbstoffmoleküle bei der Anlagerung an den DNA-Einzelstrang in räumliche Nähe geraten. Fluorescein wird durch die Lichtquelle des LightCycler® Instruments zur Aussendung grünen Fluoreszenzlichts angeregt, welches das benachbarte LC Red-Molekül im Rahmen des sog. FRET-Prozesses (*fluorescence resonance energy transfer*) zur Emission roten Fluoreszenzlichts anregt. Dieses wird durch die Optik des LightCycler® Instruments erfasst. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt jeweils am Ende des *Annealing*-Schritts, wenn Primer und Hybridisierungssonden an die DNA gebunden haben. Seine Intensität ist proportional zur vorhandenen Menge an PCR-Produkt.

Für die Reaktion wurde der LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit unter den folgenden Amplifikationsbedingungen verwendet:

- 10 min Präinkubation bei 95°C
- 40 PCR-Zyklen aus 10 sec bei 95°C, 10 sec bei 58°C, 5 sec bei 72°C  
Aufheiz- bzw. Abkühlrate jeweils 20°C /sec
- Detektion des Fluoreszenzsignals im Kanal F2 (LC Red 640) bzw. F3 (LC Red 705) am Ende jedes 58°C -Inkubationsschritts
- Abkühlung auf 40°C

Die Menge an Cholinkinase- bzw. MDM2-mRNA wurde jeweils in Relation zu einem sog. *Housekeeping*-Gen, dessen Transkriptspiegel in der Zelle im Allgemeinen nicht variiert, bestimmt. Es wurde ein in verhältnismäßig niedriger Kopienzahl exprimiertes Housekeeping-Gen ausgewählt, da auch Cholinkinase und

MDM2 geringe Expressionslevel aufweisen und die Quantifizierung präziser durchgeführt werden kann, wenn Ziel- und Referenz-mRNA in etwa gleicher Ausgangsmenge vorliegen. Für dessen Selektion wurde das LightCycler<sup>®</sup> h-Housekeeping Gene Selection Set verwendet, das Primer und Hybridisierungssonden für fünf mögliche Kandidaten enthält. Das Housekeeping-Gen  $\delta$ -Aminolävulinatsynthase (ALAS) erwies sich als geeignet und wurde in den nachfolgenden Experimenten mit Hilfe des LightCycler<sup>®</sup> h-ALAS House-keeping Gene Sets detektiert.

Bei der RT-PCR zur Bestimmung von Cholinkinase- und ALAS-cDNA-Menge wurde ein sog. Zweifarben-Protokoll durchgeführt, bei dem Ziel- und Referenz-cDNA in derselben Glaskapillare amplifiziert wurden. Die Unterscheidung der Fluoreszenzsignale war dadurch möglich, dass die Hybridisierungssonden für Cholinkinase mit LC Red 705 markiert waren, welches Licht von 705 nm Wellenlänge aussendet, die Hybridisierungssonden für ALAS jedoch mit LC Red 640 (Emission bei 640 nm). Diese werden von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen im LightCycler<sup>®</sup> Instrument detektiert. Um den sog. *Cross talk*, also die Überlappung der Fluoreszenzspektren der beiden Farbstoffe, auszugleichen, wurde eine Kompensationsdatei verwendet, die mit Hilfe des LightCycler<sup>®</sup> Color Compensation Sets generiert worden war. Der Vorteil dieses Zweifarben-Protokolls liegt in der Minimierung des Einflusses von Pipettierfehlern. Außerdem lässt sich so Enzym einsparen und es können mehr Proben pro PCR-Lauf analysiert werden.

Für den Nachweis von MDM2 konnte kein Zweifarben-Protokoll verwendet werden, da sich hier die Amplifikation von Ziel- und Referenz-cDNA gegenseitig störten. Sie wurden deshalb in getrennten Kapillaren vervielfältigt und detektiert, und ihre Hybridisierungssonden waren entsprechend beide mit LC Red 640 markiert.

Die Zusammensetzung der Reaktionsmischungen für die RT-PCR war wie folgt:

#### Mix für die Amplifikation und Detektion von Cholinkinase (ChoK) und ALAS

- 4,8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 3,2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1,0  $\mu$ l forward Primer ChoK-F (10  $\mu$ M)
- 2,0  $\mu$ l reverse Primer ChoK-R (10  $\mu$ M)
- 1,0  $\mu$ l Hybridisierungssonde Green-ChoK (4  $\mu$ M)
- 2,0  $\mu$ l Hybridisierungssonde Red-ChoK (4  $\mu$ M)
- 2,0  $\mu$ l h-ALAS Detection Mix
- 2,0  $\mu$ l FastStart DNA Master Hybridization Probes (Enzymmix)
- 2,0  $\mu$ l cDNA

#### Mix für die Amplifikation und Detektion von MDM2

- 9,6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 2,4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1,0  $\mu$ l forward Primer mdm2\_S (10  $\mu$ M)

1,0 µl reverse Primer mdm2\_R (10 µM)  
1,0 µl Hybridisierungssonde mdm2\_FL (4 µM)  
1,0 µl Hybridisierungssonde mdm2\_LC (4 µM)  
2,0 µl FastStart DNA Master Hybridization Probes (Enzymmix)  
2,0 µl cDNA

#### Mix für die Amplifikation und Detektion von ALAS

11,6 µl H<sub>2</sub>O  
2,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
2,0 µl h-ALAS Detection Mix  
2,0 µl FastStart DNA Master Hybridization Probes (Enzymmix)  
2,0 µl cDNA

Zur Normalisierung der Spiegel der Ziel-cDNA auf die Menge von ALAS-cDNA wurde die LightCycler® Relative Quantification Software verwendet.

## **2.6.8 Proteinanalytik**

### **2.6.8.1 Gewinnung von Zelllysaten für die Proteinanalytik**

Zur Gewinnung von Lysaten für die anschließende Proteinanalytik wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung ein- bis zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, dann wurde ein kleines Volumen eiskalten Lysepuffers zugegeben (30–60 µl pro Well einer 6-Well-Platte). Im Fall von Proben, die für eine Analyse von Cholinkinase per Western Blot bzw. Enzymaktivitätsmessung bestimmt waren, wurde der als „Lysepuffer Labor Laca“ bezeichnete Puffer (s. 2.1.3.6) verwendet. Die übrigen Lysate wurden mit Hilfe des „NP40-Lysepuffers“ hergestellt.

Die Platten wurden 15–20 min auf Eis belassen, dann wurden das Lysat unter Verwendung eines Zellschabers gesammelt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 20 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde die flüssige Phase vom Pellet abgetrennt und bei -20°C gelagert.

### **2.6.8.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Reagent Kits ermittelt. Die Quantifikation beruht auf der durch Proteine vermittelten Reduktion von Cu<sup>2+</sup>- zu Cu<sup>+</sup>-Ionen in alkalischer Umgebung. Cu<sup>+</sup> bildet mit dem Reagenz Bicinchoninsäure (BCA) einen violett gefärbten Komplex, der photometrisch bei 562 nm detektiert werden kann.

Als Referenz diente eine Verdünnungsreihe des im Kit enthaltenen BSA-Standards zu den Konzentrationen 200, 120, 80, 40, 20, 10, 5 und 2,5 µg/ml. Für die Leerwerte wurde H<sub>2</sub>O verwendet.

Die Proben wurden in geeigneter Weise mit H<sub>2</sub>O verdünnt, meist im Verhältnis 1:150. Die Reaktion wurde gemäß Herstellerprotokoll in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde die Absorption im Spektrophotometer Spectrafluor Plus gemessen (Messwellenlänge 562 nm, Referenzwellenlänge 690 nm).

Von den Messwerten der Proben und Proteinstandards wurde jeweils die Absorption der Leerwerte abgezogen. Es wurde eine Standardgerade erstellt und aus dieser die Konzentration der Proteinlysate errechnet.

### 2.6.8.3 Gelelektrophorese und Western Blot

Die Detektion und Quantifizierung der untersuchten Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und nachfolgenden Western Blot.

Für die Gelelektrophorese wurde das XCell-System von Invitrogen verwendet. Die Lysate wurden mit H<sub>2</sub>O auf identische Proteinkonzentrationen verdünnt, mit NuPAGE LDS Sample Buffer und Sample Reducing Agent gemischt und 10 min auf 70°C erhitzt. Sodann wurden sie auf NuPAGE-Gele (10 % oder 4–12 % Bis-Tris) aufgetragen. Als Größenreferenz wurden der High-Range Rainbow- und der MagicMark-Standard in den Randspuren des Gels aufgetragen (jeweils 5–10 µl). Die Gelelektrophorese wurde gemäß Herstellerangaben in MOPS SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Spannung betrug 200 V, ein Gellauf dauerte ca. 40 min.

Zur Vorbereitung des anschließenden Western Blots wurde die PVDF-Membran ca. 30 sec in Methanol eingelegt und dann mind. 3 min lang in Transferpuffer äquilibriert. Bei Verwendung einer Nitrozellulose-Membran wurde diese kurz mit H<sub>2</sub>O benetzt und mind. 10 min lang in Transferpuffer eingelegt. Die Blotting Pads wurden in Transferpuffer getränkt, ebenso die Filterpapiere. Pads, Filterpapiere, Gel und Membran wurden im XCell II Blot-Modul zu einem „Sandwich“ zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte bei 30 V und max. 170 mA über eine Dauer von 2 h.

Im Anschluss wurde die Membran mehrfach in NET-Puffer mit 0,25 % Gelatine gewaschen und im gleichen Puffer ca. 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur blockiert. Der Puffer aus 0,25 % Gelatine in NET diente auch zur Verdünnung der Antikörper. Die Membran wurde mit ca. 3 ml der Primärantikörperlösung in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde sie unter mehrfachem Pufferwechsel ca. 1 h lang gewaschen, danach mit der Sekundärantikörperlösung 45 min lang inkubiert und erneut gewaschen. Zur Detektion wurden die Luminol/Enhancer-Lösung und die Peroxid-Lösung aus dem Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit zu gleichen Teilen gemischt und 1–2 ml auf die Membran aufgeträufelt. Nach 2–3 min Inkubation unter Lichtschutz wurde überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Membran in Folie eingeschweißt. Das Chemilumineszenzsignal wurde am Lumi-Imager F1 Gerät aufgenommen.

Die Antikörper wurden in den folgenden Verdünnungen eingesetzt:

β-Actin (AC-15)	1:5.000
Cholinkinase polyklonal	1:5.000
MDM2 (SMP14)	1:200
p53 (DO-1)	1:500
Phospho-p53 (Ser15)	1:1.000
Anti-Mouse IgG-POD (Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Kit)	1:400
Anti-Rabbit IgG-POD (Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Kit)	1:2.000
Anti-Mouse Shp X Ms IgG-HRP (AQ328P)	1:10.000

#### 2.6.8.4 Messung der Enzymaktivität

Die Analyse der Enzymaktivität von Cholinkinase in Lysaten siRNA-transfizierter Zellen und Kontrollzellen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Juan Carlos Lacal am Instituto de Investigaciones Biomédicas in Madrid von Mónica Báñez-Coronel durchgeführt. Hierbei wurde die in [3] unter „Ex vivo assays of choline kinase activity“ beschriebene Methode verwendet. Die relative Enzymaktivität von Cholinkinase ( $A_{Chok}$ ) wurde als Quotient aus der Menge an Phosphorylcholin (PCho) und der Gesamtmenge an PCho und Cholin (Cho) ausgedrückt:

$$A_{Chok} = \frac{PCho}{PCho + Cho}$$



## 2.7 Analyse der Genexpressionsdaten

### 2.7.1 Einführung

Bei den GeneChip® Arrays der Firma Affymetrix handelt es sich um DNA-Oligonukleotidchips, die photolithographisch hergestellt werden. Die auf der Chipoberfläche befindlichen Oligonukleotidsonden (*Probes*) sind 25 Basen lang und in quadratischen Feldern mit 18 µM Kantenlänge angeordnet, die als *Features* bezeichnet werden. Die Sequenz der Probes ist komplementär zu der für die Hybridisierung verwendeten markierten Antisense-cRNA, hat selbst also Sense-Orientierung. Neben jedem Feature mit exakt komplementären 25meren, dem sog. *Perfect Match*, liegt ein Feature mit einem zentralen Basenaustausch in der Oligonukleotidsequenz. Dieser *Mismatch* dient als Kontrolle für unspezifische Kreuzhybridisierungen und bildet zusammen mit dem Perfect Match ein *Probe Pair*. Je 11 über den gesamten Chip verteilte Probe Pairs, die verschiedene Sequenzabschnitte der Ziel-cRNA abdecken, bilden ein *Probe Set*. Die Auswahl der Sequenzen basiert auf der Datenbank Unigene, welche geclusterte Gen- und mRNA-Sequenzen enthält. Aus diesen leitet der Affymetrix-Algorithmus Probe Sets ab, die einerseits möglichst spezifisch für das jeweilige Transkript sind, andererseits möglichst nah am 3'-Ende liegen, damit auch bei vorzeitigem Kettenabbruch während der reversen Transkription noch eine verlässliche Detektion möglich ist.

Jedes Probe Set repräsentiert eine mRNA, wobei für zahlreiche Gene mehrere Probe Sets auf dem Chip vorhanden sind. Dafür sind mehrere Szenarien verantwortlich: Häufig existieren für ein Gen mehrere Unigene-Subcluster mit geringen Abweichungen, z. B. alternativen PolyA-Enden, für die der Affymetrix-Algorithmus jeweils ein Probe Set generiert hat. Teilweise liegen auch Spleißvarianten zugrunde, wobei es eher selten vorkommt, dass verschiedene Probe Sets für jeweils eine Spleißvariante eines Gens spezifisch sind. Stattdessen erfasst häufig ein Probe Set eine spezifische Spleißvariante und die übrigen detektieren alle oder mehrere mögliche Isoformen. Mitunter sind Probe Sets vorhanden, die mehrere Mitglieder einer Genfamilie mit ausgeprägter Sequenzhomologie detektieren; in solchen Fällen existieren häufig noch ein oder mehrere weitere Probe Sets, die für ein Gen dieser Familie spezifisch sind.

Der in allen beschriebenen Genexpressionsexperimenten verwendete Chiptyp HG-U133A (Human Genome U133A) basiert auf der Unigene-Ausgabe 133 und enthält mehr als 22.000 Probe Sets, die ca. 13.000 gut annotierte Gene repräsentieren.

Die Detektion der während der Hybridisierung gebundenen biotinmarkierten cRNA beruht auf der Biotin-Streptavidin-Interaktion. Man verwendet ein Konjugat von Streptavidin mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin, welcher im Scanner durch Laserlicht angeregt wird und Fluoreszenzstrahlung emittiert. Die aufgezeichneten Signale dienen als Grundlage für die anschließende Quantifizierung jedes Probe Sets und für die Beurteilung, ob ein Transkript verlässlich detektiert wurde. In die Berechnung wird die Intensität der Fluoreszenzsignale aller Probes (*Perfect Match* und *Mismatch*) eines Probe Sets einbezogen, ebenso

Signalrauschen und Hintergrund. Details der Berechnungsmethode sind der Dokumentation der Affymetrix-Software zu entnehmen.

### 2.7.2 Beurteilung der Chipqualität

Die Qualität eines Chips wurde anhand mehrerer Parameter beurteilt, die über den Erfolg der Hybridisierung, das Signal-Rausch-Verhältnis und fabrikations- oder bedienungsabhängige Artefakte Auskunft geben. Die hierzu innerhalb der Affymetrix-Software zur Verfügung stehenden Parameter sind im Einzelnen:

- *Noise* (Rauschen): Sollwert  $\leq 10$
- *Background Avg* (Hintergrund, gemittelt): Sollwert  $\leq 200$
- *Number Present* (Prozentsatz der verlässlich detektierten Probe Sets): Sollwert  $\geq 30\%$

Diese Parameter waren stets erfüllt.

Zusätzlich wurde jedes nach dem Scannen erzeugte Bild der fluoreszenzmarkierten Chipoberfläche visuell auf Flecken und Kratzer hin inspiziert. Hatten diese eine inakzeptable Größe (mehr als ca. 20 Features betroffen), wurde der Chip nicht in die nachfolgende Analyse aufgenommen. Außerdem wurde visuell überprüft, ob das von der Affymetrix-Software erzeugte Gitter, auf dem die Zuordnung der Features zu den Probe Sets beruht, korrekt gelegt war. Wenn dies nicht der Fall war, wurde seine Lage berichtigt.

### 2.7.3 Beurteilung der RNA-Qualität

Auf den Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Arrays sind Probe Sets enthalten, die eine Beurteilung der RNA-Qualität hinsichtlich des Anteils an langen cRNA-Spezies ermöglicht, die bis in den 5'-Bereich der zugehörigen mRNA reichen. War die Ausgangs-RNA bereits teilweise verdaut und lag in Fragmenten vor, entstehen bei der Reversen Transkription, die ja vom 3'-PolyA-Ende ausgeht, nur kurze cDNA-Stränge, die in die entsprechenden kurzen cRNAs transkribiert werden. Liegen die Oligonukleotidsequenzen eines bestimmten Probe Sets relativ weit vom 3'-Ende der mRNA entfernt, ist es wahrscheinlich, dass das entsprechende Transkript nicht mehr detektiert bzw. korrekt quantifiziert werden kann, sofern die Ausgangs-RNA degradiert war.

Als Kontrolle für dieses Phänomen dienen zwei Housekeeping-Gene (GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) und  $\beta$ -Actin), für die auf den Chips sowohl Probe Sets im 3'- als auch im 5'-Bereich der mRNA vorhanden sind. Die gemessenen Signalhöhen von 3'- und 5'-Probe Set werden zueinander ins Verhältnis gesetzt und in Form der sog. 3'/5'-Ratio angegeben.

Im Idealfall liegt der Wert der 3'/5'-Ratio bei 1, d. h. der 5'-Bereich der mRNA ist ebenso stark repräsentiert wie der 3'-Bereich. Werte unterhalb von 2 sind als hervorragend, unterhalb von 5 als akzeptabel einzustufen.

Wie bereits erwähnt, kann der Test3-Chip verwendet werden, um die RNA-Qualität einzuschätzen, bevor die Probe auf den größeren und kostspieligeren HG-U133A-Chip aufgetragen wird. Bei den anfänglichen Versuchen wurden die Proben vorab auf Test3-Chips hybridisiert, aufgrund der gleichbleibend hohen RNA-Qualität wurde in den folgenden Experimenten auf ihren Einsatz verzichtet.

Sämtliche dieser Dissertation zugrunde liegende Chips erreichten 3'/5'-Ratios unterhalb von 5, die meisten von ihnen Werte unter 2.

## 2.7.4 Datenauswertung mittels RACE-A

### 2.7.4.1 Übersicht

Das nach dem Scannen der Chips erhaltene Affymetrix-Dateiformat (.chp) wird in die Roche-interne Software RACE A geladen und kann auf vielfältige Art und Weise weiter analysiert werden.

Die wesentlichen Schritte der Datenauswertung, die mittels RACE A durchgeführt wurden, waren folgende:

- Normalisierung der Signalintensitäten innerhalb jedes Chips: Hierbei wurde stets auf den Median aller Signale eines Chips normalisiert.
- Zusammenfassung von biologischen Replikaten in sog. *Conditions*
- Vergleich der Conditions mit derjenigen Condition, die die zugehörigen Kontrollchips (generiert aus unbehandelten bzw. mock- oder mit Negativkontroll-siRNA transfizierten Proben) enthält (*Baseline*)
- Filtern der Daten, um verlässlich detektierte und gleichzeitig zwischen Behandlung und Kontrolle signifikant veränderte Signale zu identifizieren

### 2.7.4.2 Wichtige Parameter der RACE-A-Analyse

- Signal: normalisierte Signalhöhe eines Probe Sets
  - Signal-Mittelwert: Mittelwert der Signale eines Probe Sets auf verschiedenen Chips einer Condition
  - *Call*: Maß für die Detektierbarkeit eines Probe Sets
  - $Call \geq 0,5$ : wird als *present Call* bezeichnet und besagt, dass das dem Probe Set zugehörige Transkript verlässlich detektiert wurde
  - $0,35 \leq Call < 0,5$ : wird als *marginal Call* bezeichnet
  - $Call < 0,35$ : wird als *absent Call* bezeichnet
- Sowohl *marginal* als auch *absent Call* bedeuten, dass das dem Probe Set zugehörige Transkript nicht verlässlich detektiert wurde. Sie können für die Auswertung zusammengefasst werden.
- *Change factor*: gibt an, um welchen Faktor sich das Signal eines Chips bzw. der Signal-Mittelwert einer Condition gegenüber der Kontrolle (*Baseline*) geändert hat.
- Der Change factor wird folgendermaßen berechnet (die Angabe erfolgt für Conditions, ist jedoch auf Einzelchips übertragbar):

im Fall einer Erhöhung des Signals gegenüber der Baseline:  $\frac{\text{Condition (behandelt)}}{\text{Baseline}} - 1$

im Fall einer Reduktion des Signals gegenüber der Baseline:  $-\frac{\text{Baseline}}{\text{Condition (behandelt)}} + 1$

Die Subtraktion oder Addition von 1 dient der Erzeugung eines kontinuierlichen Übergangs der Zahlenwerte des Change factors von den reprimierten zu den induzierten Signalen. Ohne diese Korrektur bestünde ein Sprung zwischen den Zahlenwerten -1 und +1, dazwischenliegende Werte wären bedeutungslos. Durch die mathematische Korrektur wird diese Lücke geschlossen.

Beispiele zur Bedeutung des Change factors:

- +2 – Signal liegt beim Dreifachen des Kontrollwerts
- +1 – Signal liegt beim Doppelten des Kontrollwerts
- 0 – Signal entspricht exakt dem Kontrollwert
- 1 – Signal liegt bei der Hälfte des Kontrollwerts
- 2 – Signal liegt beim Drittel des Kontrollwerts

### 2.7.4.3 Standardfilterkriterien

Das Ziel der Auswertung ist es, einerseits möglichst alle nach einer bestimmten Behandlung differenziell exprimierten Gene zu erfassen, also die Zahl der falsch-negativen Ergebnisse auf ein Minimum zu reduzieren, andererseits aber auch falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, indem nur verlässlich detektierte Signale und robuste Änderungen einbezogen werden. Zu diesem Zweck wurden die Datensätze in einem mehrstufigen Prozess gefiltert, der im Folgenden kurz umrissen werden soll:

- Filtern auf ausreichende Signalintensität und verlässliche Detektion:  
Aus Erfahrungswerten, die aus einer Vielzahl von Chipexperimenten stammen, ließ sich ableiten, dass Signale mit einem Intensitätswert < 50 häufig nicht mehr verlässlich detektiert werden. Diese Signale wurden aus der Analyse ausgeschlossen.  
Außerdem steht mit dem *Call* ein weiterer Parameter zur Verfügung, der angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit das detektierte Signal tatsächlich auf der sequenzspezifischen Hybridisierung des gewünschten Transkripts beruht. Nur Signale mit einem *present Call* wurden in die Auswertung aufgenommen<sup>4</sup>.
- Filtern auf Homogenität der Replikate:  
In jedem Versuch wurden biologische Replikate aller Behandlungen angesetzt, entweder Duplikate oder Triplikate. Vergleicht man nur die Mittelwerte der Signale dieser Replikate, indem man sie in

<sup>4</sup> Dieses Kriterium bedeutet nicht notwendigerweise, dass ein Transkript sowohl auf den Chips der Kontrollproben als auch der behandelten Proben *present* sein muss. Im Fall einer Induktion ist es ausreichend, wenn die behandelten Proben einen *present Call* liefern, im Fall einer Repression muss das Transkript auf den Kontrollchips *present* sein.

Conditions zusammenfasst, läuft man Gefahr, Artefakte zu erfassen, die vermeintlich differenziell exprimiert sind, in Wirklichkeit aber aus großen Streuungen zwischen den Replikaten bzw. Ausreißern resultieren. Deshalb wurde zunächst jeder Chips einzeln mit jedem einzelnen Kontrollchip verglichen. Neben den oben beschriebenen Kriterien für Signal und Call wurde hierbei gefordert, dass in jedem dieser Einzelvergleiche eine Veränderung der Signalthöhe um mind. 50 % (entsprechend einem Change factor von  $\geq 0,5$  bzw.  $\leq -0,5$ ) vorlag, also der Transkriptlevel auf das 1,5fache angestiegen oder auf das 0,67fache reduziert war.

- Filtern auf ausreichende Veränderung der Signalintensität:  
Ebenfalls aus Erfahrungswerten konnte abgeleitet werden, dass eine Änderung der Signalthöhe um den Change factor  $\pm 0,5$  für die Einzelvergleiche zwar ein sinnvoller Schwellenwert ist, für den Vergleich der gemittelten Replikate in Form von Conditions jedoch strengere Kriterien zugrunde gelegt werden sollten, um ausreichend robuste und reproduzierbare Daten zu generieren. Als geeignet erwies sich hierfür ein Change factor von  $\pm 0,75$ . Dieser entspricht einer Erhöhung des Transkriptlevels auf das 1,75fache bzw. einer Erniedrigung auf das 0,57fache im Vergleich zur Kontrolle.

Wenn im Ergebnisteil von „Standardfilterkriterien“ die Rede ist, so wurde obiger Filterprozess angewendet. Beim Vergleich unterschiedlicher Behandlungen, beispielsweise verschiedener Zytostatika oder siRNAs gegen dasselbe Target, wurden aus den nach obigem Filterschema erhaltenen Genen Schnittmengen gebildet.

#### 2.7.4.4 Filterkriterien für substanzspezifische Effekte

Darüber hinaus wurde bei der Analyse der Zytostatikadaten gezielt nach solchen Genen gesucht, die nur durch eine bestimmte Substanz deutlich dereguliert wurden, von den übrigen aber weitgehend unbeeinflusst blieben. Zu diesem Zweck wurden folgende Filterkriterien angelegt:

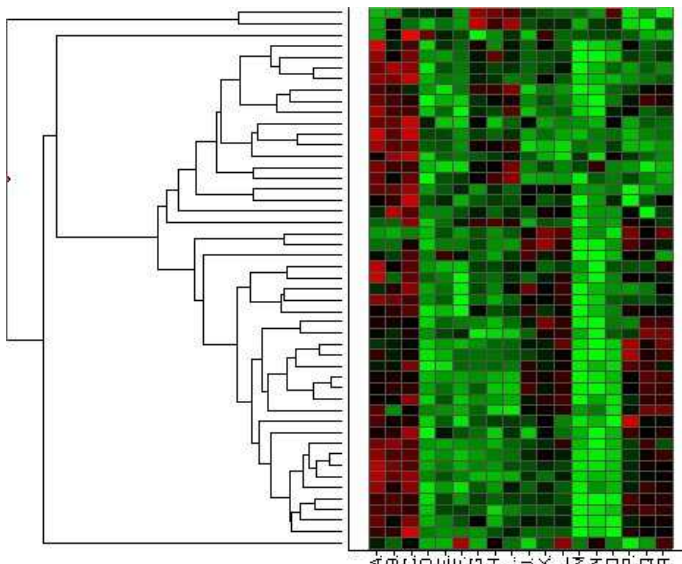
- signifikante Veränderung durch die jeweils untersuchte Substanz:  
gemäß den bereits dargestellten Kriterien, d. h. Signal  $\geq 50$ , *present Call*, homogene Replikate, Change factor  $\geq 0,75$  bzw.  $\leq -0,75$
- keine nennenswerte Veränderung durch die anderen Substanzen:  
Im Fall einer Induktion durch die untersuchte Substanz wurde bei den anderen Substanzen gefordert, dass sie einen Change factor  $< 0,5$  haben und/oder *absent* sein müssen. Im Fall einer Repression durch die untersuchte Substanz müssen die anderen einen Change factor  $> -0,5$  aufweisen.

Gene, die die Filterkriterien in puncto Signalthöhe und/oder Change factor nicht erfüllten, fielen zwar aus der Basisanalyse heraus, wurden aber, sofern sie in einen biologischen Kontext mit anderen deregulierten

Genen eingeordnet werden konnten, daraufhin untersucht, ob sie eine Tendenz in die vermutete Richtung (Induktion bzw. Repression) zeigten.

### 2.7.5 Hierarchisches Clustern und Darstellung in Heat Maps

Die Affymetrix-Daten wurden innerhalb der Software Spotfire mit Hilfe eines hierarchischen Clusteralgorithmus analysiert, welcher auf dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson basiert. Dadurch können ggf. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Genen, d. h. ähnliche Expressionsmuster über verschiedene Proben hinweg, identifiziert werden<sup>5</sup>. Die Ergebnisse des Clustervorgangs können in Form eines sog. *Heat Maps* dargestellt werden, in dem farblich gekennzeichnet ist, ob ein Signal im Vergleich zum Durchschnitt aller Signalwerte dieses Gens erhöht oder erniedrigt ist. Abb. 2-2 zeigt dies anhand eines Beispiels.



**Abb. 2-2: Beispiel eines Heat Maps als Resultat des hierarchischen Clusters in Spotfire.**

Jede Affymetrix Probe Set ID wird durch eine Zeile in der Heat Map repräsentiert, jeder Chip durch eine Spalte. Die Chips sind in diesem Beispiel mit A, B, C etc. bezeichnet. Die Farbgebung spiegelt die relative Expressionshöhe wieder, mit steigender Signalthöhe wechselt die Farbe von grün über schwarz bis nach rot. Die Skalierung wird automatisch so gewählt, dass bei jedem Probe Set die volle Farbpalette ausgenutzt wird. Auf der linken Seite befindet sich das zugehörige Dendrogramm, das die Ähnlichkeit der Probe Sets in ihrem Expressionsmuster über die verschiedenen Chips hinweg in Form von Verwandtschaftsbeziehungen wiedergibt.

### 2.7.6 Funktionelle Analyse der deregulierten Gene

Um Informationen über die biologischen Funktionen der differenziell exprimierten Gene zu erhalten, wurden intensive Recherchen in den folgenden Datenbanken des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) der National Library of Medicine (NLM) durchgeführt:

- Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>)
- OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>)
- Entrez PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>),  
von dort aus Zugriff auf die Primärliteratur

<sup>5</sup> Der Clusteralgorithmus wurde nur auf die Probe Sets angewendet und nicht auf die Chips, weshalb deren Ähnlichkeit nicht in Form eines Dendrogramms dargestellt ist.

Zudem wurden die aus den Affymetrix-Analysen erhaltenen Datensätze mittels der Software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ausgewertet, die basierend auf einer Datenbank – der Ingenuity Pathways Knowledge Base – biologische Zusammenhänge zwischen den eingegebenen Genen herstellt und diese in Form von Netzwerken visualisiert. Die Datenbank geht teils auf manuelle Eingabe, teils auf automatisierte Extraktion von Informationen aus wissenschaftlichen Publikationen zahlreicher Journale zurück.

## 2.8 Literaturverzeichnis Kapitel 2

1. Weil, D., et al., *Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells*. Biotechniques, 2002. **33**(6): p. 1244-8.
2. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
3. Hernandez-Alcoceba, R., et al., *Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design*. Oncogene, 1997. **15**(19): p. 2289-301.

## 3 Ergebnisse und theoretischer Hintergrund

### 3.1 Das p53-MDM2-Netzwerk

Vor der Darstellung der im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wird eine kurze Einführung zum Tumorsuppressor p53<sup>6</sup>, seinen Effektoren und seinem funktionellen Gegenspieler MDM2 gegeben. Dies soll dem besseren Verständnis der Effekte dienen, die sich nach Behandlung der Zellen mit Zytostatika, spezifischen Inhibitoren und siRNAs beobachten lassen, da das p53-MDM2-Netzwerk für diese Reaktionen von großer Bedeutung ist.

#### 3.1.1 p53 als Transkriptionsfaktor und proapoptotischer Effektor

Dem Tumorsuppressor p53 kommt sowohl beim Selbstschutz normaler Zellen gegen DNA-Schädigung und gegen maligne Transformation als auch in der zellulären Antwort auf antitumorale Therapien eine entscheidende Rolle zu.

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Tetramerisierung und Aktivierung eine Vielzahl von Genen durch direkte Bindung an ein p53-Response-Element (Abb. 3-1) transaktiviert, jedoch auch reprimierende Wirkung auf die Expression diverser Zielgene ausüben kann. Für letzteres werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wozu die Verdrängung anderer, aktivierender Transkriptionsfaktoren von ihren Bindungsstellen in den entsprechenden Promotoren, die hemmende Interaktion mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und die Kooperation mit transkriptionellen Repressoren wie SIN3A gehören [1, 2].

5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy...(0-13 bp)...PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy -3'

**Abb. 3-1: Die Consensussequenz der Bindungsstellen von p53 in Promotoren und Introns seiner Zielgene.**

Die beiden Wiederholungen des 10 bp langen Abschnitts können durch einen Abstandshalter mit einer Länge von bis zu 13 bp getrennt sein. Abkürzungen: Pu = Purin, Py = Pyrimidin, bp = Basenpaar. [3]

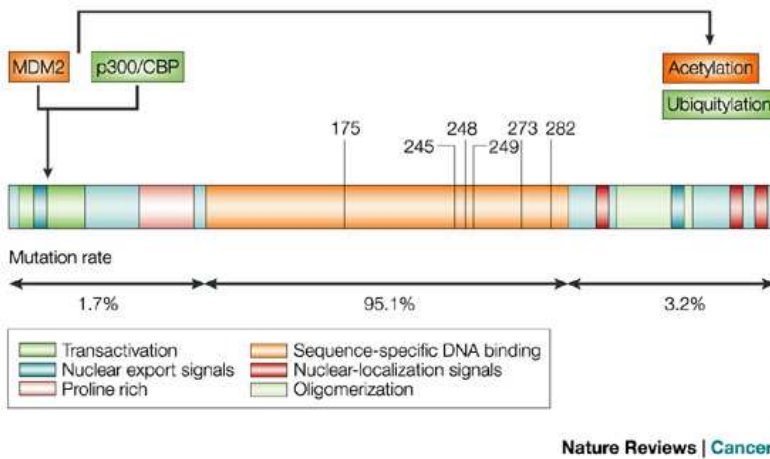
Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass p53 neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor auch eine unmittelbare proapoptotische Funktion erfüllt. Es kann zu den Mitochondrien wandern und dort über eine Interaktion mit den antiapoptotischen BCL2-Familienmitgliedern BCL-xL und BCL2 die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran erhöhen und die Freisetzung von Cytochrom c auslösen [4, 5].

<sup>6</sup> Für die Bezeichnung von Genen und Proteinen werden i. A. die offiziellen Symbole gemäß der Nomenklatur der HUGO (Human Genome Organization) verwendet, Stand 03/2005. Wenn jedoch eine andere Bezeichnung wesentlich gebräuchlicher ist und das offizielle Symbol eher verwirrend wäre, wird die gängige Bezeichnung verwendet, z. B. p53 anstelle von TP53 oder p21 anstelle von CDKN1A. Zudem werden teilweise griechische Buchstaben in den Gensymbolen verwendet, auch wenn diese im offiziellen Symbol durch lateinische Buchstaben ersetzt sind, z. B. TNF $\alpha$  anstelle von TNFA.



### 3.1.2 Mutationen von p53 in humanen Tumoren

Mindestens 50 % aller humanen Tumoren besitzen kein Wildtyp-p53-Protein mehr [2]. Somit ist p53 das am häufigsten in Tumoren inaktivierte Protein [6]. Der Verlust von funktionsfähigem p53-Protein beruht in der Mehrzahl der Fälle auf einem sog. *Loss of heterozygosity* des p53 kodierenden TP53-Gens, d. h. ein Allel ist durch Deletion des betreffenden chromosomalen Abschnitts oder des ganzen Chromosomenarms (17p) verloren gegangen und das zweite Allel wurde durch eine inaktivierende Mutation, in der Regel einer einzelnen Base, verändert. In ca. 95 % der Fälle betrifft eine solche Punktmutation die DNA-bindende zentrale Region von p53 und führt dort zu einem Aminosäure-Austausch, wodurch die transaktivierenden und vermutlich auch die transreprimierenden Eigenschaften beeinträchtigt oder zerstört werden [2]. Eine Übersicht über die Struktur des p53-Proteins und seine funktionellen Domänen ist in Abb. 3-2 gezeigt.



**Abb. 3-2: Das p53-Protein und seine funktionellen Domänen.**

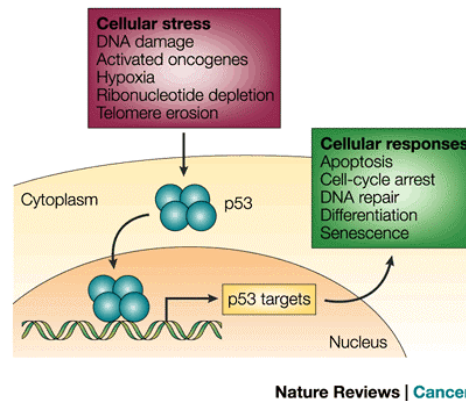
Die Prozentsätze geben die Häufigkeit der Mutationen in den jeweiligen Regionen an. Etwa 28 % aller Mutationen betreffen die sechs explizit eingezeichneten Aminosäurereste. [2]

Meist wird infolge einer Mutation ein nicht-funktionelles p53-Protein mit erhöhter Stabilität gebildet. Diese Steigerung der Stabilität rührt daher, dass das mutante p53 nicht mehr in der Lage ist, die Expression seines natürlichen Gegenspielers MDM2 zu induzieren (s. 3.1.4). Seltener geht das p53-Protein komplett verloren oder aber es entstehen dominant-negative p53-Formen, die ein gegebenenfalls noch vorhandenes Wildtyp-p53-Protein oder die anderen p53-Familienmitglieder p63 und p73 durch Oligomerisierung inaktivieren. Darüber hinaus wurden sog. *Gain-of-function*-Mutationen von p53 beschrieben, aufgrund derer die Zelle einen spezifischen Wachstumsvorteil erhält [7, 8]. Dies könnte u. a. darauf beruhen, dass das mutante p53-Protein nur noch einen Teil seiner nativen Targets transkriptionell regulieren kann, dass es völlig neue Targets transaktiviert oder die Fähigkeit erlangt, mit p63 und p73 zu interagieren und deren Funktionen zu hemmen. Aufgrund derartiger Mechanismen können *Gain-of-function*-Mutanten von p53 aktiv zur Tumorigenese beitragen [2, 7].

In den Tumorzellen, die Wildtyp-p53-Protein exprimieren, lassen sich häufig andere Mechanismen nachweisen, mit denen die antitumorigene Wirkung von p53 abgeschwächt oder ausgeschaltet wird. Diese können sowohl *upstream* (z. B. inadäquate Aktivierung von p53) als auch *downstream* (z. B. Defizienz in der Caspasekaskade, die zur Exekution der Apoptose führt) von p53 liegen [7].

### 3.1.3 Biologische Wirkungen von p53 und seinen Zielproteinen

Die biologischen Funktionen der transkriptionellen Targets von p53 sind heterogen, lassen sich aber häufig in Einklang mit Schutzmechanismen bringen, die unter Stressbedingungen wie z. B. Serumentzug, Aktivierung von Onkogenen und DNA-Schädigung in Gang gesetzt werden. p53 kann unterschiedliche Reaktionen der Zelle auf solche Stressoren auslösen. Dies ist schematisch in Abb. 3-3 dargestellt.



**Abb. 3-3: Die p53-vermittelte Stressreaktion.**

Durch zelluläre Stressoren wie DNA-Schäden, aktivierte Onkogene, Hypoxie, Ribonukleotidmangel oder Telomerverkürzung wird p53 aktiviert, transloziert in den Nucleus und vermittelt dort die Expression bzw. Repression seiner transkriptionellen Targets. Dies kann verschiedene Reaktionen auslösen: Apoptose, Zellzyklusarrest in der G1- oder G2-Phase, DNA-Reparatur, Differenzierung oder Seneszenz. [9]

Als zentraler Vermittler des p53-abhängigen Zellzyklusarrests am Übergang von der G1- in die S-Phase gilt das p21-Protein. Es inhibiert die Komplexe aus verschiedenen Cyclinen und der cyclinabhängigen Kinase CDK2 und verhindert dadurch die inaktivierende Phosphorylierung von RB, dem Retinoblastom-Protein, und die Progression in die S-Phase [10, 11]. Darüber hinaus ist p21 an der Regulation des G2-Checkpoints beteiligt [12] und wird auch für die Induktion eines seneszenzartigen Phänotyps mitverantwortlich gemacht [13, 14]. Das 14-3-3 $\sigma$ -Protein, auch bekannt als Stratifin, ist ein weiteres p53-induzierbares Target und ist Bestandteil der G2-Checkpoint-Maschinerie. Die Erhöhung der Expression von 14-3-3 $\sigma$  vermittelt einen G2-Arrest [11]. GADD45A spielt eine Rolle in der DNA-Reparatur und beim Zellzyklusarrest am G2/M-Übergang [15].

Wichtige p53-induzierbare Targets, die an der Induktion und Exekution der Apoptose beteiligt sind, sind NOXA, PUMA, BAX, die sog. Todesrezeptoren (*death receptors*) DR5 und FAS und viele andere mehr [7]. Auch die reprimierenden Wirkungen von p53 auf die Transkription des proliferationsfördernden Transkriptionsfaktors MYC und des Apoptosehemmers Survivin tragen zum Wachstumsarrest oder zum Zelltod bei [7, 16].

Welches der alternativen Programme durch p53 ausgelöst wird, scheint von der Art und dem Ausmaß der Schädigung der Zelle und möglicherweise auch von externen Stimuli, die von benachbarten Zellen oder

Immuneffektorzellen ausgehen, abzuhängen. Lässt sich beispielsweise nach einem durch p53 vermittelten Zellzyklusarrest eine Schädigung der DNA nicht durch DNA-Reparaturmechanismen beheben, wird die Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit durch p53-abhängige Apoptose eliminiert.

Man geht davon aus, dass posttranslationale Modifikationen von p53, insbesondere Phosphorylierung an verschiedenen Serinresten, aber auch Acetylierung, Dephosphorylierung, Glykosylierung etc., wesentlich mitbestimmen, welche Stressantwort durch das Tumorsuppressorprotein hervorgerufen wird. Diese Modifikationen werden z. B. durch die Checkpointkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), CHK1 und CHK2 katalysiert [7]. Ein anderes Modell besagt, dass sich in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Sätze von p53-Targets in aktiven Chromatinregionen befinden. Außerdem wird vermutet, dass das Vorhandensein transkriptioneller Kofaktoren großen Einfluss darauf hat, welche Untermengen seiner potenziellen Targets p53 zu regulieren vermag [17].

### 3.1.4 Regulation der p53-Aktivität

Normalerweise liegt das p53-Protein in der Zelle in niedriger Konzentration vor. Nach Stressexposition kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg der Menge an p53-Protein, während die mRNA-Spiegel gleich bleiben. Die Zunahme der Proteinkonzentration erklärt sich aus einer Verlängerung der Halbwertszeit von p53, die unter Normalbedingungen bei etwa 10–20 min liegt. Vermittelt wird die erhöhte Stabilität im Wesentlichen durch die bereits angesprochenen Modifikationen. Diese stören die Interaktion von p53 mit antagonistisch wirkenden Proteinen, welche sonst seine Funktion beeinträchtigen und seinen Abbau fördern. Der zentrale Gegenspieler von p53 ist das MDM2-Protein (s. 3.1.6 ff.).

Die posttranslationalen Modifikationen können zusätzlich aber auch direkt die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor fördern, indem sie z. B. seine DNA-bindenden Eigenschaften verstärken.

Daneben werden weitere Mechanismen für die Aktivierung von p53 diskutiert, z. B. Interaktion mit anderen Proteinen wie der Acetyltransferase p300/CBP (*CREB-binding protein*) und Bindung an einzelsträngige DNA [2, 7].

Die Vorteile dieser Regulation auf posttranslationaler Ebene gegenüber einem transkriptionellen Prozess liegen in der hohen Geschwindigkeit und Flexibilität, mit der auf schädigende Einflüsse reagiert werden kann, und in der Möglichkeit, die Aktivierung von p53 auch sehr schnell wieder rückgängig machen zu können [11]. Zudem kann die Funktion von p53 auch über die Kontrolle seiner subzellulären Lokalisation beeinflusst werden [2].

Vermutlich kennt man erst einen Teil der p53-modifizierenden und -aktivierenden Effektoren. Es existieren widerstreitende Befunde, welche von ihnen unter welchen (Stress-)Bedingungen in vivo tatsächlich wichtige Rollen spielen [11]. Ausführliche Diskussionen dieses Themengebiets finden sich u. a. in [2, 7, 11].

### 3.1.5 p53 und Zytostatika

In zahlreichen Publikationen wird beschrieben, dass chemotherapeutische Wirkstoffe – ebenso wie ionisierende Strahlung – die Induktion und Aktivierung von Wildtyp-p53-Protein herbeiführen. Dies gilt für direkt DNA-schädigende Agenzien wie beispielsweise Alkylanzien (z. B. Cisplatin), indirekt DNA-schädigende Wirkstoffe wie Topoisomerasehemmer (z. B. Adriamycin, Camptothecin) und auch für Mikrotubuli-Inhibitoren (z. B. Taxol, Vincaalkaloide). Je nach Zelltyp, Ausmaß der Schädigung und weiteren Faktoren können diese Substanzen zum p53-abhängigen Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führen.

Allerdings sind Zytostatika in der Lage, auch in Tumorzellen mit mutantern p53-Protein das Wachstum zu hemmen oder Apoptose einzuleiten. Die Zelle verfügt also offenbar über weitere Signalwege, mit denen sie Proliferation und Zelltod nach genotoxischem Stress modulieren kann, sodass ein funktionelles p53-System keine absolute Notwendigkeit für die Wirksamkeit von Tumortheraeutika darstellt [18].

### 3.1.6 Autoregulatorische Feedbackschleife zwischen p53 und MDM2

Das MDM2-Protein ist der physiologische Gegenspieler von p53 und hemmt die Aktivität von p53 durch verschiedene Mechanismen. Diese sind in Abb. 3-4 dargestellt.

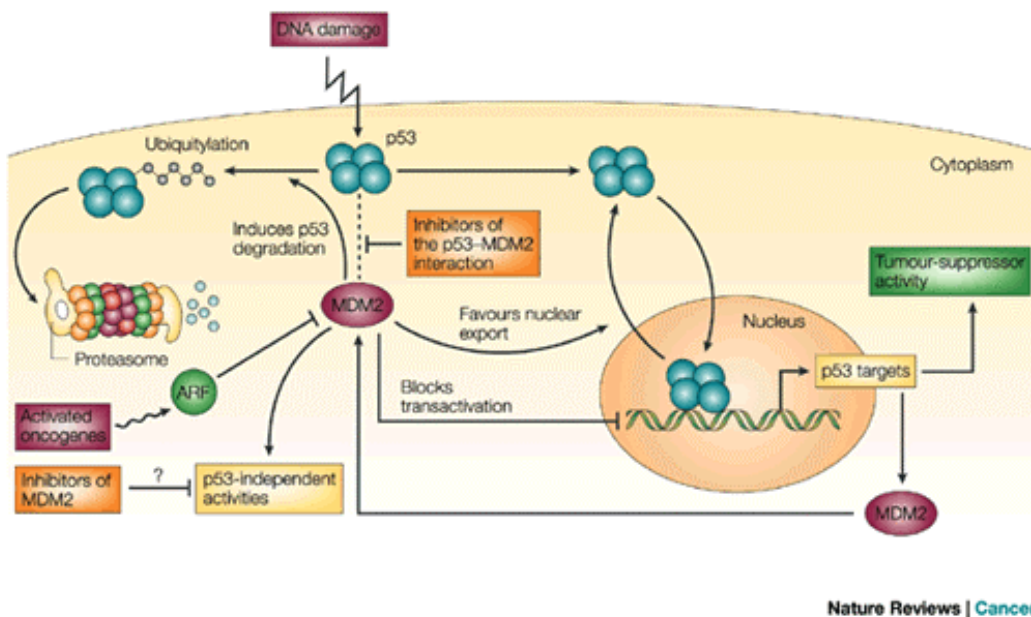


Abb. 3-4: Autoregulatorische Feedbackschleife zwischen p53 und MDM2. [9]

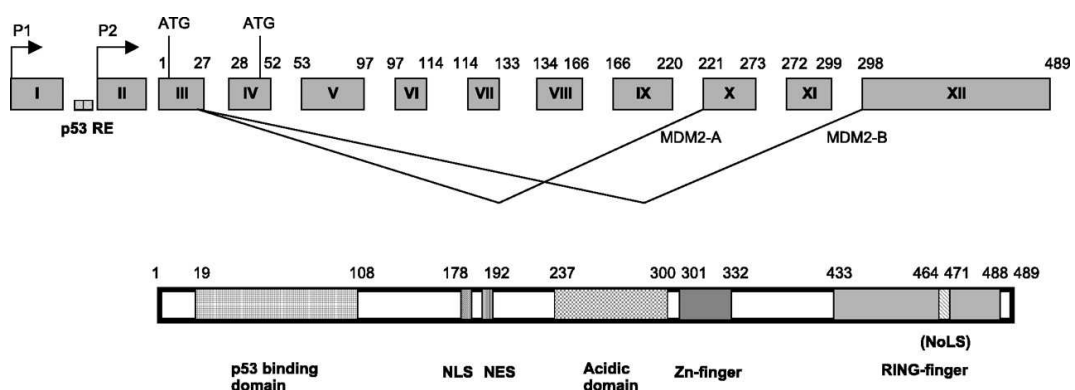
MDM2 bindet an die Transaktivierungsdomäne von p53 und verhindert dadurch die transkriptionelle Induktion der p53-Zielgene. Darüber hinaus vermittelt MDM2 nach Bindung an p53 dessen Export aus dem Zellkern, sodass p53 nicht mehr mit der genomischen DNA interagieren und die Expression seiner Targets modulieren kann. Außerdem besitzt MDM2 E3-Ligase-Enzymaktivität und katalysiert die Ubiquitinierung von p53, was dessen Abbau durch das Proteasom herbeiführt. Diese Vorgänge bewirken, dass die p53-Konzentration unter Normalbedingungen stets auf niedrigem Niveau gehalten wird.

Diverse Prozesse können nach Stressexposition die Interaktion von p53 mit MDM2 unterbinden und so den p53-Spiegel erhöhen: Durch Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste von p53, insbesondere von Ser15, Thr18 und/oder Ser20 wird die Bindung der beiden Proteine aneinander beeinträchtigt. Zur Bedeutung dieser Modifikationen gibt es allerdings widersprüchliche Befunde, vgl. [19]. Das Tumorsuppressorprotein ARF bindet an MDM2 und hemmt dessen Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase. Die Expression von ARF wird durch Aktivierung von Onkogenen wie z. B. MYC oder Proteinen der RAS-Familie induziert. ARF ist in vielen Tumoren durch Mutation, Deletion oder Methylierung inaktiviert. Somit ist es möglich, dass eine Zelle trotz Wildtyp-p53-Allel(en) einer malignen Transformation unterliegen kann [9].

Die Regulationsmechanismen zwischen MDM2 und p53 sind jedoch nicht einseitig, sondern bilden eine negative Feedbackschleife. Zu den durch p53 transaktivierten Targets zählt nämlich auch MDM2 selbst, sodass p53 seine eigene Inaktivierung fördert. Diese Autoregulation verhindert eine unnötig lange und für die Zelle potenziell „gefährliche“ Aktivität von p53. Darüber hinaus induziert p53 die Expression von Proteinen, die den Phosphorylierungszustand von MDM2 regulieren. Dazu zählen u. a. WISP1 und PTEN, die aktivierenden bzw. inhibierenden Einfluss auf die Kinase AKT ausüben, welche ihrerseits das MDM2-Protein durch Phosphorylierung aktivieren kann [2].

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass MDM2-Knock-out-Mäuse bereits in einem frühen Embryonalstadium sterben, bei zusätzlicher Deletion des p53-Gens aber lebensfähig sind und sich annähernd normal entwickeln [9]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des funktionellen Zusammenhangs zwischen p53 und MDM2. Dennoch ist die Bedeutung von MDM2 für die Zelle nicht allein auf seine p53-bezogenen Aktivitäten beschränkt, siehe dazu 3.1.9.

### 3.1.7 MDM2 – Struktur und enzymatische Eigenschaften



**Abb. 3-5: Schematische Darstellung des MDM2-Gens und -Proteins.**

Im oberen Teil der Abbildung sind die Exons des MDM2-Gens gezeigt. Seine Expression wird von zwei Promotoren gesteuert. P1 reguliert die konstitutive Transkription und führt zur Bildung des Volle-Länge-Proteins (p90). P2 ist ein p53-induzierbarer Promoter, aus der entsprechenden mRNA entsteht ein verkürztes Protein (p76).

Die Struktur der beiden häufigsten Spleißvarianten MDM2-A und MDM2-B ist angedeutet, ihnen fehlen die Exons 4–9 bzw. 4–11.

Im unteren Teil ist die Abfolge der Domänen des MDM2-Proteins gezeigt.

Abkürzungen: NLS = nukleäres Lokalisationssignal, NES = nukleäres Exportsignal, NoLS = nukleoläres Lokalisationssignal. [20]

Das MDM2-Protein wurde ursprünglich als ein aufgrund von Amplifikation stark überexprimiertes Protein in der spontan transformierten murinen Zelllinie 3T3-DM identifiziert. In manchen humanen Tumoren findet man eine Überexpression dieses Proteins infolge von Amplifikationen des MDM2-Gens oder deregulierter Transkription oder Translation. Eine Beteiligung von MDM2 an der malignen Transformation lässt sich belegen, weshalb es als Onkogen eingestuft wird. Besonders häufig tritt die Überexpression von MDM2 in Weichteil- und Osteosarkomen auf, sie wurde aber auch in soliden und hämatologischen Tumoren gefunden. In der Regel besitzen diese Tumoren ein Wildtyp-p53-Protein, das aber aufgrund der hohen Konzentration von MDM2 nicht oder nur unzureichend aktiviert werden kann [20, 21]. Die Struktur des MDM2-Gens und -Proteins ist in Abb. 3-5 gezeigt.

Von MDM2 sind zahlreiche Isoformen beschrieben, die sowohl durch alternatives Spleißen als auch durch aberrante Prozessierung des MDM2-Transkripts gebildet werden können. Nicht alle dadurch entstehenden mRNAs werden in Protein übersetzt und über die Funktionen der tatsächlich exprimierten MDM2-Proteinvarianten kann bisher nur spekuliert werden. Detaillierte Ausführungen hierzu finden sich in [22].

MDM2 besitzt E3-Ligase-Aktivität, d. h. es katalysiert die Konjugation von Ubiquitinresten mit der Aminogruppe von Lysinen in Zielproteinen. Der Prozess der Ubiquitinierung umfasst eine mehrstufige Kaskade, bei der ein E1-Enzym Ubiquitin bindet und aktiviert und ein E2-Enzym dieses aktivierte Ubiquitin auf ein E3-Enzym überträgt, welches dann die kovalente Modifikation vermittelt. Durch Ubiquitinierung werden zelluläre Proteine für einen Abbau durch das Proteasom, einen Multiproteinkomplex mit Proteinasefunktion, markiert. Für die E3-Ligase-Funktion ist das RING-Motiv im MDM2-Protein verantwortlich (siehe Abb. 3-5). Zu den Substraten dieser Enzymaktivität zählt MDM2 selbst, d. h. es vermittelt in einem negativen Auto-regulationsmechanismus seinen eigenen Abbau. Darüber hinaus wird das Tumorsuppressorprotein p53, wie unter 3.1.6 bereits angesprochen, durch MDM2 ubiquitiniert, wobei für eine Polyubiquitinierung vermutlich die Kooperation mit p300/CBP erforderlich ist [20].

Die Interaktion zwischen MDM2 und p53, die sowohl die transaktivierende Aktivität von p53 unterbindet als auch Voraussetzung für die Übertragung von Ubiquitinresten ist, findet zwischen den beiden N-Termini dieser Proteine statt und lässt sich in etwa auf den Bereich der Aminosäuren 19–108 des MDM2-Proteins und der Aminosäuren 1–50 des p53-Proteins zurückführen [9, 19]. Viele der oben erwähnten Spleißvarianten besitzen keine p53-Bindedomäne, darunter auch die beiden am häufigsten in humanen Tumoren gefundenen Formen MDM2-A und MDM2-B [20].

### **3.1.8 Modulation der MDM2-Aktivität**

Unter Normalbedingungen hält MDM2 die zelluläre Konzentration von p53 permanent niedrig. Um adäquat auf schädigende Einflüsse reagieren und p53 aus der Suppression durch MDM2 befreien zu können, existieren in der Zelle verschiedene Mechanismen: Einerseits wird durch posttranslationale Modifikation von p53 die Interaktion mit dem N-Terminus von MDM2 beeinträchtigt (s. 3.1.4). Zum anderen wird auch MDM2 selbst modifiziert, wobei auch hier Phosphorylierungen, beispielsweise durch ATM, AKT oder

p38MAPK (*mitogen activated protein kinase p38*), die Hauptrolle zu spielen scheinen. Daneben wurde auch die Sumoylierung von MDM2 durch verschiedene SUMO-E3-Ligasen beschrieben [23]. Diese Modifikationen regulieren die zelluläre Lokalisation von MDM2, seine Bindefähigkeit an p53 und seine E3-Ligase-Aktivität und deren Substratspezifität (entweder im Sinne einer verstärkten Autoubiquitinierung oder einer Ubiquitinierung von p53 oder anderen Proteinen) [19, 23]. Hinzu kommt der inhibitorische Einfluss des ARF-Proteins auf MDM2. Zu dessen genauem Mechanismus wurden verschiedene Erklärungsansätze vorgeschlagen: Das klassische Modell postuliert, dass der ARF-MDM2-Komplex in den Nukleolus abgesondert wird und dadurch MDM2 nicht mehr mit p53 interagieren kann. Neuere experimentelle Befunde sprechen aber eher dafür, dass der ARF-MDM2-Komplex im Nukleoplasma vorliegt [19].

Eine Reihe weiterer Interaktionspartner von MDM2, die seine p53-bezogenen Funktionen auf vielfältige Weise regulieren können, sind beschrieben worden. So inhibiert beispielsweise das bereits erwähnte p53-Target 14-3-3 $\sigma$  den MDM2-vermittelten p53-Export und -Abbau und hat dadurch einen verstärkenden Effekt auf die p53-Aktivierung [24]. Cyclin G1, ein weiterer p53-transaktivierbarer Effektor [25], kann die Komplexbildung zwischen MDM2 und ARF stimulieren und trägt dadurch zur Aktivierung von p53 bei, es gibt aber auch Befunde, dass Cyclin G1 die ATM-abhängige Phosphorylierung von p53 hemmt und seinen proteasomalen Abbau fördert [26, 27]. Zudem unterliegt es selbst der Ubiquitinierung durch MDM2 [27].

### 3.1.9 p53-unabhängige Funktionen von MDM2

MDM2 erfüllt in der Zelle auch p53-unabhängige Funktionen, die sich u. a. auf die Zellzykluskontrolle, Differenzierung und DNA-Reparatur erstrecken. Dass die Bedeutung von MDM2 für die maligne Transformation nicht ausschließlich aus seinem funktionellen Antagonismus gegenüber p53 resultiert, lässt sich daraus ableiten, dass es einige wenige Beispiele humaner Tumoren gibt, in denen sowohl eine Mutation des p53- als auch eine Amplifikation des MDM2-Gens vorliegen, und dass die Kombination dieser Aberrationen zu einer schlechteren Prognose für den Tumorpatienten führt [28].

In Zellmodellen konnten sowohl wachstumsfördernde als auch -hemmende Effekte von MDM2 gezeigt werden, dies war zumindest teilweise vom zellulären Hintergrund abhängig. So verleiht MDM2 Zellen, die kein funktionelles p53- und RB-Protein exprimieren, einen Wachstumsvorteil, kann andererseits aber den G1/S-Übergang normaler diploider Zellen hemmen [28].

Zusätzlich zu seinen bereits erwähnten Interaktionspartnern gibt es zahlreiche weitere Proteine, die mit MDM2 in Wechselwirkung treten können und für seine vielfältigen und teilweise widerstreitenden biologischen Wirkungen mitverantwortlich sind. So bildet MDM2 beispielsweise einen Komplex mit dem Retinoblastom-Protein (RB) und stört den RB-vermittelten G1-Arrest. Umgekehrt beeinträchtigt auch RB bestimmte Funktionen von MDM2, indem es einen trimeren Komplex mit MDM2 und p53 bildet und dadurch die inhibierende Wirkung von MDM2 auf die p53-abhängige Apoptose ausschaltet. Ein weiterer Interaktionspartner von MDM2 ist DNA-Polymerase  $\epsilon$ , deren Aktivität durch MDM2 stimuliert wird. Auf diesem Weg beeinflusst MDM2 möglicherweise die Assoziation dieser Polymerase mit Reparaturproteinen [28].

Weitere experimentelle Befunde zu MDM2, seinen Funktionen und Regulationsmechanismen sind Übersichtsartikeln zu entnehmen, beispielsweise [19, 20, 23, 28].

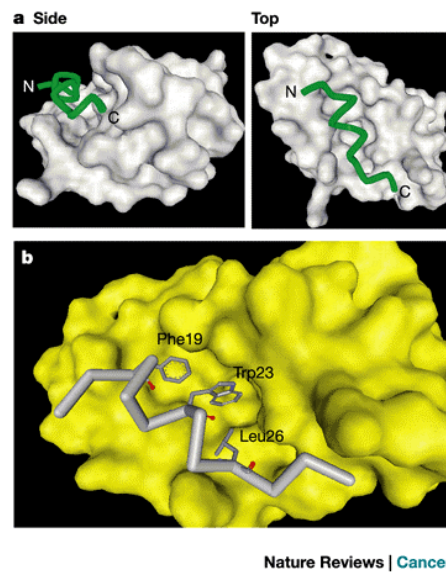
### 3.1.10 Inhibition der Interaktion zwischen p53 und MDM2

Im Rahmen der Suche nach neuen Strategien in der antitumoralen Therapie wird bereits seit einigen Jahren intensiv an der Entwicklung von Inhibitoren geforscht, die die Interaktion zwischen p53 und MDM2 unterbinden sollen. Von ihnen erhofft man sich die Aktivierung der Tumorsuppressoreigenschaft von p53, wodurch Krebszellen in ihrem Wachstum angehalten bzw. in die Apoptose getrieben werden sollen. Solche Hemmstoffe wären deshalb potenziell in allen Tumoren, welche noch Wildtyp-p53-Protein besitzen, anwendbar. Eine besonders gute Effektivität erwartet man sich in Tumoren, die eine erhöhte MDM2-Expression aufweisen, da diese Überexpression in solchen Geweben den Hauptmechanismus für die Inaktivierung von p53 darstellen dürfte. In Tumoren mit Wildtyp-p53 und niedrigen oder normalen MDM2-Spiegeln sind hingegen möglicherweise andere Mechanismen für die mangelnde Funktionalität des p53-Signalwegs verantwortlich. Sofern hiervon Effektoren betroffen sind, die *downstream* von p53 liegen, könnte der Nutzen einer Aktivierung von p53 durch MDM2-Inhibitoren eingeschränkt sein [9].

Bei der Entwicklung von MDM2-Inhibitoren wurden und werden von verschiedenen akademischen und industriellen Arbeitsgruppen unterschiedliche Strategien verfolgt. Neben peptidischen Inhibitoren, deren Charakterisierung eher von theoretischem Interesse war, wurden Antisense-Oligonukleotide gegen MDM2 eingesetzt, die sowohl in in-vitro- als auch in Xenograft-Modellen proliferationshemmende und antitumorale Wirkungen zeigten. Allerdings übten diese Antisense-Oligonukleotide annähernd gleiche Wirkungen auf Zellmodelle mit mutantern p53-Protein aus, was von der Forschergruppe auf p53-unabhängige Funktionen von MDM2, insbesondere eine direkte Aktivierung von p21, zurückgeführt wurde [29]. Auch zum Einsatz von siRNAs, die gegen die MDM2-mRNA gerichtet sind, existiert bereits eine Studie mit in-vitro- und Xenograft-Daten, in der Wachstumsinhibition und Induktion von Apoptose beschrieben wurden [30]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des RNAi-vermittelten *Silencings* von MDM2 in mehreren Zellmodellen untersucht. Näheres dazu findet sich unter 3.3.4.

Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung am Menschen sind sog. *small molecules*, also Wirkstoffe mit niedrigem Molekulargewicht, im Fokus der Forschung. Die Kristallstruktur der interagierenden Domänen von p53 und MDM2 ist bekannt (Abb. 3-6). Es ließ sich ableiten, dass es sich dabei auf der Seite von MDM2 um eine relativ kleine hydrophobe Tasche handelt, für die das Design eines niedermolekularen Hemmstoffs möglich erscheint. Dieser Inhibitor muss die an MDM2 bindende Domäne von p53 imitieren [9].





**Abb. 3-6: Struktur des Komplexes aus MDM2 und der MDM2-Bindedomäne von p53.**

**a** zeigt die Oberfläche von MDM2 (Aminosäuren 25–109) in weiß und die Interaktionsdomäne von p53 (Aminosäuren 17–29) in grün aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Abkürzungen: N = Aminoterminus, C = Carboxyterminus.

**b** zeigt die Oberfläche von MDM2 (Aminosäuren 25–109) in gelb und die Interaktionsdomäne von p53 (Aminosäuren 17–29) in grau. Die Seitenketten dreier Aminosäuren von p53, die maßgeblich an der Interaktion mit MDM2 beteiligt sind, sind angedeutet. [20]

Im Rahmen derartiger Entwicklungstätigkeiten wurde vor wenigen Jahren am Roche-Standort Penzberg eine Substanzbibliothek mit potenziellen MDM2-Inhibitoren synthetisiert, die gegen die p53-Bindedomäne von MDM2 gerichtet waren. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden zwei Kandidaten aus dieser Bibliothek untersucht, die Ergebnisse sind unter 3.3.5 und 3.3.6 dargestellt. Es ist anzumerken, dass bei Verwendung von niedermolekularen Inhibitoren, die spezifisch die Interaktion zwischen p53 und MDM2 hemmen, keine Auswirkungen auf die p53-unabhängigen Effekte von MDM2 zu erwarten sind, während der Knock-down von MDM2 durch RNAi sämtliche biologischen Funktionen von MDM2 betreffen sollte.

## 3.2 Zytostatikabehandlung der verschiedenen Zellmodelle

### 3.2.1 Einleitung

Zytostatische und zytotoxische Chemotherapeutika gehören zu den Standardbehandlungen der meisten humanen Krebserkrankungen, über ihre Wirkung auf molekularer Ebene ist aber verhältnismäßig wenig bekannt. Zum besseren Verständnis sowohl des Wirkmechanismus als auch der Nebenwirkungen und der möglichen Gründe für das therapeutische Versagen dieser Agenzien ist es jedoch wünschenswert, möglichst detaillierte und umfassende Informationen darüber zu gewinnen, welche Prozesse in Normal- und Tumorzellen nach Substanzexposition ablaufen. Die Methode der Genexpressionsprofilierung mittels Oligonukleotidarrays eröffnet die Möglichkeit, diejenigen Effekte abzugreifen, die sich auf Transkriptionsebene niederschlagen. Dies können zum einen unmittelbare Auswirkungen der Behandlung sein, zum anderen werden aber auch sekundär responsive Gene erfasst, die erst nach einem oder mehreren Zwischenschritten, z. B. nach Aktivierung einer Signalkaskade, transkriptionell aktiviert oder reprimiert werden.

### 3.2.2 Zellmodelle

Alle verwendeten Zellsysteme sind epithelialer Natur und wachsen in Kultur adhärent und als einzellige Schicht (sog. Monolayer).

Die Zelllinie A549 stammt von einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom eines männlichen Patienten ab und besitzt ein Wildtyp-p53-Gen.

Die MCF-7-Zelllinie, welche von einem Mammaadenokarzinom abgeleitet ist, exprimiert ebenfalls Wildtyp-p53-Protein. Außerdem ist bekannt, dass sie Caspase-3-defizient ist, was vermutlich einen Mechanismus darstellt, um der durch p53 gesteuerten Apoptose zu entkommen [30].

Ebenfalls von einem Mammaadenokarzinom stammt die Zelllinie MDA-MB-231, sie exprimiert jedoch ein mutantes p53-Protein.

Die Zelllinie HT-29 hat ihren Ursprung in einem kolorektalen Adenokarzinom einer weiblichen Patientin. Aufgrund einer G→A-Mutation im Codon 273 des p53-Gens entsteht ein nicht-funktionelles p53-Protein mit einer Arg→His-Substitution, welches in sehr hoher Konzentration exprimiert wird [31].

HMECs sind humane Brustepithelzellen, die meist von gesunden Spenderinnen im Rahmen von Brustreduktionsoperationen, seltener im Rahmen von Mastektomien von Tumorpatientinnen gewonnen werden, bei denen peripheres Nichttumorgewebe oder Gewebe aus der kontralateralen Brust als Ausgangsmaterial dient. Bei den HMECs handelt es sich nicht um Primärzellen, da sie bereits mehrere Passagen in Kultur durchlaufen haben. Adäquat lassen sie sich als Zellen mit begrenzter Lebensspanne, aber längerfristigem Wachstumspotenzial unter Zellkulturbedingungen beschreiben. Die Bezeichnung „Zelllinie“ wäre allerdings irreführend, da sich diese Nomenklatur im Allgemeinen auf immortalisierte Zellen mit unbegrenzter Teilungsfähigkeit bezieht. Außerdem stammen verschiedene Chargen von HMECs von unterschiedlichen

Spenderinnen und sind somit genetisch bei weitem nicht identisch, während definierte Zelllinien stets vom selben Ursprung abgeleitet sind [32].

### 3.2.3 Zytostatika

Es wurden sechs Zytostatika aus unterschiedlichen Klassen zur Behandlung der Zellmodelle verwendet. Ihre chemischen Strukturen sind in Abb. 3-7 gezeigt.

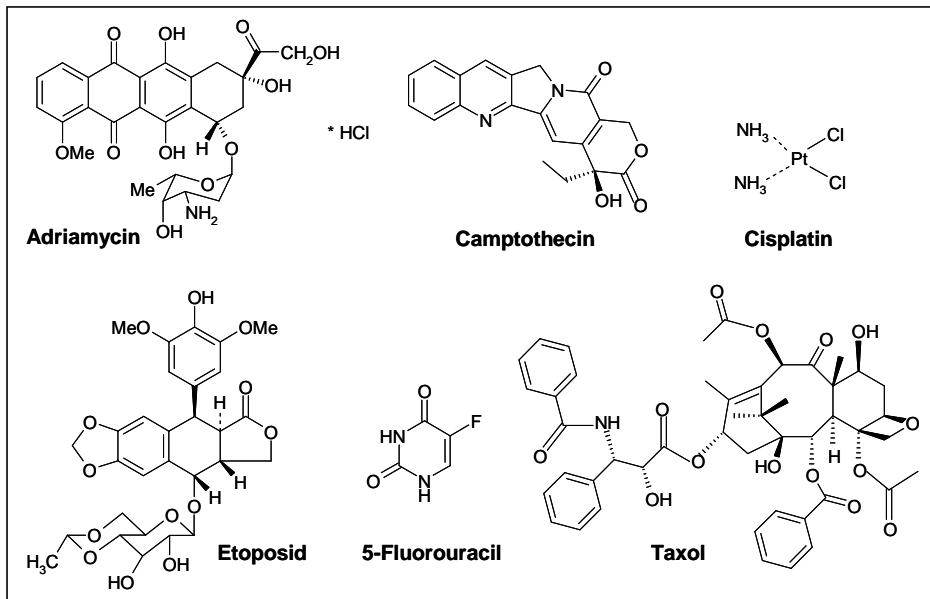


Abb. 3-7: Chemische Strukturen der Zytostatika.

In Tabellen und Abbildungen werden die Zytostatika mit folgenden Abkürzungen bezeichnet:

- Adriamycin = Adr bzw. A
- Camptothecin = Cam bzw. C
- Cisplatin = Cis bzw. P
- Etoposid = Eto bzw. E
- 5-Fluorouracil = 5FU bzw. F
- Taxol = Tax bzw. T

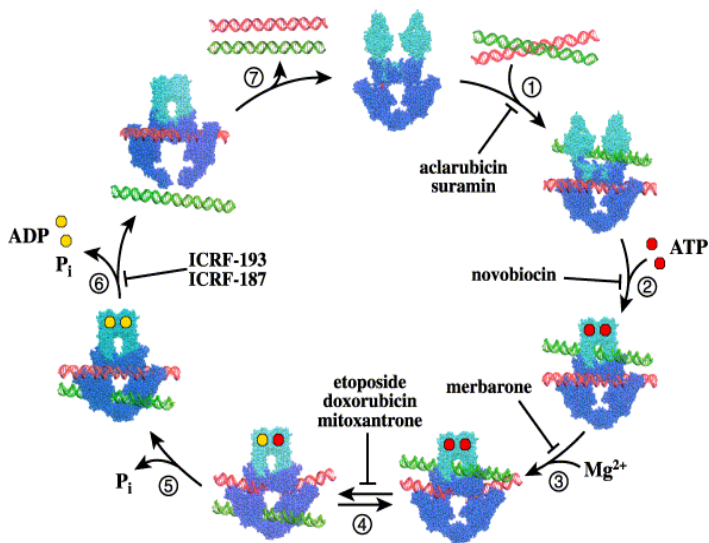
Die unbehandelten Kontrollen werden mit „Unbeh“ abgekürzt.

Im Folgenden werden die primären Wirkmechanismen dieser Agenzien und ihr klinischer Einsatz kurz vorgestellt.

#### 3.2.3.1 Adriamycin (Doxorubicin-HCl)

Das Anthrazyklin Doxorubicinhydrochlorid wird üblicherweise als Adriamycin bezeichnet, dies ist ursprünglich eigentlich ein Handelsname. Im Folgenden wird die Bezeichnung Adriamycin verwendet.

Adriamycin vermittelt seine antitumoralen Effekte durch Hemmung von Topoisomerase II-Enzymen, welche die Entspannung von überspiralisierter DNA im Rahmen von DNA-Replikation und Transkription katalysieren, wobei beide DNA-Stränge ATP-abhängig gespalten und wieder verbunden werden. Ein Intermediat dieses Prozesses ist der sog. *cleavage complex* (auch *cleavable complex*), bei dem die durchtrennten DNA-Stränge durch kovalente Bindung an das überbrückende Enzym zusammengehalten werden. Dieses Intermediat wird durch Adriamycin stabilisiert, indem es in die DNA interkaliert und einen ternären Komplex mit Topoisomerase und DNA bildet. Dies resultiert letztendlich in permanenten Doppelstrangbrüchen [33, 34]. In Abb. 3-8 ist gezeigt, an welcher Stelle Adriamycin in den katalytischen Zyklus von Topoisomerase II eingreift.



**Abb. 3-8: Der katalytische Zyklus von DNA-Topoisomerase II.**

Die ATPase-Domänen des Enzyms sind hellblau, die zentrale Domäne dunkelblau eingefärbt. Die Schritte sind im Einzelnen:

- (1) Topoisomerase II bindet an zwei doppelsträngige DNA-Segmente, das G-Segment (rot) und das T-Segment (grün).
- (2) Zwei ATP-Moleküle werden gebunden und die ATPase-Domänen dimerisieren.
- (3) Das G-Segment wird gespalten.
- (4) Das T-Segment wird durch die Spaltstelle des G-Segments transportiert, wobei ein ATP-Molekül hydrolysiert wird.
- (5) Das G-Segment wird religiert und das zweite ATP-Molekül hydrolysiert.
- (6) Nach Dissoziation der zwei ADP-Moleküle wird das T-Segment durch die Öffnung im C-terminalen Bereich des Enzyms transportiert.
- (7) Die Öffnung schließt sich und die N-terminalen ATPase-Domänen öffnen sich wieder; das Enzym kann von der DNA dissoziieren.

Adriamycin und Etoposid greifen an Schritt (4) an. Beide bilden einen stabilen ternären Komplex mit Topoisomerase und DNA. [35]

Darüber hinaus wird Adriamycin zu einem Semichinonradikal reduziert, welches zur gesteigerten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt, die insbesondere Lipidmembranen und auch DNA und RNA schädigen. Die Entstehung von ROS wird auch für die Dosis limitierende Kardiotoxizität der Anthrazykline verantwortlich gemacht [36, 37].

Die Anwendung von Adriamycin in der Krebstherapie erstreckt sich auf verschiedene Tumorarten, u. a. dient es zur Behandlung von Mamma-, Bronchial- und Prostatakarzinomen und von Lymphomen und Leukämien [37]. Wie auch alle weiteren Zytostatika kommen Anthrazykline fast ausschließlich in Kombination mit anderen antitumoralen Wirkstoffen zum Einsatz.

### 3.2.3.2 Camptothecin

Camptothecin selbst wird nicht klinisch angewendet, jedoch seine wasserlöslichen Derivate Topotecan und Irinotecan. Topotecan wird u. a. bei Ovarialkarzinomen und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) eingesetzt, Irinotecan, welches selbst ein Prodrug des aktiven Metaboliten SN-38 darstellt, bei fortgeschrittenen Kolorektaltumoren [38, 39]. Camptothecine stabilisieren ebenfalls einen *cleavage complex*, allerdings enthält dieser das Enzym Topoisomerase I, welches nur einen DNA-Strang durchtrennt. Auch Topo-

isomerase I ist für die Relaxation verdrehter DNA-Stränge während Replikation und Transkription zuständig. Man vermutet, dass bei Kollision von Replikationsgabeln mit dem stabilisierten DNA-Topoisomerase-I-Komplex der bereits vorhandene Einzelstrang- in einen Doppelstrangbruch verwandelt wird [17, 39].

### 3.2.3.3 Cisplatin

Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II)) ist ein direkt genotoxisches Zytostatikum, das DNA-Addukte ausbildet. Häufig wird es der Substanzklasse der Alkylanzien zugeordnet, wobei dies aus chemischer Sicht nicht ganz korrekt ist. Nach dem Eintritt in die Zelle werden die Chloridliganden am zentralen Platin-Ion durch Wassermoleküle ersetzt. Der entstehende positiv geladene Komplex unterliegt nukleophilen Angriffen, insbesondere von der N7-Position der Purinbasen Guanin und Adenin. Infolgedessen werden zunächst monofunktionale Addukte gebildet, die mit weiteren DNA-Basen reagieren können und dadurch *Cross links*, also Querverbindungen, innerhalb eines DNA-Strangs oder zwischen verschiedenen Strängen erzeugen können. Diese Addukte sind schematisch in Abb. 3-9 gezeigt.

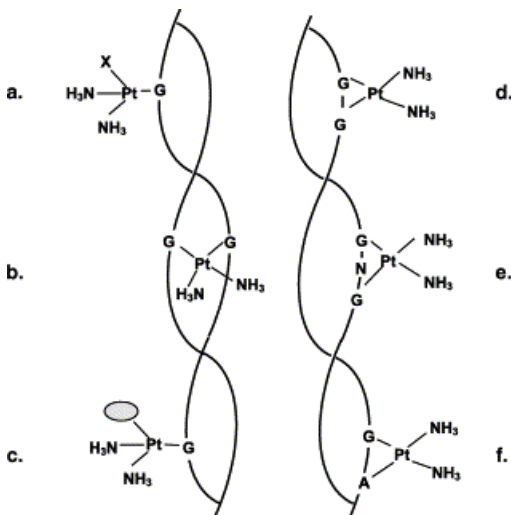


Abb. 3-9: *Cross links* innerhalb von oder zwischen DNA-Strängen durch Addukt-bildung von Cisplatin mit DNA-Basen. [40]

Cisplatin kommt unter anderem in der Therapie von kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC, NSCLC), Prostata-, Blasen-, Hoden-, Magen-Darm- und Ovarialtumoren zum Einsatz [41].

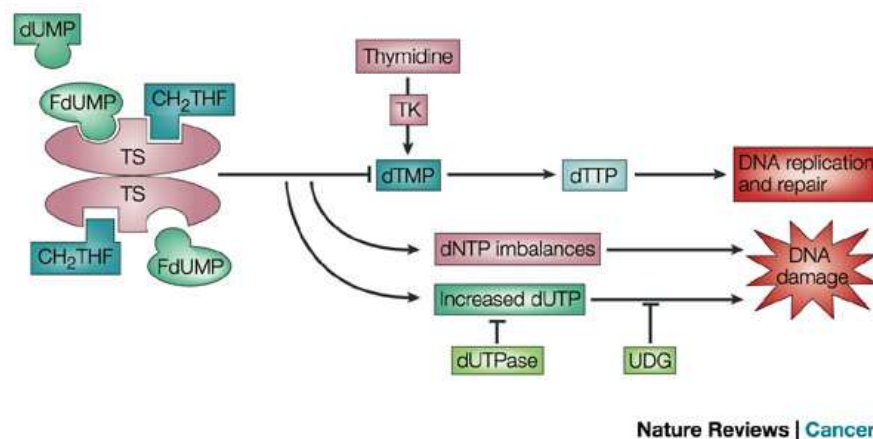
### 3.2.3.4 Etoposid

Etoposid wird auch als VP16 bezeichnet und gehört zu den Epipodophyllotoxinen. Auch Etoposid inhibiert wie Adriamycin die Topoisomerase II durch Stabilisierung des *cleavage complex* (Abb. 3-8), interkaliert jedoch nicht in die DNA-Helix.

Etoposid wird klinisch beispielweise in der Therapie von Hodentumoren, kleinzelligen Lungenkarzinomen und verschiedenen Sarkomen verwendet [37, 42].

### 3.2.3.5 5-Fluorouracil

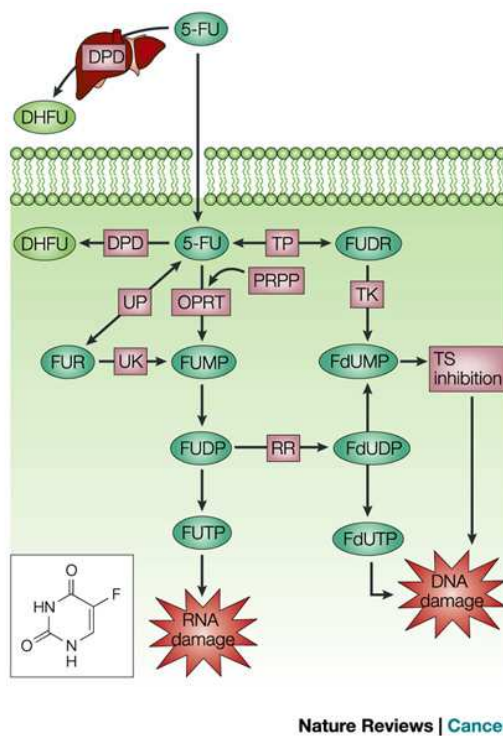
5-Fluorouracil, häufig kurz als 5-FU bezeichnet, gehört zur Substanzklasse der Antimetabolite. Es ist strukturell den natürlichen Basen Uracil und Thymin sehr ähnlich, was dazu führt, dass es in der Zelle zu den entsprechenden Nukleosidmonophosphaten FdUMP und FUMP metabolisiert wird. FdUMP wird von dem Enzym Thymidylatsynthase (TS), das normalerweise die Umwandlung von dUMP in dTMP katalysiert, fälschlicherweise als Substrat erkannt. Da die Übertragung der Methylgruppe auf das C5-Atom des Pyrimidinrings aufgrund der Fluorsubstitution nicht möglich ist, kommt es zur Hemmung von TS und in der Folge zu einer Verarmung der Zelle an dTMP und dTTP und einer Akkumulation von dUTP. Dieses Ungleichgewicht resultiert letztlich im sog. thyminlosen Tod (*thymineless death*), da DNA-Replikation und -Reparatur gehemmt werden und durch Fehleinbau von dUTP und wiederholte UDG-(Uracil-DNA-Glykosylase-)vermittelte Exzision DNA-Strangbrüche entstehen. Abb. 3-10 zeigt die Inhibition von TS und die resultierenden Effekte schematisch.



**Abb. 3-10: Inhibition von Thymidylatsynthase durch 5-FU.**

FdUMP kompetiert mit dUMP um die Bindung an TS und bildet mit dem Enzym und dem Methylendonor CH<sub>2</sub>THF (5,10-Methylen tetrahydrofolsäure) einen ternären Komplex. Dadurch wird die Synthese von dTMP unterbunden und es kommt zu einem Ungleichgewicht in der Zusammensetzung des zellulären dNTP-Pools und zur Anreicherung von dUTP, wodurch DNA-Schäden entstehen. Das Ausmaß dieser Schäden hängt vom Enzymspiegel von dUTPase und UDG ab. dTMP kann in Form eines sog. *salvage pathways* aus Thymidin gebildet werden, diese Reaktion wird durch TK (Thymidinkinase) katalysiert. [43]

Abgesehen von diesem TS-abhängigen Mechanismus schädigt 5-FU die Zelle noch auf weiteren Wegen. So kann sein Metabolit FdUTP in die DNA eingebaut werden, was zu Basenfehlpaarungen und zu Strangbrüchen infolge der Aktivierung von Reparaturenzymen unter gleichzeitigem Mangel an dTTP führen kann. Außerdem kann FUTP in sämtliche RNA-Spezies inkorporiert werden und mit deren Prozessierung und Funktion interferieren [43, 44]. Abb. 3-11 gibt eine Übersicht über den Metabolismus von 5-FU.



**Abb. 3-11: Metabolismus von 5-FU.**

**5-FU-Metaboliten:** DHFU = Dihydrofluorouracil, FdUDP = Fluorodesoxyuridindiphosphat, FdUMP = Fluorodesoxyuridinmonophosphat, FdUTP = Fluorodesoxyuridintriphosphat, FUDP = Fluorouridindiphosphat, FUDR = Fluorodesoxyuridin, FUMP = Fluorouridinmonophosphat, FUR = Fluorouridin, FUTP = Fluorouridintriphosphat

**Enzyme:** DPD = Dihydropyrimidindehydrogenase, OPRT = Orotatphosphoribosyltransferase, RR = Ribonukleotidreduktase, TK = Thymidinkinase, TP = Thymidinphosphorylase, UK = Uridinkinase, UP = Uridinphosphorylase;

Kofaktor PRPP = Phosphoribosylpyrophosphat. [43]

5-FU wird u. a. für die Therapie von Darm-, Brust- und Lungentumoren eingesetzt. Die höchsten Ansprechraten lassen sich bei kolorektalen Tumoren erzielen, wo 5-FU meist in Kombination mit Irinotecan und/oder Oxaliplatin zur Anwendung kommt. Außerdem wird 5-FU in aller Regel mit Leucovorin kombiniert, da dieses die Ansprechrate für 5-FU erhöht. Leucovorin ist identisch mit Calciumfolinat und gelangt über den Folattransporter in die Zelle. Dort wird es zu  $\text{CH}_2\text{-THF}$  (5,10-Methylentetrahydrofolsäure) verstoffwechselt, welches zur Polyglutamatform konjugiert wird und in der Zelle akkumuliert.  $\text{CH}_2\text{-THF}$  dient normalerweise als Methylgruppendonor für die Umwandlung von dUMP in dTMP und stabilisiert die Bindung von FdUMP an TS in Form eines ternären Komplexes [43, 45].

### 3.2.3.6 Taxol (Paclitaxel)

Das Taxan Paclitaxel findet sich häufig vereinfacht unter der Bezeichnung „Taxol“, die eigentlich den Handelsnamen eines Paclitaxelpräparates darstellt. Diese Bezeichnung wird im Folgenden übernommen.

Taxol gehört zu den Mikrotubuligiften und hemmt die Depolymerisation von Tubulinfasern. Mikrotubuli sind zytoskelettale Fasern, die hauptsächlich aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulinen aufgebaut sind. Sie sind hochdynamisch und spielen eine essenzielle Rolle bei der Regulation von Zellform und Motilität, bei Signalübertragungsprozessen, beim Transport von Vesikeln und Organellen und im Rahmen der Zellteilung, während der sie den mitotischen Spindelapparat erzeugen. Indem Taxol die Depolymerisation der Spindelfasern inhibiert, verhindert es die Trennung der Schwesterchromatiden und blockiert die Mitose am Übergang von der Meta- in die Anaphase [17, 46]. Dadurch kann es zum Zellzyklusarrest, zu aberranten Mitosen (sog. mitotische Katastrophe) oder zur Apoptose kommen [47]. Zudem gibt es zahlreiche Befunde, dass Taxol weitere



Effekte ausübt, die über die reine Mikrotubulihemmung hinausgehen, u. a. wurde die gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die Phosphorylierung von BCL2 und die Induktion internukleosomaler DNA-Fragmentierung nach Taxolexposition beschrieben [48-52].

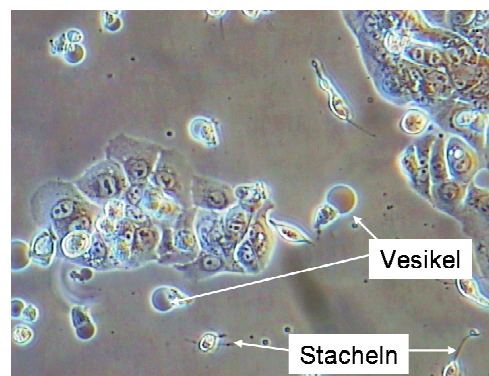
In der Klinik wird Taxol bevorzugt bei der Behandlung von Ovarial- und Mammakarzinomen, aber auch von Tumoren des Bronchialsystems eingesetzt.

### 3.2.4 Zytotoxizitätstests zur Ermittlung der IC80-Werte

Die für die Behandlung der Zellen eingesetzten Zytostatikakonzentrationen müssen standardisiert werden, um Effekte in ähnlichen Größenordnungen zu erzeugen und so deren Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Deshalb wurden Zytotoxizitätstests mit dem WST-1-Reagenz durchgeführt und aus den resultierenden Inhibitionskurven die IC80-Werte abgeleitet (vgl. 2.5.3).

Aus Vorversuchen ergab sich, dass die Tumorzelllinien nicht unmittelbar, sondern erst nach einigen Tagen Substanzexposition eine deutliche Wachstumsinhibition in Verbindung mit Anzeichen apoptotischer Prozesse zeigen. Erhöht man die Konzentration, sind zwar schon früher Proliferationshemmung und Zelltod zu beobachten, es fehlen dann aber die charakteristischen phänotypischen Merkmale der Apoptose wie Kondensation des Nukleus, Entstehung membrangebundener Vesikel (*apoptotic bodies*) usw., was eher auf nekrotischen Zelltod hindeutet. Für die Untersuchung der molekularen Effekte von Zytostatika interessierten jedoch primär apoptotische Wirkungen, da Tumorzellen im menschlichen Körper auf Krebstherapeutika in klinisch relevanten Konzentrationen vorwiegend mit dieser Form des Zelltods reagieren [53-55].

Abb. 3-12 zeigt eine Aufnahme von HT-29-Zellen, die infolge der Behandlung mit Etoposid in Apoptose gehen.



**Abb. 3-12: Apoptotische Merkmale nach Zytostatikabehandlung.**

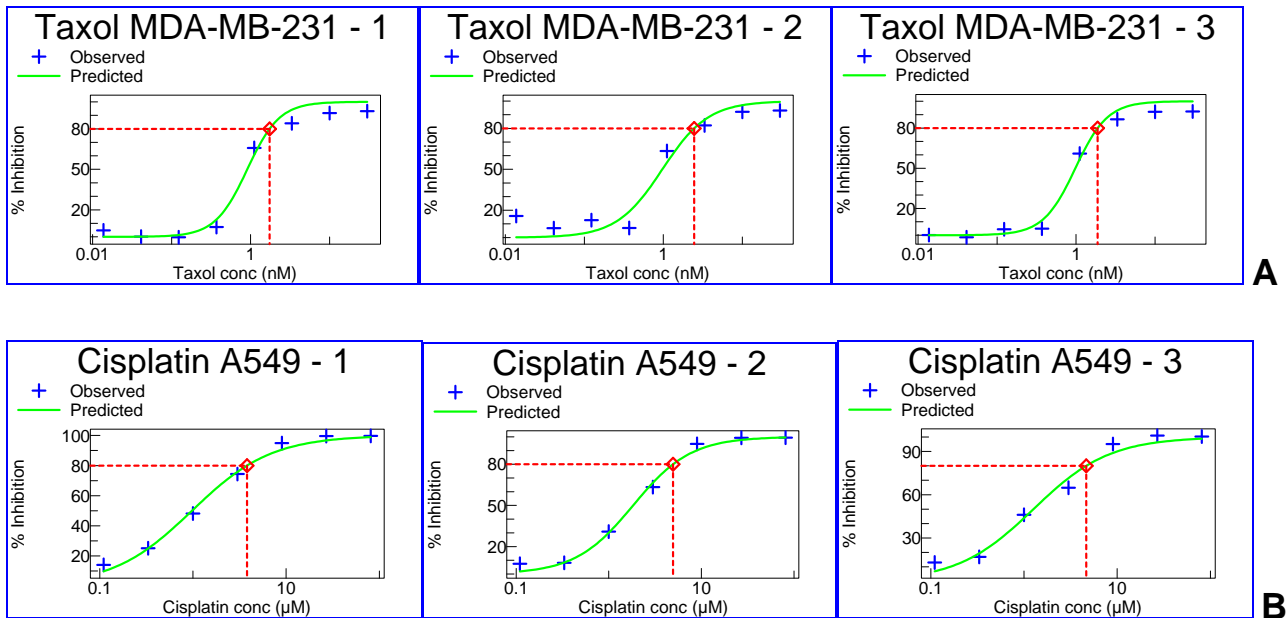
HT-29-Zellen nach dreitägiger Behandlung mit 1,1  $\mu\text{M}$  Etoposid, fotografiert in 200facher Vergrößerung. Es ist das typische *membrane blebbing*, also die Entstehung membrangebundener Vesikel, zu erkennen, ebenso beginnen sich stachelförmige Fortsätze (*Spikes*) zu bilden.

Der WST-1-Test erfasst allerdings ganz allgemein zytotoxische Effekte, da er auf die metabolische Aktivität der Mitochondrien abstellt. Es ist bekannt, dass diese Testmethode erst in den späteren Stadien der Apoptose anspricht und somit deren Ausmaß möglicherweise zunächst unterschätzt wird. Dies liegt daran, dass die Apoptose selbst ein aktiver Prozess ist und die metabolische Aktivität der Zelle erfordert [56]. Aus die-



sen Gründen wurde die verhältnismäßig lange Expositionsdauer von fünf Tagen für die IC80-Bestimmungen gewählt.

Beispielhaft sind jeweils drei Inhibitionskurven für Taxol in MDA-MB231-Zellen und für Cisplatin in A549-Zellen ausgewählt, die jeweils in unabhängigen Versuchsansätzen erstellt wurden (Abb. 3-13).



**Abb. 3-13: Inhibitionskurven aus WST-1-Tests.**

Mit Hilfe von XLfit 3 generierte Inhibitionskurven aus Daten dreier unabhängiger WST-1-Tests nach 5-tägiger Zytostatikabehandlung.

**A:** Inhibitionskurven von Taxol in MDA-MB-231-Zellen. **B:** Inhibitionskurven von Cisplatin in A549-Zellen.

In Tab. 3-1 sind die gemittelten Ergebnisse der IC80-Bestimmungen angegeben.

Zellmodell	Adriamycin (nM)	Camptothecin (nM)	Cisplatin ( $\mu\text{M}$ )	Etoposid ( $\mu\text{M}$ )	5-FU ( $\mu\text{M}$ )	Taxol (nM)
A549	285 $\pm$ 55	31,4 $\pm$ 9,0	4,47 $\pm$ 0,60	7,14 $\pm$ 3,35	11,4 $\pm$ 4,8	3,43 $\pm$ 0,93
HT-29	78,6 $\pm$ 12,2	3,79 $\pm$ 1,99	1,26 $\pm$ 0,54	1,11 $\pm$ 0,23	3,11 $\pm$ 1,77	1,91 $\pm$ 0,30
MCF-7	60,7 $\pm$ 14,9	13,9 $\pm$ 3,2	2,75 $\pm$ 0,88	0,933 $\pm$ 0,503	3,78 $\pm$ 0,02	1,88 $\pm$ 0,77
MDA-MB-231	161 $\pm$ 16	33,6 $\pm$ 3,1	5,25 $\pm$ 0,60	1,75 $\pm$ 0,13	66,9 $\pm$ 14,9	2,02 $\pm$ 0,38

**Tab. 3-1: Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Bestimmungen der IC80,  $\pm$  Standardabweichung.**

Wie den Standardabweichungen zu entnehmen ist, traten zum Teil recht ausgeprägte Variationen bei der Ermittlung der IC80-Werte auf. Hierfür dürften gewisse Unterschiede zwischen den unabhängig durchgeführten Experimenten verantwortlich sein. Insbesondere die Zelldichte zum Zeitpunkt der Substanzzugabe scheint ein kritischer Parameter zu sein und unterliegt Schwankungen, da die Zellzahlbestimmung verhältnismäßig ungenau ist und die Aussaat aufgrund der langen Experimentdauer bei sehr niedrigen Zellzahlen erfolgen musste, was die Variabilität noch weiter erhöhte.

Die IC80-Konzentrationen wurden für alle im Folgenden beschriebenen Experimente verwendet. Für das HMEC-Zellmodell wurden die für MCF-7-Zellen ermittelten IC80-Werte eingesetzt, beruhend auf der

Grundannahme, dass gesunde Brustepithelzellen im Körper des Patienten denselben Konzentrationen ausgesetzt sind wie Tumorzellen. Darüber hinaus erwiesen sich Zytotoxizitätsbestimmungen mit den HMECs als sehr schwierig, da diese – wie unter 2.5.2 beschrieben – eine aufwändige Kultivierung mit häufigen Medienwechseln für ihr optimales Wachstum benötigen. Dies ließ sich in den für WST-1-Tests erforderlichen Multiwellplatten nur schwer bewerkstelligen. Initiale Versuche lieferten kaum interpretierbare Ergebnisse, sodass diese Bestimmungen nicht fortgeführt wurden.

### 3.2.5 Beurteilung der Zellmorphologie nach Zytostatikaexposition

Für die unter 3.2.7 ff. beschriebene Genexpressionsanalyse wurden die verschiedenen Zellmodelle je 24 und 72 h lang mit den Zytostatika behandelt. Im Verlauf der Behandlung wurden sie wiederholt lichtmikroskopisch inspiziert und, sofern Veränderungen erkennbar waren, fotografiert.

Nach 24 h Zytostatikaexposition waren bei allen verwendeten Zelltypen entweder keine oder nur schwach ausgeprägte morphologische Effekte sichtbar. Im weiteren Behandlungsverlauf traten dann Veränderungen auf, die von Zellvergrößerung bis hin zu Merkmalen beginnender Apoptose reichten.

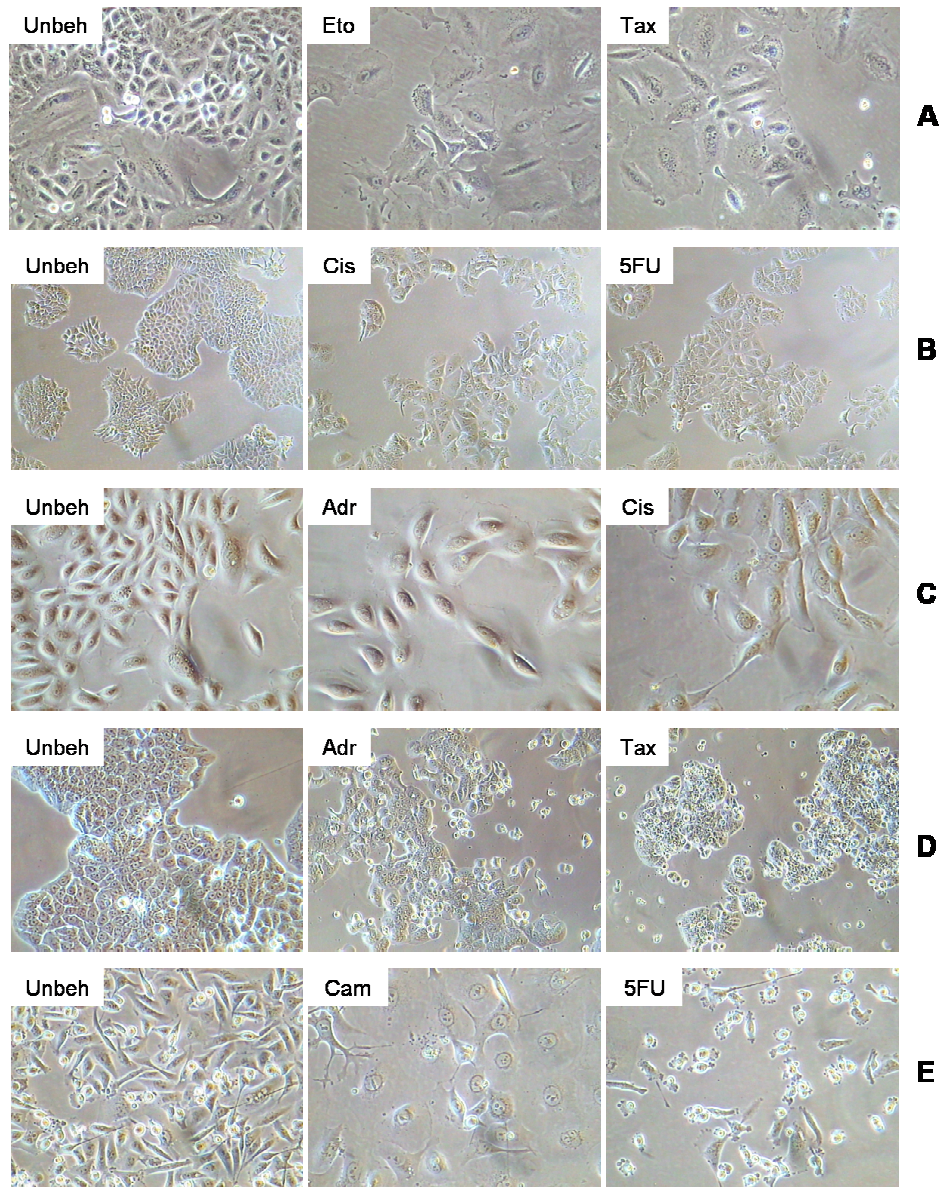
Eine Übersicht über die beobachteten Auswirkungen der verschiedenen Zytostatika auf die Morphologie der Zellmodelle findet sich in Tab. 3-2.

	A549		MCF-7		HMEC		HT-29		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
<b>Adr</b>	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓, Zellgröße ↑	--	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑	--	Zellen abgeflacht, Apoptose	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑↑
<b>Cam</b>	Zellgröße ↑↑	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑	--	Zellen abgeflacht, Zellgröße ↑, (Apoptose)	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑↑
<b>Cis</b>	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑	--	Zellgröße ↑	--	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑↑
<b>Eto</b>	Zellgröße ↑↑	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓↓, Zellgröße ↑↑	--	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑	--	Zellen abgeflacht, Apoptose	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓↓, Zellgröße ↑↑↑
<b>5-FU</b>	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓↓, Zell-Substrat-Adhäsion ↓↓	--	Zellzahl ↓, Zellgröße ↑	--	Zellzahl ↓↓	--	Zellen abgeflacht, Zellgröße ↑	--	Zellzahl ↓↓↓, Zell-Substrat-Adhäsion ↓↓
<b>Tax</b>	Zellgröße ↑	Zellzahl ↓↓↓, mehrkernige Zellen	--	Zellzahl ↓, Zell-Zell-Adhäsion ↓	--	Zellzahl ↓↓	--	viele abgelöste Zellen	--	Zellzahl ↓↓

**Tab. 3-2: Auswirkungen der Zytostatika auf die Morphologie der behandelten Zellarten.**

Bedeutung der Symbole: ↑ = leicht vergrößert, ↑↑ = vergrößert, ↑↑↑ = stark vergrößert, ↓ = leicht verringert, ↓↓ = verringert, ↓↓↓ = stark verringert; (Apoptose) = wenige apoptotische Zellen.

Einige charakteristische Beispiele sind in Abb. 3-14 gezeigt.



**Abb. 3-14: Zellmorphologie nach 72 h Zytostatikabehandlung (Beispiele).**

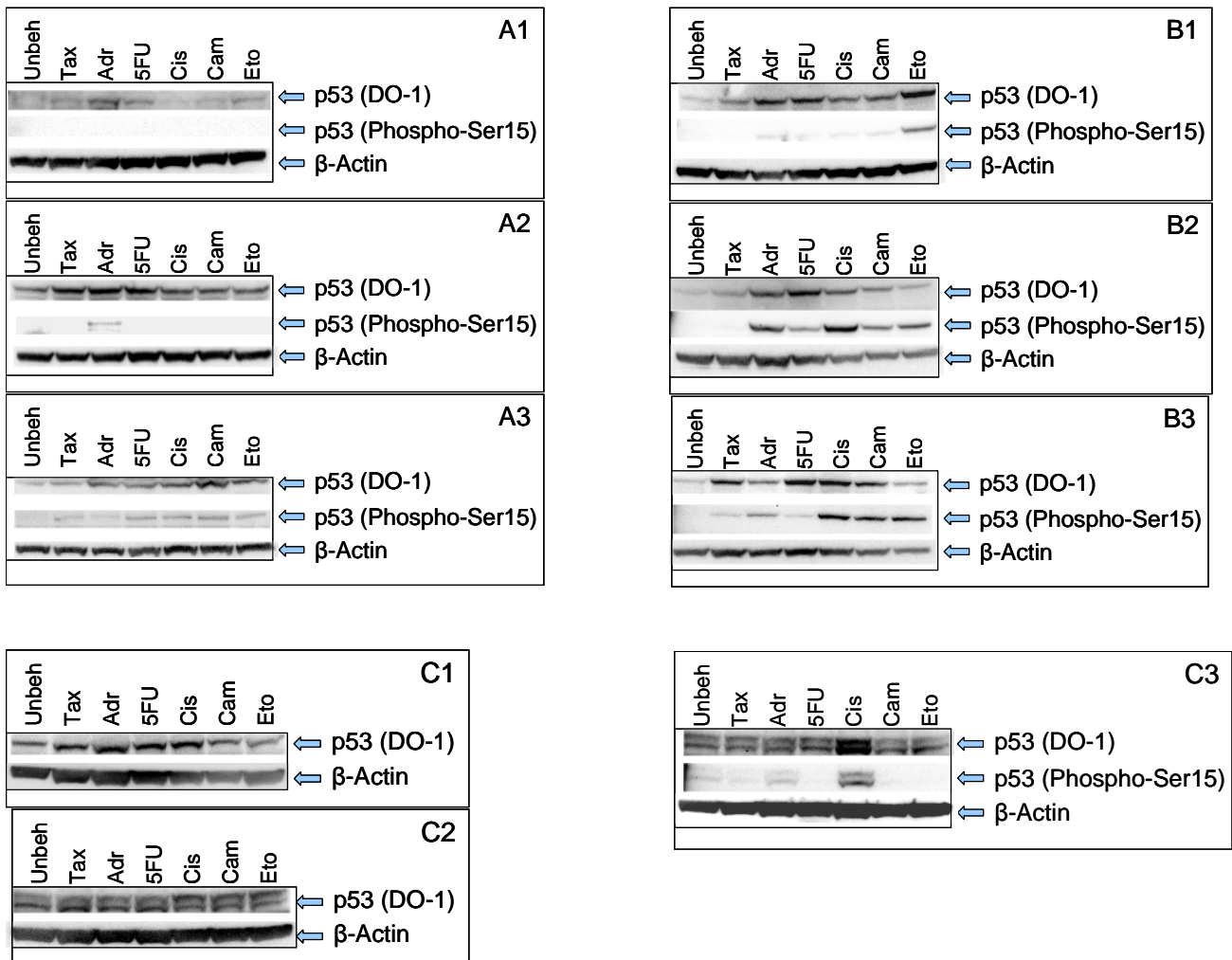
**A:** A549-Zellen (200fache Vergrößerung), **B:** MCF-7-Zellen (100fache Vergrößerung), **C:** HMEC-Zellen (200fache Vergrößerung), **D:** HT-29-Zellen (200fache Vergrößerung), **E:** MDA-MB-231-Zellen (200fache Vergrößerung).

Den Angaben in Tab. 3-2 und den Fotografien ist zu entnehmen, dass sich die phänotypischen Effekte von Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid häufig innerhalb eines Zellsystems stark ähnelten. Taxol und ganz besonders 5-FU hingegen wichen von den übrigen Substanzen ab: Sie führten in geringerem Ausmaß zu Zellvergrößerung und schienen teilweise die Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion zu beeinflussen.

### 3.2.6 Western Blot zum Nachweis von p53 nach Zytostatikabehandlung

Aufgrund der zentralen Bedeutung, die dem Tumorsuppressor p53 bei der zellulären Antwort auf eine Behandlung mit Zytostatika zugeschrieben wird, war es von Interesse, eine mögliche Veränderung in der

Menge des p53-Proteins und seines Phosphorylierungszustands nachzuweisen. Deshalb wurden die Wildtyp-p53-Zellen A549, MCF-7 und HMEC mit den IC80-Konzentrationen der Zytostatika behandelt und jeweils nach 6, 24 und 72 h geerntet.



**Abb. 3-15: Western Blots zum Nachweis von p53-Gesamtprotein und an Ser15 phosphoryliertem p53.**

Nach Zytostatikabehandlung wurde das p53-Gesamtprotein im Lysat mit dem Antikörper DO-1 und an Ser15 phosphoryliertes p53 mit dem Antikörper Phospho-p53 (Ser15) detektiert. β-Actin diente als Ladekontrolle. Die Membran wurde zwischen den Inkubationsschritten gestrippt.

**A:** Lysate aus A549-Zellen, gewonnen nach 6 (**A1**), 24 (**A2**) und 72 h (**A3**); die Gesamtproteinmenge betrug 70, 65 und 40 µg.

**B:** Lysate aus MCF-7-Zellen, gewonnen nach 6 (**B1**), 24 (**B2**) und 72 h (**B3**); die Gesamtproteinmenge betrug 70, 70 und 60 µg.

**C:** Lysate aus HMEC-Zellen, gewonnen nach 6 (**C1**), 24 (**C2**) und 72 h (**C3**); die Gesamtproteinmenge betrug 70, 90 und 90 µg. Die Phosphorylierung an Ser15 wurde hier nur nach 72 h überprüft.

Die Lysate wurden durch Gelelektrophorese und nachfolgenden Western Blot analysiert, wobei zur Detektion zunächst der p53-Antikörper Phospho-p53 (Ser15) verwendet und nach Strippen der Membran mit dem Antikörper DO-1 reinkubiert wurde. Phospho-p53 (Ser15) erkennt spezifisch die Phosphorylierung von p53 am Serinrest 15. Diese ist eine typischerweise durch genotoxischen Stress ausgelöste posttranslationale Modifikation des p53-Proteins, die u. a. durch die Kinasen ATM und ATR (*ataxia telangiectasia and*

*Rad3 related*) vermittelt werden kann [6, 19, 57]. Die Phosphorylierung an Ser15 wird meist mit einer Störung der Interaktionsfähigkeit von p53 mit MDM2 oder mit transkriptionellen Kofaktoren in Verbindung gebracht [9, 57]. DO-1 hingegen bindet unabhängig vom Phosphorylierungsstatus sowohl an Wildtyp- als auch an mutantes p53-Protein. Abb. 3-15 zeigt die Ergebnisse der Western Blots mit diesen beiden Antikörpern.

In A549-Zellen war die Gesamtmenge von p53 nach 6 h durch Adriamycin, 5-FU und Etoposid bereits leicht erhöht, eine Phosphorylierung konnte noch nicht detektiert werden. Zum 24 h-Zeitpunkt war p53 durch alle Zytostatika induziert, am stärksten durch Taxol, Adriamycin und 5-FU. Beim Adriamycin-Lysat war eine schwache Phosphorylierungsbande zu erkennen. Die Banden des 72 h-Blots sind insgesamt schwächer, da die Zytostatika nach dieser Behandlungsdauer schon ausgeprägte toxische Wirkungen auf die Zellen hatten und deshalb nur Lysate mit geringer Konzentration gewonnen und entsprechende niedrige Proteinmengen aufgetragen werden konnten. Dennoch lässt sich eine Induktion von Gesamtprotein und phosphoryliertem p53 bei fast allen Proben feststellen.

In MCF-7-Zellen war bereits nach 6 h eine Induktion von p53 durch alle Zytostatika zu beobachten, am stärksten durch Etoposid. Dieses führte auch bereits zu diesem Zeitpunkt zu einer deutlichen Phosphorylierung an Ser15. Nach 24 h sind die p53-Banden bei Adriamycin und 5-FU am ausgeprägtesten, bei Vergleich mit der  $\beta$ -Actin-Kontrolle wird aber deutlich, dass in den Spuren auf der rechten Seite einschließlich der Etoposid-Probe weniger Gesamtprotein aufgetragen worden war. Eine Phosphorylierung ist nach 24 h bei allen zytostatikabehandelten Proben mit Ausnahme von Taxol zu beobachten. Nach 72 h ist dann auch bei Taxol eine schwache Phospho-p53-Bande zu erkennen.

Bei HMEC-Zellen ist nach 6 h allenfalls eine leichte Induktion der p53-Menge durch die Zytostatika festzustellen (vgl.  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle). Nach 24 und 72 h entstand eine Doppelbande, deren Intensität nach 72 h durch Cisplatin massiv verstärkt wurde, durch die anderen Zytostatika im Vergleich zur Kontrolle jedoch kaum. Der Phosphorylierungszustand wurde nur in den 72 h-Lysaten überprüft, hier war bei Adriamycin eine schwache, bei Cisplatin eine deutliche Doppelbande zu erkennen. Allerdings ist auch beim unbehandelten Kontrolllysate eine schwache Bande zu sehen.

Diese Ergebnisse bestätigen insgesamt, dass p53 durch Zytostatikabehandlung induziert und phosphoryliert wird. Die Kinetik und das Ausmaß seiner Aktivierung scheinen aber von der jeweiligen Substanz und dem Zellsystem abzuhängen.

### 3.2.7 Genexpressionsanalyse nach Zytostatikaexposition – zahlenmäßige Betrachtung

Um sowohl verhältnismäßig frühe als auch verzögerte Wirkungen der verschiedenen Zytostatika untersuchen zu können, wurden nach jeweils 24 und 72 h Behandlung die Genexpressionsprofile der verschiedenen Zellmodelle aufgenommen. Parallel wurden unbehandelte Zellen kultiviert, deren Genexpressionsmuster als Vergleichsgrundlage diente. Alle Behandlungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

#### 3.2.7.1 Gesamtübersicht

Tab. 3-3 gibt eine Übersicht über die Anzahl differenziell regulierter Gene<sup>7</sup> für sämtliche Kombinationen aus Zellmodell, Zytostatikum und Behandlungsdauer.

	A549		MCF-7		HMEC		HT-29		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
<b>Adr</b>	133↑ 207↓	330↑ 447↓	29↑ 35↓	272↑ 819↓	5↑ 3↓	187↑ 359↓	0↑ 0↓	210↑ 213↓	11↑ 48↓	148↑ 435↓
<b>Cam</b>	218↑ 137↓	367↑ 369↓	51↑ 19↓	229↑ 589↓	5↑ 10↓	131↑ 113↓	3↑ 2↓	109↑ 124↓	28↑ 100↓	307↑ 341↓
<b>Cis</b>	88↑ 31↓	347↑ 354↓	38↑ 20↓	305↑ 579↓	10↑ 54↓	302↑ 386↓	3↑ 0↓	159↑ 125↓	2↑ 45↓	156↑ 242↓
<b>Eto</b>	124↑ 534↓	307↑ 351↓	65↑ 74↓	201↑ 503↓	1↑ 21↓	98↑ 145↓	0↑ 0↓	229↑ 157↓	2↑ 26↓	241↑ 262↓
<b>5-FU</b>	288↑ 107↓	513↑ 373↓	39↑ 21↓	115↑ 248↓	0↑ 1↓	153↑ 315↓	52↑ 13↓	153↑ 222↓	4↑ 115↓	279↑ 412↓
<b>Tax</b>	26↑ 33↓	236↑ 302↓	34↑ 18↓	83↑ 84↓	1↑ 2↓	167↑ 117↓	10↑ 0↓	354↑ 218↓	0↑ 22↓	61↑ 125↓

Tab. 3-3: Anzahl der nach 24 bzw. 72 h Zytostatikabehandlung in den verschiedenen Zellmodellen deregulierten Gene

Symbole: ↑ = hochreguliert, ↓ = herabreguliert.

Bei dieser rein zahlenmäßigen Betrachtung fallen bereits einige Punkte auf. So waren in HMEC- und HT-29-Zellen nach 24 h Behandlung nur sehr wenige Gene differenziell exprimiert, während die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 zu diesem Zeitpunkt schon gewisse und A549 ausgeprägte Änderungen zeigten. Nach 72 h lag die Anzahl deregulierter Gene dann aber bei allen Zellsystemen in etwa der gleichen Größenordnung. Daran ist abzulesen, dass die Zellmodelle offenbar unterschiedlich schnell auf die Zytostatikaexposition reagiert haben.

Darüber hinaus macht die Übersicht deutlich, dass für ein bestimmtes Zellsystem und eine feste Behandlungsdauer die Anzahl der pro Zytostatikum betroffenen Gene in vielen Fällen ähnlich ist. Es gab aber auch Abweichungen, wie z. B. eine signifikante Zahl in HT-29-Zellen nach 24 h 5-FU-Behandlung deregulierter Gene, während die anderen Substanzen hier noch nahezu wirkungslos waren, oder eine relativ geringe Zahl durch Taxol veränderter Gene in MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen nach 72 h. In Anbetracht der Tat-

<sup>7</sup> Die Bezeichnung von Genen als „differenziell reguliert“, „differenziell exprimiert“, „dereguliert“ o.ä. bedeutet im Folgenden, dass die Standardfilterkriterien (siehe 2.7.4.3) erfüllt wurden. Wenn von „induzierten“ oder „hochregulierten“ bzw. „reprimierten“ oder „herabregulierten“ Genen die Rede ist, so ist stets eine Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen gemeint. Unter der Zahl von „Genen“ ist die Zahl von GeneIDs zu verstehen, die aus der Zuordnung der Probe Sets auf dem Affymetrix-Chip zu Einträgen in Entrez Gene abgeleitet wurden. Würde man die Anzahl differenziell exprimierter Gene in Form von Affymetrix-Probe Set IDs angeben, wäre diese in den meisten Fällen höher, da manche Transkripte mehrfach auf dem Chip repräsentiert sind und mehrere oder alle zugehörigen Probe Sets eine veränderte Expression anzeigen können.



sache, dass die zur Behandlung verwendeten Zytostatikakonzentrationen auf einen äquivalenten proliferationshemmenden Effekt standardisiert worden waren, ist dieser Befund etwas überraschend. Es ist anzunehmen, dass ein gewisser Teil dieser „Ausreißer“ auf die oben beschriebene Ungenauigkeit der IC80-Bestimmungen zurückzuführen ist, jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass bestimmte Substanzen in einem oder mehreren Zellmodellen geringere Änderungen auf Expressionsebene hervorrufen und dennoch den gleichen Effekt auf die Zellproliferation ausüben (s. hierzu 3.2.9.1). Außerdem wurde der WST-1-Test nach 120 h Behandlung durchgeführt und es ist denkbar, dass die zelluläre Reaktion auf die verschiedenen Zytostatika mit unterschiedlicher Kinetik abläuft, sodass nach 72 h das Ausmaß der Wirkungen noch variiert, sich aber nach 120 h angleicht. Für Taxol lässt sich als generelle Tendenz ablesen, dass häufig weniger Gene betroffen sind als mit den anderen Substanzen, dies trifft allerdings nicht auf die 72 h-Behandlung von HT-29- und HMEC-Zellen zu.

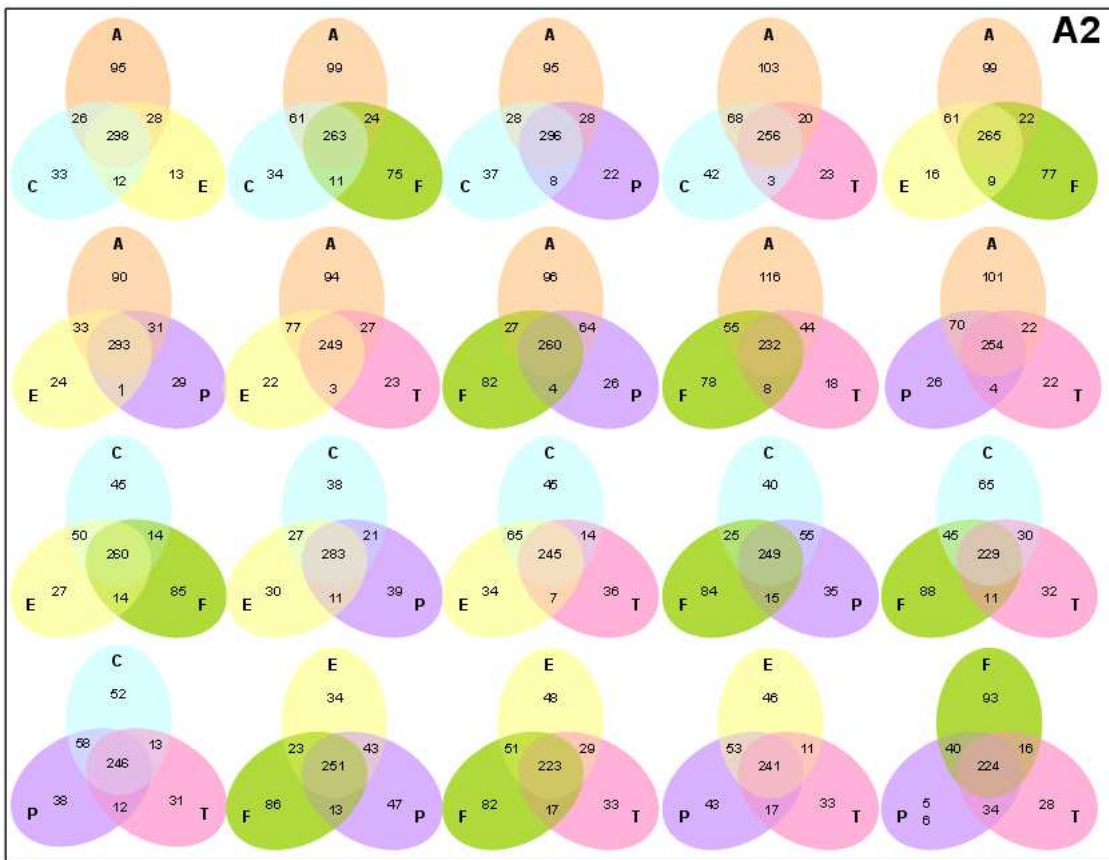
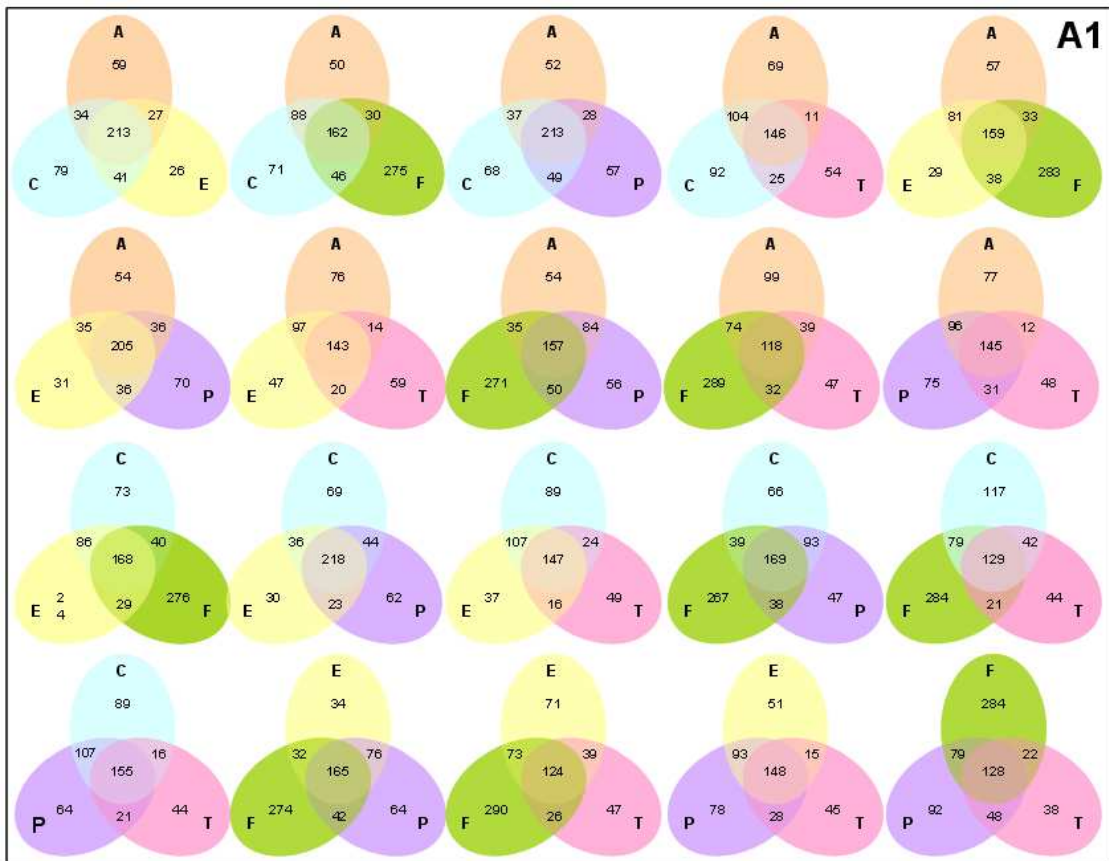
### 3.2.7.2 Vergleich der Zytostatikawirkungen innerhalb der Zellsysteme

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Zytostatika innerhalb der Zellmodelle miteinander verglichen, um zu evaluieren, inwieweit sie übereinstimmende Änderungen hervorrufen und ob sich bestimmte Substanzen stärker ähneln als andere. Die Vergleiche wurden sowohl paarweise als auch zwischen je drei, vier, fünf und sechs Substanzen gezogen. Aufgrund der immensen Zahl der hieraus resultierenden Kombinationsmöglichkeiten werden nicht alle Vergleiche gezeigt, sondern exemplarisch die Dreierkombinationen und die Schnittmenge aller sechs Substanzen für die 72 h-Behandlungen von A549- und HT-29-Zellen in Form von Venn-Diagrammen dargestellt (Abb. 3-16).

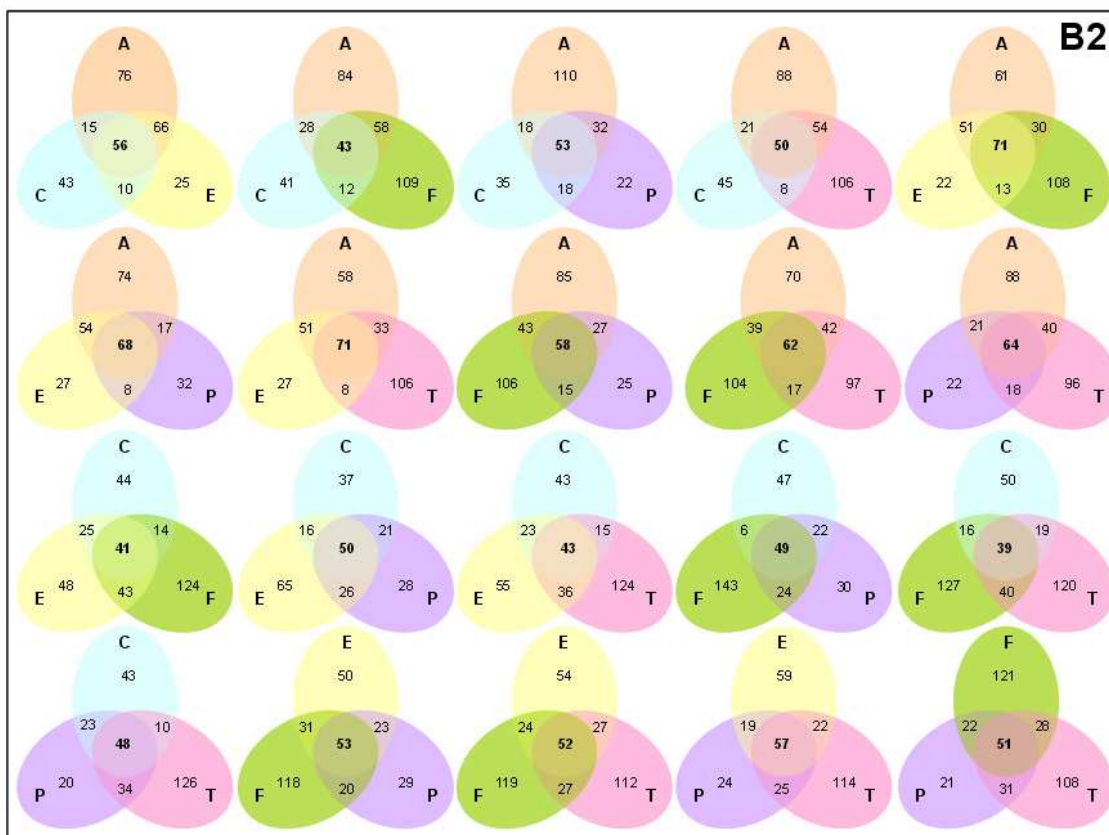
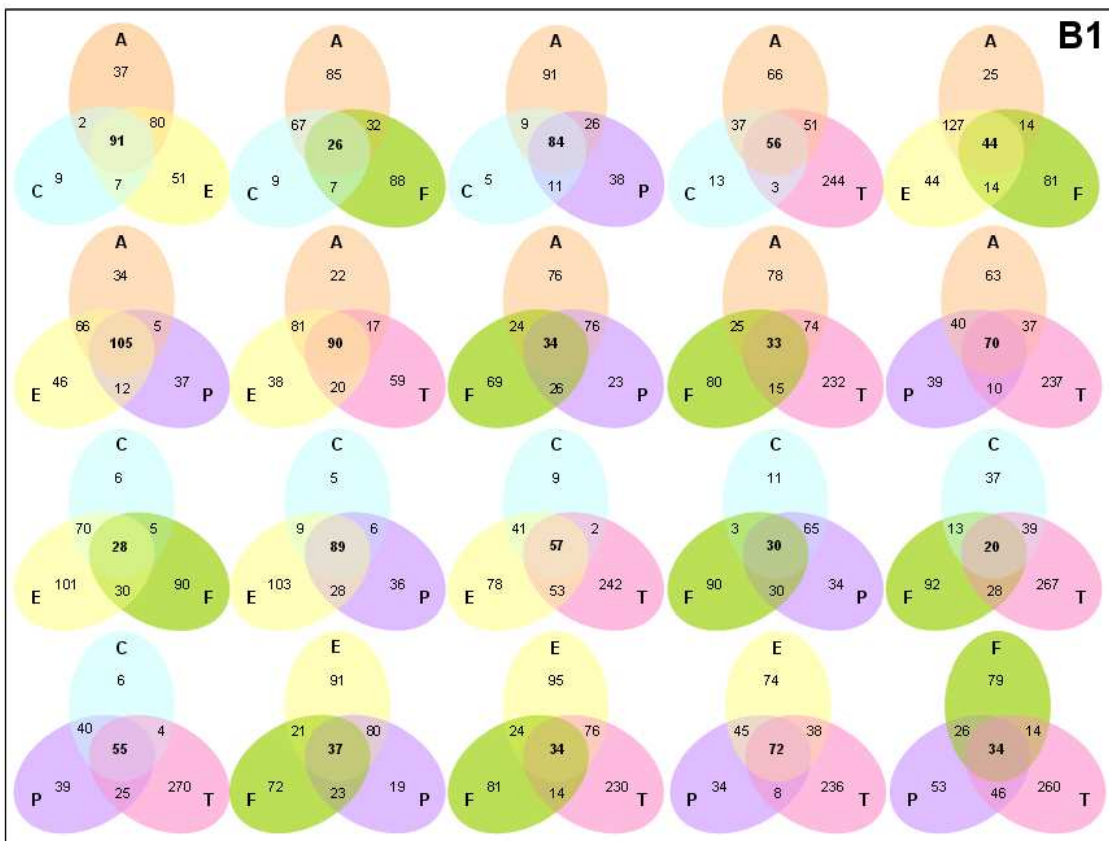
Wie diese Beispiele zeigen, ist keinerlei Tendenz festzustellen, dass sich zwei oder mehr Substanzen stärker untereinander ähneln als andere. Dieser Befund bestätigt sich in den hier nicht gezeigten Vergleichen innerhalb der anderen Zellmodelle.

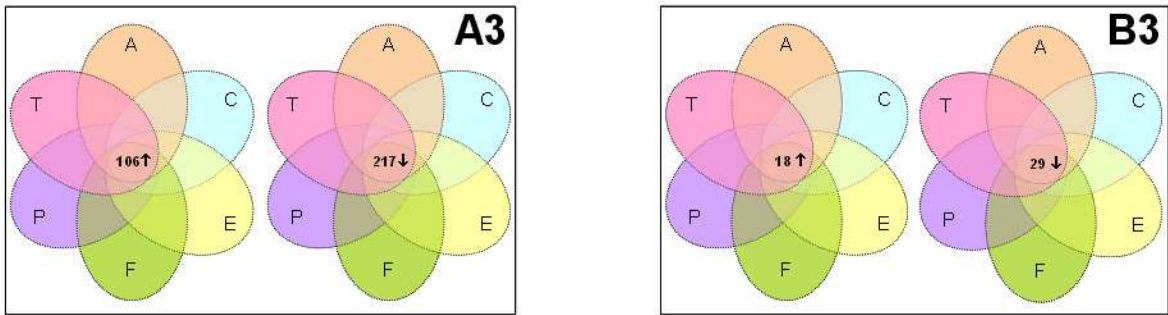
Bei der Interpretation der Schnittmengen ist zu beachten, dass immer dann, wenn ein Zytostatikum deutlich weniger oder mehr Gene moduliert hat als die restlichen Substanzen, auch die Zahlenwerte in den Venn-Diagrammen etwas inhomogener werden, wie z. B. im Fall der verhältnismäßig großen Zahl in A549-Zellen nach 72 h 5-FU-Behandlung induzierter Gene.

Bedenkt man, dass auf dem Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Array HG-U133A über 12.000 Gene repräsentiert sind, deren Expression sich potenziell ändern kann, wird offensichtlich, dass die gefundenen Überlappungen zwischen den Zytostatika auffällig groß sind. Außerdem liegt bereits durch Betrachtung der Vergleiche von je drei Substanzen (Abb. 3-16A1, A2, B1, B2) nahe, dass viele in den Schnittmengen befindlichen Gene auch zwischen verschiedenen Dreierkombinationen übereinstimmen dürften. Dies ist tatsächlich der Fall: In Abb. 3-16A3 und B3 ist die Größe der Schnittmenge aus allen sechs Zytostatika nach 72 h-Behandlung von A549- und HT-29-Zellen angegeben.









**Abb. 3-16 Anzahl der Gene, die von mehreren Zytostatika in gleicher Weise differenziell reguliert wurden.**

Abkürzungen und Farbgebung: A = Adriamycin (orange), C = Camptothecin (blau), E = Etoposid (gelb), F = 5-FU (grün), P = Cisplatin (violett), T = Taxol (rosa).

**A1:** In A549-Zellen nach 72 h Behandlung induzierte Gene, Schnittmengen von je drei Zytostatika.

**A2:** In A549-Zellen nach 72 h Behandlung reprimierte Gene, Schnittmengen von je drei Zytostatika.

**A3:** In A549-Zellen nach 72 h Behandlung von allen sechs Zytostatika induzierte (↑) und reprimierte (↓) Gene.

**B1:** In HT-29-Zellen nach 72 h Behandlung induzierte Gene, Schnittmengen von je drei Zytostatika.

**B2:** In HT-29-Zellen nach 72 h Behandlung reprimierte Gene, Schnittmengen von je drei Zytostatika.

**B3:** In HT-29-Zellen nach 72 h Behandlung von allen sechs Zytostatika induzierte (↑) und reprimierte (↓) Gene.

Eine sinnvolle graphische Darstellung der Schnittmengen aus vier oder mehr Substanzen ist nicht mehr möglich, deshalb gibt Tab. 3-4 die Anzahl der von exakt vier, fünf und sechs Substanzen deregulierten Gene in den verschiedenen Zelllinien für beide Behandlungszeiten wieder. Die Anzahl der Gene in den Schnittmengen aus vier, fünf und sechs Substanzen ist auffällig hoch, insbesondere nach 72 h.

dereguliert durch:	A549		MCF-7		HMEC		HT-29		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
genau 4 Zytostatika	37↑ 41↓	84↑ 44↓	6↑ 6↓	64↑ 306↓	1↑ 1↓	35↑ 63↓	0↑ 0↓	47↑ 48↓	0↑ 10↓	65↑ 97↓
genau 5 Zytostatika	46↑ 8↓	68↑ 56↓	3↑ 1↓	45↑ 87↓	0↑ 1↓	31↑ 86↓	0↑ 0↓	49↑ 26↓	0↑ 6↓	19↑ 31↓
genau 6 Zytostatika	11↑ 2↓	106↑ 217↓	12↑ 0↓	26↑ 30↓	0↑ 0↓	23↑ 19↓	0↑ 0↓	18↑ 29↓	0↑ 0↓	4↑ 21↓

**Tab. 3-4: Zahl der in jedem Zellmodell durch vier, fünf oder sechs Zytostatika deregulierten Gene.**

Symbole: ↑ = hochreguliert, ↓ = herabreguliert

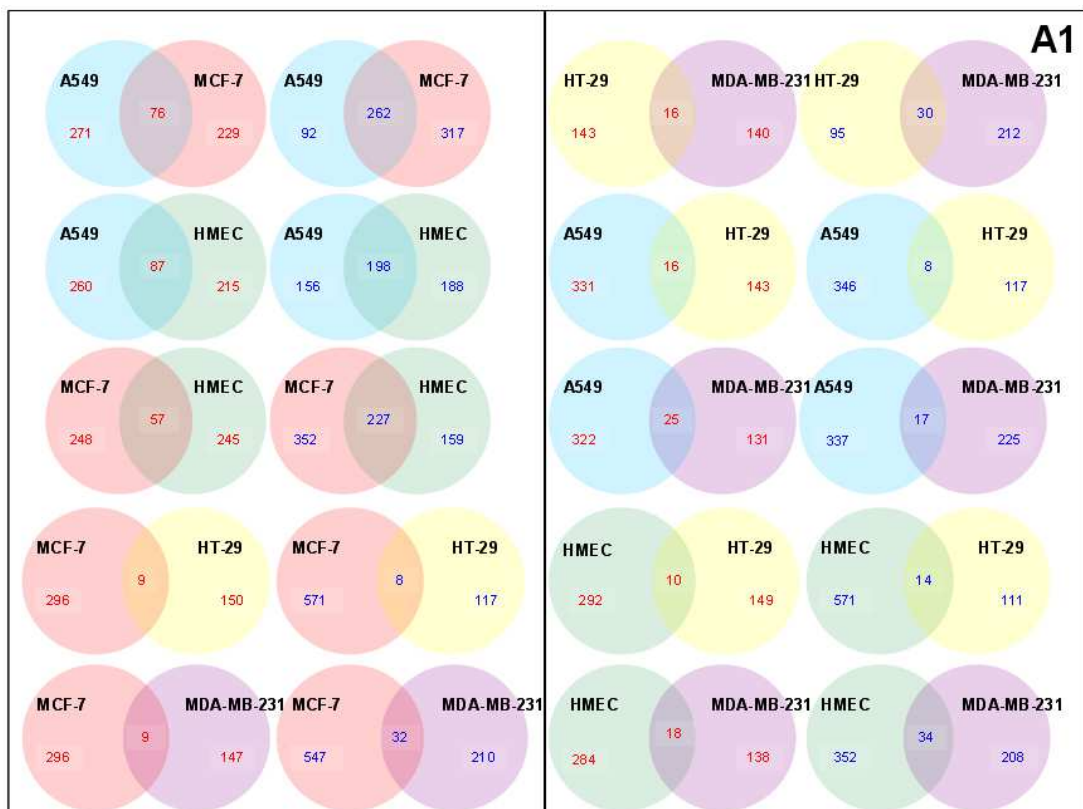
Im Verlauf der weiteren Auswertungen wurden die Gene, die in den Schnittmengen aus vier, fünf oder sechs Zytostatika enthalten waren, als „gemeinsame“ Gene betrachtet, die eine allgemeine, nicht-substanzspezifische Antwort der Zelle auf schädigende Einflüsse darstellen dürften. Es erschien nicht geboten, sich auf die durch sämtliche Substanzen betroffenen Gene zu beschränken, da dann diejenigen Gene, die bei einer oder zwei Behandlungen nur knapp die Filterkriterien verfehlt haben, verloren gehen würden. Berücksichtigt man die Schwankungen bei der IC80-Bestimmung und die Tatsache, dass sowohl im Hinblick auf die Signalhöhe als auch die Änderung des Signals und die Homogenität der Triplikate stringent gefiltert wurde (s. 2.7.4.3), ist anzunehmen, dass nicht jedes durch genotoxischen Stress differenziell regulierte Gen in jedem Fall die Schwellenwerte erreicht hat. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass beim Herausgreifen eines beliebigen von vier oder fünf Zytostatika deregulierten Gens recht häufig festzustellen ist, dass es von der oder den übrigen Substanz(en) tendenziell in die gleiche Richtung modu-

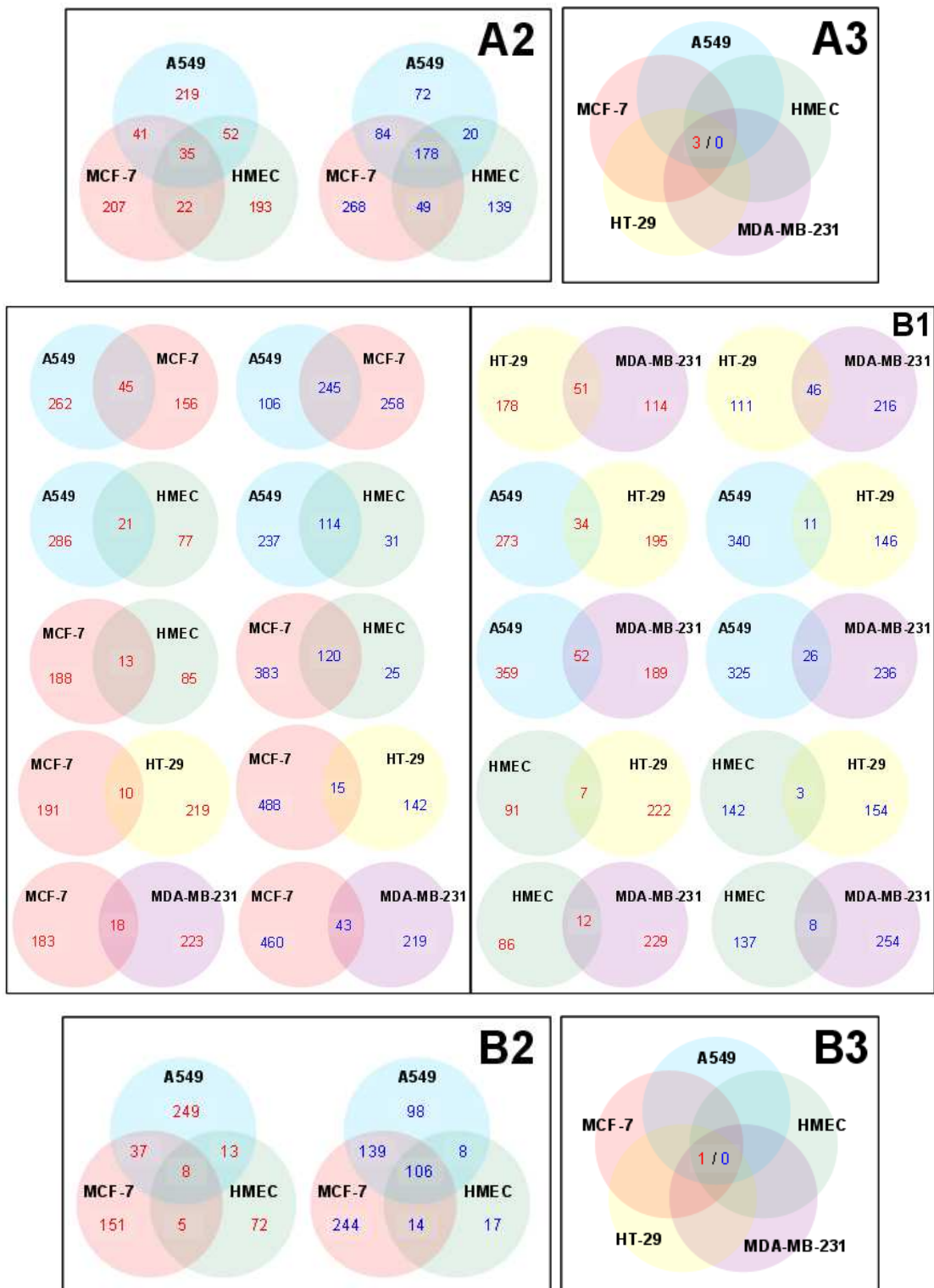
liert wurde. Es ist wahrscheinlich, dass auch unter den in der Schnittmenge von nur drei Behandlungen liegenden Genen einige enthalten sind, die bei den restlichen Substanzen die Filterkriterien nur knapp verfehlt haben. Da aber diese Kriterien natürlich auch nicht beliebig aufgeweicht werden dürfen, um möglichst nur signifikante und biologisch relevante Ergebnisse zu liefern, erschien es als geeigneter Kompromiss, die von mindestens vier Zytostatika über die Schwellenwerte hinaus deregulierten Gene als die „gemeinsamen“ einzustufen.

### 3.2.7.3 Vergleich der Wirkungen einzelner Zytostatika in verschiedenen Zellsystemen

Ein anderer Blickwinkel bei der Datenanalyse ist die Quantifizierung substanzabhängiger, zelllinienübergreifender Effekte. Zu diesem Zweck wurden jeweils die von einem bestimmten Zytostatikum in den fünf verschiedenen Zellmodellen deregulierten Gene verglichen. Zum 24 h-Zeitpunkt macht dieser Vergleich noch nicht viel Sinn, da hier, wie unter 3.2.7.1 gezeigt, in zwei der fünf Zelllinien nur marginale Änderungen auftraten. Nach 72 h Behandlung hingegen waren die Effekte in allen Zellen quantitativ ausgeprägt.

Auch hier ist die Anzahl der möglichen Vergleiche sehr hoch, da ja sämtliche Zellsysteme sowohl paarweise als auch in Dreier-, Vierer- und Fünferkombinationen auf Überlappungen untersucht werden können. Aus Platzgründen und im Interesse der Übersichtlichkeit können hier nicht alle Ergebnisse dieser Vergleiche wiedergegeben werden. Deshalb sind repräsentativ für Cisplatin und Etoposid sämtliche möglichen Zweierkombinationen, die Dreierkombinationen der Wildtyp-p53-Zellen und die Zahl der allen fünf Zellsystemen gemeinsamen Gene als Venn-Diagramme dargestellt (Abb. 3-17). Für die anderen Zytostatika ergab sich ein analoges Bild.





**Abb. 3-17: Anzahl der nach 72 h Zytostatikabehandlung deregulierten Gene und ihre Übereinstimmung zwischen verschiedenen Zellmodellen am Beispiel von Cisplatin und Etoposid.**

Farbgebung der als Kreisflächen dargestellten Zelllinien: A549 blau, MCF-7 rot, HMEC grün, HT-29 gelb, MDA-MB-231 violett.

Die Anzahl der induzierten Gene ist in roter Schriftfarbe, die der reprimierten Gene in blauer Schriftfarbe angegeben

**A1:** Anzahl der durch Cisplatin induzierten bzw. reprimierten Gene im Vergleich zwischen je zwei Zellmodellen.

**A2:** Anzahl der durch Cisplatin induzierten bzw. reprimierten Gene im Vergleich zwischen den drei Zellmodellen mit Wildtyp-p53.

**A3:** Anzahl der durch Cisplatin in allen fünf Zellmodellen induzierten bzw. reprimierten Gene.



**B1:** Anzahl der durch Etoposid induzierten bzw. reprimierten Gene im Vergleich zwischen je zwei Zellmodellen.

**B2:** Anzahl der durch Etoposid induzierten bzw. reprimierten Gene im Vergleich zwischen den drei Zellmodellen mit Wildtyp-p53.

**B3:** Anzahl der durch Etoposid in allen fünf Zellmodellen induzierten bzw. reprimierten Gene.

An der Existenz von Schnittmengen kann abgelesen werden, dass Ähnlichkeiten zwischen den von einem bestimmten Zytostatikum in verschiedenen Zellen hervorgerufenen Änderungen bestehen. Die Größe der Schnittmengen im Verhältnis zur Gesamtzahl der geänderten Gene macht deutlich, dass erhebliche Übereinstimmungen zwischen den Wildtyp-p53-Zellen vorhanden sind, insbesondere zwischen den reprimierten Genen. Geringere Überschneidungen bestehen zwischen den Zelllinien mit mutantern p53 und bei Vergleichen von Zellen mit und ohne funktionelles p53. Die Zahl der in allen fünf Zellmodellen durch ein bestimmtes Zytostatikum deregulierten Gene ist nahezu null (vgl. Abb. 3-17A3 und B3). Es gibt keine eindeutigen Anhaltspunkte, dass sich die differenziell exprimierten Gene in von Brusttumoren und/oder gesunden Brustepithelzellen abgeleiteten Zellen (MCF-7, MDA-MB-231 und HMEC) stärker ähneln als im Vergleich zu aus anderen Ursprungsgeweben stammenden Zellen.

Man könnte vermuten, dass es sich bei den in mehreren Zelllinien übereinstimmend modulierten Genen um ein substanzspezifisches Profil handelt. Vergleicht man aber die Gene, die in den Schnittmengen aus zwei Zellmodellen liegen, mit denjenigen, die innerhalb der jeweiligen Zellsysteme von mindestens vier Substanzen beeinflusst wurden (den sog. „gemeinsamen“ Genen), stellt man sehr große Übereinstimmungen fest. Dies wird in Tab. 3-5 am Beispiel von Etoposid verdeutlicht.

Zellmodell-Kombination A/B	A549/ MCF-7	A549/ HMEC	MCF-7/ HMEC	A549/ HT-29	A549/ MDA-MB- 231	MCF-7/ HT-29	MCF-7/ MDA-MB- 231	HMEC/ HT-29	HMEC/ MDA-MB- 231	HT-29/ MDA-MB- 231
Anzahl der von Eto in A und B induzierten Gene	45	21	13	34	52	10	18	7	12	51
hiervon gehören zu den gemeinsamen Genen von Zelllinie A	40	19	10	30	41	8	14	4	12	31
hiervon gehören zu den gemeinsamen Genen von Zelllinie B	33	19	9	15	26	5	8	2	7	17
Anzahl der von Eto in A und B reprimierten Gene	245	114	120	11	26	15	43	3	8	46
hiervon gehören zu den gemeinsamen Genen von Zelllinie A	231	112	117	8	24	14	36	1	7	27
hiervon gehören zu den gemeinsamen Genen von Zelllinie B	232	113	118	4	13	4	23	2	3	29

**Tab. 3-5: Vergleich der nach 72 h durch Etoposid deregulierten mit den „gemeinsamen“ Genen jedes Zellsystems.**

Die Aufstellung der induzierten Gene ist in roter, die der reprimierten Gene in blauer Schriftfarbe dargestellt. Für jeden paarweisen Vergleich zweier Zellsysteme (bezeichnet mit A und B) ist die Zahl der übereinstimmend durch Etoposid induzierten bzw. reprimierten Gene genannt. In den darunter liegenden Zeilen ist angegeben, wie viele dieser Gene zu den „gemeinsamen“ Genen des jeweiligen Zellsystems gehören.

Zum besseren Verständnis sollen zwei Beispiele erläutert werden: Nach 72 h Etoposidbehandlung wurden 45 bestimmte Gene sowohl in A549- als auch in MCF-7-Zellen hochreguliert. Vergleicht man diese Gene mit den „gemeinsamen“ deregulierten Genen in A549-Zellen, so findet man 40 Gene davon wieder, und 33

Gene stimmen mit den „gemeinsamen“ Genen von MCF-7-Zellen überein. Von den in MCF-7- und HMEC-Zellen durch Etoposid reprimierten Genen sind 120 identisch. 117 von ihnen gehören zu den „gemeinsamen“ Genen von MCF-7-Zellen und 118 zu denen von HMEC-Zellen.

Insgesamt betrachtet zählt ein sehr hoher Anteil der Gene, die von Etoposid in jeweils zwei Zellmodellen gleichermaßen dereguliert wurden, zu den „gemeinsamen“ Genen. Dies gilt für alle Vergleiche und in besonderem Ausmaß für die Zellen mit Wildtyp-p53-Protein. Bei diesen finden sich, wie anhand der genannten Beispiele verdeutlicht wird, nahezu alle von Etoposid regulierten Gene aus den paarweisen Zellvergleichen in den „gemeinsamen“ Genen wieder; sie sind somit nicht als Etoposid-spezifisch einzustufen.

Für die anderen Zytostatika ergab sich ein sehr ähnlicher Gesamteindruck, bei keiner Substanz konnte ein zelllinienübergreifendes substanzspezifisches Muster gefunden werden. Allenfalls ist denkbar, dass einzelne Zytostatika Effekte hervorrufen, die gleichzeitig substanz- und zellspezifisch sind. Für einige Substanz-Zellmodell-Kombinationen konnten solche spezifischen Effekte gefunden werden, auf diese wird in 3.2.9 näher eingegangen.

### **3.2.8 Funktionelle Analyse der in der Genexpressionsanalyse identifizierten „gemeinsamen“ Gene**

Mittels Datenbank- und Literaturrecherchen wurden die durch die Mehrzahl der Zytostatika induzierten und reprimierten „gemeinsamen“ Gene hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen und ihrer transkriptionellen Regulation charakterisiert, soweit dies aufgrund der Datenlage möglich war.

Diese Analysen ergaben deutliche Hinweise, dass durch die Zytostatikabehandlung definierte zelluläre Signalwege und Prozesse aktiviert oder inaktiviert wurden. Zahlreiche Änderungen konnten direkt auf bestimmte Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden, bei vielen anderen Genen ist eine Koregulation aufgrund ihres biologischen Zusammenhangs wahrscheinlich, jedoch nicht aus der Literatur zu belegen. Während manche dieser funktionell zusammenhängenden Effekte zelltypspezifisch waren, betrafen andere mehrere Zellsysteme. So konnte beispielsweise in den Zellen mit Wildtyp-p53-Protein eine prominente p53-abhängige Antwort detektiert werden, was unter 3.2.8.1 noch detailliert beschrieben wird. Andererseits konnte eine Aktivierung von Komponenten des Immunsystems hauptsächlich in HT-29-Zellen beobachtet werden, in geringerem Maße auch in anderen Zelllinien (s. 3.2.8.4). Eine zytostatikavermittelte Repression von Genen, die mit der sog. *Unfolded protein response* zusammenhängen, wurde ausschließlich in der Zelllinie MDA-MB-231 festgestellt (s. 3.2.8.6).

Die funktionellen Kategorien, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, sind:

- p53-Targets (3.2.8.1)
- Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Gene (3.2.8.2)
- Gene mit Funktionen in der RNA-Prozessierung (3.2.8.3)

- Zytokine und zytokinresponsive Transkripte (3.2.8.4)
- Adhäsionsmoleküle (3.2.8.5)
- Gene der Unfolded Protein Response (3.2.8.6)
- Gene mit Funktionen in Migration, Invasion und Metastasierung (3.2.8.7)
- Gene, die pro- und antiapoptotische Effektoren kodieren (3.2.8.8)

Für den Großteil dieser Kategorien wurden Tabellen erstellt, die alle zugehörigen deregulierten Gene enthalten und eine kurze Beschreibung ihrer biologischen Funktion enthalten. Diese Tabellen finden sich im Anhang (Kapitel 6).

### **3.2.8.1 Differenzielle Expression von p53-Targets**

Der Befund, dass nach Zytostatikaexposition eine auffallend große Zahl deregulierter Gene zwischen den verschiedenen Zellmodellen mit Wildtyp-p53-Protein übereinstimmt, legt nahe, dass p53 für diese transkriptionellen Änderungen eine wichtige Bedeutung besitzt. Zudem ist in der Literatur hinreichend beschrieben, dass genotoxischer Stress zur Aktivierung von p53 führt (s. 3.1.5).

In der Tat stellte sich bei der genaueren Evaluierung der „gemeinsamen“ Gene in den Datensätzen von MCF-7-, A549- und HMEC-Zellen heraus, dass viele von ihnen bereits als transkriptionelle Targets von p53 beschrieben worden sind. Es wurden sowohl viele nach Zytostatikaexposition induzierte Gene gefunden, die bekanntermaßen durch p53 transaktiviert werden können, als auch zahlreiche p53-reprimierbare Gene, die durch die Behandlung ebenfalls in die erwartete Richtung moduliert wurden. Diese p53-abhängige Antwort war in MCF-7- und A549-Zellen bereits nach 24 h Behandlung festzustellen und verstärkte sich nach 72 h, während sie in HMECs, die ja nach 24 h generell nur schwache Effekte zeigten, erst nach 72 h messbar wurde. Auch zu diesem späteren Zeitpunkt waren in HMECs deutlich weniger p53-Targets differenziell exprimiert als in A549- und MCF-7-Zellen.

Tab. 6-1 (S. 242) liefert eine Zusammenstellung der in mindestens einem der drei Wildtyp-p53-Zellsysteme zu mindestens einem Behandlungszeitpunkt als „gemeinsam“ hochreguliert identifizierten p53-transaktivierbaren Targets und ihrer biologischen Funktionen, soweit bekannt.

In Tab. 6-2 (S. 248) sind diejenigen Gene aufgelistet, die laut Literatur nach p53-Aktivierung transkriptionell reprimiert werden und in mindestens einem Zellmodell mit Wildtyp-p53-Protein nach 24 und/oder 72 h zu den „gemeinsamen“ herabregulierten Genen gehörten.

#### **3.2.8.1.1 p53-regulierbare Targets, die auch in Zellen mit mutantem p53 differenziell exprimiert waren**

Nur in sehr wenigen Fällen konnte eine Induktion p53-abhängiger Gene auch in Zellen mit mutantem p53 festgestellt werden. Bei diesen Genen handelt es sich um p21, FAS und G1P2.

Der Zellzyklusinhibitor p21 wurde abgesehen von den Tumorzellen mit Wildtyp-p53-Protein auch in HT-29- und MDA-MB-231-Zellen durch die Zytostatikabehandlung induziert. Zahlreiche Berichte in der Literatur belegen, dass p21 durchaus auch p53-unabhängig induziert werden kann, u. a. nach DNA-Schädigung.

Dies kann z. B. durch Transkriptionsfaktoren der E2F-, SMAD- und STAT-Familie vermittelt werden [58-60]. Allerdings fiel das Ausmaß der p21-Induktion in den Tumorzelllinien mit Wildtyp-p53 deutlich stärker aus, der p21-Spiegel war meist um das 5- bis 15-fache erhöht, während in den Zellen mit mutantem p53 maximal eine Vervierfachung der Expressionshöhe messbar war (Abb. 3-18A und B).

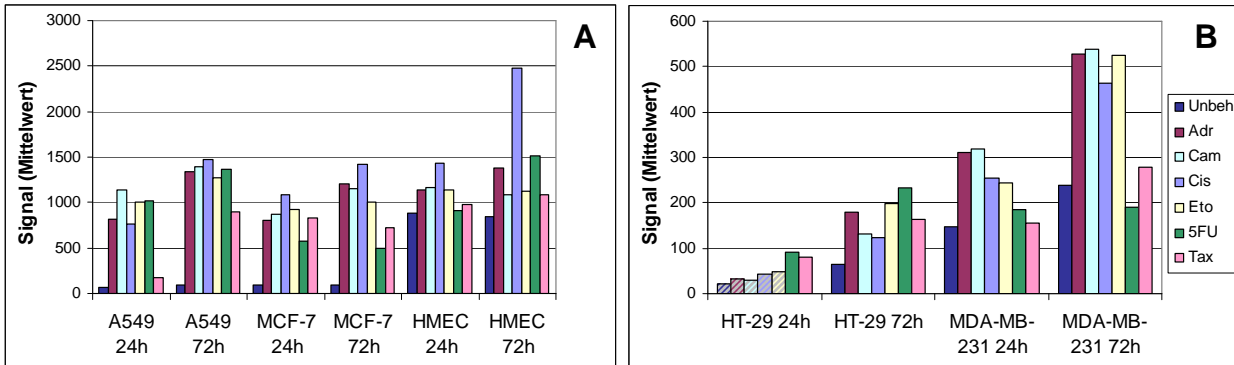


Abb. 3-18: Expression von p21 nach Zytostatikabehandlung in Wildtyp-p53-Zellen (A) und p53-mutanten Zellen (B)<sup>8</sup>.

In den HMEC-Zellen war nach 24 h noch nahezu keine Veränderung der p21-Expression festzustellen; auch nach 72 h sind nur bei zwei Zytostatika, nämlich Cisplatin und 5-FU, die Filterkriterien für eine signifikante Induktion erfüllt. Außerdem war der Ausgangsspiegel von p21 in den unbehandelten HMEC-Kontrollen bereits auffallend hoch, sodass möglicherweise von diesem Niveau aus keine wesentlich stärkere Induktion möglich war.

Auch die Expression des *Death receptors* FAS, der eine zentrale Rolle bei der Einleitung der Apoptose spielt, wurde sowohl in Zellen mit Wildtyp- als auch mit mutiertem p53-Protein durch die Zytostatika heraufreguliert.

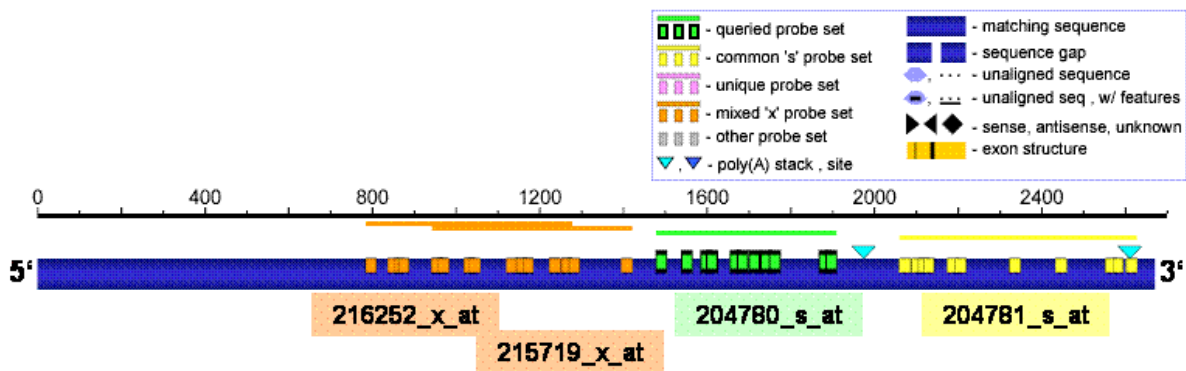


Abb. 3-19: Die Lage der vier Affymetrix-Probe Sets für FAS auf der Transkriptvariante 1.

Der überspannte Sequenzbereich ist jeweils als durchgezogene Linie dargestellt. Jedes Kästchen repräsentiert ein 25meres Oligonukleotid, je 11 bilden ein Probe Set. Die beiden Probe Sets 215719\_x\_at und 216252\_x\_at detektieren überlappende Sequenzbereiche. Die hellblauen Dreiecke symbolisieren alternative PolyA-Enden.

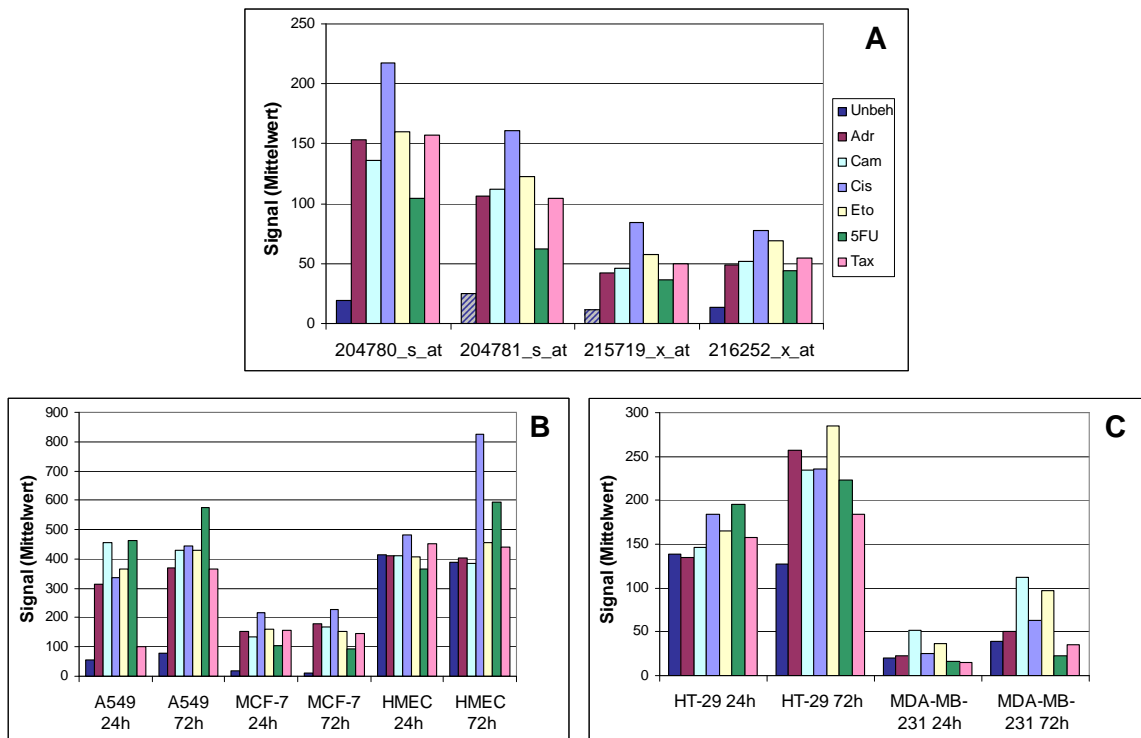
<sup>8</sup> In Balkendiagrammen von Affymetrix-Genexpressiondaten stellt jeder Balken stets den Mittelwert aus Triplikaten bzw. Duplikaten dar. Signale, die als *marginal* oder *absent*, also nicht verlässlich detektierbar, eingestuft wurden, sind stets grau schraffiert dargestellt.



Auf dem Affymetrix GeneChip® Array HG-U133A befinden sich vier Probe Sets für FAS, die unterschiedliche Sequenzabschnitte seiner mRNA detektieren. Diese liegen teils im 3'-Bereich (Affymetrix-ID 204780\_s\_at und 204781\_s\_at), teils im mittleren Bereich (Affymetrix-ID 215719\_x\_at und 216252\_x\_at). Es existieren mindestens acht verschiedene Spleißvarianten des FAS-Transkripts und jedes der genannten Probe Sets detektiert mehrere unterschiedliche Isoformen, jedoch gibt es kein Probe Set, das alle Isoformen erfasst. In Abbildung Abb. 3-19 ist die Lage der vier Probe Sets auf der häufigsten Transkriptvariante 1 gezeigt.

Alle vier Probe Sets zeigen qualitativ übereinstimmende Veränderungen der Signalhöhe von FAS an, wie beispielhaft für MCF-7/24 h dargestellt (Abb. 3-20A). Am verlässlichsten erscheint aus theoretischen Überlegungen das Probe Set 204780\_s\_at, da es einerseits relativ weit am 3'-Ende liegt (d. h. es ist auch dann geeignet, wenn bei der Reversen Transkription keine Volle-Länge-cDNA entstanden ist), andererseits 5'-seitig zu beiden alternativen PolyA-Enden. In der Tat liefert dieses Probe Set durchgängig höhere Signale als die anderen drei, was nahe legt, dass es auch verkürzte cRNAs und/oder eine größere Anzahl an Isoformen detektiert.

In HT-29-Zellen war FAS erst nach 72 h Zytostatikabehandlung hochreguliert, und in HMEC- und MDA-MB-231-Zellen war keine allgemeine Induktion von FAS zu beobachten, sondern jeweils nur durch ein oder zwei Zytostatika. In Abb. 3-20B und C sind die Ergebnisse in allen Zellmodellen anhand des Probe Sets 204780\_s\_at gezeigt. Wie im Fall von p21 war auch bei FAS die Induktion in A549- und MCF-7-Zellen wesentlich prominenter als in den übrigen Zellmodellen.



**Abb. 3-20: Expression von FAS nach Zytostatikabehandlung.**

**A:** Signalhöhen der vier Probe Sets für FAS in MCF-7-Zellen nach 24 h Zytostatikabehandlung. **B:** Signalhöhen des Probe Sets 204780\_s\_at in den Wildtyp-p53-Zellsystemen. **C:** Signalhöhen des Probe Sets 204780\_s\_at in den p53-mutanten Zellsystemen.

An der Induktion von FAS in Zellen mit mutantern p53-Protein lässt sich ablesen, dass dieses Gen nicht ausschließlich durch p53 transkriptionell aktiviert werden kann. In der Tat gibt es diverse experimentelle Befunde, dass FAS auch p53-unabhängig hochreguliert werden kann, u. a. ist dies für HT-29-Zellen nach Behandlung mit Adriamycin, 5-FU, Camptothecin, Cisplatin und Mitomycin C beschrieben worden [61, 62].

G1P2 ist eigentlich ein interferonresponsives Gen, das ein an der antiviralen Immunabwehr beteiligtes Protein kodiert, es kann aber auch durch p53 transaktiviert werden [38, 63, 64]. Insofern ist verständlich, warum es sowohl in MDA-MB-231-Zellen, hier als Teil der Aktivierung der Immunantwort nach Zytostatikabehandlung (s. 3.2.8.4) als auch in den Zellen mit Wildtyp-p53-Protein einschließlich HMEC induziert wurde.

Unter den p53-reprimierbaren Genen in Tab. 6-2 sind ebenfalls nur sehr wenige, die auch in einer Zelllinie mit mutantern p53 von mehreren Zytostatika herabreguliert wurden. Mit HT-29 gibt es keine einzige Übereinstimmung, und nur vier Gene gehören auch in MDA-MB-231-Zellen zu den „gemeinsamen“ reprimierten Genen. Diese sind CDC20, PLK1 (*polo-like kinase 1*), SCD (Stearoyl-CoA-Desaturase) und SLCO4A1 (*solute carrier organic anion transporter family, member 4A*). CDC20 und PLK1 spielen eine bedeutende Rolle während der mitotischen Zellteilung (vgl. 3.2.8.2.4) und ihre Expression schwankt zellzyklusabhängig. Für beide ist beschrieben, dass sie auch durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie reguliert werden, somit wird verständlich, dass ihr mRNA-Spiegel auch p53-unabhängig verändert sein kann [65]. Zur möglichen transkriptionellen Regulation des an der Synthese ungesättigter Fettsäuren beteiligten Enzyms SCD und des Anionentransporters SLCO4A1 fanden sich keine Literaturdaten. Aufgrund ihrer physiologischen Rolle im Basisstoffwechsel ist jedoch anzunehmen, dass sie nicht ausschließlich durch p53 und somit stressabhängig moduliert werden, sondern ihre Expression unter Normalbedingungen anderen Regulationsmechanismen unterliegt.

### 3.2.8.1.2 Beispiele wichtiger Effektoren der p53-abhängigen Antwort auf die Zytostatikaexposition

Die p53-regulierten Gene können häufig in funktionellen Zusammenhang mit p53-vermittelten Stressreaktionen der Zelle wie Wachstumsarrest, programmiertem Zelltod oder Seneszenz gebracht werden (vgl. 3.1.3). Die Daten zur zytostatikavermittelten Induktion von p21, das als zentraler Vermittler des p53-abhängigen G1-Arrests, aber auch von G2-Arrest und Seneszenz fungiert, wurden bereits gezeigt (Abb. 3-18). Ein weiteres am Zellzyklusarrest beteiligtes p53-induzierbares Target ist GADD45A, dieses spielt hauptsächlich beim G2-Checkpoint eine Rolle. In A549-Zellen war GADD45A bereits nach 24 h Zytostatikabehandlung hochreguliert; dieser Effekt verstärkte sich nach 72 h noch weiter (Abb. 3-21A). In MCF-7 waren zwar erst nach 72 h für vier der sechs Substanzen die Filterkriterien erfüllt, das Diagramm zeigt aber, dass seine Expression auch nach 24 h schon durch fast alle Behandlungen erhöht wurde, jedoch den Schwellenwert für die Signalthöhe ( $\geq 50$ ) nicht in allen Fällen erreichte (Abb. 3-21B). In den übrigen Zellsystemen einschließlich HMECs konnte keine Induktion von GADD45A beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

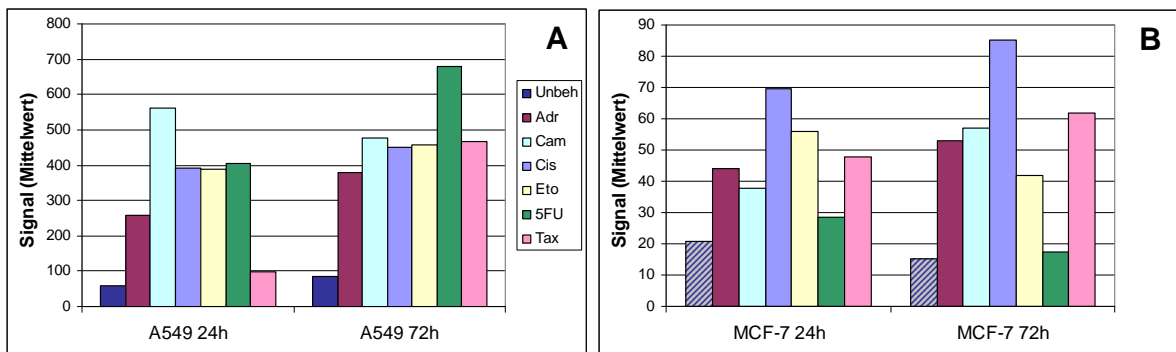


Abb. 3-21: Expression von GADD45A in A549-Zellen (A) und MCF-7-Zellen (B) nach Zytostatikabehandlung.

Ein weiterer Wachstumsinhibitor, dessen Expression durch p53 gesteuert wird und der in den Wildtyp-p53-Zellsystemen durch Zytostatikabehandlung induziert wurde, ist GDF15 (*growth differentiation factor 15*), ein Mitglied der TGF $\beta$ -Familie, das auch unter den Bezeichnungen PLAB, MIC-1 oder *prostate differentiation factor* bekannt ist. In den beiden Tumorzelllinien war es nach 24 und 72 h massiv hochreguliert, in HMEC-Zellen jedoch weniger stark (Abb. 3-21A). GDF15 kann die Zellproliferation hemmen und war in einem Xenograftmodell in der Lage, die Tumorigenität einer malignen Zelllinie komplett zu unterdrücken. Zudem kann es einen Verlust der Substratadhäsion mit anschließender Apoptose (sog. Anoikis) bewirken und wird auch p53-unabhängig durch Stressfaktoren wie z. B. Hypoxie induziert [14, 66, 67]. In zahlreichen Studien wurde die Zunahme seiner Expression nach Zytostatikabehandlung beschrieben, meist im Zusammenhang mit p53 [38, 68, 69]; es wurde sogar als sezernierter Biomarker für die Aktivierung des p53-Signalwegs vorgeschlagen [70]. Eine Induktion von GDF15 in den Zelllinien mit mutantern p53 konnte ausschließlich mit Taxol in HT-29-Zellen beobachtet werden (Abb. 3-21B).

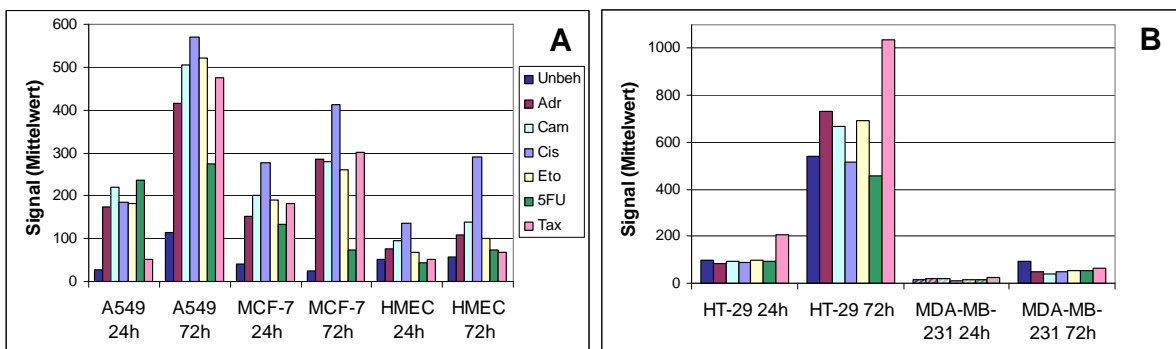


Abb. 3-22: Expression von GDF15 in Wildtyp-p53-Zellen (A) und Zellen mit mutantern p53 (B) nach Zytostatikabehandlung.

Zu den am Zelltod beteiligten p53-Targets zählen Rezeptoren der *tumor necrosis factor receptor*-(TNFR)-Superfamilie wie FAS (s. 3.2.8.1.1) und DR5/KILLER (HUGO: TNFRSF10B<sup>9</sup>). Diese aktivieren den extrinsischen Weg der Apoptose, indem sie die Bildung des DISC (*death-inducing signaling complex*) stimulieren,

<sup>9</sup> Gene, die im analysierten Datensatz dereguliert sind und deren Gensymbol gemäß HUGO-Nomenklatur eher ungebrauchlich ist, werden unter ihrer gängigen Bezeichnung beschrieben. Das offizielle Symbol wird jedoch bei der erstmaligen Nennung in Klammern angegeben. In den Tabellen im Anhang (Kap. 0) sind diese Gene alphabetisch gemäß ihrem HUGO-Symbol eingeordnet, der gängige Name ist durch Fettdruck hervorgehoben.

was die Aktivierung der Caspasekaskade nach sich zieht. Die Expression von DR5 wurde in A549-Zellen bereits nach 24 h Zytostatikaexposition induziert, in MCF-7 durch die Mehrzahl der Substanzen erst nach 72 h (Abb. 3-23). In den übrigen Zellsystemen war keine Änderung der Transkriptmenge von DR5 feststellbar (Daten nicht gezeigt).

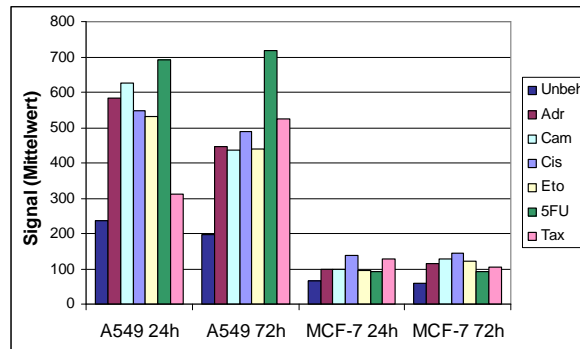


Abb. 3-23: Expression von DR5 in A549- und MCF-7-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

Des Weiteren transaktiviert p53 auch proapoptotische Mitglieder der BCL2-Familie, die den sog. intrinsischen Weg der Apoptose vermitteln, indem sie die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien auslösen. Zu diesen gehören u. a. BAX, NOXA (HUGO: PMAIP1) und PUMA (HUGO: BBC3), welche als wichtige Vermittler der p53-abhängigen Apoptose eingestuft werden. Wie in Abb. 3-24A, B und C dargestellt, war NOXA in A549-Zellen bereits nach 24 h Zytostatikabehandlung induziert, nach 72 h stiegen auch die Transkriptmengen von BAX und PUMA in dieser Zelllinie im Vergleich zu den Kontrollproben deutlich an. In MCF-7-Zellen blieb ihre Expression jedoch weitgehend konstant. Auch in HMECs und den Zelllinien mit mutantern p53 war keine Veränderung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

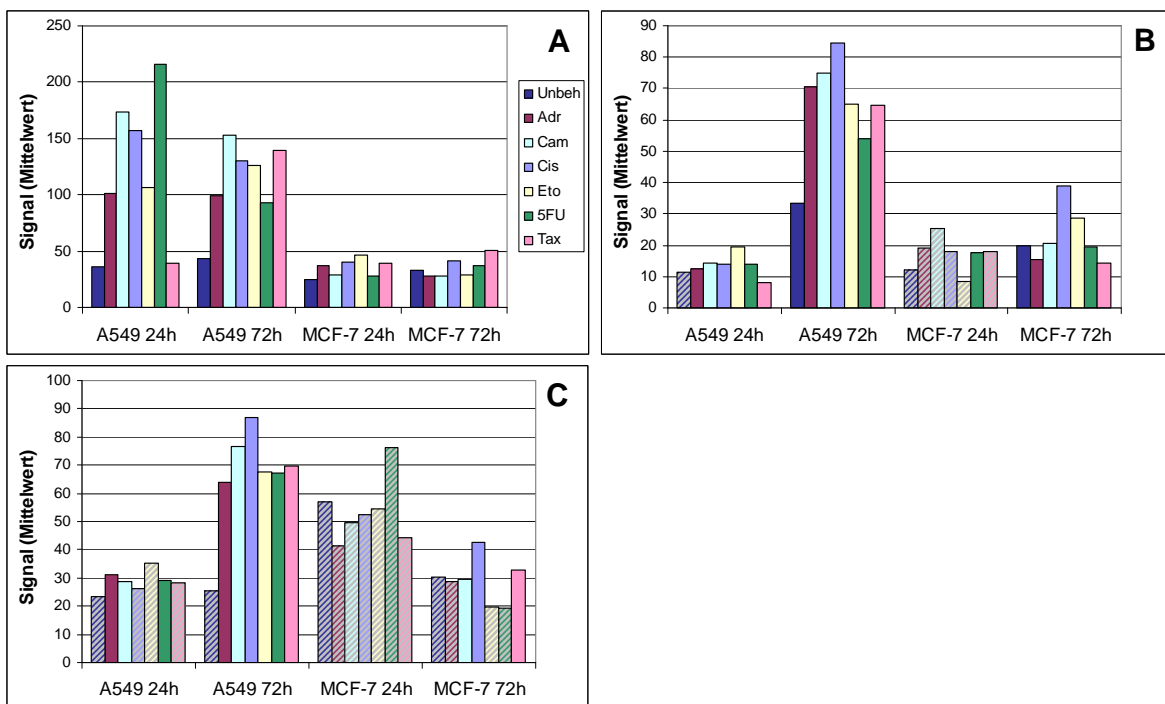
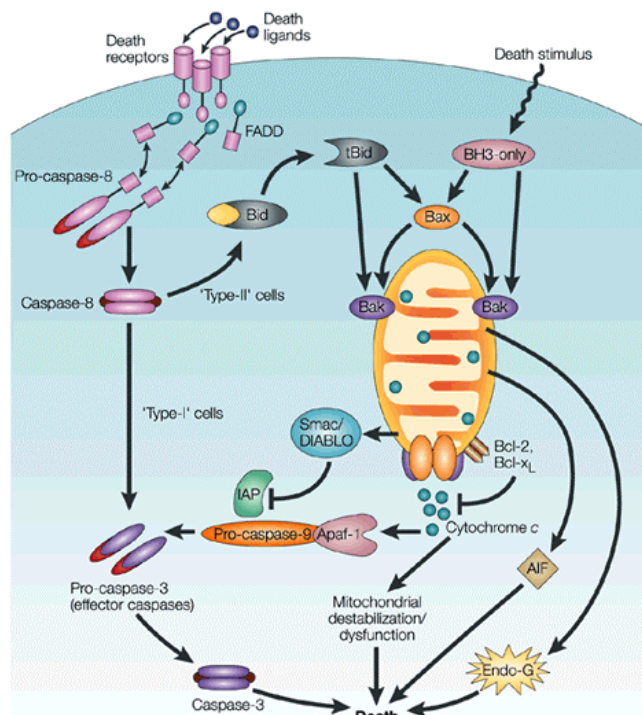


Abb. 3-24: Expression von NOXA (A), BAX (B) und PUMA (C) in A549- und MCF-7-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

Abb. 3-25 stellt schematisch die alternativen Apoptosemechanismen dar, an denen die genannten Proteine beteiligt sind.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Abb. 3-25: Einleitung der Apoptose durch verschiedene zelluläre Mechanismen.**

**Extrinsischer Weg** (links): Die *Death receptors* der TNFR-Familie (u. a. FAS, DR4 und DR5) werden durch ihre Liganden aktiviert und stimulieren die Bildung des DISC (*death-inducing signaling complex*), welcher u. a. das Adaptorprotein FADD und Procaspase-8 enthält. Letztere wird hierbei zur aktiven Caspase-8 gespalten. Je nach Zelltyp werden entweder ausreichend hohe Spiegel von Caspase-8 erzeugt, welche direkt eine Kaskade von Effektorcaspasen zu aktivieren vermag, oder es muss eine Signalverstärkung durch Caspase-8-vermittelte Spaltung des BCL2-Familienmitglieds BID stattfinden. Das BID-Fragment tBID kooperiert mit BAX und BAK und fördert deren Effekte auf die Mitochondrienmembran.

**Intrinsischer Weg** (rechts): Ausgelöst durch verschiedene Stimuli werden proapoptotische *BH3 domain-only*-Proteine aktiviert, die alle zur BCL2-Familie gehören (u. a. BID, BAD, BIM, NOXA und PUMA). Diese erleichtern die Bildung von Heterodimeren aus weiteren proapoptotischen BCL2-Proteinen, insbesondere BAX und BAK, die sich in Form von Poren in die äußere Mitochondrienmembran einlagern. Infolgedessen werden zahlreiche Faktoren freigesetzt, zu denen Cytochrom c, Smac/DIABLO (ein Inhibitor der antiapoptotischen IAPs), AIF (*apoptosis-inducing factor*) und Endo-G (Endonuklease-G) gehören. Antiapoptotische Mitglieder der BCL2-Familie wie BCL2 und BCL-xL wirken diesen Vorgängen entgegen. Der Austritt von Cytochrom c führt einerseits zur weiteren Destabilisierung der Mitochondrien, andererseits ist er essenziell für die Entstehung des Apoptosoms aus Procaspase-9 und Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*). Die Aktivierung von Procaspase-9 führt wiederum zur aktivierenden Spaltung von Effektorcaspasen.<sup>10</sup>

Die beschriebenen Signalwege führen letztlich alle zum Tod der Zelle. [71]

Ein funktionell sehr interessantes p53-reprimiertes Gen ist Survivin (HUGO: BIRC5), welches zur Familie der IAP-Proteine (*inhibitors of apoptosis*) gehört. Auch Survivin ist auf dem Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Array HG-U133A durch mehrere Probe Sets vertreten und stellvertretend werden die beiden am nächsten zum 3'-Ende der mRNA liegenden Sets gezeigt (Abb. 3-26). Sie zeigen qualitativ übereinstimmend an, dass

<sup>10</sup> Wird in einer Abbildung ein Gensymbol verwendet, das nicht der HUGO-Nomenklatur entspricht (wie hier z. B. im Fall von AIF, das offiziell als PDCD8 bezeichnet werden müsste), so wird das offizielle Symbol nur dann angegeben, wenn das betreffende Gen im analysierten Datensatz de-reguliert ist.

Survivin durch die Mehrzahl der Zytostatika in allen drei Zellsystemen mit Wildtyp-p53-Protein nach 72 h deutlich herabreguliert wurde. Zum 24 h-Zeitpunkt waren in A549-Zellen die Kriterien für eine Repression bereits von drei Zytostatika erfüllt, in MCF-7 und HMEC lässt sich immerhin eine Tendenz zur Reduktion der Expressionshöhen erkennen.

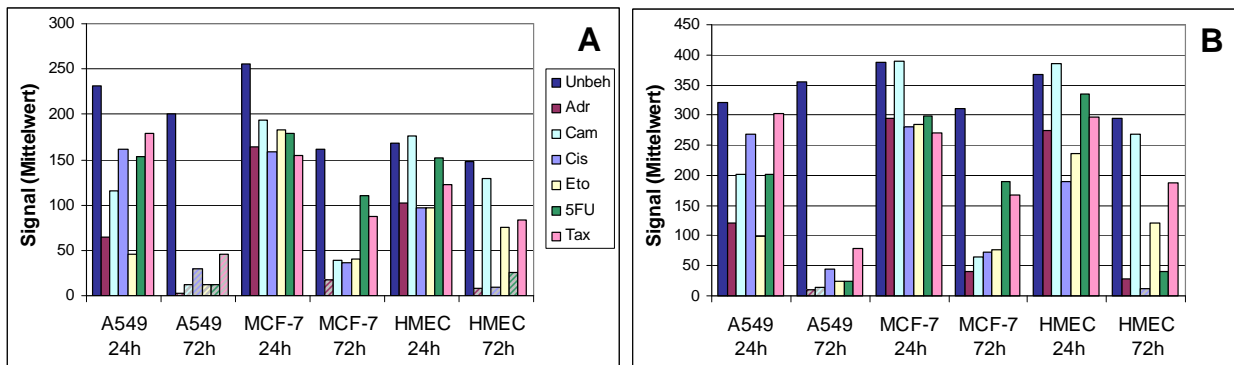


Abb. 3-26: Expression von Survivin in Wildtyp-p53-Zellen, gezeigt anhand der Signalthöhen der Probe Sets 202094\_at (A) und 202095\_s\_at (B).

Es gibt Hinweise, dass Survivin im Gegensatz zu den anderen IAPs nicht direkt die Aktivität von Caspasen inhibiert (vgl. Abb. 3-25), sondern seinen antiapoptotischen Effekt hauptsächlich durch die Kontrolle mitotischer Prozesse ausübt. Es reguliert die Chromosomensegregation, ist am Spindelcheckpoint beteiligt und verhindert die sog. mitotische Katastrophe (*mitotic catastrophe*). Ein Verlust von Survivin führt zu aberranten Mitosen und letztlich zum Zelltod [72]. Mehrere Publikationen konnten eine direkte Repression der Promotoraktivität von Survivin durch aktiviertes p53 zeigen [73]. Da die Expression von Survivin durch E2F stimuliert werden kann [74] und das p53-Response-Element mit einer Bindungsstelle für E2F überlappt, wurde als möglicher Mechanismus die Verdrängung dieses aktivierenden Transkriptionsfaktors durch p53 vorgeschlagen [16]. Es finden sich außerdem Berichte in der Literatur, die eine Reduktion der Survivin-mRNA nach Zytostatikaexposition bestätigen. So konnten zwei Studien mit Hilfe von DNA-Arrays zeigen, dass Adriamycin bzw. das Taxan Docetaxel und der Antimetabolit Furtulon die Expression von Survivin in Zellen mit Wildtyp-p53-Protein (HCT-116 bzw. LNCaP) herabregulieren [14, 75]. Interessanterweise scheint Survivin selbst in das p53-MDM2-Netzwerk einzugreifen. Es wurde beschrieben, dass ektop exprimiertes Survivin die Konzentration von p53 auf mRNA- und Proteinebene erniedrigt und die Expression der p53-Homologe  $\Delta$ Np63, TAp73 und  $\Delta$ Np73 erhöht. Die Reduktion des p53-Proteinlevels konnte zumindest teilweise auf einen gesteigerten MDM2-vermittelten Abbau zurückgeführt werden, da Survivin die durch Caspasen vermittelte Spaltung von MDM2 inhibiert [76]. Indem p53 die Expression von Survivin reprimiert, hemmt es also seinen eigenen Abbau.

### 3.2.8.1.3 Auswertung der Literatur zur p53-abhängigen transkriptionellen Regulation

Wie jeweils aus den Spalten „p53-Regul.“ von Tab. 6-1 und Tab. 6-2 ersichtlich ist, diente eine ganze Reihe von Veröffentlichungen als Quelle für die Informationen, welche Gene auf Transkriptionsebene durch p53 reguliert werden. In Summe wurden 55 Publikationen ausgewertet, von denen mehrere [8, 16, 63, 77-80] in einem globalen Ansatz eine Vielzahl von p53-Targets identifizieren konnten. Eine Auswahl aus den verwendeten Techniken gibt Tab. 3-6 wieder.

Zellsystem	Details	Messmethode	Quelle
H1299 p53(-/-), transfiziert mit temperatursensitiver p53-Mutante	Unterscheidung zwischen primären und sekundären Targets durch Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid	Oligonukleotid-Array	[77]
Tet-off-System oder Adenovirus-Infektion zur Expression von exogenem p53 in verschiedenen Zelllinien	Vergleich fünf verschiedener Zelllinien; Untersuchung der Induzierbarkeit durch Zytostatika und der Abhängigkeit dieser Induktion von endogenem p53	SAGE ( <i>serial analysis of gene expression</i> ); Bestätigung durch Northern Blots	[78]
zinkinduzierbares System zur Expression von exogenem p53 in EB-1-Zellen	Untersuchung der dosisabhängigen Induktion von p53-Targets; Vergleich mit Genexpression nach DNA-Schädigung durch $\gamma$ - und UV-Bestrahlung	Oligonukleotid-Array	[63]
Adenovirus-basierte Expression von p53 in verschiedenen Zelllinien	parallel bioinformatische Identifikation („in silico-Vorhersage“) von p53-Response-Elementen im humanen Genom; Schnittmenge der beiden Ansätze dürfte laut Autoren mit tatsächlichen p53-Targets angereichert sein	cDNA-Array; Bestätigung ausgewählter Ergebnisse mittels ChIP ( <i>chromatin immunoprecipitation</i> )	[1, 80]
p53-sensitive Zelllinie ECV-304 (Wildtyp-p53) und durch wiederholte Infektion mit p53-Adenovirus abgeleitete p53-resistente Zelllinie DECV	Vergleich der Genexpressionsprofile von p53-sensitiven und -resistenten Zellen	cDNA-Array	[81]
Zelllinie mit Wildtyp-p53 und entsprechende Knock-out-Linie (HCT-116 +/+ und -/-)	Behandlung mit Topotecan; Identifizierung von p53- und/oder Topotecan-abhängig induzierten oder reprimierten Genen	cDNA-Array	[38]
Zelllinie mit induzierbarem exogenem p53 (lac-Operon)		<i>Differential display</i>	[79]
p53(-/-)-Zelllinie, infiziert mit p53-Adenovirus		cDNA-Array	[79]
Reportersystem in Hefezellen		Klonieren p53-responsiver Sequenzen aus genomischer DNA	[79]
Zelllinie mit Wildtyp-p53 und entsprechende Knock-out-Linie (HCT-116 +/+ und -/-)	Behandlung mit 5-FU; Identifizierung der in p53-abhängiger Weise durch 5-FU deregulierten Gene; Cycloheximid hemmte in dieser Studie die Akkumulation von p53!	Oligonukleotid-Array	[16]
HCT-116 p53(-/-), transfiziert mit Wildtyp-p53-Vektor oder Gain-of-function-p53-Mutanten		cDNA-Array	[8]

Tab. 3-6: Studien mit dem Ziel der Identifikation transkriptioneller Targets von p53.

In diesen Berichten wurden insgesamt über 1.200 verschiedene p53-Targets beschrieben, ca. 35 % davon als p53-induzierbar<sup>11</sup>. Jede dieser Studien lieferte einen anderen Satz mutmaßlicher p53-Targets, wobei sich manche Gene in allen oder nahezu allen Untersuchungen finden ließen, während andere nur unter ganz bestimmten Bedingungen identifiziert wurden. Als mögliche Gründe für die Heterogenität der Ergebnisse sind denkbar:

<sup>11</sup> Einige neuere Publikationen konnten die Zahl p53-reprimierbarer Gene stark erweitern. In diesen Studien wurde gefunden, dass p53 weitaus mehr Gene reprimiert als transaktiviert [8, 16, 80].

- die Verwendung verschiedener Zellsysteme, in denen das p53-Protein unterschiedliche Targets differenziell reguliert (beispielweise aufgrund von Unterschieden im Vorhandensein p53-modifizierender Enzyme oder transkriptioneller Kofaktoren),
- unterschiedliche p53-Spiegel, sowohl hinsichtlich der Gesamtkonzentration an p53-Protein als auch seiner Aktivierung durch verschiedene posttranslationale Modifikationen; insbesondere das Vorliegen unphysiologisch hoher Spiegel von exogenem p53-Protein, sodass dieses möglicherweise aberrant an Promotoren bindet,
- methodische Unterschiede, wie die Verwendung verschiedener Messmethoden oder das Zugrundelegen unterschiedlicher Schwellenwerte für eine signifikante Induktion oder Repression.

Da bei jeder weiteren Studie mit veränderter Methodik und anderem biologischen Modellsystem neue Targets von p53 gefunden werden, ist anzunehmen, dass der Satz p53-regulierbarer Gene in Zukunft noch erweitert werden kann. Zumindest ein Teil der bisher identifizierten und noch zu erwartenden Kandidaten dürfte auch *in vivo* unter Stressbedingungen in der Zelle differenziell exprimiert werden.

Die Vermutung liegt nahe, dass unter den durch die Zytostatika differenziell regulierten „gemeinsamen“ Genen noch weitere sind, die durch p53 induziert oder reprimiert werden, in dieser Hinsicht aber noch nicht in der Literatur beschrieben sind. Insbesondere Gene mit p53-Response-Elementen sind Kandidaten für eine direkte p53-Regulation. Basierend auf einer Studie von Wang et al., in der das humane Genom auf das Vorhandensein von p53-Response-Elementen in Promotorregionen oder Intronsequenzen untersucht wurde [1], kann für einige der durch Zytostatikabehandlung modulierten Gene spekuliert werden, dass sie tatsächlich unter physiologischen Bedingungen von p53 reguliert werden.

Als Beispiele werden im Folgenden je ein induziertes und reprimiertes potenzielles p53-Target herausgegriffen:

Das Galectin LGALS3 war nach jeweils 72 h sowohl in A549- als auch in MCF-7-Zellen durch alle sechs Zytostatika induziert, nicht aber in HMEC-, HT-29- und MDA-MB-231-Zellen (Abb. 3-27).

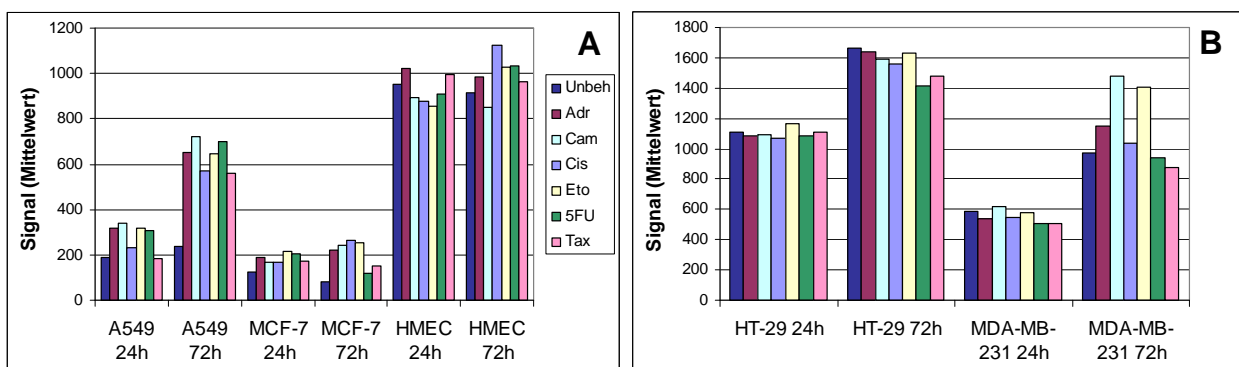


Abb. 3-27: Expression von LGALS3 in Zellen mit Wildtyp-p53-Protein (A) und mutantern p53 (B) nach Zytostatikabehandlung.



In der Promotorsequenz von LGALS3 wurde in der genannten Studie eine potenzielle p53-Bindestelle identifiziert. Darüber hinaus konnte auch in den RNAi-Versuchen, in denen p53 durch transkriptionelles Silencing von MDM2 aktiviert wurde, eine Induktion von LGALS3 in MCF-7-Zellen beobachtet werden (s. 3.3.6.2.1). Dies unterstützt die Vermutung, dass LGALS3 ein p53-transaktivierbares Target ist. LGALS3 spielt eine Rolle in der Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen, außerdem besitzt es proangiogene und antiapoptotische Eigenschaften [82-85]. Diese lassen sich mit dem klassischen Bild einer p53-vermittelten Tumorsuppression nur schwer in Einklang bringen, könnten aber Anzeichen für einen negativen Feedbackmechanismus sein.

Ein möglicherweise durch p53 reprimiertes Gen ist der Transkriptionsfaktor FOXM1 (*forkhead box M1*), in dessen Promotor durch Wang et al. ebenfalls ein p53-Response-Element identifiziert wurde. Seine Expression war in A549-, MCF-7- und HMEC-Zellen jeweils nach 72 h Zytostatikabehandlung deutlich reduziert, in den Zelllinien mit mutantern p53 blieben die Signalwerte konstant (Abb. 3-28).

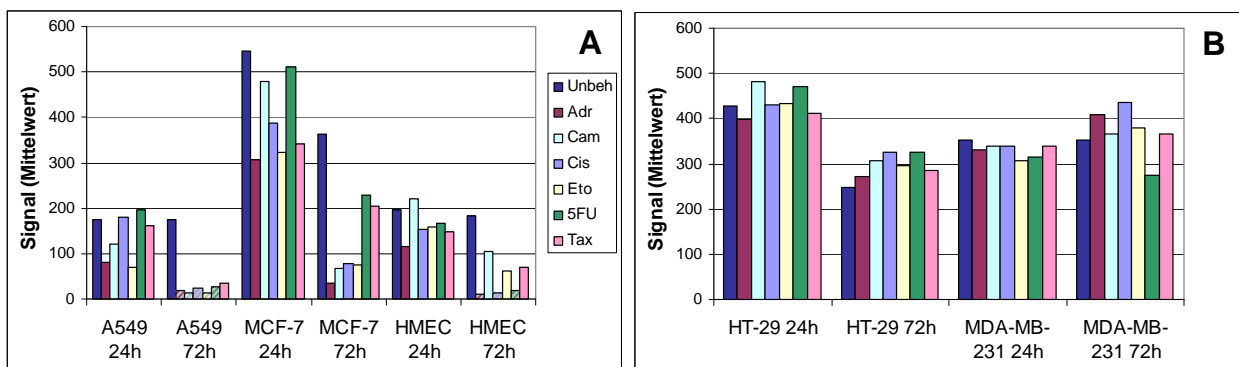


Abb. 3-28: Expression von FOXM1 in Zellen mit Wildtyp-p53-Protein (A) und mutantern p53 (B) nach Zytostatikabehandlung.

In seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor reguliert FOXM1 viele zellzyklusrelevante Gene, z. B. stimuliert es die Expression der Cycline B1 und D1 und der Phosphatase CDC25B [86]. Da zahlreiche an der Zellzyklusprogression beteiligte Gene einschließlich der drei genannten Beispiele nach der Zytostatikabehandlung in den Wildtyp-p53-Zellen herabreguliert waren, kann man vermuten, dass dies zumindest teilweise auf der Repression von FOXM1 durch p53 beruhen könnte. Für eine große Zahl von Zellzyklusgenen ist eine verminderte Expression nach p53-Aktivierung beschrieben, möglicherweise wird dies in manchen Fällen indirekt vermittelt, indem p53 ihre FOXM1-vermittelten Transaktivierung unterbindet. Sehr viele zellzyklusrelevante Gene werden allerdings auch durch den Transkriptionsfaktor E2F reguliert; wie unter 3.2.8.2.6 noch detailliert erläutert wird, gibt es starke Indizien, dass eine verringerte Aktivität von E2F – gemeinsam mit p53 – für die Repression der Zellzyklusgene nach Zytostatikaexposition verantwortlich ist.

### 3.2.8.2 Deregulation von Genprodukten mit Funktionen in Zellzyklus, Proliferation und DNA-Damage-Response

In den Zellmodellen A549, HMEC und MCF-7 fällt eine massive Häufung von nach Zytostatikabehandlung deregulierten „gemeinsamen“ Genen auf, deren Expression bekanntermaßen zellzyklusabhängig schwankt

und deren Produkte in Zellzyklusprogression, Zellteilung oder die Antwort auf DNA-Schäden, die sog. *DNA-Damage-Response*, involviert sind. Der überwiegende Teil dieser Gene wurde in den genannten Zellmodellen durch die Zytostatika herabreguliert. Es fanden sich aber auch einige induzierte Gene aus den genannten Kategorien, die teilweise inhibitorische Funktionen im Zellzyklus erfüllen.

Die Induktion bzw. Repression war bei manchen Genen bereits nach 24 h zu beobachten (besonders bei A549-Zellen), nach 72 h ließ sich dann in allen drei Zelltypen ein ausgeprägter Effekt mit sehr vielen deregulierten Genen feststellen. Im Gegensatz hierzu wurden in den Zelllinien mit mutantern p53 kaum Gene beeinflusst, die im Zusammenhang mit dem Zellzyklus oder der Reaktion auf DNA-Schäden stehen, bzw. diese wurden teilweise in die entgegengesetzte Richtung moduliert.

Tab. 6-3 (S. 253) enthält eine Zusammenstellung der Gene mit Funktionen in Zellzyklus oder DNA-Damage-Response, die in mindestens einem Zellsystem mit Wildtyp-p53 zu mindestens einem Zeitpunkt von vier, fünf oder sechs Substanzen dereguliert wurden. Außerdem ist auch angegeben, wenn nur ein, zwei oder drei Zytostatika zu einer Expressionsänderung gemäß den Filterkriterien führten. Hieraus ist ersichtlich, dass bei einer etwas weniger stringenten Gestaltung der Filterkriterien noch mehr derartige Gene zu den „gemeinsamen“ Genen jeder Zellart zählen würden, da in vielen Fällen nur drei Substanzen die Anforderungen erfüllten.

In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Schritte in der G1/S-Progression (3.2.8.2.1), DNA-Replikation (3.2.8.2.2), DNA-Damage-Response (3.2.8.2.3) und Mitose (3.2.8.2.4) dargestellt und zentrale daran beteiligte Proteine genannt. Diejenigen Effektoren, deren Transkripte im vorliegenden Datensatz in mindestens einer Zellart zu den „gemeinsamen“ differenziell exprimierten zählten, sind im Text nach folgendem Schema markiert:

nach 24 u./o. 72 h dereguliert in:	Symbol bei Induktion:	Symbol bei Repression:
A549	[Gen] <sup>A↑</sup>	[Gen] <sup>A↓</sup>
MDA-MB-231	[Gen] <sup>B↑</sup>	[Gen] <sup>B↓</sup>
HT-29	[Gen] <sup>H↑</sup>	[Gen] <sup>H↓</sup>
MCF-7	[Gen] <sup>M↑</sup>	[Gen] <sup>M↓</sup>
HMEC	[Gen] <sup>N↑</sup>	[Gen] <sup>N↓</sup>

Bei der Markierung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht unterschieden, ob ein Gen nach 24 und/oder 72 h Behandlung differenziell exprimiert war, dies ist jedoch Tab. 6-3 zu entnehmen. Taucht ein betroffenes Gen mehrfach im Text eines Unterkapitels auf, so sind die hochgestellten Symbole nur bei der ersten Erwähnung angegeben. Ebenfalls aus Tab. 6-3 ist ersichtlich, dass außer den im Folgenden erwähnten noch eine sehr große Zahl weiterer Gene, die eine Rolle im Zellzyklus oder in der DNA-Damage-Response spielen, in den Wildtyp-p53-Zellen nach Zytostatikaexposition dereguliert war. Auf ihre Funktio-

nen kann hier nicht ausführlich eingegangen werden, eine kurze Zusammenfassung ihrer wichtigsten Aufgaben sowie Daten zu ihrer zellzyklusabhängigen Expression sind jedoch in der Tabelle enthalten.

### 3.2.8.2.1 G1/S-Progression

Eine stark vereinfachte Übersicht über die Regulation des Zellzyklus durch cyclinabhängige Kinasen (CDKs) und ihre Interaktionspartner ist in Abb. 3-29 gezeigt.

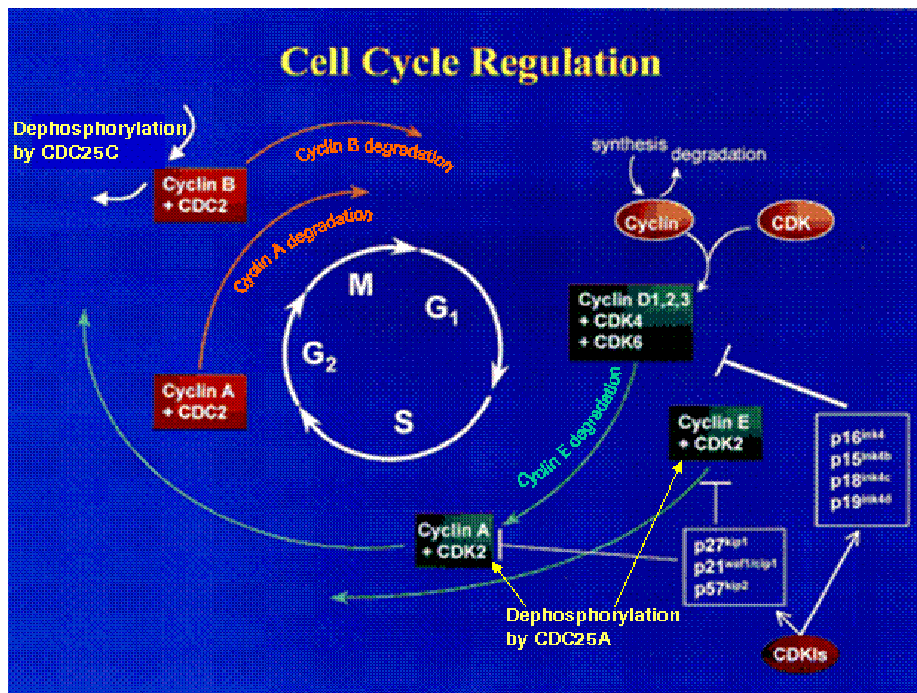


Abb. 3-29: Regulation der Zellzyklusprogression.

Komplexe aus CDKs und Cyclinen regulieren die Progression durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Die Dephosphorylierung der CDKs durch CDC25-Proteine führt zu ihrer Aktivierung, während die CDKIs inhibierend auf CDK-Cyclin-Komplexe einwirken. Ein wesentliches Steuerungselement für die Zellzyklusprogression ist der zelluläre Spiegel der Cycline, welcher durch das Ausmaß ihrer Synthese und Degradation bestimmt wird.

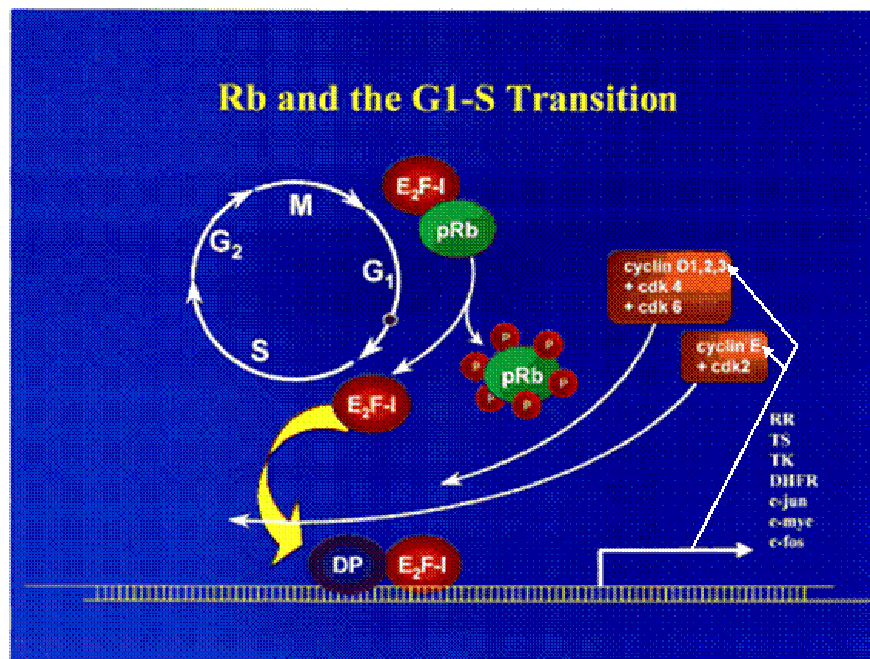
[12], modifiziert.

Der Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus wird maßgeblich durch CDK2<sup>A↓</sup>, CDK4 und CDK6 gesteuert. CDK2 assoziiert mit Cyclin E (Cyclin E1, Cyclin E2<sup>M↓N↓</sup> (HUGO: CCNE2)) und Cyclin A (Cyclin A1, Cyclin A2<sup>A↓M↓N↓</sup> (HUGO: CCNA2)) und aktiviert u. a. Komponenten des präreplikativen Komplexes (*pre-RC*) und des DNA-Polymerase/Primase-Komplexes, wodurch die DNA-Replikation initiiert wird. Die Aktivität der CDK2-Cyclin-Komplexe wird durch CDK-Inhibitoren (CDKIs) negativ reguliert, zu ihnen gehören p21<sup>A↑B↑H↑M↑</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup>. Die Kinasen CDK4 und CDK6 komplexieren mit D-Typ-Cyclinen (Cyclin D1<sup>A↑N↑</sup> (HUGO: CCND1), D2 und D3) und werden in ihrer Aktivität ebenfalls durch CDKIs gehemmt, und zwar durch p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup><sup>A↓M↓</sup> (HUGO: CDKN2C) und p19<sup>INK4d</sup>.

Verschiedene Mechanismen verhindern ein verfrühtes Einsetzen der DNA-Replikation: Das RB-Protein und weitere Proteine der RB-Familie, die auch als „Pocket-Proteine“ bezeichnet werden (p107 und p130),

sind während der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phasen an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie gebunden und verwandeln diese in Repressoren. Dadurch wird die Expression sämtlicher Cycline niedrig gehalten und somit die Aktivierung von CDK2, CDK4 und CDK6 verhindert. Die Transkription von D-Cyclinen kann aber nicht nur durch E2F, sondern auch durch diverse andere Transkriptionsfaktoren, welche von mitogenen Signalen abhängen, stimuliert werden. So können beispielsweise MYC-MAX-Dimere, der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/AKT-Signalweg die Expression von D-Cyclinen fördern. Diese und andere Signalwege wirken auf komplizierte und vielfältige Weise auf die Zellzyklusmaschinerie ein, indem sie u. a. auch die Expression oder Aktivität von CDKs steuern. Details sind z. B. [87] zu entnehmen.

Infolge der Expression von D-Cyclinen können sich aktive Komplexe mit CDK4 und CDK6 bilden, die hypophosphoryliertes RB phosphorylieren und dadurch inaktivieren. Daraufhin dissoziiert RB von E2F-Familienmitgliedern, wodurch diese transkriptionell aktiv werden können und die Expression zahlreicher Zielgene anstoßen, deren Produkte für die G<sub>1</sub>/S-Transition, die DNA-Replikation, die weitere Zellzyklusprogression und die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität erforderlich sind. Zu den E2F-Targets gehört auch Cyclin E. Deshalb werden verstärkt CDK2-Cyclin E-Komplexe gebildet, welche ebenfalls in der Lage sind, RB zu phosphorylieren und somit einen positiven *Feed-forward-Loop* bilden [12], [87]. Diese Vorgänge sind schematisch in Abb. 3-30 gezeigt.



**Abb. 3-30: Regulation der G<sub>1</sub>/S-Transition durch E2F, RB und CDK-Cyclin-Komplexe.**

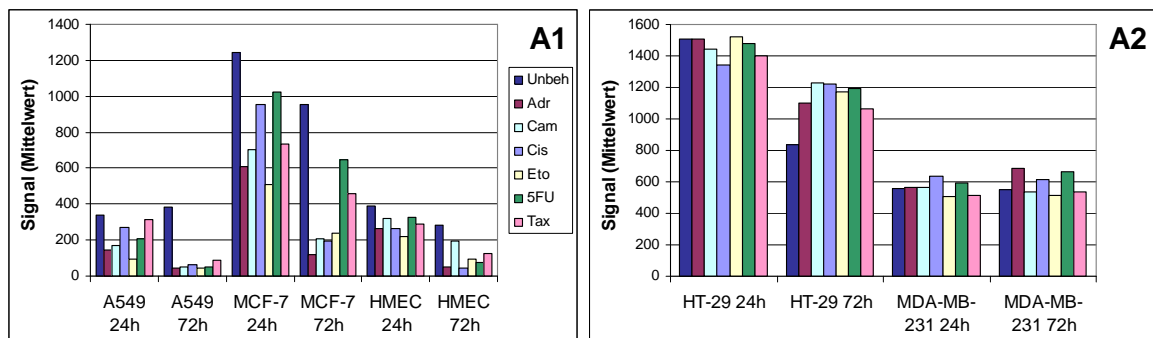
In seiner hypophosphorylierten Form ist pRb (RB) aktiv und hemmt die E2F-Transkriptionsfaktoren durch Komplexbildung. Dies verhindert die G<sub>1</sub>/S-Progression. Durch CDK2-, CDK4- oder CDK6-Cyclin-vermittelte Phosphorylierung wird RB inaktiviert. E2F wird freigesetzt und kann eine Vielzahl transkriptioneller Targets aktivieren. Diese umfassen in Form eines Feed-forward-Loops auch D- und E-Cycline.

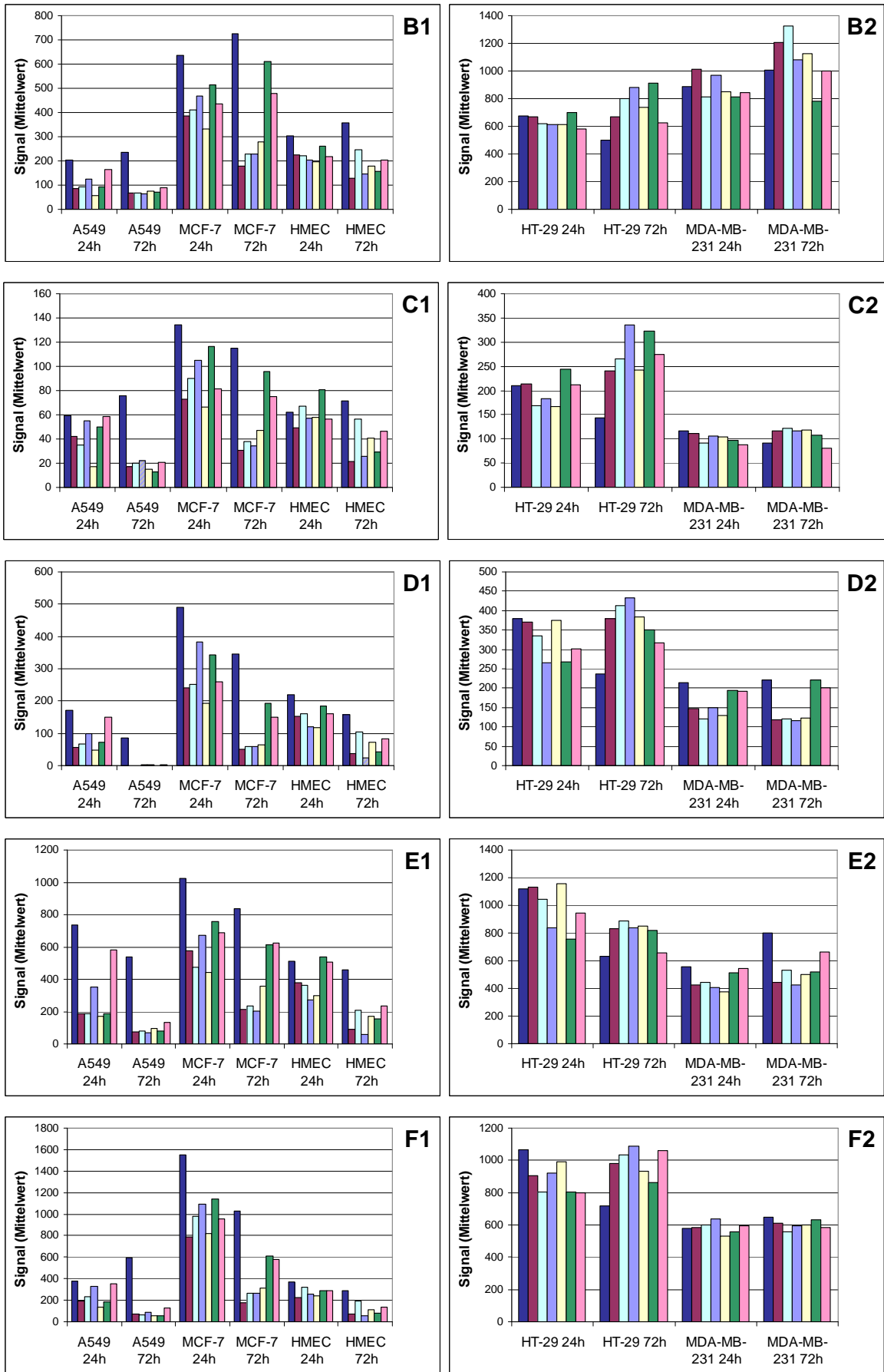
[12], modifiziert.

Die Aktivierung von CDK2 wird durch Phosphorylierung via CAK, der CDK-aktivierenden Kinase (Komplex aus Cyclin H, CDK7 und MAT1), und der Entfernung inhibitorischer Phosphorylierungen durch CDC25-Proteine, insbesondere CDC25A<sup>H↑M↓</sup>, vervollständigt. Aktivierte CDK2 kann sodann p27<sup>Kip1</sup> phosphorylieren. In der Folge wird p27<sup>Kip1</sup> polyubiquitiniert und letztlich am Proteasom abgebaut. An der Polyubiquitinierung von p27<sup>Kip1</sup> sind die F-Box-Proteine SKP1A/B, SKP2<sup>A↓M↓N↓</sup>, CUL1, CKS1A und CKS1B<sup>A↓M↓N↓</sup> beteiligt, die den Komplex SCF (SKP/CUL/F-Box-Protein) bilden [87]. In Summe bewirken diese Vorgänge den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus.

### 3.2.8.2.2 DNA-Replikation

Während der S-Phase des Zellzyklus muss die gesamte genomische DNA der Zelle exakt einmal repliziert werden. Hierfür ist ein komplexes System zuständig, das das mehrfache „Feuern“ von Replikationsursprüngen verhindert. Dies ist für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität der Zelle essenziell. Damit ein Replikationsursprung aktiv wird, muss er mit einem Komplex aus den sogenannten MCM- (*minichromosome maintenance*-)Proteinen beladen werden, der aus MCM2<sup>A↓M↓N↓</sup>, MCM3<sup>A↓H↑M↓N↓</sup>, MCM4<sup>A↓M↓N↓</sup>, MCM5<sup>A↓B↓M↓N↓</sup>, MCM6<sup>A↓M↓N↓</sup> und MCM7<sup>A↓M↓N↓</sup> besteht und vermutlich während der Replikation als Helikase fungiert. Dieser Vorgang wird als *Licensing* bezeichnet und erfordert neben den MCM-Proteinen u. a. die Mitwirkung der Faktoren CDC6<sup>A↓M↓N↓</sup> und CDT1<sup>A↓M↓</sup> und des Multiproteinkomplexes ORC (*origin recognition complex*, bestehend aus ORC1L<sup>A↓M↓</sup>, ORC2L, ORC3L, ORC4L, ORC5L und ORC6L<sup>A↓M↓</sup>). Gemeinsam bilden diese Proteine den präreplikativen Komplex (pre-RC). Dessen Zusammenlagerung an den Replikationsursprüngen kann nur stattfinden, wenn die Aktivität von CDK-Cyclin-Komplexen gering ist. Dies wird durch den Proteinkomplex APC (*anaphase promoting complex*, auch als Cyclosom bezeichnet) gewährleistet, da dieser E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt und zum proteasomalen Abbau von mitotischen Cyclinen und Geminin<sup>A↓M↓N↓</sup> (HUGO: GMNN) führt. Letzteres übt ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf das Laden des pre-RC aus, indem es an CDT1 bindet und dieses inaktiviert. Die Expressionsdaten der MCM-Proteine nach Zytostatikabehandlung aller fünf Zellmodelle sind in Abb. 3-31 gezeigt. Es ist offensichtlich, dass ihre Expression nur in den Wildtyp-p53-Zellmodellen herabreguliert wurde, in A549- und MCF-7-Zellen noch stärker als in HMECs. In den beiden Zelllinien mit mutiertem p53 blieb ihr Spiegel hingegen weitgehend unverändert.





**Abb. 3-31: Expression der sechs im pre-RC enthaltenen MCM-Proteine nach Zytostatikabehandlung.**

**A:** Expression von MCM2 in Wildtyp-p53- (A1) und p53-mutanten (A2) Zelllinien. **B:** Expression von MCM3 in Wildtyp-p53- (B1) und p53-mutanten (B2) Zelllinien. **C:** Expression von MCM4 in Wildtyp-p53- (C1) und p53-mutanten (C2) Zelllinien. **D:** Expression von MCM5 in Wildtyp-p53- (D1) und p53-mutanten (D2) Zelllinien. **E:** Expression von MCM6 in Wildtyp-p53- (E1) und p53-mutanten (E2) Zelllinien. **F:** Expression von MCM7 in Wildtyp-p53- (F1) und p53-mutanten (F2) Zelllinien.<sup>12</sup>

Die zellulären Spiegel bzw. Aktivitäten von APC und CDK-Cyclin-Komplexen oszillieren gegenläufig. APC selbst wird durch mitotische CDK-Cyclin-Komplexe phosphoryliert und aktiviert und ubiquitiniert daraufhin Cycline. Es existieren verschiedene Formen von APC, und zwar APC/CDC20<sup>A↓ B↓ M↓ N↓</sup> und APC/CDH1. CDC20 und CDH1 binden direkt an APC und aktivieren seine Ubiquitinierungsfunktion. APC/CDC20 spielt eine wichtige Rolle für die Trennung der Schwesterchromatiden während der Mitose (s. 3.2.8.2.3.1). Unter anderem vermittelt es hierbei den ubiquitinabhängigen Abbau mitotischer CDK-Cyclin-Komplexe und kann in der Folge selbst nicht mehr phosphoryliert werden, d. h. es fördert letztlich seine eigene Inaktivierung. Der andere Interaktionspartner von APC, CDH1, wird durch CDK-abhängige Phosphorylierung gehemmt und kann erst nach APC/CDC20-vermittelter CDK-Inaktivierung mit APC assoziieren. Der APC/CDH1-Komplex ubiquitiniert, abgesehen von Cyclinen, noch zahlreiche andere Substrate während der G1-Phase, u. a. CDC20, Bestandteile des SCF-Komplexes (CKS1A/B<sup>A↓ M↓ N↓</sup>, SKP2<sup>A↓ M↓ N↓</sup>) und CDCA3<sup>A↓ M↓ N↓</sup> [88, 89]. Nur während der späten Mitose und der frühen G1-Phase ist die APC-Aktivität hoch und die CDK-Aktivität gering, sodass in diesem Zeitfenster das Licensing stattfinden kann. Während der weiteren Zellzyklusprogression verliert der APC-Komplex seine Aktivität und die für den G1/S-Übergang erforderlichen CDK-Cyclin-Komplexe (D-Cycline mit CDK4 und CDK6, E-Cycline mit CDK2<sup>A↓</sup>) werden aktiv [90].

Damit die Replikationsursprünge zu feuern beginnen können, ist eine Aktivierung der pre-RCs erforderlich. Daran sind die Proteine ASK<sup>A↓ M↓ N↓</sup> (*activator of S phase kinase*) und CDC7<sup>M↓</sup> wesentlich beteiligt. ASK bindet an CDC7 und stimuliert dessen Kinaseaktivität, woraufhin CDC7 Bestandteile des pre-RC, vermutlich MCM2 und MCM3, phosphoryliert [91, 92]. Der Komplex aus den MCM-Proteinen agiert vermutlich als Helikase, die den DNA-Doppelstrang entwindet, und ist somit essenziell für das Fortschreiten von Replikationsgabeln (*replication forks*). Er scheint auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität während der S-Phase zu spielen. Der Komplex aus CDC7 und ASK sowie die MCM-Proteine sind wichtige Targets des S-Phasen-Checkpoints (s. 3.2.8.2.3.1.) [93, 94].

An der Rekrutierung von DNA-Polymerasen und der Initiation der Replikation sind u. a. CDC45L<sup>M↓</sup>, MCM10<sup>A↓ H↑ M↓ N↓</sup> und TOPBP1<sup>A↓ M↓</sup> (*topoisomerase II binding protein*) beteiligt [95]. Eine ganze Reihe verschiedener DNA-abhängiger DNA-Polymerasen vermittelt sodann im Zusammenspiel mit Primasen und Ligasen (z. B. LIG1<sup>M↓</sup>) die Verdopplung der chromosomalen DNA und die Reparatur von DNA-Läsionen. Der Polymerase  $\alpha$ /Primase-Komplex, der aus den Untereinheiten POLA<sup>A↓ M↓</sup>, POLA2<sup>A↓ H↑ M↓ N↓</sup>, PRIM1<sup>A↓ M↓ N↓</sup>

<sup>12</sup> Für MCM4, MCM5 und MCM7 sind mehrere Probe Sets auf dem Affymetrix-Chip vorhanden, diese lieferten qualitativ übereinstimmende Ergebnisse. Für die Abbildung ist jeweils eines repräsentativ ausgewählt.

und PRIM2A besteht, ist für die de-novo-Replikation von Leitstrang und Folgestrang zuständig [96]. DNA-Polymerase  $\delta$  (Untereinheiten D1<sup>A↓M↓</sup>, D2, D3<sup>A↓M↓</sup>, D4) spielt eine wichtige Rolle für die DNA-Replikation und -Reparatur und interagiert dabei u. a. mit PCNA<sup>M↓</sup> (*proliferating cell nuclear antigen*), WRN (*Werner syndrome*), TREX1 (*three prime repair exonuclease 1*), TREX2<sup>A↓M↓</sup> und dem RFC-(*replication factor C*-) Komplex (bestehend aus RFC1, RFC2<sup>A↓M↓</sup>, RFC3<sup>A↓M↓N↓</sup>, RFC4<sup>A↓M↓N↓</sup>, RFC5<sup>A↓M↓N↓</sup> und/oder DCC1<sup>A↓M↓</sup> (*defective in sister chromatid cohesion homolog 1*)) [97-99]. Auch DNA-Polymerase  $\epsilon$  (Untereinheiten E<sup>M↓</sup>, E2<sup>A↓M↓N↓</sup>, E3<sup>M↓</sup>, E4) ist an Replikation und Reparatur beteiligt [100].

### 3.2.8.2.3 DNA-Damage-Response

Die Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, mit Schäden an ihrer DNA umzugehen. Dazu zählen Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und die Einleitung der Apoptose. Diese Prozesse müssen koordiniert werden und nach gegenwärtigem Kenntnisstand sind zelluläre Kontrollpunkte, sog. Checkpoints, hierfür von entscheidender Bedeutung. Im Folgenden werden die der Zelle in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zur Verfügung stehenden Checkpoints kurz vorgestellt. Im Anschluss findet sich eine Übersicht über die unterschiedlichen Reparaturmechanismen, die je nach Art der DNA-Schädigung aktiv werden.

#### 3.2.8.2.3.1 Zelluläre Kontrollpunkte (Checkpoints)

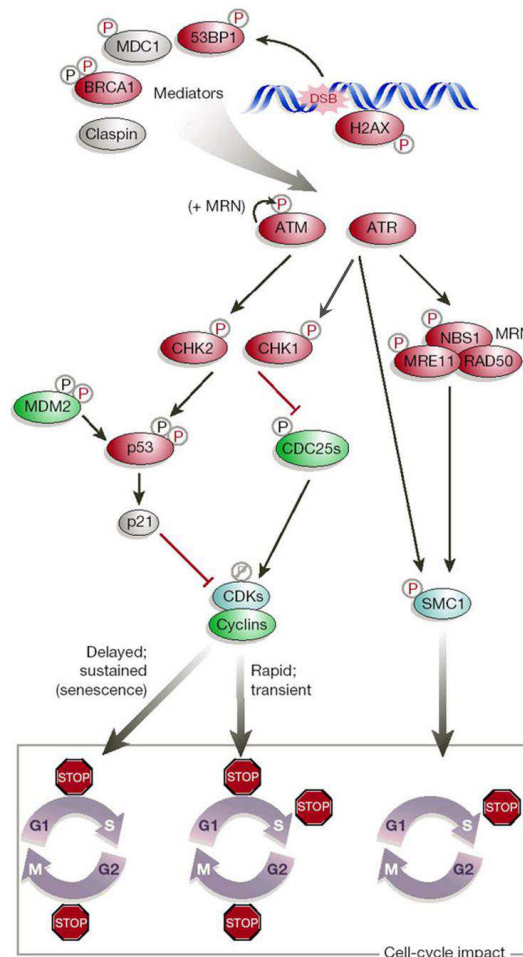
Ganz allgemein kann ein Checkpoint als Mechanismus definiert werden, mit dem die Zelle aktiv die Progression durch den Zellzyklus anhält, bis gesichert ist, dass ein früherer Prozess, wie DNA-Replikation oder Mitose, abgeschlossen ist. Durch die Aktivierung von Checkpoints werden gleichzeitig die Reparatur von DNA-Schäden und die Wiederherstellung angehaltener Replikationsgabeln ermöglicht. Falls eine Reparatur unmöglich oder nicht erfolgreich ist, kommt es zur Aktivierung proapoptotischer Signalkaskaden. Die aufeinander folgenden Elemente eines Checkpoints sind das Erkennen des DNA-Schadens und die Signalinitiation, die Signalvermittlung und -prozessierung und schließlich das Einleiten von Effektorprozessen [101, 102].

Vielfältige Arten von DNA-Läsionen, die von Fehlpaarungen einzelner Basen bis zu Doppelstrangbrüchen reichen können, müssen von Checkpointkomponenten erkannt werden, ebenso ein Stocken im Voranschreiten der Replikationsgabel. Als direkter Sensor fungiert hierbei möglicherweise der Komplex aus RAD50, MRE11 (*meiotic recombination 11*) und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*). Gesichert ist, dass die Kinasen ATM und ATR eine Position an der Spitze der nachfolgenden Signalkaskade einnehmen. Außerdem gibt es Berichte, dass der RPA-Komplex (*replication protein A*-Komplex, bestehend aus RPA1, RPA2<sup>M↓</sup> und RPA3<sup>A↓N↓</sup>) wichtig für die Rekrutierung von ATM und ATR zu den Orten der DNA-Schädigung und für die Initiation der Checkpoints ist. Während ATM vornehmlich nach DNA-Schädigung aktiviert wird, scheint ATR für die Antwort auf einen Replikationsarrest essenziell zu sein. Da aber viele Formen von DNA-Schäden sowohl zu direkten DNA-Läsionen als auch zum Anhalten der Replikationsgabel führen, agieren ATM und ATR häufig auch gemeinsam. Die beiden Kinasen phosphorylieren verschiedene Sub-



strate, darunter  $CHK1^{A\downarrow M\downarrow}$  (HUGO: CHEK1) und  $CHK2^{M\downarrow}$  (HUGO: CHEK2), die für die weitere Signaltransduktion eine zentrale Rolle spielen. ATM phosphoryliert bevorzugt  $CHK2$ , ATR hingegen  $CHK1$ , unter bestimmten Bedingungen wird diese Substratspezifität aber durchbrochen. Verschiedene sog. Checkpointmediatoren modulieren parallel die Aktivität von ATM und ATR, erleichtern ihre Substratinteraktionen und sind an der Zusammenlagerung von Multiproteinkomplexen im Bereich der DNA-Läsionen beteiligt. Zu ihnen gehören  $MDC1^{M\downarrow}$  (*mediator of DNA damage checkpoint 1*),  $TP53BP1$  (*tumor protein p53 binding protein 1*),  $BRCA1^{A\downarrow M\downarrow N\downarrow}$  (*breast cancer 1, early onset*),  $TOPBP1^{A\downarrow M\downarrow}$  und Claspin.

Je nachdem, an welchem Punkt im Zellzyklus die Zelle sich bei Aktivierung dieser ATM/ATR-CHK2/CHK1-Kaskade gerade befindet, kann ein vorübergehender Arrest in der G1-, der S- oder der G2-Phase oder ein permanenter Arrest in G1 oder G2 stattfinden [101]. Abb. 3-32 zeigt ein stark vereinfachtes Schema dieser Vorgänge.



**Abb. 3-32: Die Checkpointmaschinerie.**

Nach der Detektion von DNA-Schäden (hier beispielhaft ein Doppelstrangbruch) wird die Information durch Mediatoren an die Checkpointkinasen ATM und ATR weitergeleitet. Diese phosphorylieren entweder direkt oder vermittelt durch  $CHK1/CHK2$  vielfältige Komponenten eines Signalnetzwerks, welches hier vereinfacht gezeigt ist. Die vom Arrest betroffenen Zellzyklusphasen und die Dauer der Blockade sind angegeben. Tumorsuppressoren sind rot, Protoonkogene grün markiert. [101], modifiziert.

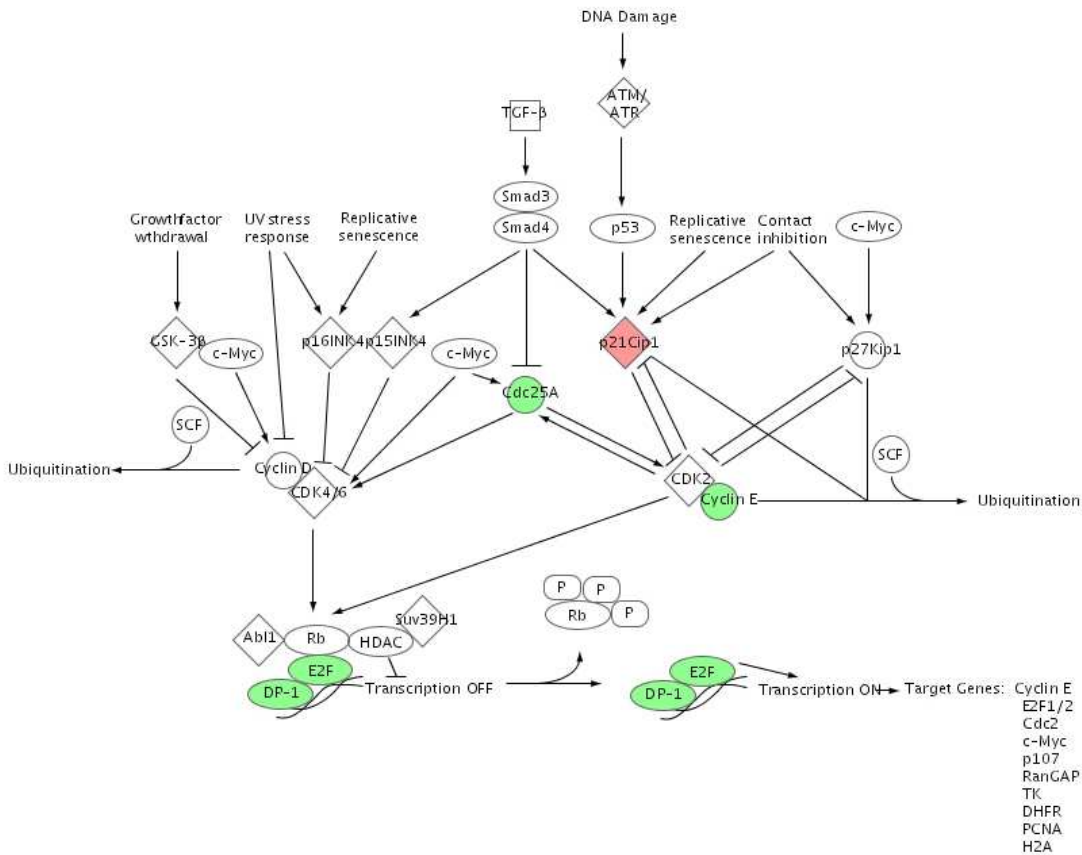
Die verschiedenen Checkpoints können hier nur sehr verkürzt beschrieben werden, für detaillierte Ausführungen siehe [101-104].

**G1-Checkpoint**

Dieser Kontrollpunkt wird im Wesentlichen durch p53 vermittelt. p53 kann sowohl von ATM und ATR als auch von CHK1<sup>A↓ M↓</sup> und CHK2<sup>M↓</sup> phosphoryliert und aktiviert werden, wodurch seine Interaktion mit MDM2 gehemmt wird. MDM2 ist selbst auch ein Substrat dieser vier Kinasen. Zentraler Vermittler des G1-Arrests ist p21<sup>A↑ B↑ H↑ M↑</sup>, welches als CDKI die Aktivität von CDK2<sup>A↓</sup>-Cyclin-Komplexen hemmt (s. 3.2.8.2.1) [101].

**G1/S-Checkpoint**

Es ist anzumerken, dass dieser Checkpoint nicht von allen Autoren vom G1-Checkpoint unterschieden wird und die Bezeichnungen „G1-Checkpoint“ und „G1/S-Checkpoint“ teilweise synonym verwendet werden. ATR und CHK1<sup>A↓ M↓</sup> phosphorylieren CDC25A<sup>H↑ M↓</sup> und markieren es dadurch für die Ubiquitinierung durch den SCF-Komplex (s. 3.2.8.2.1) und den Abbau am Proteasom. Dadurch unterbleibt die Aktivierung von CDK2<sup>A↓</sup>-CyclinE/A-Komplexen, die für die Progression in die S-Phase von zentraler Bedeutung sind [101].



**Abb. 3-33: Deregulierte Gene der G1- und G1/S-Checkpoints.**

Schema der G1- und G1/S-Checkpoints, in dem bei der IPA-Analyse die Gene markiert wurden, die in MCF-7-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung dereguliert waren. Farbgebung: rot = induziert, grün = reprimiert, farblos = nicht dereguliert.

In Abb. 3-33 ist anhand eines im Rahmen einer Ingenuity Pathway Analysis-(IPA-)Auswertung generierten Schemas gezeigt, welche Komponenten des G1- und G1/S-Checkpoints in MCF-7-Zellen nach 72 h Zytostatikaexposition differenziell exprimiert waren.

### S-Phasen-Checkpoints

Ganz allgemein dient ein Stopp der Zellzyklusprogression während der S-Phase dazu, das Feuern von bisher nicht aktivierten Replikationsursprüngen vorübergehend zu verhindern und die Integrität angehaltener Replikationsgabeln zu schützen.

Die Checkpoints, die zu diesem Zweck im Verlauf der S-Phase aktiviert werden können, werden meist in verschiedene Signalwege unterschieden, wobei die Bezeichnungen und Abgrenzungen uneinheitlich sind. Häufig erfolgt eine Unterteilung in Intra-S-Checkpoint (auch DNA-Damage-Checkpoint) und S/M-Checkpoint (auch DNA-Replikations-Checkpoint).

Der Intra-S-Checkpoint umfasst mehrere parallele Äste, einer davon ist die bereits beim G1/S-Checkpoint beschriebene Degradation von CDC25A<sup>H↑ M↓</sup>. Wenn CDK2<sup>A↓</sup> inaktiv bleibt, wird nämlich – wie unter 3.2.8.2.1 beschrieben – auch die Aktivierung essenzieller Komponenten der Replikationsmaschinerie verhindert [101]. Daneben können auch CDC7<sup>M↓</sup>, sein Interaktionspartner ASK<sup>A↓ M↓ N↓</sup> und MCM-Proteine durch ATR- oder ATM-vermittelte Phosphorylierung inaktiviert werden, sodass die Initiation der Replikation unterbleibt [93, 94].

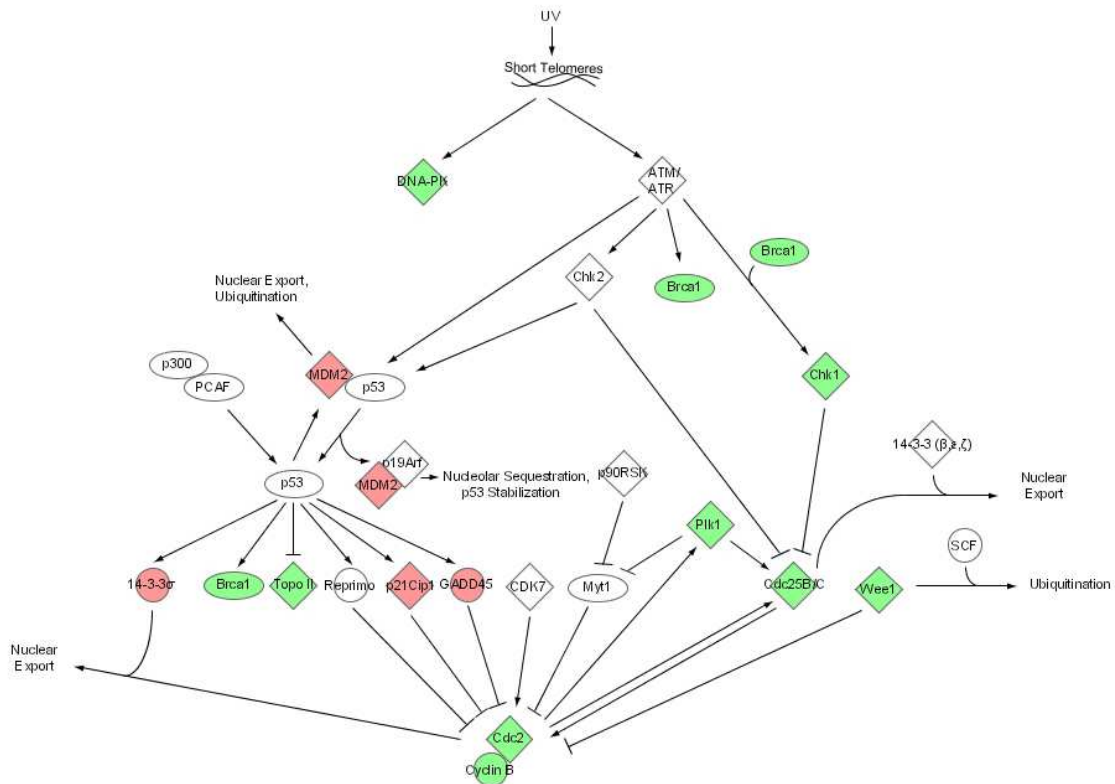
Außerdem kann das Protein SMC1 (*structural maintenance of chromosomes 1*) durch ATM/ATR und/oder NBS1 phosphoryliert werden und trägt gemeinsam mit BRCA1<sup>A↓ M↓ N↓</sup> und FANCD2 (*Fanconi anemia, complementation group D2*) auf bislang ungeklärte Weise zu einem S-Phasen-Arrest bei [101]. Des Weiteren wird dem sogenannten 9-1-1-Komplex (RAD9-RAD1<sup>A↓ M↓</sup>-HUS1) eine Rolle im S-Phasen-Arrest, u. a. als Sensor für DNA-Schäden, zugeschrieben [103, 105]. In manchen Veröffentlichungen wird noch ein gesonderter S/M-Checkpoint beschrieben, der verhindert, dass sich die Zelle zu teilen beginnt, bevor das gesamte Genom verlässlich repliziert ist. Dieser Checkpoint ist jedoch nur in Hefezellen gut charakterisiert und scheint auf sehr ähnlichen Effektoren zu beruhen wie der bereits beschriebene eigentliche S-Phasen-Checkpoint. Sein Hauptangriffspunkt ist der für den Eintritt in die Mitose essenzielle CDC2<sup>A↓ M↓ N↓</sup>-Cyclin B<sup>A↓ M↓ N↓</sup> (HUGO: CCNB2) -Komplex [103].

### G2-Checkpoint

Dieser Kontrollpunkt, der gelegentlich auch als G2/M-Checkpoint bezeichnet wird, verhindert die Initiation der Mitose, wenn Zellen während der G2-Phase DNA-Schäden erleiden oder noch nicht reparierte Schäden aus den vorherigen Zellzyklusphasen aufweisen. Das kritische Target dieses Checkpoints ist der CDC2<sup>A↓ M↓ N↓</sup>-Cyclin B<sup>A↓ M↓ N↓</sup>-Komplex, der die G2/M-Transition vorantreibt. Die Aktivierung dieses Komplexes wird durch verschiedene Mechanismen verhindert, die zur Relokalisation, zum Abbau oder zur Inak-

tivierung der Phosphatase CDC25C<sup>A↓ M↓ N↓</sup>, die CDC2 durch Dephosphorylierung stimuliert, führen. Unter anderem phosphoryliert CHK1<sup>A↓ M↓</sup> CDC25C und vermittelt so dessen Entfernung aus dem Nukleus. Für diesen Export sind 14-3-3-Proteine, z. B. 14-3-3σ<sup>A↑ M↓</sup> (HUGO: SFN), verantwortlich [11]. Gleichzeitig vermitteln sowohl 14-3-3σ als auch GADD45A<sup>A↑ M↑</sup> eine Reduktion der nukleären Cyclin B-Konzentration, so dass die Aktivität von CDC2 abnimmt [15, 106]. p21<sup>A↑ B↑ H↑ M↑</sup> ist nicht nur am G1-Checkpoint, sondern auch am G2-Arrest nach DNA-Schädigung beteiligt, vermutlich indem es die aktivierende Phosphorylierung von CDC2 verhindert [12]. Anhand der Tatsache, dass 14-3-3σ, GADD45A und p21 p53-induzierbare Targets sind, wird deutlich, dass p53 auch in diesen Checkpoint entscheidend eingreift. BRCA1<sup>A↓ M↓ N↓</sup> dürfte ebenfalls eine wichtige Rolle beim G2-Checkpoint spielen [101].

Abb. 3-34 zeigt, dass auch durch eine IPA-Analyse zahlreiche nach Zytostatikabehandlung induzierte und reprimierte Gene dem G2(/M)-Checkpoint zugeordnet werden. Beispielhaft sind die in A549-Zellen nach 72 h induzierten und reprimierten Gene farbig markiert.



**Abb. 3-34: Deregulierte Gene des G2-Checkpoints.**

Schema des G2-Checkpoints, in dem bei der IPA-Analyse die Gene markiert wurden, die in A549-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung dereguliert waren. Farbgebung: rot = induziert, grün = reprimiert, farblos = nicht dereguliert.

### Spindelcheckpoint

Dieser Checkpoint, der auch die Bezeichnung *Spindle assembly*-Checkpoint trägt, wird aktiviert, wenn der mitotische Spindelapparat beschädigt ist oder Chromosomen nicht korrekt über ihre Kinetochore an den mitotischen Spindelfasern angeheftet sind. Er hemmt die Aktivität des Komplexes APC/CDC20<sup>A↓ B↓ M↓ N↓</sup>,

welcher sonst durch Ubiquitinierung des Anaphasen-Inhibitors Securin<sup>A↓M↓</sup> (HUGO: PTTG1) die Segregation der Schwesterchromatiden auslösen würde. Diese Hemmung verläuft über eine Komplexbildung von MAD2<sup>A↓N↓</sup> (HUGO: MAD2L1) und BUBR1<sup>A↓M↓N↓</sup> (HUGO: BUB1B) mit CDC20. Weitere beteiligte Checkpointproteine, die gemeinsam mit MAD2 an die Kinetochore binden, sind BUB1<sup>A↓M↓N↓</sup>, BUB3, MAD1, MAD3 u. a. Außerdem geht man davon aus, dass Motorproteine wie CENPE<sup>A↓B↓M↓N↓</sup>, das direkt mit BUBR1 interagiert, auch als Kontrollpunkt-komponenten fungieren [107-109]. In manchen Veröffentlichungen wird neben dem *Spindle assembly*-Checkpoint noch ein *Spindle positioning*-Checkpoint beschrieben [72].

#### 3.2.8.2.3.2 DNA-Reparaturmechanismen

Die DNA-Reparatur ist ein physiologischer Prozess, der sicherstellt, dass Schäden am Genom rasch und verlässlich behoben werden, und der dadurch die Integrität der Erbinformation aufrechterhält.

Besonders während der S-Phase des Zellzyklus muss die Reparaturmaschinerie der Zelle permanent aktiv oder aktivierungsbereit sein, um Fehler zu korrigieren, die direkt bei der DNA-Replikation entstehen oder schon vorher vorliegen und beim Voranschreiten der Replikationsgabel entdeckt werden. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Replikations- und Reparaturproteinen steuern, sind aktivierende Mitglieder der E2F-Familie (E2F1<sup>M↓</sup>, E2F2, E2F3). Sie stimulieren in Form von Heterodimeren mit DP1 oder DP2 die S-Phasen-Progression [110]. Deshalb werden an der DNA-Replikation und der Reparatur von DNA-Läsionen beteiligte Proteine im Zellzyklus koexprimiert. Außerdem erfüllen viele von ihnen Aufgaben sowohl in der DNA-Synthese als auch bei Reparaturmechanismen, sodass eine klare Trennung dieser funktionellen Kategorien kaum möglich ist.

Auch während der Mitose drohen durch Fehler bei der Ausbildung des Spindelapparats oder bei der Chromosomensegregation DNA-Schäden mit fatalen Auswirkungen, auf die die Zelle nach Aktivierung des Spindel-Checkpoints durch Einsatz von Reparaturproteinen reagieren kann.

Die wichtigsten Mechanismen für die Behebung von Schäden an der DNA werden im Folgenden übersichtsartig dargestellt. Innerhalb der Legenden sind die durch Zytostatika deregulierten Gene mit den unter 3.2.8.2 beschriebenen hochgestellten Symbolen markiert.

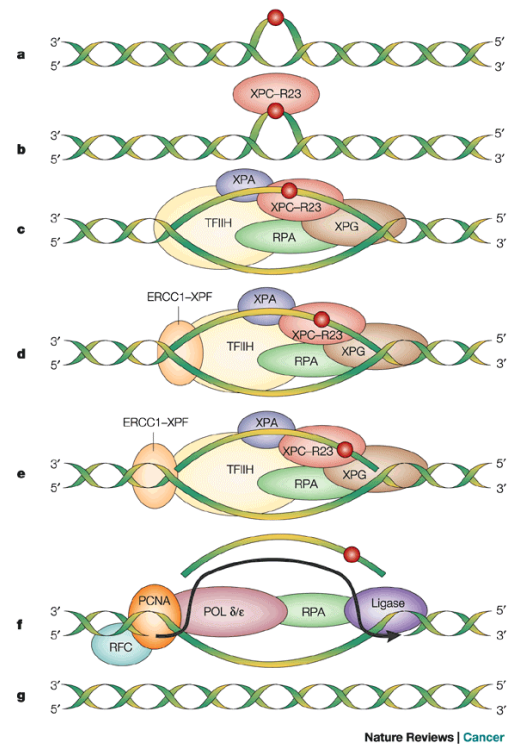
#### Nukleotidexzisionsreparatur (NER) [111, 112]

- Reparatur von bestimmten durch Bestrahlung, Chemikalien oder ROS hervorgerufenen DNA-Schäden (insbesondere Cyclobutanpyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte), die die Struktur der DNA-Helix verzerren
- Unterscheidung in GG-NER (*global genome NER*, Reparatur von Läsionen im gesamten Genom) und TC-NER (*transcription-coupled NER*, Reparatur von Läsionen in transkribierten DNA-Strängen)

- Schema s. Abb. 3-35

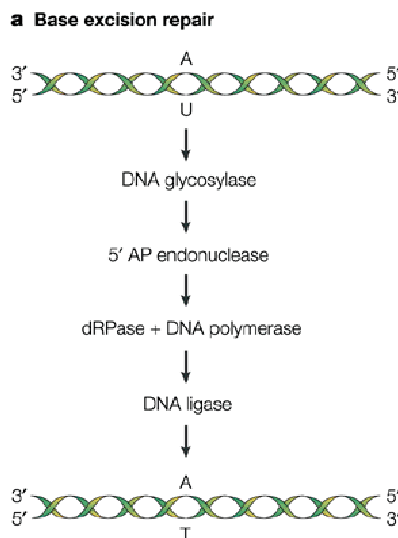
**Abb. 3-35: Die Nucleotidexzisionsreparatur (NER).**

DNA-Schäden werden durch den Komplex aus XPC<sup>AT</sup> (*xeroderma pigmentosum, complementation group C*) und R23 (RAD23B) erkannt. Diese rekrutieren mehrere andere Proteine: XPA und RPA (RPA2<sup>MJ</sup>, RPA3<sup>AL NJ</sup>) erleichtern vermutlich die spezifische Identifikation von Basenläsionen. TFIIH ist ein Subkomplex der RNA-Polymerase-II-Transkriptionsmaschinerie, der auch an der NER beteiligt ist. Zu seinen Untereinheiten zählen die Helikasen XPB und XPD, die den DNA-Doppelstrang zunächst aufwinden und ihm lokal eine blasenartige Struktur verleihen. Daraufhin lagert sich ein Heterodimer aus ERCC1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*) und XPF an. XPG fungiert als DNA-Endonuklease und durchtrennt den beschädigten DNA-Strang auf der 3'-Seite der Läsion, während der ERCC1-XPF-Komplex diesen auf der 5'-Seite schneidet. Dadurch wird ein ca. 27–30 Nukleotide langes Fragment entfernt; die entstehende Lücke wird durch sog. Reparatursynthese unter Beteiligung von DNA-Polymerase  $\delta$  (POLD1<sup>AL MJ</sup>, D3<sup>AL MJ</sup>) oder  $\epsilon$  (POLE<sup>MJ</sup>, E2<sup>AL MJ NJ</sup>, E3<sup>MJ</sup>), PCNA<sup>MJ</sup>, RPA- und RFC-Proteinen und DNA-Ligase geschlossen. [112]



**Basenexzisionsreparatur (BER) [112, 113]**

- Austausch geschädigter oder „falscher“ Basen (z. B. Uracil, 3-Methyladenin)
- Reparatur von Läsionen, die die DNA-Helix nicht verzerren
- initiiert durch verschiedene spezialisierte Glykosylasen, z. B. UNG<sup>AL MJ</sup> (Uracil-DNA-Glykosylase), MPG (N-Methylpurin-DNA-Glykosylase)
- Schema s. Abb. 3-36

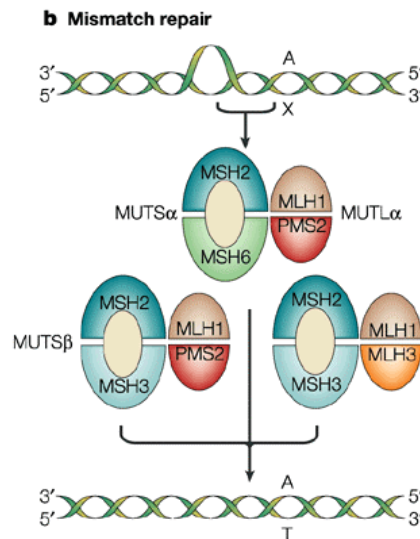


**Abb. 3-36: Die Basenexzisionsreparatur (BER).**

Eine DNA-Glykosylase erkennt spezifisch die veränderte Base und spaltet die N-C1'-Bindung zwischen Base und Desoxyribose. Eine AP-Endonuklease erzeugt eine AP-Site (apurinische oder apyrimidinische Stelle), die dann durch eine 5'-Desoxyribophosphodiesterase (dRPase), z. B. XRCC1 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*), und eine Polymerase, z. B. DNA-Polymerase  $\beta$ , aufgefüllt wird. Eine Ligase stellt sodann wieder ein intaktes Desoxyribosephosphat-Gerüst her. [112]

Mismatchreparatur (MMR) [114, 115]

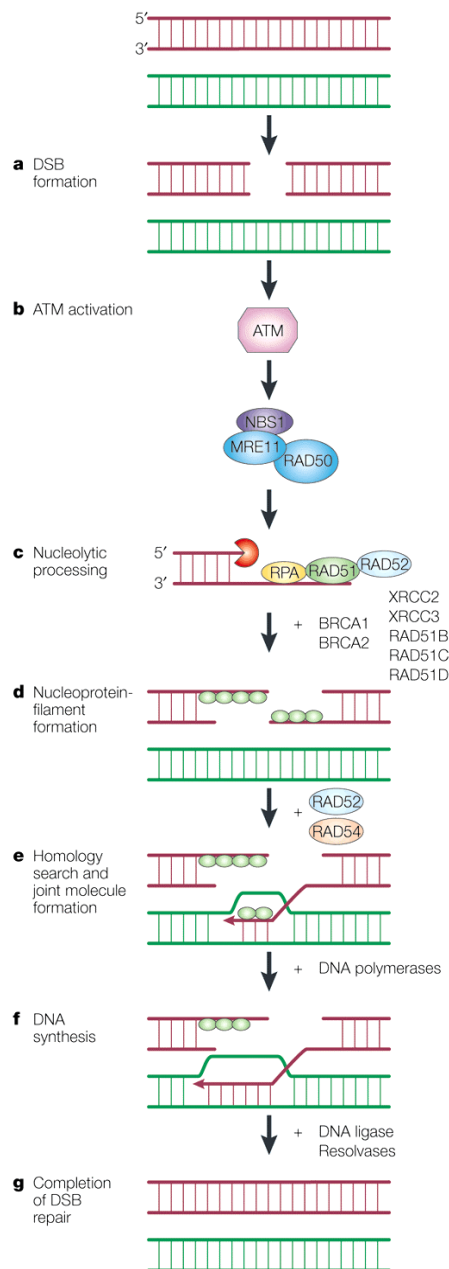
- erkennt falsch paarende Basen (*mismatches*) und sog. IDLs (*insertion-deletion loops*)
- wichtige Rolle während der DNA-Replikation, da sie falsch eingebaute Basen aus dem neu entstehenden DNA-Strang entfernt
- Schema s. Abb. 3-37

**Abb. 3-37: Die Mismatchreparatur (MMR).**

Ein als MUTS $\alpha$  bezeichneter Komplex aus MSH2<sup>A $\downarrow$ M $\downarrow$ N $\downarrow$</sup>  (*mutS homolog 2*) und MSH6<sup>A $\downarrow$ M $\downarrow$ N $\downarrow$</sup>  oder evtl. auch ein Komplex aus MSH2 und MSH3 (MUTS $\beta$ ) erkennt den Basenmismatch bzw. kleine Schleifen (*loops*). Unter Beteiligung von MLH1 (*mutL homolog 1*), PMS2 (*postmeiotic segregation increased 2*), MLH3 und weiteren Proteinen (DNA-Polymerase  $\delta$  (POLD1<sup>A $\downarrow$ M $\downarrow$</sup> , D3<sup>A $\downarrow$ M $\downarrow$</sup> ), PCNA<sup>M $\downarrow$</sup> , RPA- (RPA2<sup>M $\downarrow$</sup> , RPA3<sup>A $\downarrow$ N $\downarrow$</sup> ) und RFC-Proteinen [115]) wird die Läsion repariert. Der genaue Mechanismus ist allerdings unklar. [112]

Homologe Rekombination [116, 117]

- Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen
- nutzt das unbeschädigte Schwesterchromatid als Vorlage
- Schema s. Abb. 3-38
- mögliche Rolle des FA-(Fanconi-Anämie-)Komplexes im Zusammenspiel mit BRCA-Proteinen und RAD51<sup>A $\downarrow$ M $\downarrow$</sup> : Modell s. Abb. 3-39

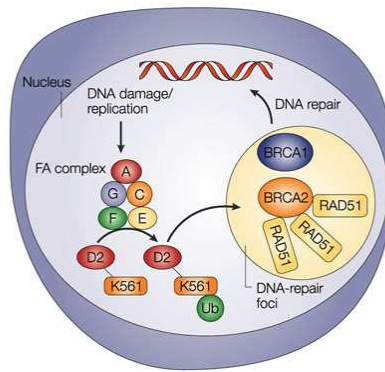


Nature Reviews | Genetics

**Abb. 3-38: Die Homologe Rekombination**

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) führen zur Aktivierung von Checkpoints unter Beteiligung der ATM-Kinase, die NBS1 phosphoryliert. Die freien DNA-Enden werden möglicherweise durch RAD52 im Zusammenspiel mit dem RAD50-MRE11-NBS1-Komplex erkannt. Durch nukleolytische Spaltung wird eine einzelsträngige Region mit 3'-Überhang gebildet. RAD51<sup>AJ MJ</sup> polymerisiert auf der ssDNA zu einem Nukleoproteinfilament, unterstützt von RPA (RPA2<sup>MJ</sup>, RPA3<sup>AJ NJ</sup>), RAD52 und möglicherweise BRCA1<sup>AJ MJ NJ</sup>, BRCA2<sup>MJ</sup> (*breast cancer 2, early onset*), XRCC2/3 und RAD51-Paralogen. Das RAD51-Nukleoproteinfilament sucht den homologen DNA-Doppelstrang. Unter Beteiligung von RAD52 und RAD54 findet ein Strangaustausch statt. Durch nachfolgende DNA-Synthese und Ligation wird der Reparaturprozess abgeschlossen.





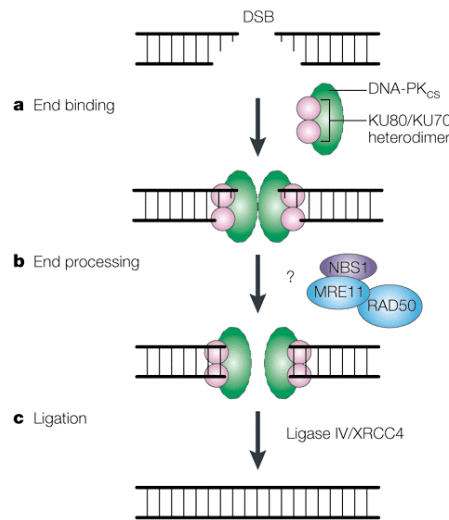
Nature Reviews | Cancer

**Abb. 3-39: Die Rolle des FA-Komplexes und der BRCA-Proteine bei der DNA-Reparatur.**

Die FA-Proteine FANCA<sup>M↓</sup>, FANCC, FANCE<sup>M↓N↓</sup>, FANCF<sup>H↓</sup> und FANCG<sup>A↓M↓N↓</sup> bilden einen konstitutiven Komplex im Nucleus normaler Zellen. Während der S-Phase oder auf DNA-Schädigung hin vermittelt dieser Komplex indirekt die Monoubiquitinierung von FANCD2. Aktiviertes FANCD2 transloziert zu DNA-Reparatur-Foci, die BRCA1<sup>A↓M↓N↓</sup> und BRCA2 enthalten. BRCA2 bindet direkt an RAD51 und an DNA und stellt vermutlich die Verbindung zur homologieabhängigen DNA-Reparatur her. [117]

**Non-homologous end-joining (NHEJ) [116]**

- dient der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, aber auch dem Prozessieren von Intermediaten der V(D)J-Rekombination bei der Bildung der Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgene
- da keine homologen Chromosomenabschnitte genutzt werden, besteht erhebliche Fehleranfälligkeit
- Schema s. Abb. 3-40



Nature Reviews | Genetics

**Abb. 3-40: Das Non-homologous end-joining.**

Der Doppelstrangbruch wird durch einen Komplex aus dem KU-Heterodimer (KU70 und KU80) und der katalytischen Untereinheit von DNA-PK (DNA-aktivierte Proteinkinase, DNA-PKcs<sup>A↓M↓</sup>, HUGO: PRKDC) erkannt. Nach Hinzufügen oder Entfernen einiger Basenpaare vermittelt ein Komplex aus DNA-Ligase IV und XRCC4 die Ligation der freien Enden. Der RAD50-MRE11-NBS1-Komplex könnte am Aufwinden der DNA-Helix und/oder der nukleolytischen Prozessierung der DNA-Enden beteiligt sein. [116]

Eine mögliche Rolle in der Überwachung der DNA-Integrität oder der Reparatur von DNA-Schäden wird einem Multiproteinkomplex zugeschrieben, der viele der bereits erwähnten Checkpoint- und/oder Reparaturproteine enthält und als BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) bezeichnet wird [118]. Abb. 3-41 gibt ein Modell dieses Komplexes wieder.

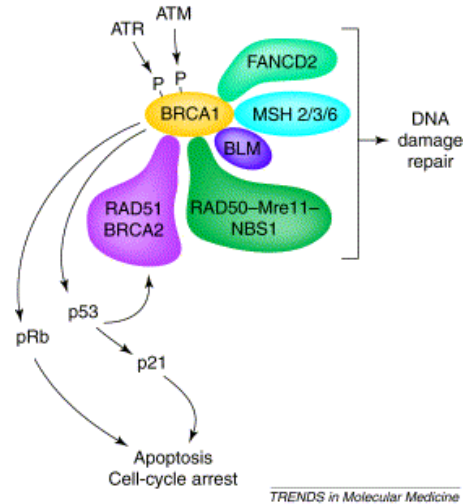
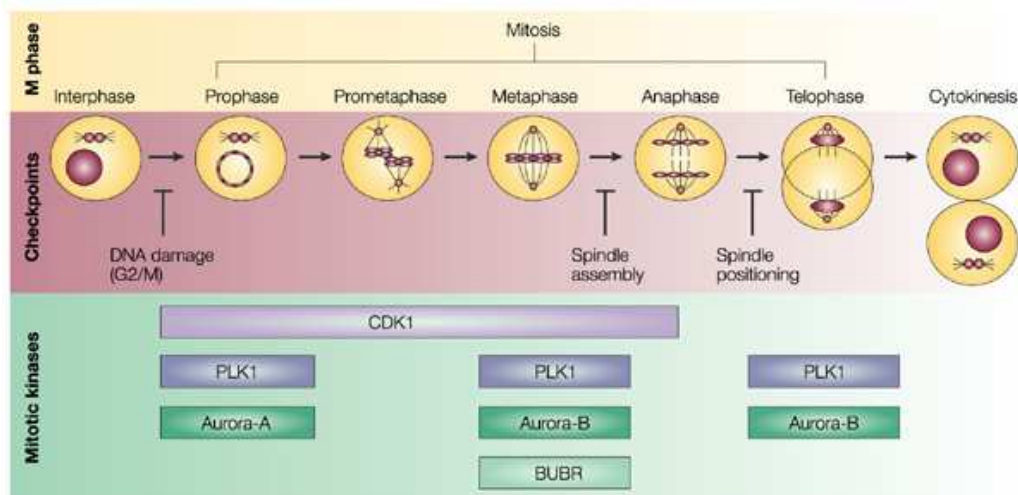


Abb. 3-41: Der BASC-Komplex.

Hypothetisches Modell des BASC-Komplexes. Die beteiligten Proteine beeinflussen die Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden, indem sie Reparaturprozesse initiieren und/oder mit RB und p53 interagieren und dadurch Zellzyklusarrest und Apoptose modulieren. [118]

### 3.2.8.2.4 G2/M-Progression und Mitose

Abb. 3-42 zeigt eine schematische Übersicht über die Phasen der mitotischen Zellteilung und wichtige daran beteiligte Kinasen.



Nature Reviews | Cancer

Abb. 3-42: Mitose und Zytokinese und wichtige mitotische Kinasen.

Die M-Phase des Zellzyklus dient der geordneten Trennung der Schwesterchromatiden und ihrer Verteilung auf die Tochterzellen. Nach der eigentlichen Mitose läuft die Zytokinese ab, während der die Bestandteile des Zytoplasmas gleichmäßig auf die neu entstehenden Zellen verteilt werden. Verschiedene Checkpoints kontrollieren hierbei die Integrität des Chromosomenmaterials und des Spindelapparats. Essenzielle an der mitotischen Progression beteiligte Kinasen sind CDK1 (CDC2), PLK1, die Aurora-kinasen A und B sowie BUBR(1). [72]

Die cyclinabhängige Kinase CDC2<sup>A↓M↓N↓</sup> ist in Assoziation mit den mitotischen Cyclinen vom A- und B-Typ (Cyclin A1, A2<sup>A↓M↓N↓</sup>, B1<sup>A↓M↓N↓</sup> und B2<sup>A↓M↓N↓</sup>) zentraler Vermittler der Progression von der G2- in die M-Phase. Der CDC2-Cyclin B-Komplex wird auch als *M-phase promoting factor* (MPF) bezeichnet und ist, wie bereits erwähnt, Angriffspunkt des S/M- und des G2-Checkpoints (s. 3.2.8.2.3.1). CDC25C<sup>A↓M↓N↓</sup> aktiviert Cyclin B-assoziiertes CDC2 durch Dephosphorylierung und löst dadurch den Eintritt in die Mitose aus. Die Signalthöhen von CDC2, Cyclin B1, Cyclin B2 und CDC25C in den Zellsystemen mit Wildtyp-p53-Protein sind in Abb. 3-43 gezeigt. Ihre Expression war nach 24 h in A549-Zellen zumindest durch einen Teil der Zytostatika bereits reduziert, in MCF-7- und HMEC-Zellen hingegen noch unverändert. Nach 72 h waren diese vier für den Eintritt in die Mitose essenziellen Faktoren in A549-Zellen extrem stark herabreguliert, in MCF-7-Zellen wurden sie hauptsächlich durch Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid reprimiert. In HMEC-Zellen verringerten Adriamycin, Cisplatin und 5-FU ihre Expression nach 72 h jeweils am deutlichsten.

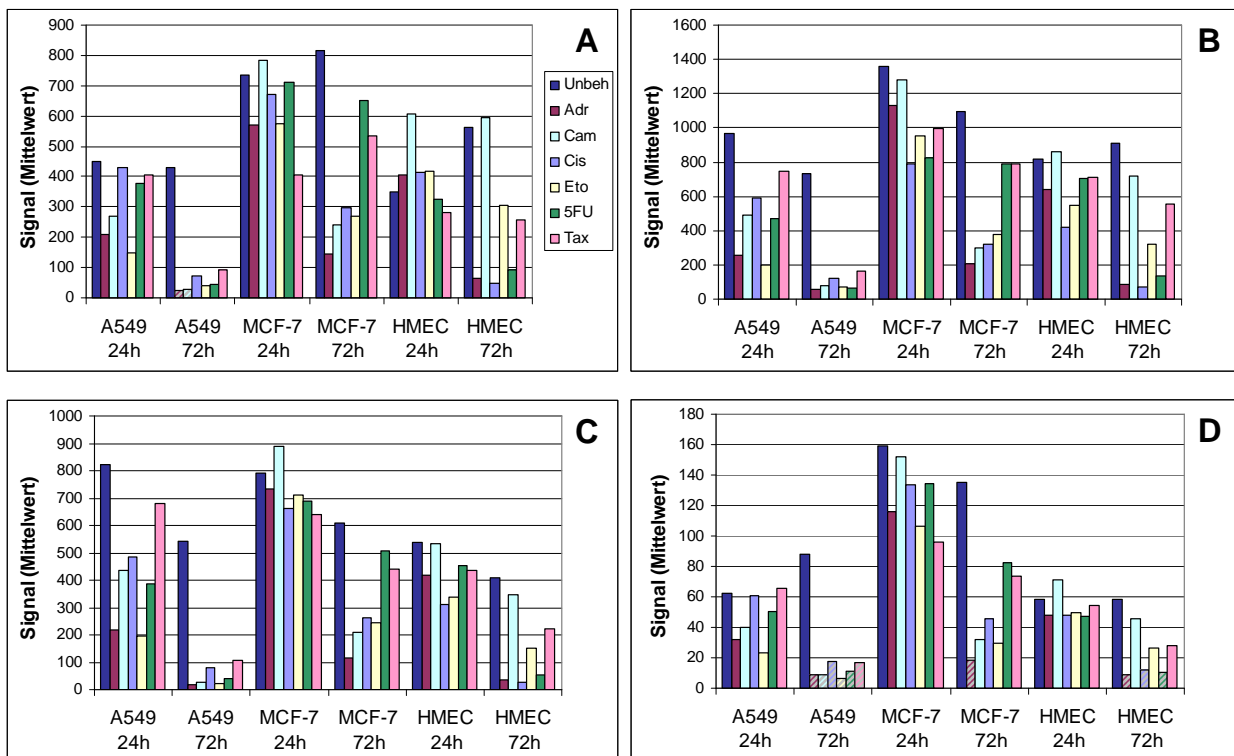


Abb. 3-43: Expression von an der G2/M-Progression beteiligten Genen in Wildtyp-p53-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

A: CDC2, B: Cyclin B1, C: Cyclin B2, D: CDC25C.

Sowohl APC/CDC20<sup>A↓B↓M↓N↓</sup> als auch das ubiquitinkonjugierende Enzym UBCH10<sup>A↓M↓N↓</sup> (HUGO: UBE2C) vermitteln den ubiquitinabhängigen Abbau von B-Cyclinen. Dieser setzt während des Übergangs von der Meta- in die Anaphase ein und ist Voraussetzung für die weitere Progression der Mitose [119].

Für die Trennung der Schwesterchromatiden ist die korrekte Ausbildung des Spindelapparats essenziell. Ausgehend von den Zentrosomen werden die Mikrotubuli gebildet und heften sich teilweise an den Kinetochores, speziellen proteinreichen Regionen an den Zentromeren, in Form der sog. K-Faser an, wodurch

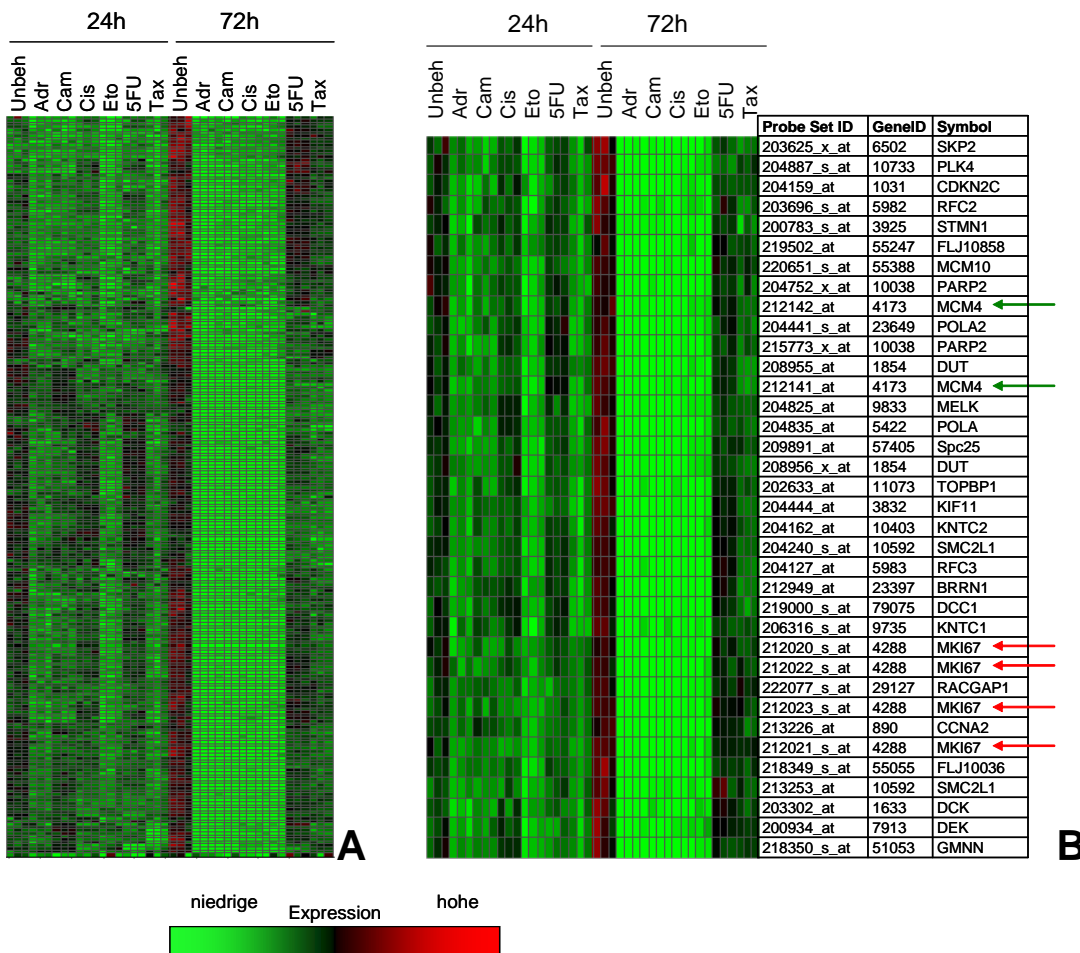
eine feste Verbindung der Chromatiden zu den Spindelpolen entsteht. Weitere Tubulinfasern interagieren mit den Chromosomenarmen oder mit Fasern aus dem gegenüberliegenden Spindelpol. Durch ein komplexes Zusammenspiel aus polwärts und entgegengesetzt gerichteten Kräften (*poleward* bzw. *polar ejection forces*) werden die Chromosomen in der Äquatorialebene ausgerichtet und können dann geordnet zu den Polen transportiert werden [107]. Zahlreiche Zentromer- bzw. Kinetochorproteine sind hieran beteiligt, u. a. die Motorproteine CENPE<sup>A↓ B↓ M↓ N↓</sup> und CENPF<sup>A↓ M↓ N↓</sup> und Mitglieder der Kinesinfamilie, die ebenfalls als Motorproteine fungieren (z. B. Eg5<sup>A↓ M↓ N↓</sup> (HUGO: KIF11), KIF20A<sup>A↓ B↓ M↓ N↓</sup> und KIF22<sup>A↓ M↓ N↓</sup>).

Eine überaus wichtige regulatorische Rolle spielen bei diesen Prozessen die Aurorakinasen: Aurora A<sup>A↓ M↓ N↓</sup> (HUGO: STK6) beeinflusst die Funktion von Zentrosom und Spindelapparat. Sie reguliert die Zentrosomenduplikation sowie die Ausbildung und korrekte Anheftung der Spindelfasern. Aurora B<sup>A↓ M↓ N↓</sup> ist maßgeblich an der Chromosomensegregation beteiligt, indem sie die korrekte Orientierung der Schwesterchromatiden überwacht. Sie bewerkstelligt dies vermutlich über die Kontrolle der Spindelfaserdynamik. Auch in der Zytokinese spielt Aurora B eine tragende Rolle. Teilweise überlappen die Funktionen der beiden Kinasen, beispielsweise können beide die Phosphorylierung von CENPA<sup>A↓ M↓ N↓</sup> katalysieren, die für die korrekte Anheftung der K-Fasern an den Kinetochoren bedeutsam ist. Darüber hinaus beeinflusst Aurora A auch die p53-Aktivität: Sie kann p53 phosphorylieren, stimuliert dadurch seine MDM2-vermittelte Ubiquitinierung und unterbindet seine Tumorsuppressorfunktion. Dies kann zur malignen Transformation von Zellen beitragen, deshalb wird Aurora A als onkogene Kinase eingestuft [120, 121].

Die Kinase PLK1<sup>A↓ B↓ M↓ N↓</sup> (*polo-like kinase 1*) besitzt ebenfalls zentrale Bedeutung für die Ausbildung und Funktion des Spindelapparats. Außerdem wurde festgestellt, dass die zelluläre Lokalisation von Cyclin B1 und CDC25C durch PLK1-vermittelte Phosphorylierung reguliert wird; dies bedeutet, dass PLK1 bereits den Eintritt in die Mitose reguliert [122, 123].

#### 3.2.8.2.5 Darstellung der differentiellen Expression von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen in Form von Heat Maps

Sämtliche Gene mit Funktionen im Zellzyklus oder in der DNA-Damage-Response, die in MCF-7-Zellen durch die Zytostatikabehandlung reprimiert wurden, sind in Abb. 3-44A in Form eines sog. *Heat Map* dargestellt. Dieser wurde mit Hilfe der Software Spotfire DecisionSite erstellt, indem die Signalhöhen der zugehörigen Probe Sets nach Normalisierung einem hierarchischen Clustering unterworfen wurden (s. 2.7.5).



**Abb. 3-44: Heat Maps der Expressionsdaten von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen in MCF-7-Zellen nach Zytostatikabehandlung.**

Jede Probe Set ID wird durch eine Zeile im Heat Map repräsentiert, jeder Chip durch eine Spalte. Die nach 24 h Behandlung analysierten Proben bilden die linke Seite des Heat Maps, die nach 72 h gemessenen die rechte Seite. Sie sind jeweils in der Reihenfolge Unbeh-Adr-Cam-Cis-Eto-5FU-Tax dargestellt, wobei jede Behandlung durch drei Chips und somit drei Spalten im Heat Map vertreten ist. Die Probe Sets wurden hierarchisch geclustert, das dabei entstehende Dendrogramm ist nicht gezeigt.

**A:** Gesamter Heat Map aller Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Gene.

**B:** Willkürlich gewählter Ausschnitt aus dem Heat Map; jeder Zeile sind die entsprechende Affymetrix Probe Set ID, die GeneID und das Gensymbol zugeordnet. Die zwei Probe Sets von MCM4 und die vier Probe Sets von MKI67 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Aus dieser groben Übersicht ist erkennbar, dass bereits nach 24 h viele Probe Sets auf den Chips der zytostatikabehandelten Proben ein im Vergleich zu den Kontrollchips (ganz links) erniedrigtes Signal aufwiesen und deshalb stärker grün eingefärbt sind. In den nach 72 h Behandlung erhaltenen Daten, die den rechten Teil des Heat Maps von Abb. 3-44A bilden, ist dieses Phänomen noch deutlich stärker ausgeprägt. Die Signalwerte der Arrays, auf die die mit Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid behandelten Proben hybridisiert wurden, sind grün gefärbt und somit sehr niedrig, während die Signale der Kontrollchips deutlich höher liegen und deshalb in rot bzw. schwarz dargestellt sind. Eine intermediäre Stellung nehmen die aus 5-FU- und Taxol-Behandlung stammenden Chips ein: Ihre Signale liegen zwar niedriger als die der Kontrollen, jedoch im Allgemeinen höher als die Daten aus den übrigen Zytostatikabehandlungen.

Ein Ausschnitt (Subcluster) aus diesem Heat Map, bei dem jeder Zeile die passende Affymetrix Probe Set ID, die GeneID und das Gensymbol zugeordnet sind, ist in Abb. 3-44B gezeigt.

Ein Clustern nach funktionellen Subkategorien wie z. B. DNA-Replikations- oder Spindelapparat-Proteinen ist nicht festzustellen, dazu ähnelten sich die Änderungen der Expressionshöhen aller zellzyklusassoziierten Gene zu stark. Allerdings fällt auf, dass die vier Probe Sets, die das Gen MKI67 (*Ki67*, *antigen identified by monoclonal antibody Ki-67*) repräsentieren, sehr nah zusammenliegen. Ebenso sind zwei der Probe Sets von MCM4 in diesem Subcluster vertreten. Daraus ist abzulesen, dass die unterschiedlichen Probe Sets dieser Gene über alle Chips hinweg ein extrem ähnliches Expressionsprofil aufweisen.

Nach dem gleichen Prinzip wurde auch mit den aus der Behandlung von A549-Zellen erhaltenen Daten ein Heat Map erstellt. Dieser ist in Abb. 3-45A wiedergegeben.

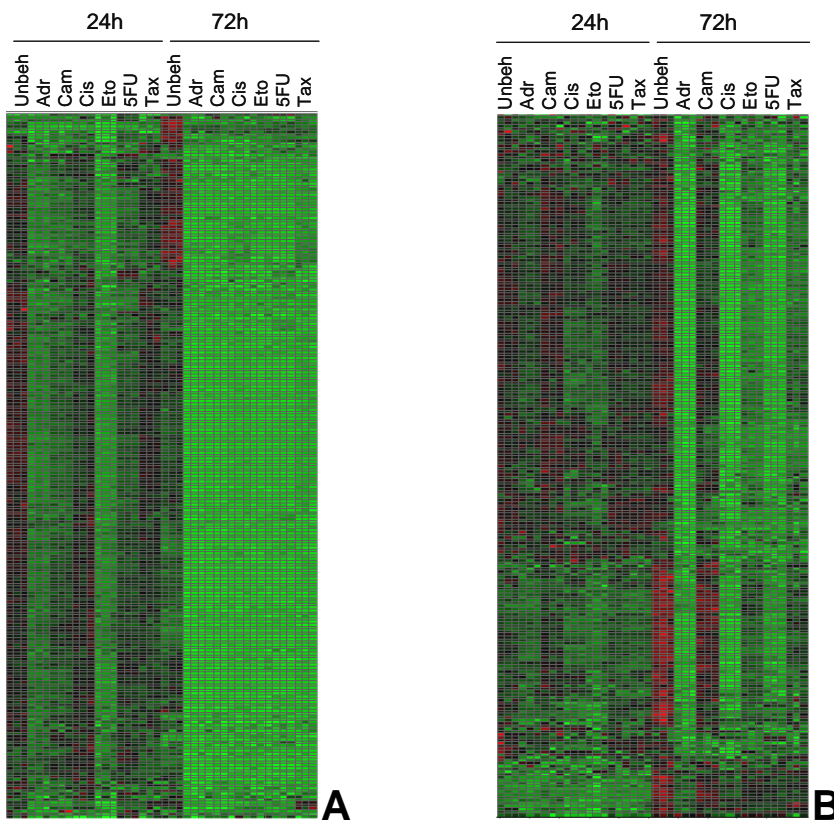


Abb. 3-45: Heat Maps der Expressionsdaten von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen in A549-Zellen (A) und HMECs (B) nach Zytostatikabehandlung.

Bei Betrachtung dieses Heat Maps fällt besonders auf, dass Etoposid nach 24 h die Expressionshöhen im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen noch stärker reduziert als die übrigen Zytostatika. Nach 72 h stimmen alle sechs Zytostatika weitgehend überein; die bei MCF-7-Zellen beobachteten geringeren Effekte von 5-FU und Taxol sind bei A549-Zellen nicht festzustellen.

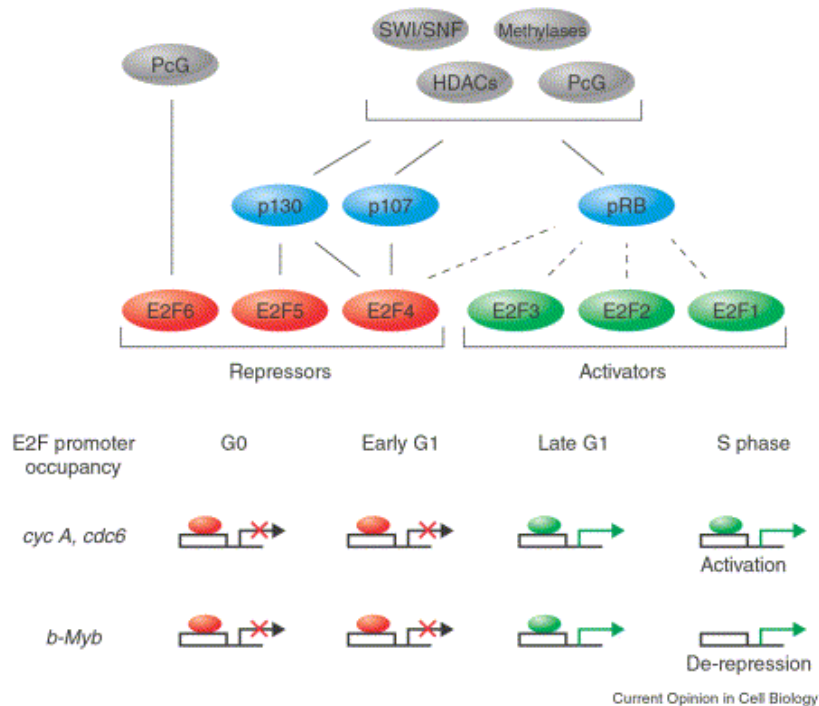
Auch mit den aus der Behandlung von HMEC-Zellen gewonnenen Affymetrix-Daten der reprimierten Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Gene wurde ein Heat Map erstellt (Abb. 3-45B). Dieser spiegelt den Befund wider, dass die Zytostatika nach 24 h im Vergleich zur Kontrollbehandlung nur äußerst geringe Ef-



fekte ausübten. Die in der rechten Hälfte des Heat Maps dargestellten 72 h-Ergebnisse untermauern eine Beobachtung, die sich bereits aus den beispielhaft gezeigten Balkendiagrammen einiger Zellzyklusgene herauskristallisiert hatte, nämlich die stärker ausgeprägten Effekte von Adriamycin, Cisplatin und 5-FU im Vergleich zu den übrigen Wirkstoffen (s. Abb. 3-31, Abb. 3-43).

**3.2.8.2.6 Transkriptionelle Regulation von Zellzyklusprogression und DNA-Damage-Response**

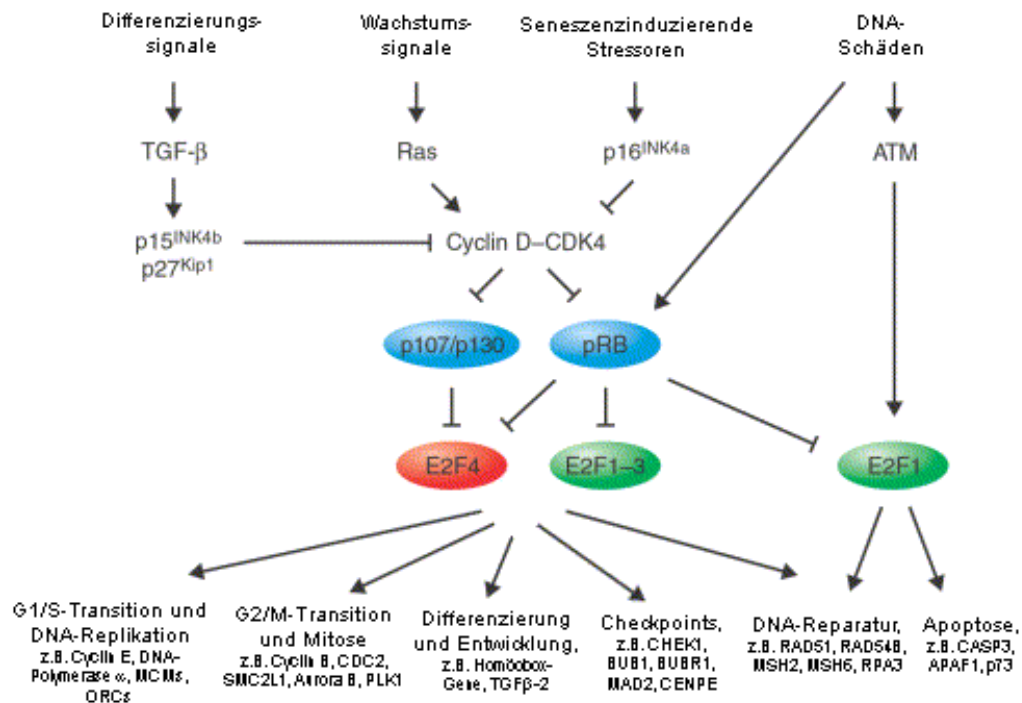
Wie bereits kurz beschrieben (s. 3.2.8.2.3.2), kontrollieren Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie die Expression von Replikations- und Reparaturgenen, mitotischen Genen und zahlreichen Checkpointgenen. Darüber hinaus regulieren E2F-Proteine auch die Promotoraktivität von Genen, die an Entwicklung, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind [110, 124, 125]. Zur E2F-Familie gehören mindestens sechs verschiedene Mitglieder. E2F1, E2F2 und E2F3 fungieren als transkriptionelle Aktivatoren, E2F4, E2F5 und E2F6 hingegen als Repressoren. In Abb. 3-46 sind die E2F-Mitglieder, ihre Assoziation mit Pocket-Proteinen und mit Chromatin-Remodellierungsfaktoren und ihre zellzyklusabhängige Promotorbindung gezeigt.



**Abb. 3-46: Die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, ihre Assoziationspartner und ihre Promotorbindung.**

E2F1–3 sind transkriptionelle Aktivatoren und binden bevorzugt während der späten G1- und der S-Phase an ihre Targetpromotoren. Durch Assoziation mit RB (pRB) werden sie gehemmt. E2F4 und 5 liegen i.A. im Komplex mit p107 bzw. p130 vor und fungieren während der G0- und der frühen G1-Phase als transkriptionelle Repressoren. Einerseits binden diese Komplexe direkt an Promotoren von Zielgenen, andererseits rekrutieren sie Chromatin-Remodellierungsfaktoren, z. B. Histondeacetylasen (HDACs) und Methylasen, die die Transkription durch Chromatinmodifikation negativ regulieren. E2F6 wirkt durch direkte Rekrutierung von Polycomb-Proteinen (PcG) als transkriptioneller Repressor. Zur Expression von E2F-Targetgenen kommt es einerseits durch Promotorbindung aktivierender E2F-Faktoren, andererseits durch Dissoziation reprimierender Familienmitglieder (Derepression). [124]

Eine Übersicht über die Signale, die die Aktivität von E2F-Proteinen steuern, und die E2F-abhängig in Gang gesetzten Prozesse ist in Abb. 3-47 gezeigt.



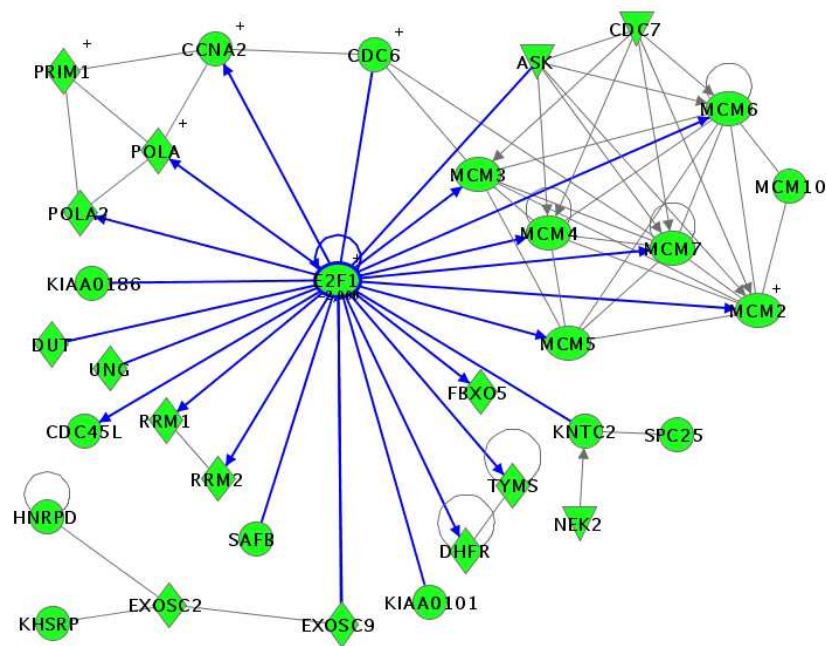
**Abb. 3-47: Der E2F/RB-Signalweg.**

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wird durch verschiedene Signalkaskaden moduliert. Differenzierungssignale aktivieren via TGF $\beta$  p15<sup>INK4b</sup> und p27<sup>Kip1</sup>, Seneszenz induzierende Stresssignale aktivieren p16<sup>INK4a</sup>. Diese CDKIs halten durch Inhibition der Cyclin D-CDK4-abhängigen Phosphorylierung von RB-Familienmitgliedern E2F-Faktoren im inaktiven Zustand. Wachstumssignale hingegen aktivieren über den RAS/MAPK-Weg die Expression von Cyclin D und aktivieren die E2F-abhängige Transkription. Eine DNA-Schädigung kann einerseits durch RB-Aktivierung und E2F-Hemmung zum Wachstumsarrest, evtl. in Form des seneszenzartigen terminalen Wachstumsarrests, führen oder ATM-vermittelt E2F1 aktivieren und dadurch DNA-Reparatur und Apoptose fördern. [124], modifiziert.

Bei sehr vielen nach Zytostatikaexposition reprimierten Genen handelt es sich um E2F-Targets, insbesondere bei den in A549-, HMEC- und/oder MCF-7-Zellen gefundenen. Dies lässt sich u. a. in Tab. 6-3 aus der Spalte „E2F-Regul.“ ablesen. Außerdem bestätigten auch IPA-Analysen, dass E2F ein zentraler Regulator der durch Zytostatika deregulierten Gene ist und enorm viele E2F-abhängige Gene durch die Behandlung reprimiert wurden. Im Fall von MCF-7 ist nach 72 h Behandlung das E2F1-Transkript selbst herabreguliert, in den übrigen Zelllinien ist dies nicht der Fall.

Abb. 3-48 zeigt ein von IPA generiertes Netzwerk, in dem der Zusammenhang von E2F1 mit einer Reihe herabregulierter Gene für die 72 h-Behandlung in MCF-7-Zellen identifiziert wurde.





**Abb. 3-48: Repression von E2F-Targets in MCF-7-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.**

Durch eine IPA-Analyse der 72 h-Daten von MCF-7-Zellen generiertes Netzwerk, das mit transkriptionellen Targets von E2F angereichert ist. Farbgebung: grün = reprimiert; dies betrifft sämtliche im Netzwerk enthaltenen Gene.

Darüber hinaus finden sich für eine ganze Reihe von Zellzyklusgenen Daten in der Literatur, die eine Reduktion ihrer Expression durch p53 beschreiben. In einem Teil dieser Studien wurde belegt, dass es sich hierbei nicht um sekundäre Effekte handelt, indem die Translation mittels Cycloheximid gehemmt wurde. Diesen Ansatz verfolgten beispielsweise Kannan et al. [77], sie konnten u. a. CDC6 als primäres p53-reprimierbares Target bestätigen.

### 3.2.8.2.7 Zusammenhang mit der zellulären Seneszenz

Viele der durch Zytostatikabehandlung deregulierten Gene, insbesondere die in den Wildtyp-p53-Zellen differenziell exprimierten, sind im Zusammenhang mit der Induktion zellulärer Seneszenz beschrieben worden. Seneszenz kann das Resultat der Telomerverkürzung nach zahlreichen Zellteilungen sein (sog. replikative Seneszenz) oder kann durch DNA-Schädigung oder Aktivierung des Onkogens RAS ausgelöst werden (sog. beschleunigte Seneszenz). Seneszenten Zellen sind durch erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose und verstärkte Expression von ECM-(extrazelluläre Matrix-)Komponenten und daraus resultierende erhöhte Adhäsion gekennzeichnet und sezernieren vermehrt Proteasen, Proteaseinhibitoren und mitogene Faktoren.

In Zellkultur- und Tierstudien wurde gezeigt, dass antitumorale Wirkstoffe seneszenzartige Veränderungen hervorrufen können [18, 72]. Von besonderem Interesse ist hier eine Publikation von Chang et al., in der HCT-116-Zellen mit Adriamycin behandelt und danach bis zu zehn Tage in arzneistofffreiem Medium kultiviert wurden [14]. Die überlebenden Zellen wurden in proliferierende und wachstumsarretierte Populationen aufgeteilt; ihre Genexpression wurde mittels cDNA-Arrays verglichen. Die arretierten Zellen zeigten

phänotypische Seneszenzmerkmale wie Zellvergrößerung, gesteigerte Adhäsion und Granularität. Hinsichtlich der beobachteten Änderungen auf Genexpressionsebene besteht eine auffallend große Ähnlichkeit mit den in den vorliegenden Versuchen durch Zytostatika deregulierten Genen. So fanden die Autoren eine große Zahl herabregulierter Gene, die eine Rolle in der Zellzyklusprogression, insbesondere der DNA-Replikation, Mitose und DNA-Reparatur, spielen. Zu diesen gehörten beispielsweise RRM1<sup>A↓ M↓</sup> (Ribonukleotidreduktase M1), TOP2A<sup>A↓ M↓ N↓</sup> (Topoisomerase II  $\alpha$ ), Ki67<sup>A↓ M↓ N↓</sup> und FEN1<sup>A↓ M↓ N↓</sup> (*flap structure-specific endonuclease 1*). Unter den induzierten Genen identifizierten sie viele Wachstumsinhibitoren, u. a. BTG2<sup>A↑ M↑</sup> (*B-cell translocation gene 2*) und GDF15<sup>A↑ B↑ M↑ N↑</sup>. Auch zahlreiche in Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte involvierte Gene waren in den arretierten Zellen hochreguliert, was in Korrelation mit der seneszenzassoziierten verstärkten Adhäsion stand. Generell konnten Zeichen einer „Normalisierung“ in den seneszenten HCT-116-Zellen beobachtet werden: Eine Reihe von Genen, deren Expression in Tumoren häufig verringert ist, wurde induziert, während Onkogene und typischerweise in Tumoren überexprimierte Gene herabreguliert wurden. Allerdings wurde auch eine erhöhte Expression mitogener, antiapoptotischer und angiogener Faktoren festgestellt, die den Erfolg einer Tumorthherapie möglicherweise einschränken könnten. p53 und p21 wurden als positive Regulatoren der behandlungsinduzierten Seneszenz identifiziert, jedoch konnte ein Teil der Effekte auch in Abwesenheit von p53 und/oder p21 beobachtet werden [14]. Wie auch in Abb. 3-32 gezeigt, ist von p53 hinreichend bekannt, dass es zu langfristigem Zellzyklusarrest und Seneszenz führen kann. Darüber hinaus bewirken verschiedene Stressoren die Inhibition von E2F-Faktoren und rufen dadurch Wachstumsarrest und Seneszenz hervor (vgl. Abb. 3-47) [124]. Um die große Übereinstimmung zwischen den Daten der vorliegenden Arbeit und den Befunden von Chang et al. zu verdeutlichen, sind in der Spalte „Zytost.-Literatur“ von Tab. 6-3 die Zitate aus der Publikation Chang et al. farblich hervorgehoben.

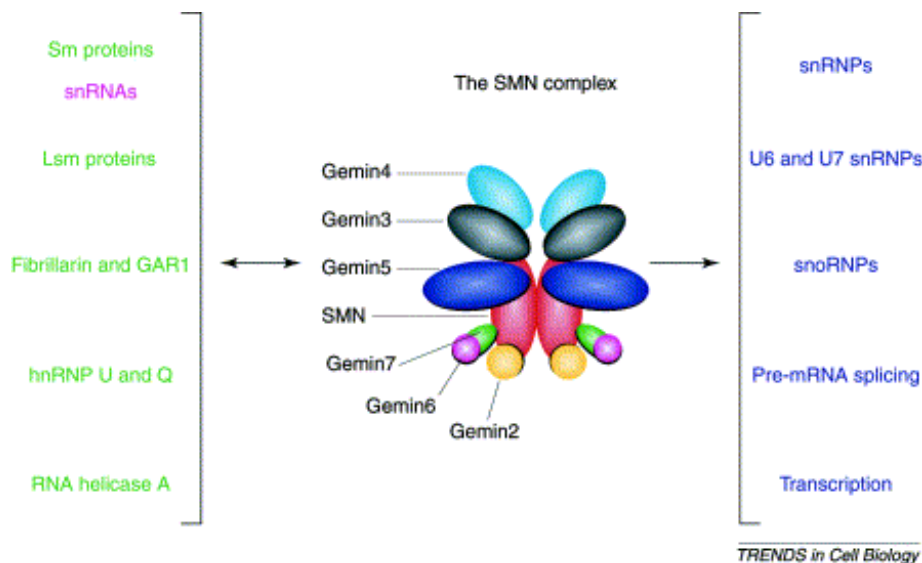
### 3.2.8.3 Deregulation von Genen, die Effektoren der RNA-Prozessierung kodieren

Eine weitere funktionelle Kategorie, in die eine Reihe von Beispielen aus dem vorliegenden Datensatz eingeordnet werden kann, ist die zelluläre Maschinerie zur RNA-Prozessierung. Gene, deren Produkte an der Bildung des Spleißapparats oder der Prozessierung von prä-mRNAs beteiligt sind oder die eine Rolle im Transport oder Abbau von Transkripten spielen, wurden in A549-, MCF-7- und teilweise auch in HMEC-Zellen durch Zytostatikaexposition herabreguliert, im Allgemeinen erst nach 72 h. Es ist bekannt, dass die genannten Prozesse eng miteinander verwoben sind [126], sodass es nicht überrascht, dass viele der hieran mitwirkenden Proteine auf Expressionsebene koreguliert sind. In HT-29- und MDA-MB-231-Zellen wurden im Gegensatz zu den Wildtyp-p53-Zellen nur sehr wenige Gene dieser funktionellen Kategorie differenziell exprimiert. In Tab. 6-4 (S. 272) sind die in mindestens einer Wildtyp-p53-Zelllinie nach 72 h Zytostatikaexposition von mindestens vier Substanzen reprimierten Gene mit Funktionen im RNA-Metabolismus gezeigt.

Im Folgenden werden einige der mit der Prozessierung von Transkripten zusammenhängenden zellulären Abläufe kurz beschrieben; ihre Beeinflussung durch die Zytostatikabehandlung wird anhand von Beispielen illustriert.

Die prä-mRNAs fast aller proteinkodierenden Gene enthalten Intronsequenzen, die präzise entfernt werden müssen, bevor die mRNAs translatiert werden können. Diesem Zweck dient ein großer Ribonukleoprotein-komplex, das Spleißosom. Essenzielle Komponenten von Spleißosomen sind die snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), die jeweils aus einer snRNA (*small nuclear RNA*; U1, U2, U5 oder U4/U6-Dimer) und einem Satz sog. Sm-Proteine bestehen.

Die Zusammenlagerung der snRNP-Partikel unterliegt einer aufwändigen Regulation, bei der die snRNAs zunächst aus dem Kern exportiert werden, im Zytoplasma dann unter Kontrolle des SMN- (*survival of motor neurons*-)Komplexes mit den Sm-Proteinen assoziieren, an 5'- und 3'-Ende prozessiert und schließlich wieder in den Kern importiert werden. Der SMN-Komplex erfüllt hierbei eine wichtige regulatorische Funktion, indem er snRNAs identifiziert und verhindert, dass die Sm-Proteine mit anderen RNA-Spezies in Wechselwirkung treten. In Abb. 3-49 sind der SMN-Komplex, seine Interaktionspartner und zellulären Funktionen dargestellt.



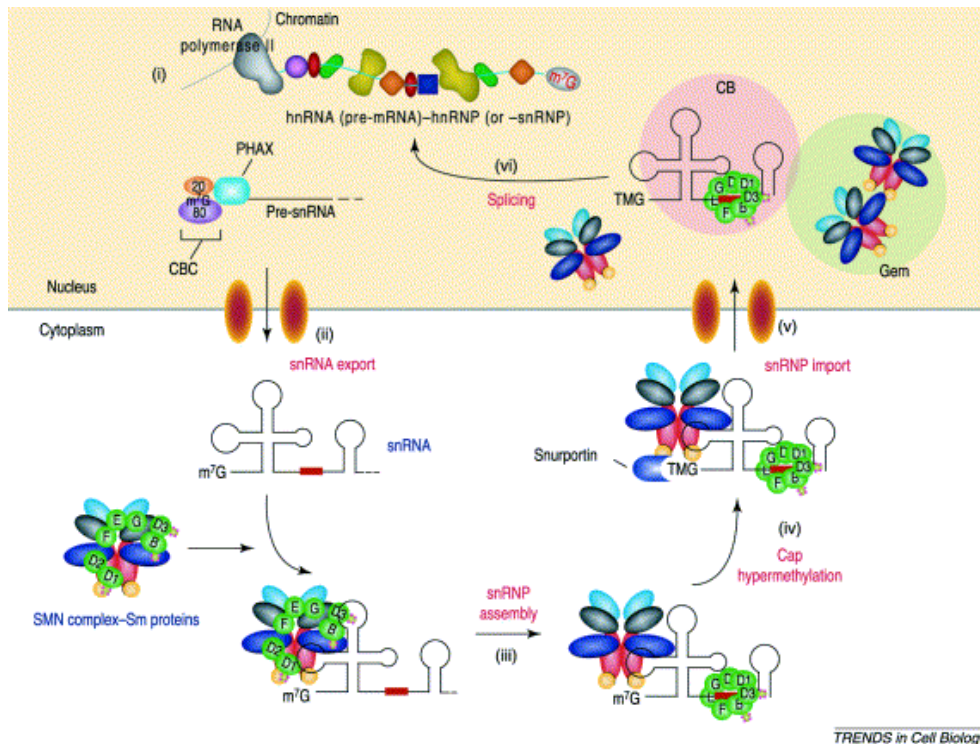
**Abb. 3-49: Der SMN-Komplex und seine Substrate.**

Vereinfacht ist der SMN-Komplex als Dimer dargestellt, obwohl er aufgrund seiner Größe (30–70S) vermutlich eine oligomere Struktur besitzt. Gemin2, 3, 5 und 7 binden direkt an die SMN-Proteine (SMN1, SMN2), während Gemin4 und 6 indirekt über die Interaktion mit Gemin3 bzw. Gemin7 assoziiert sind. Auf der linken Seite sind die direkten Proteintargets des SMN-Komplexes gezeigt. Diese sind Bestandteile unterschiedlicher RNPs, die Funktionen auf verschiedenen Stufen des RNA-Metabolismus erfüllen und auf der rechten Seite dargestellt sind. Abgesehen von seiner Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen kann der SMN-Komplex auch direkt mit snRNAs in Kontakt treten. [127]

Von den in dieser Abbildung gezeigten Bestandteilen und Interaktionspartnern des SMN-Komplexes waren die folgenden nach Zytostatikaexposition reprimiert (Markierung wie unter 3.2.8.2): Die SMN-Komponenten Gemin2<sup>M↓</sup> (HUGO: SIP1) und Gemin4<sup>A↓M↓</sup>, die Sm-Proteine SNRPA<sup>A↓</sup>, SNRPB<sup>A↓M↓</sup> und SNRPD1<sup>M↓</sup>, die

Lsm-Proteine LSM2<sup>M↓</sup> und LSM6<sup>A↓</sup>, Fibrillarin<sup>A↓</sup> (HUGO: FBL), hnRNP Q<sup>A↓ M↓</sup> (HUGO: SYNCRIP) und RNA-Helikase A<sup>M↓</sup> (HUGO: DHX9).

Abb. 3-50 vermittelt einen Eindruck von den Abläufen bei der Bildung von snRNPs.



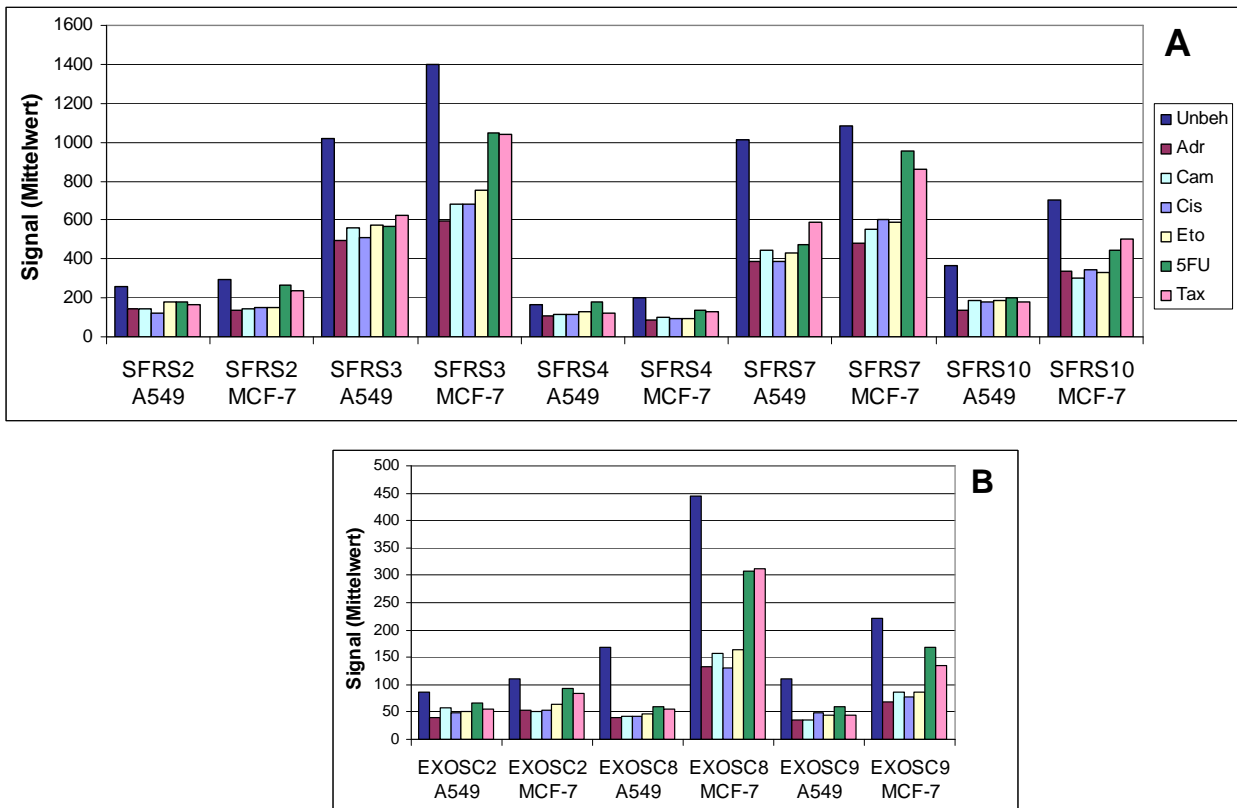
**Abb. 3-50: Die Zusammenlagerung von snRNPs.**

(i) RNA-Polymerase II transkribiert die snRNA-kodierenden Gene. Die primären Transkripte tragen ein monomethyliertes m<sup>7</sup>GpppG(m<sup>7</sup>)G-Cap am 5'-Ende. (ii) Sie werden über den *cap-binding complex* (CBC) und den Adaptor PHAX ins Zytoplasma exportiert. (iii) Die Bildung des Sm-Kerns aus SMN-Komplex und Sm-Proteinen ist für die nachfolgende Hypermethylierung der Capstruktur (iv), ihre Umwandlung in ein 2,2,7-Trimethylguanosin (TMG) und die Reifung des 3'-Endes der snRNA erforderlich. Sind der Sm-Kern korrekt formiert und die TMG-Capstruktur intakt, kann der Import des snRNPs in den Nucleus erfolgen (v). Im Nucleus sind die snRNPs zunächst in *Cajal Bodies* (CB) konzentriert, aus diesen wandern sie zu prä-mRNAs und führen das Spleißen durch (vi). [127]

rRNAs unterliegen ebenso wie mRNAs nach der Transkription einer Prozessierung, diese findet im Nucleolus an snoRNPs (*small nucleolar RNPs*) statt. Es existieren mehrere Subtypen von snoRNPs, die verschiedene snRNAs und assoziierte Proteine enthalten, zu diesen zählt beispielsweise Fibrillarin. Der SMN-Komplex scheint nicht nur für die Bildung von snRNPs, sondern auch für die Entstehung von snoRNPs eine Rolle zu spielen [128].

Am Spleißen von prä-mRNAs im Zellkern sind neben den snRNPs noch viele weitere Nicht-snRNP-Proteine beteiligt. Untersuchungen haben gezeigt, dass bis zu 300 verschiedene Proteinkomponenten im Spleißosom enthalten sind, beispielsweise hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), Lsm-Proteine und zahlreiche zusammenfassend als *splicing factors* bezeichnete Effektoren [127, 129, 130].

Einige Beispiele solcher Spleißfaktoren und die Veränderung ihrer Expression nach 72 h Zytostatikabehandlung in den beiden Tumorzelllinien mit Wildtyp-p53-Protein sind in Abb. 3-51A dargestellt.

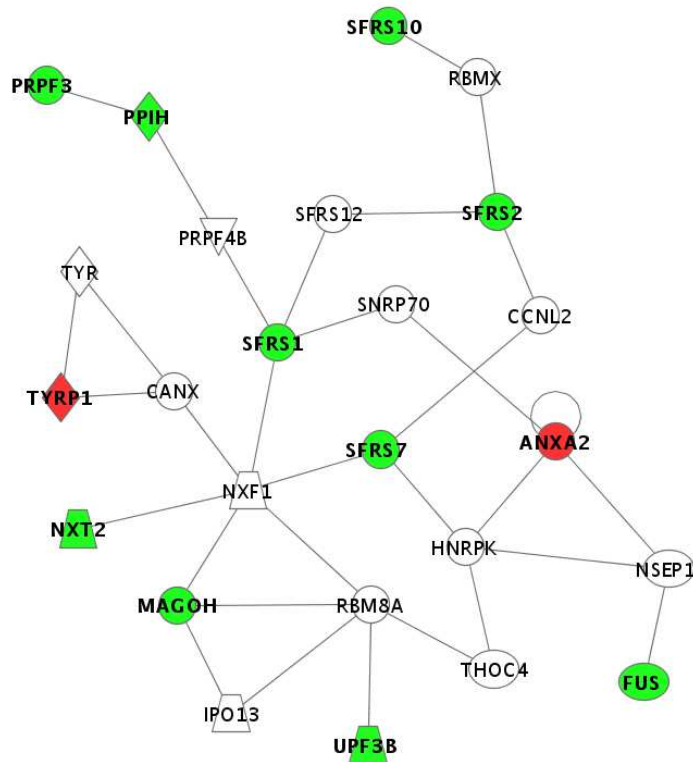


**Abb. 3-51: Expression verschiedener RNA-prozessierender Effektoren in A549- und MCF-7-Zellen nach 72 h Behandlung mit Zytostatika. A: Expression von Spleißfaktoren. B: Expression von Exosomkomponenten.**

Aus dem Spleißen geht die mRNA nicht isoliert, sondern im Komplex mit verschiedenen Proteinen als mRNP-(*messenger ribonucleoprotein*-)Partikel hervor. Unter anderem wird der Multiproteinkomplex EJC (*exon-exon junction complex*) vom Spleißosom spezifisch 20–24 Nukleotide stromaufwärts von Exon-Exon-Grenzen auf der mRNA deponiert. Der EJC vermittelt den nukleären Export der mRNA, ist aber auch am sog. *Nonsense-mediated decay*-(NMD-)Signalweg beteiligt, in dem aberrante Transkripte mit vorzeitigem Stoppcodon sehr schnell abgebaut werden [131, 132].

Ein ebenfalls in vielfältiger Weise in den RNA-Metabolismus involvierter Proteinkomplex ist das Exosom, das fast ausschließlich aus 3'→5'-Exonukleasen besteht. Es nimmt Einfluss auf die Transkription und den Export von mRNAs und vermittelt den Abbau AU-reicher mRNAs, aber auch die Degradation anderer RNA-Spezies [126, 133, 134]. Die Repression mehrerer Exosomkomponenten in A549- und MCF-7-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung ist in Abb. 3-51B gezeigt. Wie bereits in Abb. 3-48 zu sehen war, wird EXOSC9 durch den Transkriptionsfaktor E2F1 reguliert [110], gleiches gilt für EXOSC8 [125] und möglicherweise andere Exosomproteine.

Die Analyse der Affymetrixdaten mittels IPA unterstützte den biologischen Zusammenhang vieler der hier beschriebenen RNA-prozessierenden Effektoren. In Abb. 3-52 ist ein aus den Daten von MCF-7-Zellen nach 72 h Behandlung generiertes Netzwerk gezeigt, in dem u. a. Proteine, die am Aufbau des Spleißosoms mitwirken, angereichert sind.



**Abb. 3-52: Deregulation von RNA-Prozessierungsgenen in MCF-7-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.**

Ausschnitt eines durch IPA-Analyse generierten Netzwerks. Farbgebung: rot = induziert, grün = reprimiert, farblos = nicht dereguliert. Die Gene, die im analysierten Datensatz nicht differenziell exprimiert waren, wurden vom IPA-Algorithmus als Bindeglieder des Netzwerks eingefügt. Die Funktionen der reprimierten Gene sind Tab. 6-4 zu entnehmen. Von den induzierten Effektoren ANXA2 (annexin A2) und TYRP1 (tyrosinase-related protein 1), die durch den IPA-Algorithmus in dasselbe Netzwerk eingeordnet wurden, ist nichts über eine Beteiligung am RNA-Metabolismus bekannt.

Wie bereits erwähnt, konnten bei HT-29- und MDA-MB-231-Zellen kaum Veränderungen der Expression von Genen mit Funktionen in der Prozessierung von RNA-Spezies beobachtet werden. Interessanterweise fand sich aber insbesondere in HT-29-Zellen eine eklatante Häufung von herabregulierten Genen, deren Produkte in einen anderen Aspekt des RNA-Stoffwechsels involviert sind, nämlich die Synthese von tRNAs. Insgesamt wurden sechs tRNA-Synthetasen durch jeweils mindestens vier Zytostatika nach 72 h in HT-29-Zellen reprimiert, von diesen gehörte nur eine (Methionin-tRNA-Synthetase, MARS) auch in MDA-MB-231-Zellen zu den „gemeinsamen“ nach 72 h herabregulierten Genen und eine weitere (Alanyl-tRNA-Synthetase, AARS) war in A549-Zellen nach 72 h durch alle Zytostatika außer Taxol signifikant reduziert. Zwei weitere Enzyme dieser Familie (Glutamyl-Prolyl-tRNA-Synthetase, EPRS, und Isoleucin-tRNA-Synthetase, IARS) erfüllten nicht die Filterkriterien für „gemeinsame“ Gene, wurden aber dennoch tenden-



ziell durch die Zytostatika herabreguliert. In Abb. 3-53 sind die Expressionshöhen dieser tRNA-Synthetasen in HT-29-Zellen nach 72 h Behandlung gezeigt.

Da die tRNAs als Trägermoleküle für die Aminosäurebausteine und als Adaptoren bei der ribosomalen Proteinsynthese dienen, kann man folgern, dass die Zytostatikabehandlung in HT-29-Zellen vermutlich eine generelle Suppression der Translation hervorgerufen hat.

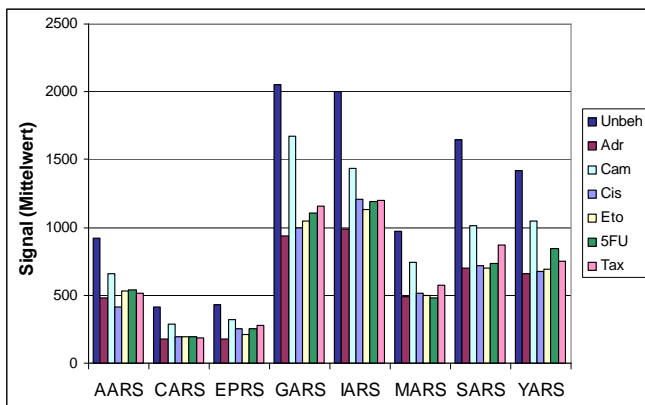


Abb. 3-53: Expression von tRNA-Synthetasen in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

### 3.2.8.4 Differenzielle Expression von Zytokinen und zytokinresponsiven Transkripten

In allen untersuchten Zellmodellen ließen sich nach Zytostatikabehandlung Veränderungen in der Expression von Genen feststellen, die eine Rolle in immunologischen Prozessen spielen. Die kodierten Proteine fungieren entweder direkt als Zytokine oder ihre Expression und Aktivität sind zytokinabhängig und sie vermitteln die Effekte dieser Botenstoffe.

Der überwiegende Teil von ihnen wurde durch die Zytostatikaexposition induziert. Zwischen den verschiedenen Zellmodellen gab es einige Übereinstimmungen hinsichtlich der betroffenen immunologisch relevanten Gene, viele waren aber auch zellspezifisch hoch- oder herabreguliert und blieben in den anderen Zellsystemen weitgehend unverändert.

Die ausgeprägtesten Veränderungen von an der Immunantwort beteiligten Genen waren in HT-29-Zellen nach 72 h Behandlung zu beobachten, hier konnten 62 induzierte und 9 reprimierte Gene unter den „gemeinsamen“ Genen aufgrund von Literaturangaben als zytokinartig oder zytokinresponsiv eingestuft werden. Da die Gesamtzahl der „gemeinsamen“ induzierten Gene in dieser Zelllinie nach 72 h gerade einmal bei 114 lag, ist offensichtlich, dass eine massive Aktivierung von an der Immunabwehr beteiligten Signalwegen stattgefunden haben muss. Außerdem fiel auf, dass 5-FU in HT-29-Zellen extrem wenige Immunantwort-Gene modulierte, fast alle „gemeinsamen“ Gene wurden nämlich nur durch Adriamycin, Camptothecin, Etoposid und Cisplatin und teilweise auch durch Taxol dereguliert. Gleiches galt auch in MDA-MB-231-Zellen. Interessant ist auch der Befund, dass HT-29-Zellen – im Kontrast zu der prominenten Immunreaktion nach 72 h Behandlung – zum 24 h-Zeitpunkt noch keinerlei Veränderung von Genen dieser Kategorie zeigten.

Auch in den anderen Zellmodellen ließen sich insbesondere nach 72 h Zytostatikaexposition eine ganze Reihe „gemeinsamer“ deregulierter Gene als an der Immunantwort beteiligt einstufen. Tab. 3-7 gibt eine Übersicht über die Anzahl der jeweils differenziell exprimierten Gene dieser Kategorie.

	A549		MCF-7		HMEC		HT-29		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Anzahl deregulierter Immunantwortgene	10↑ 1↓	19↑ 2↓	2↑ 0↓	11↑ 1↓	0	15↑ 1↓	0	62↑ 9↓	0	24↑ 7↓

Tab. 3-7: Anzahl deregulierter Gene mit Zytokinfunktion, zytokinabhängiger Expression oder anderweitiger Funktion bei der Immunabwehr nach Zytostatikabehandlung in den verschiedenen Zellmodellen.

↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

In die Zählung aufgenommen wurden einerseits Gene, die selbst Zytokinfunktion besitzen, u. a. Chemokine wie Interleukin 8 (IL8) und Mitglieder der CXC- und CC-Chemokinfamilien. Andererseits wurden Gene berücksichtigt, deren Produkte an der Signalübermittlung im Rahmen immunologischer und inflammatorischer Prozesse beteiligt sind, beispielsweise der *Death receptor* FAS, Adaptoren an relevanten Rezeptoren (z. B. TRAF1, IRS2) und Transkriptionsfaktoren wie das NFκB-(*nuclear factor κB*-)Familienmitglied RELB und Faktoren der STAT-Gruppe. Schließlich wurden auch Gene eingeschlossen, deren Expression vorwiegend durch Zytokine, wie z. B. Tumornekrosefaktor α (TNFα), Interleukin 1 (IL1) oder Interferone, reguliert wird. In vielen Fällen ist für die Proteine, die durch solche zytokinresponsiven Gene kodiert werden, auch eine Beteiligung an der Immunantwort und/oder der Wachstumsregulation beschrieben. Typischerweise werden die transkriptionellen Effekte von Zytokinen durch Transkriptionsfaktoren der NFκB-, STAT- oder AP-1-Familie vermittelt [135]. Tab. 6-5 (S. 276) zeigt die in mindestens einem Zellmodell nach 24 und/oder 72 h zu den „gemeinsamen“ Genen zählenden und in die Immunantwort involvierten Gene.

Für den Großteil der zytokinartigen oder -responsiven Gene bzw. ihre Genprodukte gilt, dass ihr Vorkommen und ihre Effekte in der Literatur hauptsächlich für Zellen des Immunsystems, wie z. B. Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, beschrieben sind. Es wird allerdings auch berichtet, dass sie von Tumorzellen exprimiert werden können und Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Zelltod nehmen und dass sie – soweit es sich nicht um isolierte Zellen, sondern um Tumoren im physiologischen Umfeld eines Patienten oder eines Tiermodells handelt – die Immunantwort des Wirts modulieren können [136-138].

Zu den zytokinresponsiven Genen, die nach Zytostatikabehandlung induziert wurden, gehören zahlreiche interferonabhängige Gene aus der Gruppe der sog. ISGs (*interferon-stimulated genes*) und auch sehr viele Gene, für die eine Induktion durch TNFα, Interleukine und andere Zytokine beschrieben ist. Diese Befunde sind ein starkes Indiz dafür, dass die Tumorzellen durch die Zytostatikaexposition selbst zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine angeregt werden, da ja in der Zellkultur keine Immunzellen vorhanden sind, von denen diese Botenstoffe stammen könnten. Offensichtlich wirken die sezernierten Zytokine dann au-



tokrin auf die Tumorzelle zurück bzw. parakrin auf die benachbarten Zellen und stimulieren die Expression der genannten Gene.

Ein solches Zytokin, welches durch die Zytostatikabehandlung induziert wurde und möglicherweise die Expression vieler anderer deregulierter Gene stimuliert hat, ist Interleukin 8. In den vorliegenden Datensätzen wurde eine Induktion von IL8 in A549-Zellen (nach 24 und 72 h) und HT-29-Zellen (nach 72 h) jeweils durch mindestens fünf der sechs Zytostatika beobachtet (Abb. 3-54).

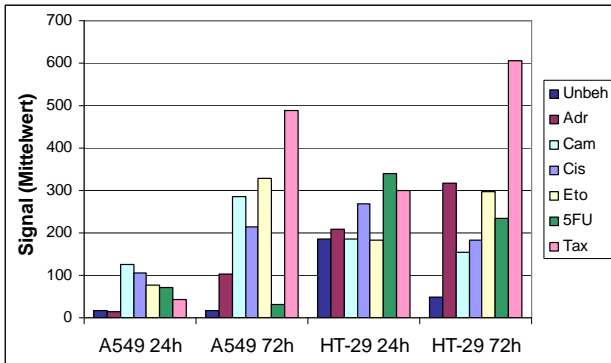


Abb. 3-54: Expression von IL8 in A549- und HT-29-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

In den anderen Zellmodellen war entweder keine signifikante Induktion festzustellen (MCF-7) oder nur eine Induktion durch zwei Substanzen (HMEC nach 72 h) oder sogar eine Repression (MDA-MB-231 nach 72 h durch 3 Substanzen). Die Induktion von IL8 in Tumoren wird in der Literatur sowohl mit der wünschenswerten Stimulierung einer antitumoralen Immunantwort als auch mit unerwünschten proangiogenen und metastasierungsfördernden Effekten in Zusammenhang gebracht [49, 136, 139].

Eine erhöhte Expression von Interferonen selbst konnte zwar in keinem Zellsystem gemessen werden, jedoch waren zahlreiche ISGs, also interferonresponsive Gene, in HT-29- und teilweise auch in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung induziert. Einige Beispiele sind in Abb. 3-55 gezeigt.

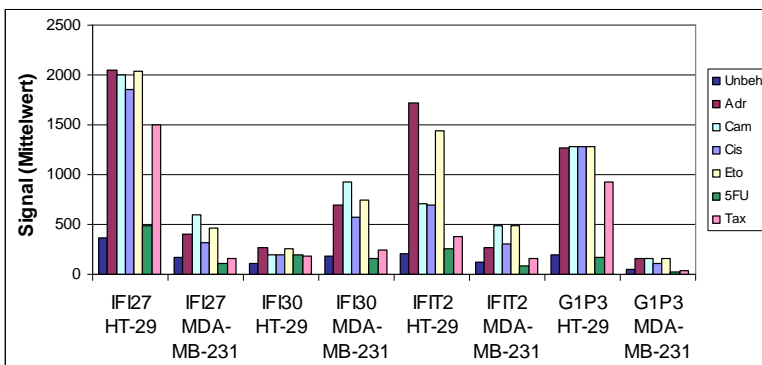


Abb. 3-55: Expression verschiedener ISGs in HT-29- und MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

Auffällig war hier der bereits erwähnte Befund, dass 5-FU zu keiner bzw. nur einer schwachen Induktion dieser interferonresponsiven Transkripte führte. Den ISGs werden neben ihrer antiviralen und immunmodulatorischen Wirkung auch antiproliferative, antiangiogene und teilweise proapoptotische Eigenschaften zugeschrieben [138].

In den Zellmodellen mit Wildtyp-p53-Protein wurde abgesehen von der Induktion von G1P2, welches ja auch durch p53 transaktiviert werden kann (s. 3.2.8.1.1), kein typisches ISG unter den „gemeinsamen“ hochregulierten Genen identifiziert.

Der bereits bei den p53-Effektoren beschriebene Rezeptor FAS spielt neben seiner Funktion bei der Einleitung der Apoptose auch eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Nach Bindung seines Liganden FASL stimuliert er verschiedene Signalkaskaden, von denen mindestens eine in der Aktivierung von NF $\kappa$ B und somit der Expression zahlreicher Targetgene resultiert.

Wie bereits in Abb. 3-20 gezeigt, wurde FAS durch die Zytostatikabehandlung sowohl in Zellen mit Wildtyp- als auch mit mutiertem p53-Protein induziert. Neben den Publikationen, die eine p53-abhängige Regulation der FAS-Expression belegen, existieren auch zahlreiche Berichte darüber, dass FAS durch proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) transkriptionell aktiviert werden kann [140-143]. In Kombination mit den übrigen Daten liegt nahe, dass die in HT-29- und mit einzelnen Zytostatika auch in MDA-MB-231-Zellen beobachtete Induktion hierauf zurückgeführt werden kann. An der Induktion von FAS durch Zytokine ist NF $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor beteiligt [140], d. h. man kann einen *Feed-forward-Loop* postulieren, in dem NF $\kappa$ B nach Ligandenbindung an FAS aktiviert wird und daraufhin die Synthese weiterer FAS-Rezeptoren bewirkt.

Ein derartiger selbstverstärkender Effekt ist auch für das System aus dem *Death ligand* TRAIL (HUGO: TNFSF10) und seinen Rezeptoren, u. a. DR5, beschrieben. Einerseits kann TRAIL den NF $\kappa$ B-Signalweg aktivieren, andererseits gehört es selbst zu den transkriptionellen Targets von NF $\kappa$ B [144]. Die Expression von TRAIL war in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikaexposition signifikant erhöht.

Wie erwähnt, kommt es häufig zur Aktivierung von NF $\kappa$ B, wenn eine Zelle Zytokinen ausgesetzt ist. Die daraufhin transaktivierten Targets haben primär proliferationsfördernde und immunstimulierende Wirkungen. Der Befund, dass auch FAS und TRAIL zu den NF $\kappa$ B-induzierbaren Effektoren gehören, zeigt jedoch, dass NF $\kappa$ B auch an proapoptotischen Prozessen mitwirkt [50, 135]. Eine Auswahl einiger NF $\kappa$ B-Targets, die teils am Zellüberleben, teils an der Apoptose beteiligt sind, ist in Abb. 3-56 gezeigt.

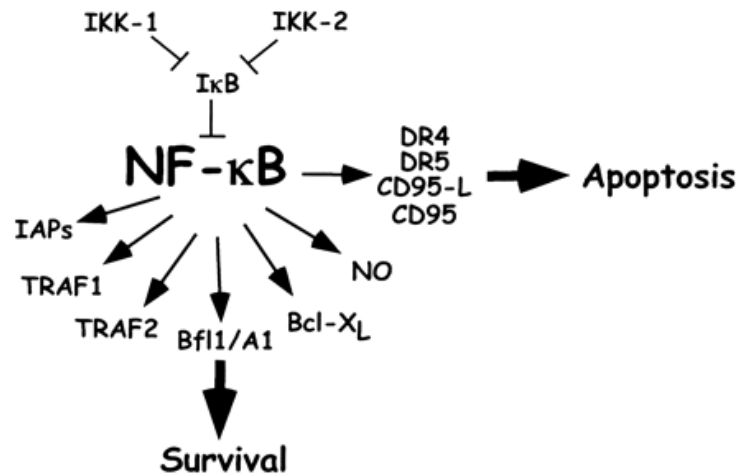


Abb. 3-56: Targets von NF-κB, die in Zellüberleben oder Apoptose involviert sind. [53]

In der Spalte „Funktion“ von Tab. 6-5 ist angegeben, ob die zytokinabhängige Expression des betreffenden Gens durch NFκB vermittelt wird, soweit diese Information der Literatur zu entnehmen war. Dies trifft auf eine Vielzahl von Genen zu.

Die Rolle, die NFκB möglicherweise in der Antwort von HT-29-Zellen auf Zytostatikaexposition spielt, wurde auch durch den IPA-Algorithmus erkannt. Dies wird in Abb. 3-57 deutlich, die ein durch IPA-Analyse generiertes Netzwerk zeigt, in dem NFκB als zentraler Vermittler bei der Induktion diverser inflammatorischer Zytokine identifiziert wurde.

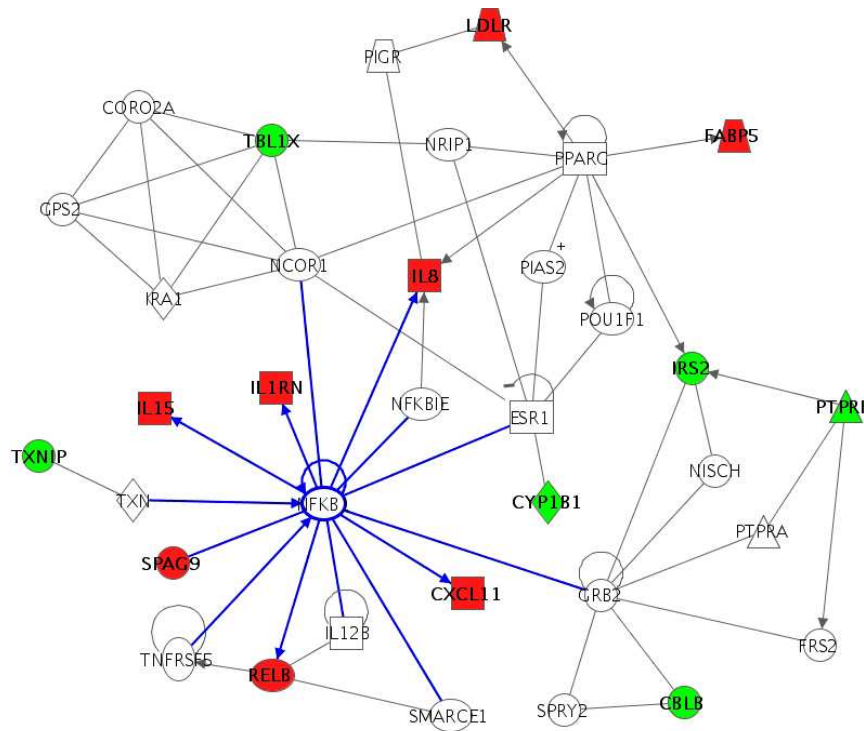


Abb. 3-57: Zentrale Rolle von NFκB in der Regulation von Immunantwortgenen.

Durch eine IPA-Analyse der 72 h-Daten von HT-29-Zellen generiertes Netzwerk, das mit transkriptionellen Targets von NFκB angereichtert ist. Farbgebung: rot = induziert, grün = reprimiert, farblos = nicht dereguliert.

Weitere Beispiele zytokinresponsiver Transkripte, die in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung induziert waren, sind die Plasminogenaktivatoren uPA (HUGO: PLAU) und tPA (HUGO: PLAT) sowie der uPA-Rezeptor (uPAR; HUGO: PLAUR). uPA und tPA aktivieren Plasmin, welches sowohl direkt als auch indirekt über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zur Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) führt. uPA kann außerdem selbst die ECM-Komponente Fibronectin spalten. Aufgrund dieser Eigenschaften spielen die Plasminogenaktivatoren eine zentrale Rolle für die Motilität und Migration von Tumorzellen [145-147]. Der uPA-Rezeptor vermittelt die Effekte von uPA, interagiert mit Integrinen und Komponenten der ECM wie z. B. Vitronectin und stimuliert dadurch die adhäsiven und invasiven Eigenschaften von Tumorzellen. Außerdem wirkt uPAR auf verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden wie z. B. den JAK-STAT-Signalweg ein [147-149]. Eine Induktion dieser Effektoren durch Chemotherapie, wie sie in HT-29-Zellen beobachtet wurde und auch in der Literatur beschrieben ist [14, 75], kann also potenziell die Invasion und Metastasierung von Tumoren anregen. Andererseits sind aber auch erwünschte immunstimulierende Wirkungen denkbar, da uPA beispielsweise über die Aktivierung von MMP9 die Spaltung des IL8-Vorläufers zum aktiven IL8-Chemokin auslösen kann [150].

### 3.2.8.5 Differenzielle Expression von Adhäsionsmolekülen

Unter den nach Zytostatikabehandlung differenziell regulierten Genen waren viele, deren Produkte direkt an adhäsiven Interaktionen der Zelle und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind oder die modulierend auf die Adhäsion einwirken. In sämtlichen untersuchten Zellmodellen ließen sich Änderungen der Expression solcher Gene beobachten, in der Mehrzahl der Fälle waren sie induziert. Manche Gene wurden in mehreren Zelltypen als dereguliert identifiziert, andere scheinen eine zellspezifische Reaktion auf die Zytostatikabehandlung darzustellen. In Tab. 6-6 (S. 288) sind diejenigen Gene gezeigt, die in adhäsive Interaktionen bzw. die Reorganisation des Zytoskeletts involviert sind und in mindestens einem Zellsystem nach 24 oder 72 h zu den durch Zytostatika deregulierten „gemeinsamen“ Genen gehörten.

Unter Adhäsion versteht man den spezifischen, rezeptorvermittelten Kontakt von Zellen untereinander oder zwischen Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Adhäsive Interaktionen erfüllen einerseits eine mechanische Funktion für die Gewebeintegrität und die Migration von Zellen, sind andererseits aber auch in Signaltransduktionsprozesse involviert. Adhäsionsabhängige Signale haben großen Einfluss auf Überleben, Proliferation, Differenzierung und Funktion von Zellen und sind essenziell für die zelluläre Kommunikation. Durch Adhäsion werden Umstrukturierungen des Zytoskeletts in Gang gesetzt, die wiederum entscheidend für die Motilität und Funktion der Zelle sind. Generell unterscheidet man homophile und heterophile Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen, je nachdem, ob Ligand und Rezeptor identisch sind oder nicht. Die Adhäsionsmoleküle lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen und umfassen Zellverbindungsmoleküle (*cell junction molecules*, CJMs), Substratadhäsionsmoleküle (SAMs) und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs).

CJMs bilden feste interzelluläre Brücken in Form von Desmosomen, *Tight-* oder *Gap-Junctions*. Zu ihnen zählen u. a. TJPs (*tight junction proteins* oder Proteine der *Zonula occludens*), Claudine, Connexine, Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin.

Die SAMs sind Proteine der ECM und der Basalmembran wie z. B. Kollagene, Proteoglykane, Fibronectin und Vitronectin.

CAMs dienen der Erkennung der Zellumgebung und dem Knüpfen erster Kontakte zu anderen Zellen. Zu den CAMs gehören die Selektine, Cadherine, Integrine und Moleküle der Immunglobulinfamilie.

Cadherine sind homotypische Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, die in spezialisierten Membranbereichen, wie der *Zonula adherens* und den Desmosomen von Epithelzellen, lokalisiert sind. Sie bilden enge Zell-Zell-Verbindungen und stehen über ihre Interaktion mit Cateninen in Verbindung mit dem Actin-Zytoskelett. Gleichzeitig beeinflussen sie den Wnt-Signalweg, in dem  $\beta$ -Catenin eine zentrale Rolle spielt und der vielfältige Effekte auf Proliferation und Differenzierung ausübt. Integrine sind Heterodimere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die sowohl an membranständige Rezeptoren auf anderen Zellen als auch an ECM-Proteine binden können. Auch sie stehen in enger Verbindung mit dem Zytoskelett. Integrine clustern in Strukturen, die als fokale Komplexe bezeichnet werden. Auf ihrer zytoplasmatischen Seite, den sog. fokalen Adhäsionsstellen, interagieren sie mit Multiproteinkomplexen, welche Kinasen und Phosphatasen enthalten, die vielfältige zelluläre Signalkaskaden in Gang setzen können. Zu ihnen gehört u. a. die fokale Adhäsionskinase (FAK), die die MAPK-, JNK-(*c-Jun N-terminal kinase*-) und PI3K-Signalwege beeinflusst. Die Ausbildung der fokalen Komplexe wird ebenso wie viele mit der Organisation des Zytoskeletts zusammenhängende Prozesse von GTPasen der Rho-Familie wie CDC42, RACs und RHOs reguliert. Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinfamilie vermitteln sowohl homo- als auch heterotypische Interaktionen, zu ihnen gehört beispielsweise L1CAM [151, 152]. Aus Tab. 6-6 lässt sich entnehmen, welche Aufgaben die nach Zytostatikabehandlung differenziell exprimierten Gene in adhäsiven Vorgängen erfüllen und welche weiteren Eigenschaften von ihnen bekannt sind. In vielen Fällen besitzen in die Adhäsion involvierte Effektoren nämlich weitere Funktionen, beispielsweise in der Regulation der Apoptose.

Welche Auswirkung die Induktion oder Repression von Adhäsionsmolekülen auf das Tumorgeschehen, insbesondere auf Migration und Metastasierung, haben, ist schwer zu beurteilen. Ihre Effekte sind überaus ambivalent, da sie einerseits als Verankerung der Zelle dienen und dadurch die Invasion unterdrücken können, andererseits aber auch als eine Art „Haltegriffe“ fungieren, mit denen wandernde Tumorzellen z. B. an Gefäßendothelzellen andocken und in Zielgewebe eindringen können [171].

Ein interessanter Effektor, der modulierend in die Adhäsion eingreift, ist der Wachstumsfaktor CTGF (*connective tissue growth factor*). Seine Expression wurde sowohl in A549- als auch HMEC-Zellen nach 72 h Behandlung durch die Mehrzahl der Zytostatika erhöht (Abb. 3-58). CTGF reguliert die durch Integrine vermittelte Adhäsion, stimuliert die Expression des ECM-Bestandteils Fibronectin und beeinflusst auch die

Reorganisation des Zytoskeletts. Je nach Studie wird ihm eine fördernde oder hemmende Wirkung auf Proliferation, Migration und Metastasierung zugeschrieben [153-155].

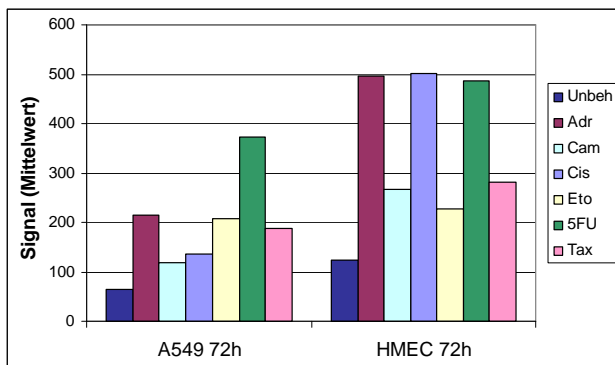


Abb. 3-58: Expression von CTGF in A549- und HMEC-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

In MDA-MB-231-Zellen wurden nach 72 h mehrere Gene aus der CAM-Familie durch die Zytostatika Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid induziert, und zwar ICAM1, ICAM2 und MCAM. Die Daten hierzu zeigt Abb. 3-59. 5-FU und Taxol riefen keine Erhöhung der Expression hervor. In den anderen Zellmodellen blieben diese Gene weitestgehend unverändert (Daten nicht gezeigt).

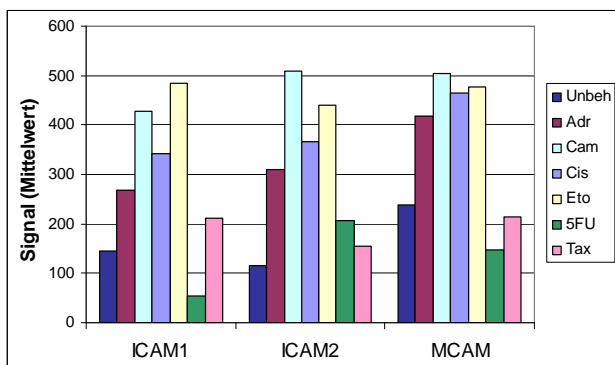
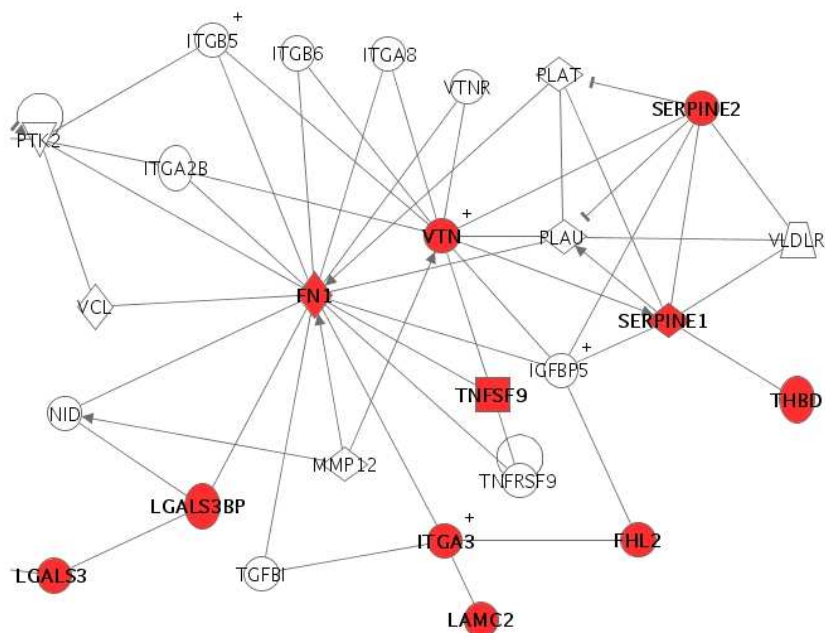


Abb. 3-59: Expression von ICAM1, ICAM2 und MCAM in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

Von diesen drei Zelladhäsionsmolekülen ist bekannt, dass sie die Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen fördern. Häufig sind sie auf den Tumorzellen von Krebspatienten in hoher Dichte exprimiert und können mit dem histologischen Grad des Tumors korreliert werden [156, 157]. Interessanterweise ist von ICAM1 und ICAM2 aber auch bekannt, dass sie durch proinflammatorische Zytokine induziert werden können und an der Immunantwort beteiligt sind [158-162]. Speziell für ICAM1 gibt es sogar konkrete Befunde, dass es die Abwehr des Wirts gegen die Krebsgeschwulst zu stimulieren vermag, da seine Expression mit einer verstärkten Infiltration des Tumors durch T-Lymphozyten in Zusammenhang zu stehen scheint [163]. Im Gegensatz zu seiner postulierten Beteiligung an der Invasion und zu Daten aus anderen Tumorarten wurde außerdem über eine verringerte Expression bei Brustkrebspatientinnen mit Lymphknotenbefall im Verhältnis zu lymphknotennegativen Fällen berichtet. ICAM1 wurde deshalb eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben [164].

Die beobachtete Induktion von ICAM1 nach Zytostatikaexposition wird durch Publikationen bestätigt, die den besagten Effekt nach Behandlung von Tumorzellen mit verschiedenen genotoxischen Agenzien nachweisen konnten [165, 166].

Auch die Datenanalyse mit IPA stellte einen funktionellen Zusammenhang zwischen zahlreichen nach Zytostatikabehandlung deregulierten Adhäsionsmolekülen her. Als Beispiel ist hier ein Netzwerk gezeigt, das aus den Expressiondaten von A549-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung generiert wurde (Abb. 3-60).



**Abb. 3-60: Induktion von Adhäsionsgenen in A549-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.**

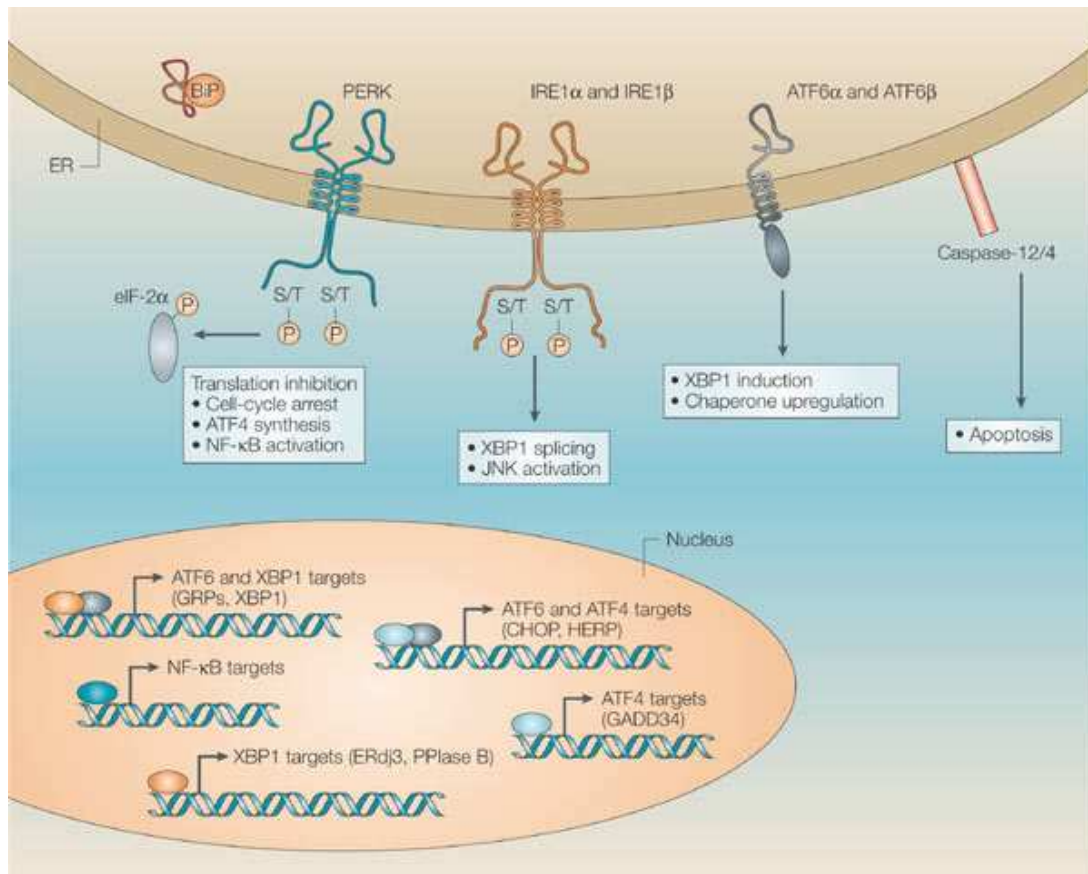
Durch eine IPA-Analyse erzeugtes Netzwerk, das mit an der Adhäsion beteiligten Effektoren angereicht ist. Die rot markierten Gene sind im Datensatz induziert. Die Funktion der deregulierten Adhäsionsmoleküle ist Tab. 6-6 zu entnehmen. Nicht in Tab. 6-6 enthalten sind FHL2 (*four and a half LIM domains 2*), ein transkriptioneller Koaktivator mit proapoptotischer Wirkung, der durch den RHO-Signalweg induziert wird [167-169], und das Zytokin TNFSF9, welches an der Antigenpräsentation beteiligt ist [170].

### 3.2.8.6 Repression der Unfolded Protein Response

In MDA-MB-231-Zellen fällt auf, dass nach 72 h Zytostatikabehandlung eine ganze Reihe von Genen herabreguliert sind, deren Produkte an der sog. *Unfolded Protein Response* (UPR) beteiligt sind. Diese sind in Tab. 6-7 (S. 294) zusammengestellt.

Die UPR wird als Reaktion auf Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert. Zu den zytotoxischen Stressoren, die die UPR auslösen können, gehören u. a. Hypoxie, Nährstoff- und Calciummangel und pH-Verschiebungen im ER. Die UPR dient dazu, die Akkumulation ungefalteter Proteine zu verhindern und dadurch das ER, aber auch andere Organellen vor Schäden zu schützen. Im Allgemeinen erfüllt die UPR eine zytoprotektive Wirkung, d. h. sie versucht, das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen zu sichern. Jedoch vermag sie bei lang andauernder Aktivierung auch Apoptose auszulösen, wodurch der Or-

ganismus in seiner Gesamtheit geschützt wird. Wichtige Komponenten der UPR und ihre wesentlichen Funktionen sind in Abb. 3-61 dargestellt.



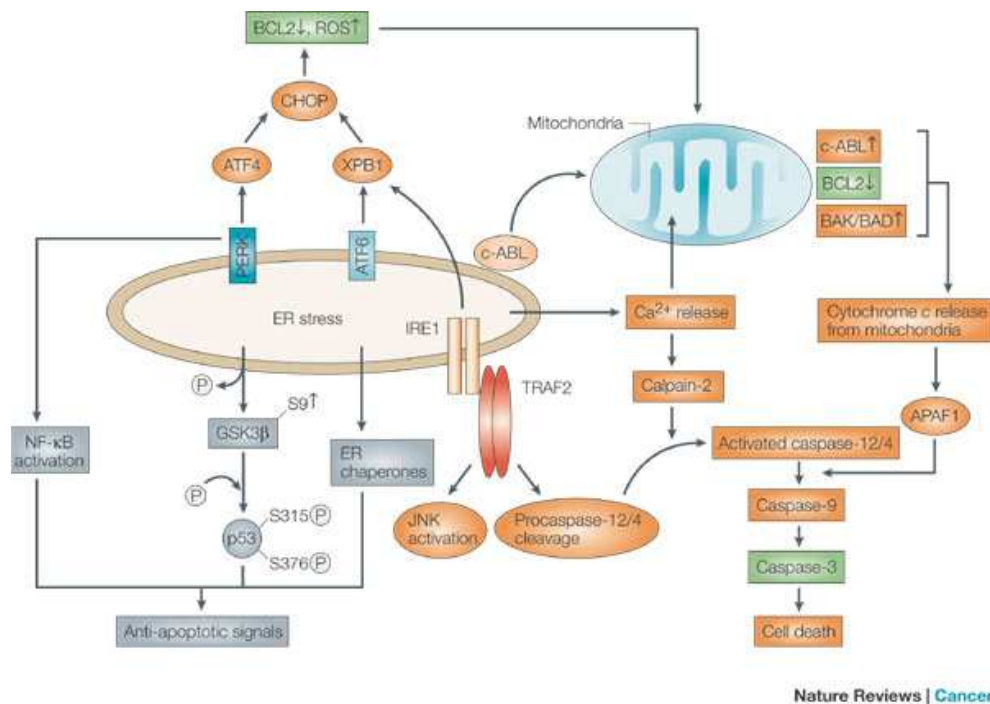
Nature Reviews | Cancer

**Abb. 3-61: Die Aktivierung der Unfolded Protein Response.**

Eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der UPR spielen die Kinasen PERK (*pancreatic eIF-2 $\alpha$  kinase*), IRE1 $\alpha/\beta$  (*inositol-requiring 1  $\alpha/\beta$* ) und ATF6  $\alpha/\beta$  (*activating transcription factor 6  $\alpha/\beta$* ), die als Transmembranproteine in der Membran des ER lokalisiert sind. Unter Normalbedingungen ist das Hitzeschockprotein BiP (HUGO: HSPA5) an die luminalen Domäne dieser Kinasen gebunden und hält sie in inaktivem Zustand. Bei Akkumulation ungefalteter Proteine im ER dissoziiert BiP von seinen Bindungsstellen. PERK phosphoryliert daraufhin eIF-2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* ) und löst dadurch eine Translationshemmung aus. Es kommt zum G1-Arrest aufgrund der fehlenden Synthese wichtiger Zellzyklusproteine wie z. B. Cyclin D1, jedoch auch zur spezifischen Bildung des Transkriptionsfaktors ATF4, welcher die Expression zahlreicher Targets induziert. Zu diesen zählt u. a. GADD34 (*growth arrest and DNA-damage-inducible 34*, HUGO: PPP1R15A), das als Untereinheit von Proteinphosphatase PP1 fungiert und die Phosphorylierung von eIF-2 $\alpha$  wieder rückgängig macht. ATF6 kann nach Dissoziation von BiP zum Golgi-Apparat transportiert werden, wo die Proteasen S1P und S2P seine zytoplasmatische Domäne freisetzen. Diese besitzt Transkriptionsfaktoreigenschaft, wandert in den Nucleus und induziert dort die Expression verschiedener Effektoren. Zu diesen zählt u. a. XBP1 (*x-box binding protein 1*). Das XBP1-Transkript muss jedoch zunächst durch IRE1 $\alpha/\beta$  um 26 Basen verkürzt werden. Diese Endonukleaseaktivität von IRE1 $\alpha/\beta$  wird erst nach Dissoziation von BiP aktiviert. Die resultierende Leserahmenverschiebung in der XBP1-mRNA ermöglicht die Synthese des zugehörigen Proteins, das als hochaktiver Transkriptionsfaktor die Expression von an der Proteinfaltung beteiligten Chaperonen und Enzymen (z. B. PPlase B) induziert. Bei langfristiger Aktivierung der UPR kann Apoptose ausgelöst werden, dies geschieht in murinen Zellen über Caspase-12, in humanen Zellen vermutlich über die der murinen Caspase-12 homologe Caspase-4. [172]



Abb. 3-62 gibt eine Übersicht über die pro- und antiapoptotischen Signale, die bei Aktivierung der UPR ausgesandt werden.



Nature Reviews | Cancer

**Abb. 3-62: Modulation der Apoptose nach Aktivierung der Unfolded Protein Response.**

Die antiapoptotischen Vorgänge (grau dargestellt), die durch Stress im ER angestoßen werden können, umfassen die Aktivierung von NFκB, Chaperonen und GSK3β (Glykogensynthasekinase 3β). Letztere phosphoryliert p53 und stimuliert dadurch seinen ubiquitinabhängigen Abbau, unterdrückt also die p53-abhängige Apoptose. Die proapoptotischen Wirkungen der UPR (dargestellt in orange und grün) erstrecken sich auf mitochondriale und nicht-mitochondriale Signalwege. Die Induktion von CHOP (*C/EBP homologous protein*) und die Translokation von c-ABL (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*) zur Mitochondrienmembran führt zur Hochregulation proapoptotischer BCL2-Proteine (BAK und BAD) und zur Herabregulation des antiapoptotischen BCL2. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zur Aktivierung von APAF1, welches die Caspasekaskade in Gang setzt. Unabhängig von den Mitochondrien verläuft ein weiterer Weg von der UPR zur Caspaseaktivierung: IRE1 rekrutiert TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), welches Procaspase-4 (bzw. in murinen Zellen Procaspase-12) aktiviert. [172]

Die Bedeutung der UPR für das Tumorgeschehen erklärt sich aus der Tatsache, dass unphysiologische Bedingungen wie Nährstoffmangel und Hypoxie typischerweise im Inneren wachsender Neoplasien anzutreffen sind, die noch nicht ausreichend mit Blutgefäßen versorgt sind. Dies führt einerseits zur Aktivierung von HIF1α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) und der Expression seiner zahlreichen Targets mit zytoprotektiven und proangiogenen Eigenschaften. Parallel wird aber auch die UPR induziert, die mit der Hypoxieantwort zwar einige Effektoren (beispielsweise VEGF, den *vascular endothelial growth factor*) teilt, jedoch einen eigenständigen Signalweg darstellt. In Tumoren scheint die UPR häufig konstitutiv aktiviert zu sein, ohne Apoptose auszulösen, d. h. es werden offenbar nur die zytoprotektiven Komponenten des Signalwegs wirksam. Die Mechanismen hierfür sind weitgehend unklar.

Darüber hinaus existieren Befunde, dass die Aktivierung der UPR die Chemosensitivität von Tumorzellen gegenüber antineoplastischen Agenzien verändert. Es wird berichtet, dass sie die Resistenz gegenüber Topoisomerase-II-Inhibitoren wie Etoposid erhöht, während sie synergistisch mit quer vernetzenden Substanzen wie Cisplatin wirkt und die Empfindlichkeit der Tumorzellen steigert. Für eine Diskussion mögli-

cherweise daran beteiligter Mechanismen und eine ausführliche Darstellung der Rolle der UPR bei der Tumorentstehung und -progression s. [172].

In der Literatur ist interessanterweise beschrieben, dass Komponenten der UPR in diversen Brustkrebszelllinien einschließlich MDA-MB-231 sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene induziert sind [173].

In Tab. 6-7 werden die Charakteristika der in MDA-MB-231-Zellen reprimierten UPR-Effektoren kurz umrissen. Es fällt auf, dass der Transkriptionsfaktor ATF4 und mehrere seiner transkriptionellen Targets (HERPUD1, HSPA5, VEGF) herabreguliert sind, was ihren funktionellen Zusammenhang unterstreicht.

Der Transkriptionsfaktor XBP1, der die Expression zahlreicher Chaperone und an der Proteinfaltung beteiligter Enzyme steuert [174], ist allerdings nur durch zwei Behandlungen, nämlich Adriamycin und Cisplatin, deutlich reprimiert (Abb. 3-63A). Der proangiogene Wachstumsfaktor VEGF ist einerseits auf Transkriptionsebene reprimiert (vermutlich infolge der Repression von ATF4), zum anderen ist auch die Expression des Chaperons HYOU1 verringert, welches die Sekretion von VEGF steuert [175].

Die Expressionshöhen der genannten und einiger weiterer UPR-Effektoren in MDA-MB-231-Zellen zum 72 h-Zeitpunkt sind in Abb. 3-63B1 und B2 dargestellt.

In den anderen Tumorzelllinien war keine Repression von Komponenten der UPR zu beobachten.

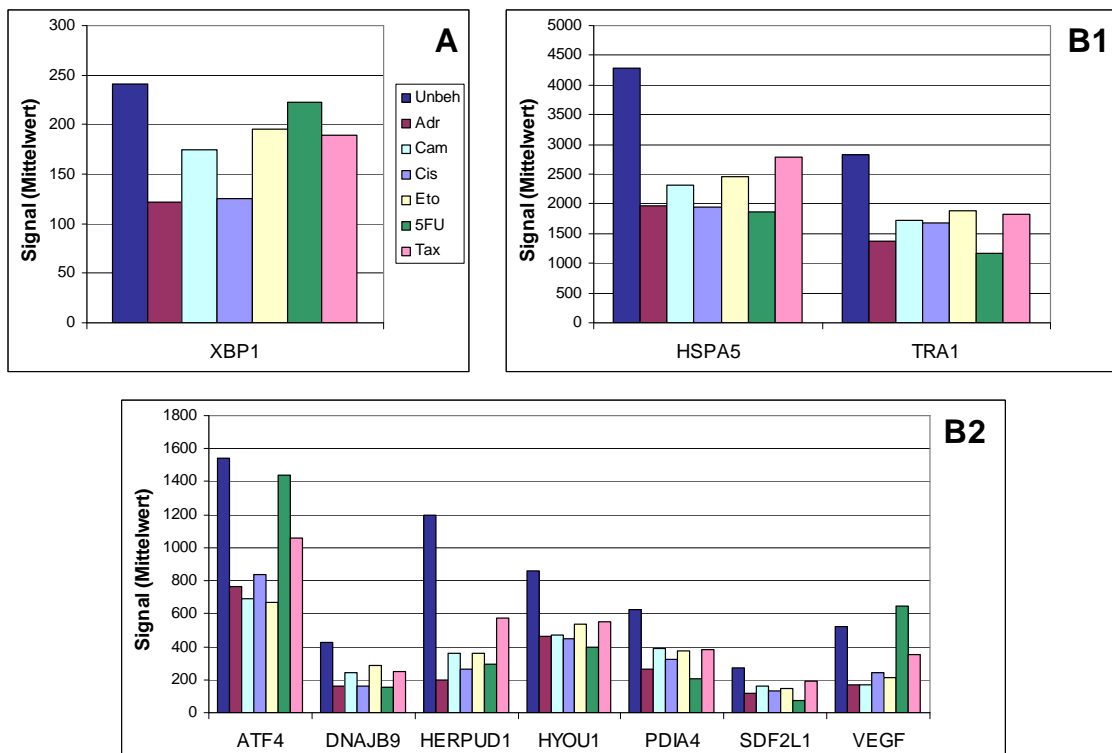


Abb. 3-63: Expression von an der UPR beteiligten Genen in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

A: XBP1, B1: HSPA5 und TRA1, B2: ATF4, DNAJB9, HERPUD1, HYOU1, PDIA4, SDF2L1 und VEGF.

### 3.2.8.7 Deregulation von Genen mit Funktionen in Migration, Invasion und Metastasierung

In den untersuchten Zellmodellen wurde nach Behandlung mit Zytostatika die Expression verschiedenster Gene beeinflusst, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Migration von Tumorzellen, ihrer Invasion in fremde Gewebe und der Bildung von Metastasen beschrieben sind. Im Vergleich der Zellmodelle untereinander finden sich allerdings kaum Übereinstimmungen, d. h. in jedem Zelltyp wurden andere Gene mit derartigen Funktionen durch die Zytostatikabehandlung dereguliert. Diese Heterogenität wurde auch innerhalb der verschiedenen Wildtyp-p53-Zellmodelle beobachtet.

In jedem Zellsystem lassen sich jeweils sowohl bei den induzierten als auch den reprimierten „gemeinsamen“ Genen solche finden, die proinvasive Proteine kodieren, und ebenso Gene mit antiinvasiv wirkenden Produkten. Zudem wurden für manche als differenziell exprimiert identifizierte Effektoren in einem System fördernde, in einem anderen hemmende Effekte auf Motilität und Metastasierungstendenz beschrieben.

Beispielhaft sollen anhand der differentiellen Expression derartiger Gene in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung ihre teilweise gegenläufigen Effekte dargelegt werden.

Zu den in dieser Zelllinie induzierten metastasierungsassoziierten Genen gehört Matrixmetalloproteinase MMP7, auch bekannt als Matrilysin (Abb. 3-64A). Das kodierte Enzym degradiert wie alle MMPs Komponenten der extrazellulären Matrix und kann in eindeutigen Zusammenhang mit der Progression und Invasion verschiedener Tumorarten gebracht werden [176, 177].

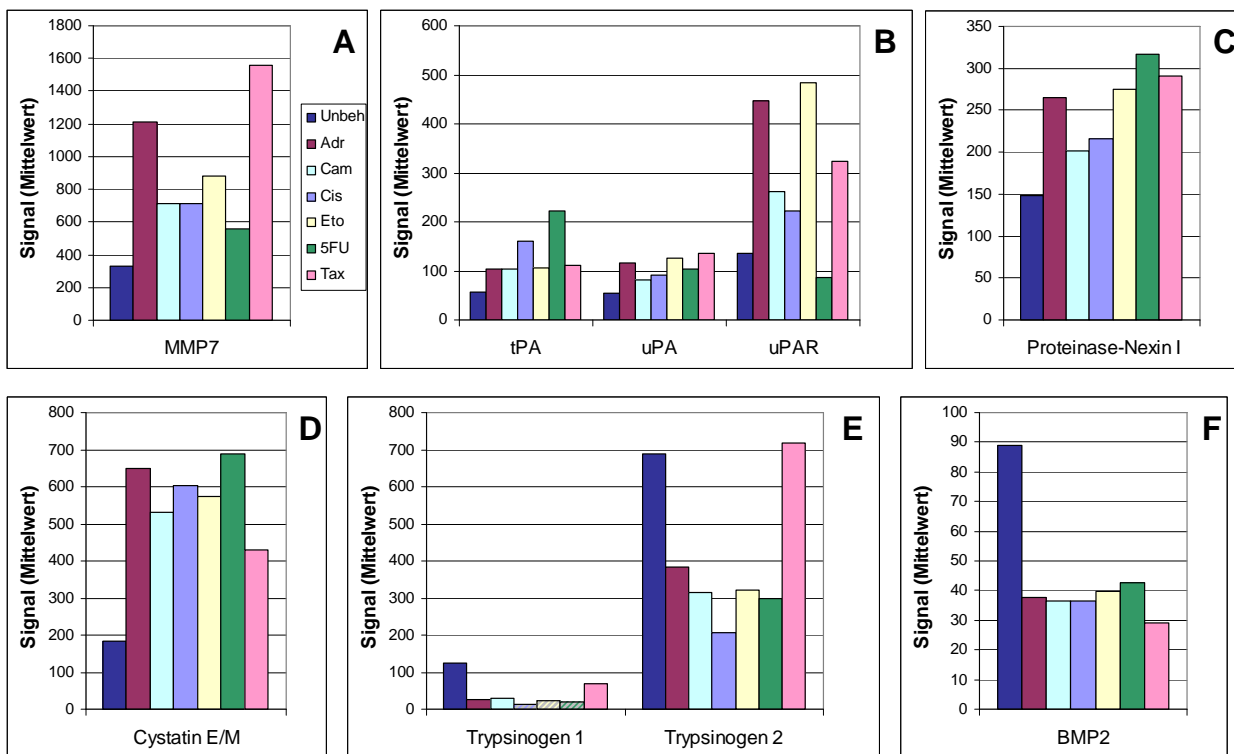


Abb. 3-64: Expression von Genen, die pro- und antiinvasive Effektoren kodieren, in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

A: MMP7, B: Plasminogenaktivatoren tPA und uPA sowie der uPA-Rezeptor (uPAR), C: Proteinase-Nexin I, D: Cystatin E/M, E: Trypsinogen 1 und 2, F: BMP2.

Die Induktion der metastasierungsfördernden Plasminogenaktivatoren tPA und uPA und des Rezeptors uPAR wurde bereits im Zusammenhang mit der zytokinabhängigen Genexpression in HT-29-Zellen beschrieben (s. 3.2.8.4). Ihre Expressionshöhen sind in Abb. 3-64B gezeigt. Gleichzeitig wurde in dieser Zelllinie aber auch Proteinase-Nexin I (HUGO: SERPINE2; s. auch Abb. 3-60) hochreguliert (Abb. 3-64C), das als Inhibitor der Plasminogenaktivatoren fungiert und die Zusammensetzung der ECM moduliert. Es kann, wie auch die Plasminogenaktivatoren, durch Zytokine induziert werden [178], was möglicherweise einen Feedbackmechanismus gegen übermäßige Aktivität von tPA und uPA darstellt. Trotz seines hemmenden Einflusses auf tPA und uPA wurde beschrieben, dass Proteinase-Nexin I das invasive Potenzial von Tumorzellen in Xenograft-Modellen steigert und zudem antiapoptotisch wirkt, vermutlich aufgrund seines Eingriffs in den Adhäsionsprozess [179, 180].

Ganz allgemein gilt für viele in die Adhäsion involvierte Effektoren, die bereits unter 3.2.8.5 beschrieben und in Tab. 6-6 gezeigt sind, dass sie auch die Migration und Metastasierung von Tumorzellen fördern können.

Der erhöhten Expression der genannten invasionsfördernden Moleküle nach Zytostatikabehandlung steht jedoch einerseits die Induktion antiinvasiver Gene, andererseits die Repression weiterer metastasierungsfördernder Gene in HT-29-Zellen gegenüber. So wurde der Cysteinproteinaseinhibitor Cystatin E/M (HUGO: CST6) nach 72 h Behandlung durch alle sechs Zytostatika hochreguliert (Abb. 3-64D). Cystatin E/M bremst die Proliferation und das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* und wird als möglicher Tumorsuppressor diskutiert [181, 182].

Zu den herabregulierten proinvasiven Genen gehören Trypsinogen 1 (HUGO: PRSS1) und Trypsinogen 2 (PRSS2), die nach Aktivierung zu Trypsin 1 bzw. 2 als Serinproteinasen fungieren (Abb. 3-64E). Sie sind an der Aktivierung von MMPs beteiligt, interessanterweise auch an der von MMP7, greifen aber auch direkt ECM-Komponenten an und fördern folglich u. a. die Migration und Invasion von Tumorzellen [183, 184].

Eine ambivalente Rolle in der malignen Progression spielt das TGF $\beta$ -Familienmitglied BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*). Einerseits hat es proliferationshemmende Eigenschaften und kann in verschiedenen Zelltypen Apoptose auslösen, andererseits wurden auch wachstums- und invasionsfördernde Effekte dieses Zytokins beschrieben [185-187]. Die Expression von BMP2 wurde in HT-29-Zellen nach 72 h durch alle sechs Zytostatika reprimiert (Abb. 3-64F).

### 3.2.8.8 Differenzielle Expression von pro- und antiapoptotischen Effektoren

Vieles, was bereits bei der Kategorie der migrationsassoziierten Gene (3.2.8.7) erläutert wurde, gilt auch für Gene, deren Produkte in apoptotische Prozesse involviert sind. Die Zytostatikaexpression führte nämlich in sämtlichen Zellmodellen zur Induktion und Repression sowohl pro- als auch antiapoptotischer Effektoren, sodass die letztendlich resultierende Wirkung auf die Zelle schwer abzuschätzen ist. Zudem besitzen zahlreiche Proteine je nach zellulärem Hintergrund, apoptotischem Stimulus etc. entweder pro- oder antiapoptotische Eigenschaften.

Am Beispiel von MDA-MB-231-Zellen wird eine Auswahl der nach Zytostatikaexposition differenziell exprimierten Gene dargestellt, die modulierend auf die Apoptose einwirken. Ihre Expressionsdaten nach 72 h Behandlung sind in Abb. 3-65 gezeigt.

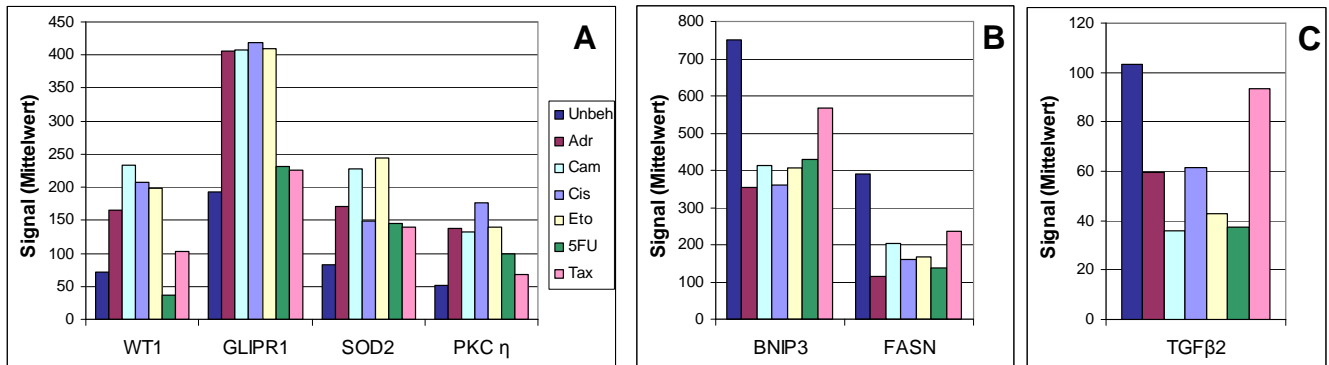


Abb. 3-65: Expression pro- und antiapoptotischer Gene in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

A: WT1, GLIPR1, SOD2, PKC  $\eta$ , B: BNIP3, FASN, C: TGF $\beta$ 2.

Unter den induzierten Genen befanden sich zwei Tumorsuppressoren mit proapoptotischen Eigenschaften, WT1 (*Wilms tumor 1*) und GLIPR1 (*GLI pathogenesis-related 1*, auch bekannt als RTVP-1). Wie Abb. 3-65A zeigt, wurden sie durch Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid hochreguliert, nicht jedoch durch 5-FU und Taxol. WT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression seiner Zielgene sowohl aktivieren als auch reprimieren kann. Zu den durch WT1 reprimierbaren Targets gehören z. B. Cyclin E, das entscheidend an der G1/S-Progression beteiligt ist (s. 3.2.8.2.1), und der Wachstumsfaktorrezeptor IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) [188, 189]. Über seine Eigenschaft als transkriptioneller Regulator hinaus besitzt WT1 weitere Funktionen, die in Zusammenhang mit seinen antiproliferativen und proapoptotischen Effekten gebracht werden [190]. So konnte gezeigt werden, dass WT1 das  $\beta$ -Catenin-Protein destabilisiert, die Bildung von Komplexen aus  $\beta$ -Catenin und TCF-(*T-cell factor*-)Proteinen vermindert und folglich die Transkription von Targets des Wnt-Signalwegs unterbindet. Dieser Signalweg fördert Wachstum und Differenzierung und spielt eine wichtige Rolle in Transformation und Tumorprogression [191]. Die genannte Studie wurde in MDA-MB-231-Zellen durchgeführt und ekto exprimiertes WT1 war hier in der Lage, den transformierten Phänotyp zu unterdrücken. Es suppressierte das klonale Wachstum in Softagar und verhinderte die Entstehung von Tumoren aus MDA-MB-231-Zellen im Xenograft-Modell [192]. Die Expression von GLIPR1 ist in humanen Prostatatumoren herabreguliert und bei rekombinanter Expression im Zellmodell leitet es Apoptose ein. Aufgrund dieser Eigenschaften wird ihm eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben [193, 194].

Ebenfalls durch die Zytostatikabehandlung, in diesem Fall durch alle sechs Substanzen, wurde Superoxid-dismutase 2 (SOD2) induziert (Abb. 3-65A). Dieses Enzym, das auch als MnSOD (Mangan-Superoxiddismutase) bekannt ist, kann u. a. durch oxidativen Stress und verschiedene Zytokine aktiviert werden und schützt die Zelle vor stressinduzierter Apoptose, insbesondere vor den freien Radikalen, die im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien entstehen [195]. Trotz dieser antiapoptoti-

schen Eigenschaften und weiterer Hinweise auf proliferationsfördernde Wirkungen von SOD2 [196, 197] gibt es auch Indizien, dass es als Tumorsuppressor fungieren kann [198]. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten wurde die Erhöhung seiner Expression durch Adriamycin- und Etoposid-Behandlung in Tumorzellen *in vitro* beschrieben und ein Zusammenhang mit deren Überleben und Zytostatikaresistenz hergestellt [196, 199].

Ein weiteres Enzym, das in MDA-MB-231-Zellen nach Zytostatikaexposition induziert war (Abb. 3-65A) und dem vorwiegend antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben werden, ist Proteinkinase C  $\eta$  (PKC  $\eta$  bzw. HUGO: PRKCH). Es wurde eine klare Korrelation zwischen der Expressionshöhe von PKC  $\eta$  und dem Grad der Tumorprogression einerseits und der Resistenz gegen Zytostatika und UV-Bestrahlung andererseits beobachtet [200-202]. Diese Kinase ist in der Lage, die PI3K/AKT-, MAPK- und mTOR-(*mammalian target of rapamycin*-)Signalwege zu aktivieren, dadurch das Wachstum zu fördern und Apoptose zu unterdrücken [202, 203].

Auch unter den durch die Zytostatikaexposition herabregulierten Genen ließ sich eine ganze Reihe von Regulatoren der Apoptose identifizieren.

So nahm einerseits die Expression des proapoptotischen BCL2-Familienmitglieds BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*) deutlich ab (Abb. 3-65B). Es unterliegt u. a. einer transkriptionellen Regulation durch HIF1 $\alpha$  und ist in hypoxischen Regionen von soliden Tumoren an der Einleitung der Apoptose beteiligt. Es gibt Befunde, dass BNIP3 nach Taxolbehandlung von Ovarialkarzinompatientinnen auf Transkriptionsebene reprimiert wird [204]. Außerdem ist seine Expression auch in 5-FU-resistenten Tumorzellen herabreguliert, was mit deren gesteigerter Überlebensfähigkeit in Verbindung gebracht wird [205].

Auf der anderen Seite wurde das antiapoptotisch wirkende Enzym FASN (*fatty acid synthase*) in MDA-MB-231-Zellen ebenfalls durch sämtliche Zytostatika herabmoduliert (Abb. 3-65B). Tumoren, die FASN überexprimieren, haben einen massiven Wachstumsvorteil, sind vor Apoptose geschützt und legen einen aggressiveren Phänotyp an den Tag, deshalb wird FASN als Onkogen eingestuft [206]. Eine gesteigerte Expression dieses Enzyms der Fettsäurebiosynthese wurde auch im Zusammenhang mit einer Chemoresistenz gegen Taxol beobachtet [207].

Interessanterweise wurde das sog. *DNA-damage-inducible transcript 4* (DDIT4, auch RTP801 oder REDD1) durch die Zytostatikabehandlung sehr stark reprimiert. Die Literaturbefunde sprechen dafür, dass DDIT4 zwar nach DNA-Schädigung induziert werden kann, jedoch nur in Wildtyp-p53-Zellen, und in der Tat wurde es auch als p53-transaktivierbares Target beschrieben [208]. DDIT4 ist in der Lage, Zellen gegen verschiedene apoptotische Stimuli wie Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies und genotoxische Schäden zu schützen [209, 210].

Eine ambivalente Rolle im Apoptosegeschehen spielt der ebenfalls durch den Großteil der Zytostatika reprimierte Wachstumsfaktor der TGF-Familie TGF $\beta$ 2 (Abb. 3-65C). Je nach zellulärem Kontext kann er pro- oder antiapoptotische und auch pro- oder antiproliferative Signalkaskaden in Gang setzen und die Aktivität

von Immunzellen des Wirts modulieren [211]. Unter anderem aktiviert TGF $\beta$ 2 den NF $\kappa$ B-Signalweg, dessen Beteiligung an der Immunantwort, der positiven Wachstumsregulation und der Apoptose bereits erwähnt wurde (s. 3.2.8.4) [212]. In kolorektalen Tumoren wurde eine Überexpression von TGF $\beta$ 2 beobachtet, außerdem wird es von verschiedenen Tumorzelllinien vermehrt sezerniert [212, 213].

### **3.2.9 Zytostatikaspezifische Effekte auf die Genexpression**

Insgesamt betrachtet sind sich die untersuchten Zytostatika in ihren molekularen Effekten auf die Genexpression sehr ähnlich. Dies wurde bereits aus der rein zahlenmäßigen Betrachtung der Affymetrix-Daten deutlich (s. 3.2.7) und bestätigte sich in den funktionellen Analysen der deregulierten Gene (s. 3.2.8). Dennoch ließen sich substanzspezifische Charakteristika feststellen. Diese können einerseits darin bestehen, dass ein Zytostatikum Gene in ihrer Expression moduliert, die von keiner anderen Substanz wesentlich verändert werden, andererseits auch darin, dass ein Zytostatikum deutlich weniger Gene beeinflusst als die restlichen Behandlungen. Beide Szenarien konnten in bestimmten Kombinationen aus Substanz und behandeltem Zellsystem beobachtet werden und werden im Folgenden dargestellt.

#### **3.2.9.1 Im Vergleich zu den übrigen Zytostatika geringere Effekte einzelner Substanzen**

Im Rahmen der funktionellen Analyse der durch die Mehrzahl der Zytostatika deregulierten „gemeinsamen“ Gene wurde bereits mehrfach erwähnt, dass einzelne Substanzen in bestimmten Zellsystemen ein geringeres Ausmaß an Änderungen hervorgerufen haben als die übrigen Zytostatika. Dies wird auch bei der Betrachtung der verschiedenen Gentabellen im Anhang (Kap. 0) deutlich, in denen ja jeweils per Buchstabenkode angegeben ist, durch welche Substanzen das betreffende Gen dereguliert wurde. Es fällt ganz generell auf, dass die Zytostatika Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid bei einem sehr großen Anteil der differenziell exprimierten Gene vertreten sind, während 5-FU und Taxol tendenziell seltener auftauchen. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen bei MDA-MB-231-Zellen, hier wurden sehr viele „gemeinsame“ Gene nicht durch 5-FU und Taxol dereguliert. Von den UPR-Genen (s. Abb. 3-63) wurden allerdings die meisten auch durch 5-FU und Taxol herabreguliert, d. h. hinsichtlich der Repression dieser Stressantwort des ER unterscheiden sich die beiden Zytostatika nicht nennenswert von den übrigen.

In HT-29-Zellen wich Taxol in beschränktem Ausmaß von den anderen Substanzen ab, 5-FU hingegen sehr stark, denn es beeinflusste nur wenige der von den übrigen Zytostatika deregulierten Gene. Dies ist beispielsweise anhand der differentiellen Expression von ISGs (s. Abb. 3-55) zu erkennen.

In MCF-7-Zellen ließen sich ebenfalls schwächere Effekte von Taxol und besonders 5-FU auf die von der Mehrzahl der Zytostatika deregulierten Gene beobachten. Beispielsweise wurden zahlreiche mit dem Zellzyklus oder der DNA-Damage-Response zusammenhängende Gene nur von Adriamycin, Camptothecin, Cisplatin und Etoposid sowie teilweise auch von Taxol reprimiert. Dies läßt sich auch an dem in Abb. 3-44

dargestellten Heat Map sehr deutlich ablesen, der jedoch gleichzeitig zeigt, dass eine Tendenz zur Erniedrigung der Expressionshöhe durch 5-FU und Taxol in den meisten Fällen durchaus vorhanden ist.

In A549-Zellen hob sich wiederum Taxol von der Mehrzahl der übrigen Behandlungen ab, da es generell eine relativ niedrige Zahl von Genen signifikant veränderte und nur relativ wenige der „gemeinsamen“ Gene beeinflusste. Zieht man das Beispiel der p53-abhängigen Antwort heran (s. Abb. 3-18 und Abb. 3-20 bis Abb. 3-24), so wird deutlich, dass Taxol nach 24 h Behandlung von A549-Zellen nur zu einer schwachen p53-Aktivierung führte, welche sich nach 72 h verstärkte, jedoch immer noch schwächer blieb als bei den übrigen Zytostatika. 5-FU unterschied sich in diesem Zellmodell im Hinblick auf die Deregulierung der „gemeinsamen“ Gene nicht wesentlich von den anderen Substanzen.

In HMEC-Zellen ist das Bild etwas unklarer, hier bewirkten Taxol, Camptothecin und Etoposid teilweise geringere Veränderungen als die anderen drei Zytostatika. So war beispielweise bei der Induktion von CTGF (s. Abb. 3-58) zwar eine Induktion durch alle sechs Zytostatika messbar, diese war aber bei Adriamycin, Cisplatin und 5-FU deutlich stärker als bei den übrigen Substanzen. Zahlreiche p53-Targets wurden in HMEC-Zellen ebenfalls durch Taxol, Camptothecin und Etoposid nur schwach oder gar nicht moduliert, sodass viele p53-abhängige Gene in diesem Zellmodell nicht zu den „gemeinsamen“ gehörten. Auch anhand des in Abb. 3-45 gezeigten Heat Maps für die Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Gene ist zu erkennen, dass Adriamycin, Cisplatin und 5-FU deren Expression in stärkerem Maß herabregulierten als die übrigen Wirksubstanzen. Bei der Interpretation dieser Befunde ist zu bedenken, dass die zur Behandlung von HMEC-Zellen verwendeten Konzentrationen den IC80-Werten von MCF-7-Zellen entsprachen. Möglicherweise ist die Empfindlichkeit von HMECs gegenüber den verschiedenen Zytostatika nicht in gleicher Weise abgestuft wie die von MCF-7-Zellen, sodass nicht ganz äquieffektive Konzentrationen verwendet wurden.

### 3.2.9.2 Substanzspezifisch deregulierte Gene

Bei der Betrachtung der von einem Zytostatikum beeinflussten Gene erhält man zwar keinen Zellmodell überspannenden Fingerprint, findet aber in einzelnen Zelltypen auffallende Abweichungen von den übrigen Zytostatika, die eine nähere Betrachtung wert sind.

Um im jeweiligen Zellmodell gezielt die substanzspezifischen Veränderungen herauszugreifen, wurde so gefiltert, dass ausschließlich diejenigen deregulierten Gene erfasst wurden, die von nur einem Zytostatikum signifikant beeinflusst wurden und bei den übrigen Substanzen deutlich unterhalb der Schwellenwerte lagen (s. 2.7.4.4).

Die Auswertung nach diesen Filterkriterien lieferte bei nahezu allen Kombinationen aus Zytostatikum und behandeltem Zellsystem nur eine Handvoll oder sogar keinerlei Gene. Daraus lässt sich schließen, dass in den meisten Fällen keine substanzspezifischen Effekte vorhanden waren. Außerdem wird offenbar, dass die Gene, die von einem Zytostatikum dereguliert wurden und nicht in der Schnittmenge der „gemeinsamen“ Gene lagen, sehr häufig auch von anderen Substanzen verändert wurden, jedoch etwas weniger



stark, sodass sie die Schwellenwerte nur knapp verfehlten. Zu diesem generellen Befund gibt es aber bemerkenswerte Gegenbeispiele und diese betreffen fast in allen Fällen die Substanz 5-Fluorouracil. 5-FU ließ nämlich nicht nur, wie unter 3.2.9.1 bereits ausgeführt, in der Mehrzahl der Zellmodelle viele der „gemeinsamen“ Gene unbeeinflusst, sondern führte zudem zur differentiellen Expression zahlreicher anderer Gene. Dies unterstreicht, dass der oben beschriebene Effekt nicht durch zu gering gewählte Konzentrationen bei der Behandlung mit 5-FU verursacht wurde, sondern dass dieser Wirkstoff tatsächlich in mehreren Zelltypen eine charakteristische Signatur hervorrief.

Derartige spezifische Veränderungen waren in A549-, HT-29- und MDA-MB-231-Zellen zu beobachten, und zwar sowohl nach 24 als auch nach 72 h Behandlungsdauer. Es muss hervorgehoben werden, dass zwischen den 5-FU-spezifischen Genen der drei Zelllinien kaum Überschneidungen bestanden, d. h. 5-FU erzeugte in jeder Zellart ein anderes Muster. In MCF-7- und HMEC-Zellen hingegen hob sich 5-FU nicht durch die Deregulierung spezifischer Gene von den übrigen Substanzen ab.

Ein weiteres Zytostatikum, für das spezifische Änderungen der Genexpression beobachtet werden konnten, war Taxol. Allerdings unterschied es sich ausschließlich in HT-29-Zellen von den übrigen Substanzen.

### 3.2.9.2.1 5-FU-spezifische Veränderungen der globalen Genexpression

Im Folgenden werden einige der in HT-29-, MDA-MB-231- und A549-Zellen gefundenen 5-FU-spezifischen Gene näher beschrieben.

#### 5-FU in HT-29-Zellen

In HT-29-Zellen hob sich 5-FU nach 24 h deutlich von den anderen Substanzen ab, da es zu diesem Zeitpunkt schon eine signifikante Zahl von Genen modulierte, während die übrigen Behandlungen nur marginale Änderungen hervorriefen. Nach 72 h glich sich die absolute Zahl der deregulierten Gene zwar an, der von 5-FU beeinflusste Satz von Genen wich aber auffallend von den restlichen Zytostatika ab.

Zu den nach 24 h 5-FU-Exposition in HT-29-Zellen induzierten Genen gehören die beiden Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und CEACAM6. Beide besitzen Homologie zu dem Tumormarker CEA (*carcinoembryonic antigen*), dessen Serumkonzentration bei Kolonkarzinompatienten als wichtiger prä- und postoperativer Parameter dient [214]. CEACAM6 hemmt ebenso wie CEA die terminale Differenzierung verschiedener Zelltypen einschließlich Kolonkarzinomzellen und vermittelt Resistenz gegen Anoikis, also die durch Verlust der Adhäsion an die Wachstumsfläche verursachte Apoptose [215, 216]. Es ist in vielen Tumorarten überexprimiert und fördert deren Invasionsneigung [217]. Im Gegensatz dazu wird CEACAM1 im Allgemeinen als Tumorsuppressor eingestuft, da es die Proliferation von Tumorzellen hemmt und proapoptotisch und antiangiogen wirkt [218, 219]. Außerdem ist der Verlust der CEACAM1-Expression ein wichtiger Schritt in der kolorektalen Karzinogenese [220] und auch in vielen anderen Tumorarten ist es herabreguliert [221]. Allerdings gibt es auch Berichte über eine proangiogene Wirkung von CEACAM1 [222]. Da das Protein in zwei Isoformen, CEACAM1-L und CEACAM1-S, exprimiert wird, bestimmt möglicherweise das Verhältnis aus beiden den biologischen Effekt von CEACAM1 [223]. Nach 72 h waren

CEACAM1 und CEACAM6 nach wie vor in den 5-FU-behandelten Proben hochreguliert, zusätzlich wurden sie aber noch durch ein bzw. zwei weitere Zytostatika in gleicher Weise beeinflusst.

Zudem induzierte 5-FU in HT-29-Zellen nach 24 h zwei Gene, die in die zelluläre Differenzierung involviert sind: KRT13 (Keratin 13) und RAI14 (*retinoic acid induced 14*). Ihre Expressionsdaten zum 24- und 72 h-Zeitpunkt sind in Abb. 3-66A und B gezeigt.

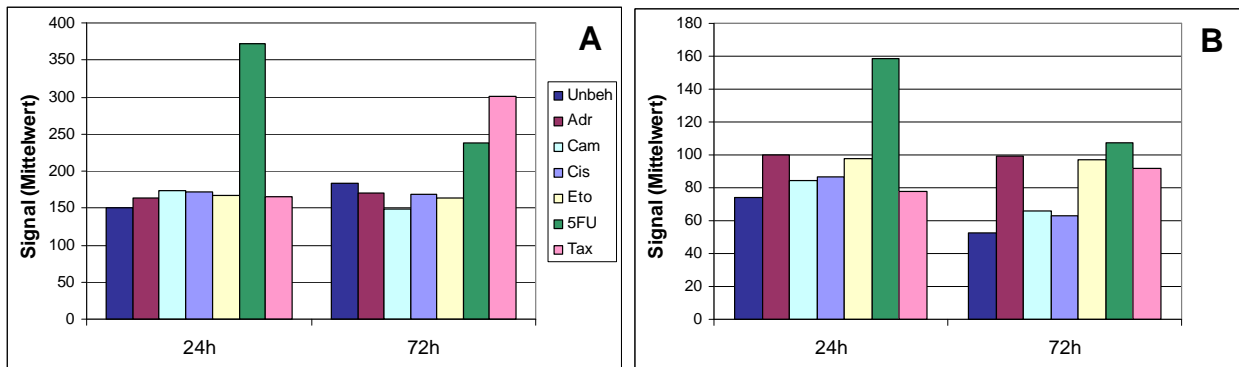


Abb. 3-66: Expression von KRT13 (A) und RAI14 (B) in HT-29-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

KRT13 ist ein Zytokeratin, das als Marker für den Differenzierungsgrad normaler und tumoraler Zellen dient [224]. Seine Expression ist in verschiedenen Tumortypen reduziert [225-227]. Nach 72 h war KRT13 im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle durch keinen der Wirkstoffe mehr signifikant induziert, tendenziell war seine Expression jedoch in den 5-FU- und Taxol-behandelten Proben erhöht. Über RAI14 ist nicht allzu viel bekannt: Es wurde als durch Retinsäure induzierbar beschrieben, außerdem ist es mit dem Actin-Zytoskelett assoziiert und spielt möglicherweise eine Rolle in dessen Reorganisation [228, 229]. Nach 72 h Behandlung erfüllten sowohl 5-FU als auch Adriamycin die Kriterien für eine signifikante Erhöhung der RAI14-Expression.

Sowohl nach 24 als auch nach 72 h war die Expression von HMMR (*hyaluronan-mediated motility receptor*) in 5-FU-behandelten HT-29-Zellen reprimiert. Das kodierte Protein stabilisiert den mitotischen Spindelapparat, ist aber auch in Proliferation, Migration und Metastasierung involviert und wird als Onkogen eingestuft [230, 231]. Während es in sämtlichen Zellmodellen mit Wildtyp-p53-Protein durch alle oder fast alle Zytostatika reprimiert wurde, beeinflusste in HT-29-Zellen nur 5-FU seine Expression. Die Signalhöhen der beiden auf dem HG-U133A-Chip befindlichen Probe Sets für HMMR nach 24 und 72 h Behandlung von HT-29-Zellen sind in Abb. 3-67 gezeigt. In MDA-MB-231-Zellen konnte keine Substanz eine signifikante Änderung der Transkriptmenge von HMMR bewirken (Daten nicht gezeigt).

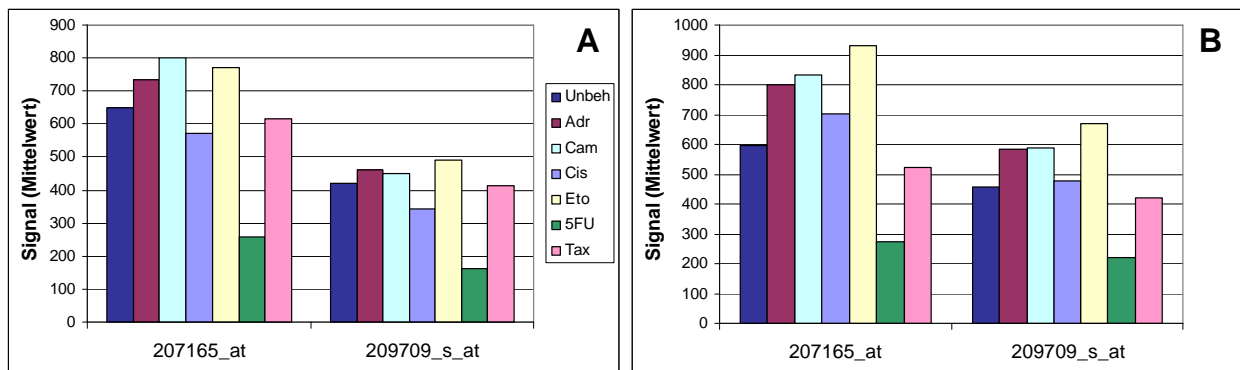


Abb. 3-67: Signalhöhen der beiden Probe Sets von HMMR in HT-29-Zellen nach 24 h (A) und 72 h (B) Zytostatikabehandlung.

Darüber hinaus reprimierte 5-FU in HT-29-Zellen nach 24 h spezifisch mehrere mitotische Gene (Aurora A, CENPF und KIF20A), die in den Wildtyp-p53-Zellen zu den „gemeinsamen“ Genen gehörten und unter 3.2.8.2.4 bereits besprochen wurden.

Während 5-FU viele der in HT-29-Zellen nach 72 h durch die anderen Substanzen induzierten Immunantwortgene unbeeinflusst ließ, steigerte es selbst zu diesem Zeitpunkt die Expression eines Interleukinrezeptors, nämlich IL17RB, des Rezeptors für IL17B und IL17E (Abb. 3-68A). Diese sind proinflammatorische Zytokine und stimulieren die Aktivierung von NF $\kappa$ B und die Synthese von IL8. So wie vielen anderen Immuneffektoren wird auch dem IL17-System sowohl ein Einfluss bei der Tumorangiose und -invasion als auch bei der Stimulierung der körpereigenen antitumoralen Abwehrmechanismen zugeschrieben [232]. Auch das Onkogen MUC1 (Mucin 1) gehörte zu den nach 72 h in HT-29-Zellen 5-FU-spezifisch hochregulierten Genen (Abb. 3-68B). Es kann durch Zytokine induziert werden und vermittelt Resistenz gegen genotoxische Agenzien wie z. B. Cisplatin, indem es die Exekution der Apoptose hemmt [233, 234]. Zudem fungiert es als Koaktivator von  $\beta$ -Catenin bei der Transkription von Targets des Wnt-Signalwegs [235, 236].

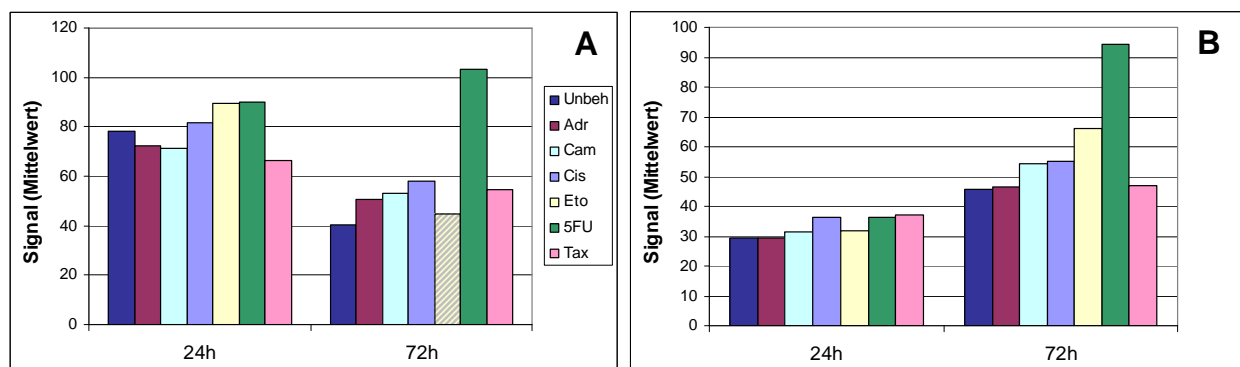


Abb. 3-68: Expression von IL17RB (A) und MUC1 (B) in HT-29-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

Der Transkriptionsfaktor MYC wurde nach 72 h in HT-29-Zellen ausschließlich durch 5-FU auf Expressionsebene herabreguliert. Da MYC durch die Aktivierung oder Repression einer enormen Zahl von transkriptionellen Targets sowohl die Zellzyklusprogression stimulieren und als Onkogen fungieren kann als

auch unter bestimmten Bedingungen eine proapoptotische Wirkung vermittelt [237], sind die Folgen seiner verringerten Expression schwer einzuschätzen.

### 5-FU in MDA-MB-231-Zellen

Auch in MDA-MB-231-Zellen rief 5-FU nach beiden Behandlungszeiten ein Expressionsmuster hervor, das sich von den übrigen Zytostatika auffallend unterschied.

Nach 24 und noch deutlich stärker nach 72 h induzierte es spezifisch die Expression von GADD34 (HUGO: PPP1R15A), einer regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase PP1 (Abb. 3-69A).

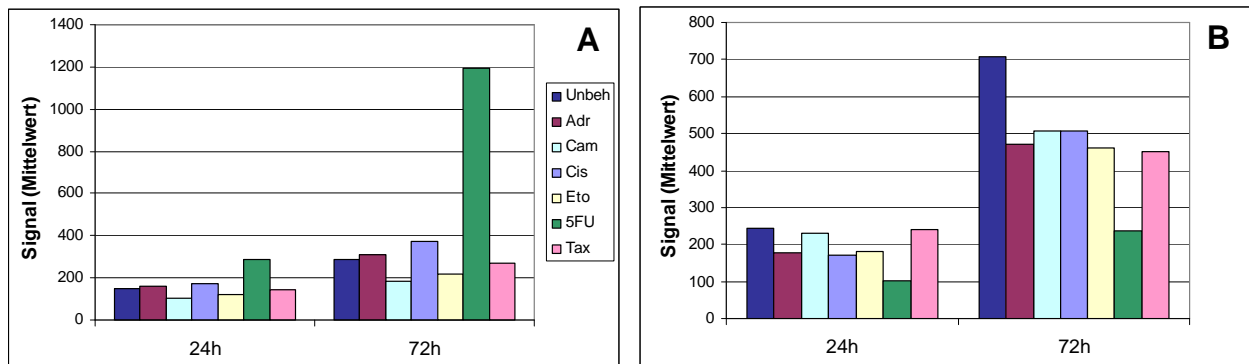


Abb. 3-69: Expression von GADD34 (A) und NNMT (B) in MDA-MB-231-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

Die Bedeutung von GADD34 im Rahmen der UPR wurde bereits kurz erwähnt (s. Abb. 3-61), und in dieser Hinsicht fällt auf, dass es trotz seiner Eigenschaft als Target von ATF4 und seiner Beteiligung an der UPR nicht reprimiert, sondern im Gegenteil induziert wurde. Abgesehen von ER-Stress kann GADD34 jedoch noch durch verschiedene andere Stressoren, wie Hypoxie und DNA-Schädigung, aber auch durch proapoptotische Stimuli induziert werden, was die beobachtete Erhöhung der Expression erklären könnte [238, 239]. Auf diese Signale hin vermittelt GADD34 einen Wachstumsarrest in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus und ist auch in die Einleitung der Apoptose involviert [240].

Das nach 24 h am stärksten von 5-FU reprimierte Gen war NNMT (Nicotinamid-N-Methyltransferase). Dieser Effekt blieb auch nach 72 h bestehen, zusätzlich war dann auch nach Behandlung mit allen anderen Zytostatika eine reduzierte Expression zu beobachten, die jedoch nur für Taxol die Filterkriterien erfüllte (Abb. 3-69B). Es existieren diverse Studien, die eine erhöhte Expression von NNMT in Tumorgeweben unterschiedlicher Herkunft nachweisen konnten [241, 242].

Zu den durch 5-FU in MDA-MB-231-Zellen nach 24 und 72 h reprimierten Genen gehören zwei Enzyme der Sterolbiosynthese, IDI1 (Isopentenylidiphosphat-delta-Isomerase) und FDFT1 (Farnesylidiphosphat-Farnesyltransferase 1, auch als Squalensynthase bezeichnet). IDI1 katalysiert im Rahmen des Isoprenstoffwechsels die Umwandlung von Isopentenylidiphosphat in sein Isomer Dimethylallyldiphosphat, welches wiederum als Vorstufe von Farnesylidiphosphat dient. Dieses wird dann unter Katalyse von FDFT1 zu

Squalen umgesetzt [243]. Da die beiden Enzyme für direkt aufeinander folgende Stoffwechselschritte verantwortlich sind, kann man vermuten, dass ihre Expression koreguliert wird.

Nach 72 h induzierte 5-FU in MDA-MB-231-Zellen eine große Zahl von Genen, die von den übrigen Zytostatika nicht moduliert wurden. Die Funktionen dieser Gene sind sehr heterogen, es lässt sich allerdings eine gewisse Häufung von Zellzyklus- und Checkpointeffektoren feststellen. So wurde u. a. MDC1, ein Checkpointmediator für die Aktivierung von ATM und ATR nach DNA-Schädigung, spezifisch durch 5-FU hochreguliert, ebenso NBS1, dem als Teil des RAD50-MRE11-NBS1- und des BASC-Komplexes eine Rolle in der Aktivierung zellulärer Kontrollpunkte und der Reparatur von DNA-Schäden zukommt (s. 3.2.8.2.3). Außerdem induzierte 5-FU auch die Expression von Inh2 (HUGO: PPP1R2), einer inhibitorischen Unter-einheit von Proteinphosphatase 1C, die zellzyklusabhängig exprimiert wird und an der Mitose beteiligt ist. Inh2 bildet einen Komplex mit NEK2 (*NIMA-related kinase 2*) und initiiert so vermutlich die Teilung der Zentrosomen im Rahmen der Ausbildung des Spindelapparats [244]. NEK2 ist auch am G2-Checkpoint beteiligt und möglicherweise spielt Inh2 hierbei ebenfalls eine Rolle [245]. Ein weiteres Beispiel eines an der Mitose beteiligten, durch 5-FU spezifisch induzierten Gens ist BRD4 (*bromodomain containing 4*). Das zugehörige Protein ist wichtig für den G2/M-Übergang und reguliert vermutlich die Chromosomendynamik während der Zellteilung [246]. Zudem interagiert BRD4 auch mit einer Komponente des *Replication factor*-Komplexes, RFC1, und hemmt die G1/S-Transition und die DNA-Elongation [247]. Abb. 3-70A zeigt die Expressionsdaten der vier beschriebenen Gene nach 72 h Zytostatikabehandlung.

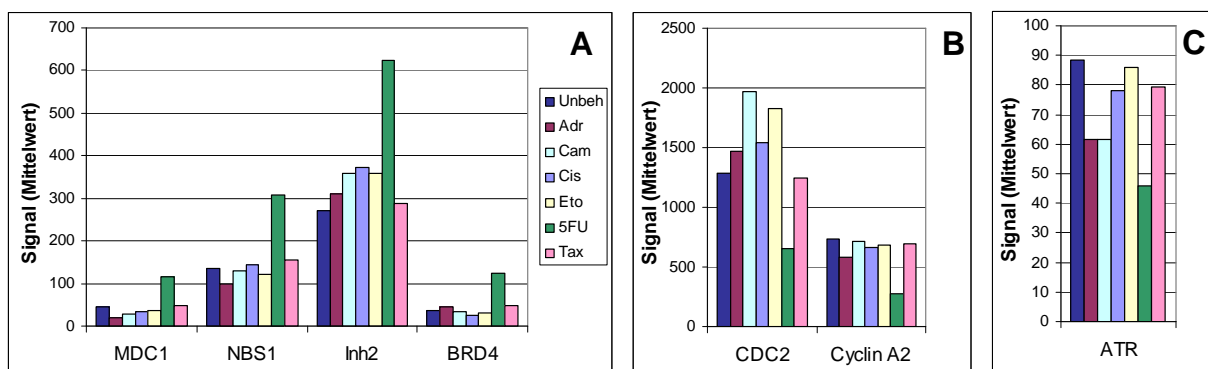


Abb. 3-70: Induktion (A) und Repression (B und C) von Zellzyklus- und Checkpointgenen durch 5-FU in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

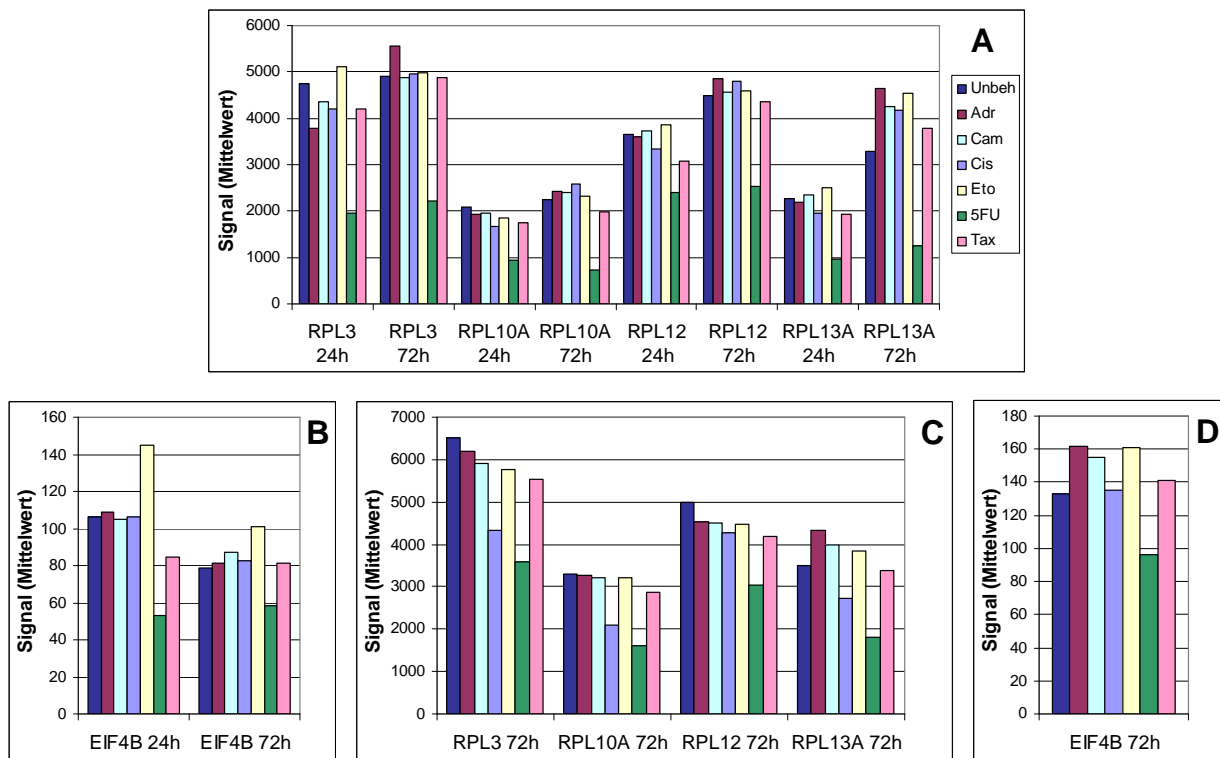
Auf der anderen Seite reprimierte 5-FU aber in MDA-MB-231-Zellen auch eine Vielzahl von Zellzyklusgenen, vorwiegend nach 72 h Behandlung.

So nahm beispielweise die Expression von CDC2 und Cyclin A2, die gemeinsam einen für die G2/M-Progression essenziellen Komplex bilden (s. 3.2.8.2.4), nach 5-FU-Behandlung ab (Abb. 3-70B). Auch die Expression der anderen mitotischen Cycline B1 und B2 wurde durch 5-FU verringert, teils jedoch auch durch Adriamycin.

Die Checkpointkinase ATR (s. 3.2.8.2.3.1) wurde in MDA-MB-231-Zellen ebenfalls durch 5-FU reprimiert, die nach 72 h Behandlung erhaltenen Daten zeigt Abb. 3-70C. Während also diese Kinase, die eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der zellulären Antwort auf DNA-Schäden spielt, herabreguliert wurde, stieg die Expression des Mediators MDC1, der ihre Aktivität stimuliert, nach 5-FU-Behandlung an.

### 5-FU in A549-Zellen

Bei der Betrachtung der 5-FU-spezifischen Antwort in A549-Zellen fällt auf, dass sowohl nach 24 als auch nach 72 h eine ganze Reihe von Genen, die ribosomale Proteine der 60S-Untereinheit kodieren, reprimiert war und parallel auch das Gen des Translationsinitiationsfaktors EIF4B. Die Expressionsdaten sind in Abb. 3-71A und B wiedergegeben. In HMEC-Zellen wurden die genannten Gene ebenfalls ausschließlich durch 5-FU reprimiert, allerdings erst nach 72 h (Abb. 3-71C und D). Diese Befunde sprechen dafür, dass 5-FU die Funktionsfähigkeit der ribosomalen Translationsmaschinerie verringert und somit die zelluläre Proteinsynthese blockiert.



**Abb. 3-71: 5-FU-spezifische differenzielle Genexpression in A549-Zellen bzw. HMEC-Zellen.**

Expression ribosomaler Proteine der 60S-Untereinheit (A) und von EIF4B (B) in A549-Zellen nach 24 und 72 h Behandlung; Expression ribosomaler Proteine (C) und von EIF4B (D) in HMEC-Zellen nach 72 h Behandlung.

5-FU induzierte nach 24 h Behandlung spezifisch mehrere Gene, die Zytokine kodieren. Dazu gehören zwei Chemokine, CCL2 und CXCL5, die an der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt sind und die antitumorale Immunabwehr stimulieren können [136, 248]. Ihre Expression kann durch andere Zytokine, wie IL1, IL2 und TNF $\alpha$ , induziert werden [249]. Nach 72 h waren diese Chemokine allerdings auch durch andere Zytostatika in A549-Zellen hochreguliert.

Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression eines weiteren zytokininduzierbaren Transkripts ausschließlich durch 5-FU erhöht, welches allerdings als Gegenspieler der Zytokinantwort fungiert und die Immunabwehr abschwächt. Es handelt sich um SOCS5 (*suppressor of cytokine signaling 5*), das vermittelt durch Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen aktiviert wird und in Form eines negativen Feedbackmechanismus u. a. den JAK-STAT-Signalweg inhibiert [250].

5-FU induzierte darüber hinaus auch JAG1 (*jagged 1*), den Liganden des Rezeptors NOTCH1 (Abb. 3-72). JAG1 ist häufig in Tumoren überexprimiert, dies korreliert mit der Invasivität und mit der Rezidivrate nach Tumorresektion [251]. NOTCH1 selbst hat onkogene Eigenschaften und fördert nach Aktivierung durch JAG1 Proliferation und Überleben von Tumorzellen [252].

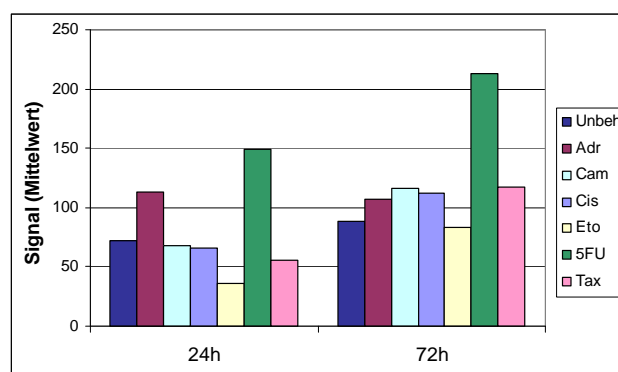


Abb. 3-72: Expression von JAG1 in A549-Zellen nach Zytostatikabehandlung.

### 3.2.9.2.2 Taxol-spezifische Effekte in HT-29-Zellen

Wie bereits angesprochen, ließ sich nach 72 h Behandlung in HT-29-Zellen nicht nur eine 5-FU-spezifische Antwort feststellen, sondern es wurden auch zahlreiche Gene ausschließlich von Taxol dereguliert. Diese wurden hauptsächlich induziert.

Unter ihnen finden sich diverse in die zelluläre Stressantwort involvierte Effektoren (Abb. 3-73). So wurde das Transkript des Hitzeschockproteins HSPA6 ausgehend von einem nicht detektierbaren Spiegel sehr stark hochreguliert. Auch GADD45B (*growth arrest and DNA-damage-inducible  $\beta$* ) wurde durch Taxol deutlich induziert. Das zugehörige Protein kann generell die Reaktion der Zelle auf Stressbedingungen, wie z. B. Strahlenexposition, regulieren, indem es über Bindung an die MAP3-Kinase MTK1 die p38- und JNK-Signalwege aktiviert [253]. Letztendlich kann dies sowohl zu Apoptose führen als auch die Apoptose hemmen; dies scheint vom schädigenden Stimulus oder der Aktivität weiterer Effektoren abhängig zu sein [254].

HMOX1 (*heme oxygenase (decycling) 1*) kann ebenfalls durch Stressfaktoren induziert werden und schützt die Zelle insbesondere vor oxidativer Belastung und der dadurch ausgelösten Apoptose. Seine Expression wurde beispielsweise in HMEC-Zellen nach 72 h durch alle Zytostatika hochreguliert.

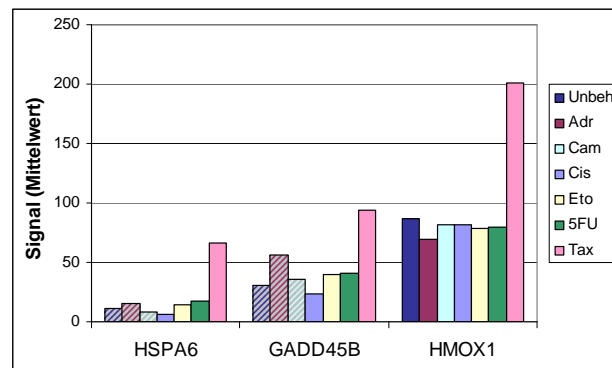


Abb. 3-73: Expression stressinduzierbarer Gene in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung; spezifische Induktion durch Taxol.

Ausschließlich durch Taxol wurde in HT-29-Zellen auch das Enzym Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3B) induziert (Abb. 3-74). GSK3B inhibiert durch Phosphorylierung eine ganze Reihe von Zellzyklus- und Wachstumsregulatoren, u. a. Cyclin D1, den Transkriptionsfaktor MYC, Glykogensynthase und  $\beta$ -Catenin [87]. In Summe vermittelt es antiproliferative und proapoptotische Effekte [255, 256]. Seine Aktivität wird durch den AKT- und den Wnt-Signalweg, die beide das Zellüberleben fördern, gehemmt [87].

Der NOTCH1-Ligand JAG1, der in A549-Zellen 5-FU-spezifisch induziert wurde, war in HT-29-Zellen ausschließlich nach 72 h Taxolbehandlung hochreguliert (Abb. 3-74).

Ebenfalls durch Taxol induziert wurde die Expression des Tumorsuppressors ING1 (*inhibitor of growth family, member 1*; (Abb. 3-74). In Tumoren wurden sowohl Genrearrangements als auch reduzierte Transkriptspiegel von ING1 beobachtet. Es hat vielfältige Wirkungen, zu denen die Induktion von Wachstumsarrest und Seneszenz, die Aktivierung zellulärer Kontrollpunkte und der DNA-Reparatur und die Einleitung von Apoptose gehören [257, 258]. Seine biologische Funktion wurde deshalb mit der von p53 verglichen [259]. Aus verschiedenen Spleißvarianten der ING1-mRNA entsteht eine ganze Proteinfamilie, deren am weitesten verbreitetes Mitglied ING1B einen Großteil der beschriebenen Effekte vermittelt [258].

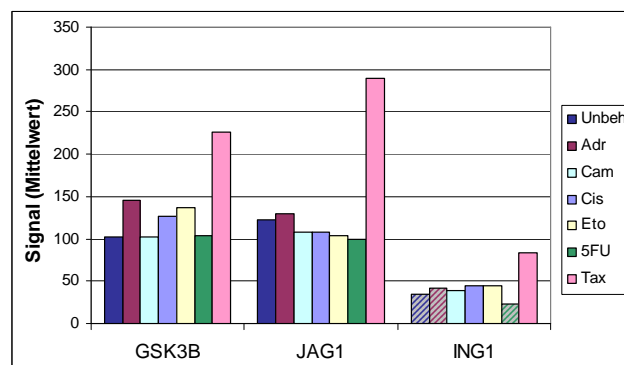


Abb. 3-74: Taxol-spezifisch induzierte Gene in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung.

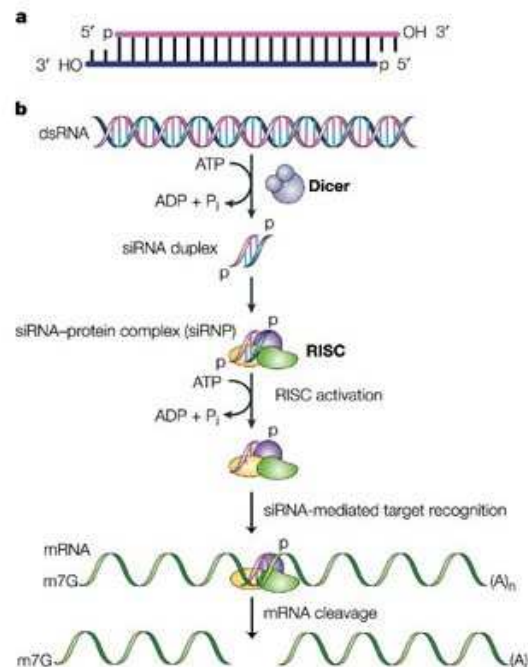


### 3.3 Spezifische Inhibition von Zielmolekülen durch RNAi und niedermolekulare Hemmstoffe

#### 3.3.1 Einleitung

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine relativ neue Methode, die in den wenigen Jahren seit ihrer Etablierung einen geradezu fulminanten Aufschwung genommen hat und mittlerweile zum Standardprogramm bei der Identifizierung und Validierung biologischer Zielmoleküle sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten akademischen und industriellen Forschung gehört.

Der postulierte RNAi-Mechanismus ist schematisch in Abb. 3-75 dargestellt.



**Abb. 3-75: Mechanismus der RNA-Interferenz.**

**a:** Struktur von siRNAs (*small interfering RNAs*): Zu den Charakteristika natürlich vorkommender und synthetischer siRNAs gehören eine ca. 19 bp lange doppelsträngige Region, 2 nt lange Überhänge, phosphorylierte 5'- und unphosphorylierte 3'-Enden.

**b:** Lange dsRNA-Moleküle werden durch das RNase-III-artige Enzym Dicer ATP-abhängig zu siRNAs prozessiert. Diese werden in den Effektor-komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert und ATP-abhängig entwunden. Der Antisensestrang vermittelt die Erkennung der komplementären Ziel-mRNA, die durch Komponenten des RISC endonukleolytisch gespalten wird. [260]

Mit Hilfe der RNAi-Technologie kann die Expression eines Targets spezifisch inhibiert werden, woraufhin sich die Auswirkungen dieses *Silencings* auf die verschiedensten biologischen Parameter charakterisieren lassen. Neben dieser wissenschaftlichen Zweckbestimmung eröffnet RNAi aber auch therapeutische Perspektiven.

Bisher wurden Experimente vorwiegend in in-vitro-Systemen mit siRNAs (*small interfering RNAs*) oder shRNAs (*small hairpin RNAs*), die von Vektoren exprimiert und in der Zelle zu siRNAs prozessiert werden, durchgeführt. Es existieren aber bereits in-vivo-Daten aus Tierstudien, und Ende 2004 wurde sogar eine Phase-I-Humanstudie zur therapeutischen Anwendung von siRNAs bei Makuladegeneration gestartet, bei der die Applikation durch intraokuläre Injektion erfolgt [261].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion verschiedener Zelllinien mit synthetischen siRNA-Molekülen methodisch etabliert. Hierfür wurden zwei Targets ausgewählt, die aufgrund der Datenlage als potenzielle onkologische Targets einzustufen sind. Einerseits wurde die Expression des zytoplasmatischen Enzyms Cholinase gehemmt, dem – vermutlich aufgrund der Synthese eines mitogenen *second messengers* – tumorprogressionsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden, andererseits wurde der biologische Gegenspieler des Tumorsuppressors p53, MDM2, als Angriffspunkt im Nukleus gewählt. Die Effekte des spezifischen Silencings dieser Zielmoleküle wurden unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der Charakterisierung möglicher antiproliferativer, zellzyklusarretierender oder proapoptotischer Wirkungen und Veränderungen der globalen Genexpression lag.

Darüber hinaus wurden diese Effekte mit denen von niedermolekularen Inhibitoren verglichen, die gegen dieselben Targets gerichtet sind. Dieses Vorgehen beruht auf der Grundannahme, dass das Silencing durch RNAi ein geeignetes Modellsystem darstellt, um die Auswirkungen eines perfekten spezifischen Inhibitors zu simulieren. Insofern sollte der Abgleich zwischen dem durch siRNAs hervorgerufenen Genexpressionsmuster und dem eines Inhibitors eine Unterscheidung in spezifische und unspezifische Nebeneffekte des niedermolekularen Hemmstoffs ermöglichen. Diese Vorstellung wird allerdings dadurch eingeschränkt, dass auch die vermeintlich zielgerichteten siRNAs unspezifische Wirkungen, sog. „Off-Target-Effekte“, induzieren können. In der Literatur häufen sich mittlerweile Publikationen hierzu, wobei sowohl über die sequenzabhängige Hemmung homologer Transkripte mit ein bis drei fehlgepaarten Basen als auch über eine unspezifische Aktivierung des Interferonsystems berichtet wird [262-265]. Diese Problematik lässt sich jedoch lösen, indem man für ein Target mehrere funktionelle siRNAs einsetzt und deren gemeinsame Effekte ermittelt, da die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass ihre Übereinstimmungen auf das Silencing des gewünschten Targets zurückzuführen sind.

### 3.3.2 Positiv- und Negativkontrollen in RNAi-Experimenten

Zusätzlich zu den gegen Cholinase bzw. MDM2 gerichteten siRNAs wurden bei den im Folgenden beschriebenen RNAi-Transfektionen verschiedene Kontrollen mitgeführt. Zum einen wurde als Positivkontrolle eine siRNA gegen das Kinesin Eg5 eingesetzt. Eg5 spielt als Motorprotein eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des mitotischen Spindelapparats. Das Silencing von Eg5 führt in den transfizierten Zellen sehr rasch, nämlich schon innerhalb von 24 h, zu einem ausgeprägten G2/M-Arrest, der sich nach 48 und 72 h

noch verstärkt. Außerdem beginnen die arretierten Zellen, sich von der Wachstumsfläche abzulösen und gehen nach und nach in Apoptose. Deshalb lässt sich der Erfolg der Transfektion sehr gut und einfach lichtmikroskopisch kontrollieren, zudem kann man die Transfektionseffizienz per Zellzyklusanalyse quantifizieren.

Negativkontroll-siRNAs, die keine Homologien zu bekannten humanen Genen besitzen, sollen für die Effekte kontrollieren, die sequenzunabhängig durch das Einführen kurzer doppelsträngiger RNA in die Zelle und ihre Inkorporation in den RISC-Komplex hervorgerufen werden. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden zwei Negativkontrollen ausgetestet, um diejenige mit den geringeren unspezifischen Wirkungen zu identifizieren. Einerseits wurde die von Elbashir et al. beschriebene Luciferase-GL3-siRNA [266], andererseits die kommerziell angebotene Non-silencing control siRNA verwendet. Außerdem wurden im weitaus größten Teil der Experimente „mock-transfizierte“ Zellen mitgeführt, die nur mit Transfektionsagens ohne siRNA behandelt wurden, und parallel auch gänzlich unbehandelte Zellen kultiviert und analysiert.

In den Diagrammen und Tabellen werden diese Kontrollbehandlungen folgendermaßen abgekürzt:

- Eg5 = Eg5-siRNA
- Luci = Luciferase-siRNA
- Ns = Non-silencing control siRNA
- Mock = Mock-Transfektion
- Unbeh = unbehandelte Kontrolle

### 3.3.3 Hemmung von Cholinase

#### 3.3.3.1 Einleitung

Das Enzym Cholinase (ChoK, HUGO: CHKA) katalysiert die ATP- und magnesiumabhängige Synthese von Phosphorylcholin (PCho) aus Cholin. Cholin selbst stammt aus der Nahrung und gelangt durch verschiedene Transportsysteme in die Zelle. Es ist der Vorläufer der wichtigen Membranbestandteile Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sowie des Neurotransmitters Acetylcholin und der Aminosäure Methionin. Cholin kann auch durch Spaltung des Phospholipids Phosphatidylcholin entstehen, vermittelt durch Phospholipase D. Hierbei wird neben Cholin auch Phosphatidsäure gebildet. Diese kann weiter in die *second messengers* Diacylglycerol oder Lysophosphatidsäure umgewandelt werden. Diese besitzen ebenso wie diverse andere von Lipiden abgeleitete Botenstoffe mitogene Eigenschaften und spielen eine wichtige Rolle in von Onkogenen regulierten Signalwegen und bei der Tumorigenese.

Das durch die Aktivität von ChoK aus Cholin generierte PCho kann in CDP-Cholin umgewandelt werden, welches ein Intermediat bei der Bildung bzw. Regenerierung von Phosphatidylcholin im Rahmen des sog. Kennedy-Stoffwechselwegs darstellt. Zudem scheint PCho second messenger-Funktion zu besitzen. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von ChoK essenziell für die mitogene Wirkung von PDGF

(*platelet-derived growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) sowohl in murinen Fibroblasten als auch in humanen Brustepithelzellen ist [267, 268].

Eine Reihe von Befunden spricht dafür, dass ChoK eine bedeutsame Rolle in der Karzinogenese spielt und sich als therapeutisches Target bei Tumorpatienten anbietet. So konnten erhöhte Spiegel von PCho und gesteigerte ChoK-Enzymaktivitäten sowohl in Zellmodellen, die durch ektope Expression verschiedener Onkogene (RAS, SRC, RAF, MOS) transformiert waren, als auch in humanen Tumoren und aus diesen abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen werden. Bei Mammakarzinompatientinnen wurde eine Korrelation zwischen dem Grad der Aktivierung von ChoK und klinischen Parametern, die für erhöhte Malignität sprechen (histologischer Tumorgrad, negativer Estrogenrezeptorstatus), gefunden [268]. Außerdem konnten mit Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von Cholinase in Zell- und Xenograftmodellen ausgeprägte antiproliferative bzw. tumorhemmende Effekte erreicht werden [269, 270].

Es ist unklar, wie und warum es zur (Über-)Aktivierung von ChoK in transformierten Zellen kommt. Man weiß, dass die zelluläre Konzentration von ChoK durch Wachstumsfaktoren und verschiedene Hormone erhöht wird, vermutlich durch Regulation auf Transkriptionsebene. Außerdem verursachen diverse Onkogene, wie bereits erwähnt, eine Erhöhung der ChoK-Aktivität [267]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass dies nicht die Folge einer Aktivierung von Phospholipase D ist und somit die ChoK-Aktivität nicht vom zellulären Spiegel von Cholin abhängt. Des Weiteren sprechen experimentelle Befunde dafür, dass die RAS-abhängige Stimulierung von ChoK durch den GTPase-Austauschfaktor RAL-GDS und den PI3K-Signalweg vermittelt wird. RAL-GDS und PI3K können ChoK getrennt aktivieren, wirken in Kombination jedoch synergistisch [271].

Noch weniger als über die Wege der ChoK-Aktivierung ist über die downstream von ChoK gelegenen Mechanismen bekannt. Man nimmt an, dass PCho als second messenger fungiert und an der Vermittlung mitogener Signale mitwirkt, jedoch ist es auch möglich, dass ein bisher unbekanntes Target von ChoK für die wachstumsfördernden Effekte verantwortlich ist [267].

Die Arbeitsgruppe, von der der Großteil der beschriebenen Befunde stammt, hat sich auf die Forschung an Cholinase spezialisiert. Sie wird von Professor Juan Carlos Lacal geleitet und befindet sich am Instituto de Investigaciones Biomédicas in Madrid. Mit dieser Gruppe wurden im Rahmen einer Kooperation Reagenzien, Proben und Versuchsergebnisse ausgetauscht.

### 3.3.3.2 RNAi gegen Cholinase

Ein möglicher Weg, um zu untersuchen, welche Auswirkungen das Fehlen der ChoK-Aktivität auf die Zelle hat, ist die Anwendung der RNA-Interferenz, durch welche die Bildung des Enzyms von vornherein verhindert werden soll. Es konnten drei gegen ChoK-mRNA gerichtete siRNAs identifiziert werden, die zu einem effizienten *Knock-down* ihres Targets führten. Sie wurden mit C1, C2 und C3 bezeichnet und ihre Sequenzen sind unter 2.1.2.8 angegeben.

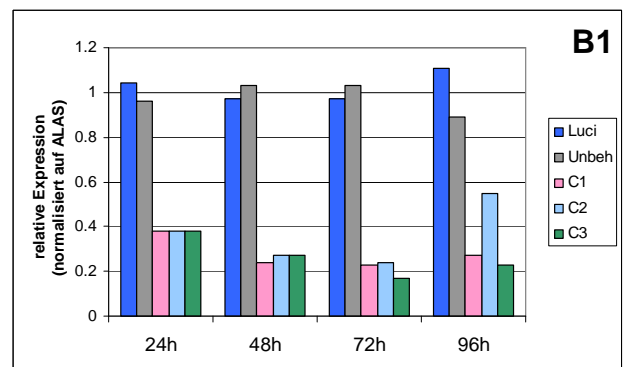
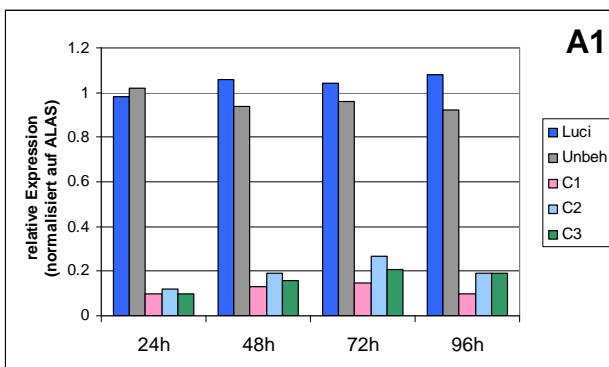
### 3.3.3.2.1 Zelllinien

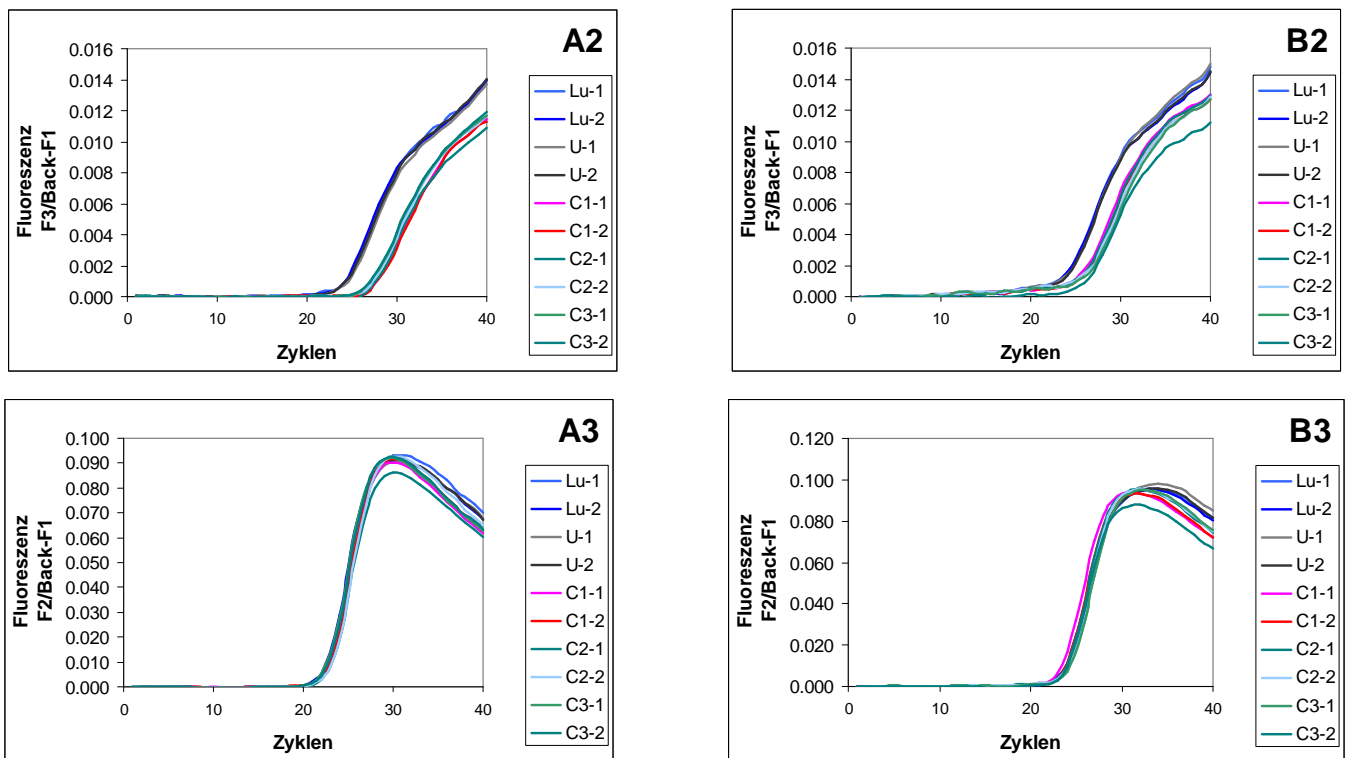
Die Expression von ChoK wurde in den zwei Tumorzelllinien HT-29 und MDA-MB-231 durch RNAi gehemmt. Die Charakteristika dieser Zellen wurden bereits unter 3.2.2 beschrieben. In beiden Zellmodellen waren in vorangegangenen Studien ausgeprägte antiproliferative Effekte von ChoK-Inhibitoren festgestellt worden [268, 270], sodass es viel versprechend und interessant erschien, deren Wirkungen mit denen von gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs zu vergleichen. Die zur Transfektion dieser Zelllinien angewendeten Protokolle sind unter 2.5.7 beschrieben.

### 3.3.3.2.2 Silencing von ChoK auf Transkriptionsebene

Als erster Schritt bei der Identifizierung funktioneller siRNAs muss der Nachweis geführt werden, dass sie ihren primären Angriffspunkt, also die Ziel-mRNA, effizient herabregulieren. Für die Quantifizierung der ChoK-Transkriptmenge wurde ein RT-PCR-Protokoll entwickelt, bei dem die ChoK-Expression auf den Spiegel des Housekeeping-Gens  $\delta$ -Aminolävulinatsynthase (ALAS) normalisiert wurde (s. 2.6.7.2).

Das Silencing der ChoK-mRNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion quantifiziert. Wie in Abb. 3-76A gezeigt, war sowohl in HT-29- als auch in MDA-MB-231-Zellen bereits nach 24 h eine deutliche Reduktion der Ziel-mRNA durch alle drei siRNAs festzustellen. Dieser Effekt verstärkte sich nach 48 h noch und blieb bis 72 bzw. 96 h nach der Transfektion bestehen. In Abb. 3-76A2 und A3 bzw. B2 und B3 sind beispielhaft die Amplifikationskurven von Target und Housekeeping-Gen zum 48 h-Zeitpunkt dargestellt. Während bei ALAS die Kurven von ChoK-siRNA-transfizierten und Kontrollproben übereinander liegen (A3 bzw. B3), überschreiten bei der ChoK-Amplifikation die ChoK-siRNA-transfizierten Proben die Detektionsschwelle erst mehrere PCR-Zyklen später als die Negativkontrollen, was an der Rechtsverschiebung der Graphen abzulesen ist (A2 bzw. B2). Dies beruht auf der deutlichen Verringerung der Ausgangsmenge an ChoK-Transkript.





**Abb. 3-76: Silencing von Cholinkinase-mRNA.**

HT-29- und MDA-MB-231-Zellen wurden im 6-Well-Maßstab mit den ChoK-siRNAs C1, C2 und C3 bzw. mit Luciferase-siRNA transfiziert. Bei HT-29-Zellen betrug die siRNA-Konzentration 33 nM, bei MDA-MB-231-Zellen 100 nM. Parallel wurden jeweils unbehandelte Zellen kultiviert. 24, 48, 72 und 96 h nach der Transfektion wurden Lysate gewonnen und diese per Two-Step-RT-PCR quantifiziert und auf das Housekeeping-Gen ALAS normalisiert.

**A1:** Relative Expressionslevel von ChoK-mRNA in HT-29-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (Mittelwerte aus Duplikaten).

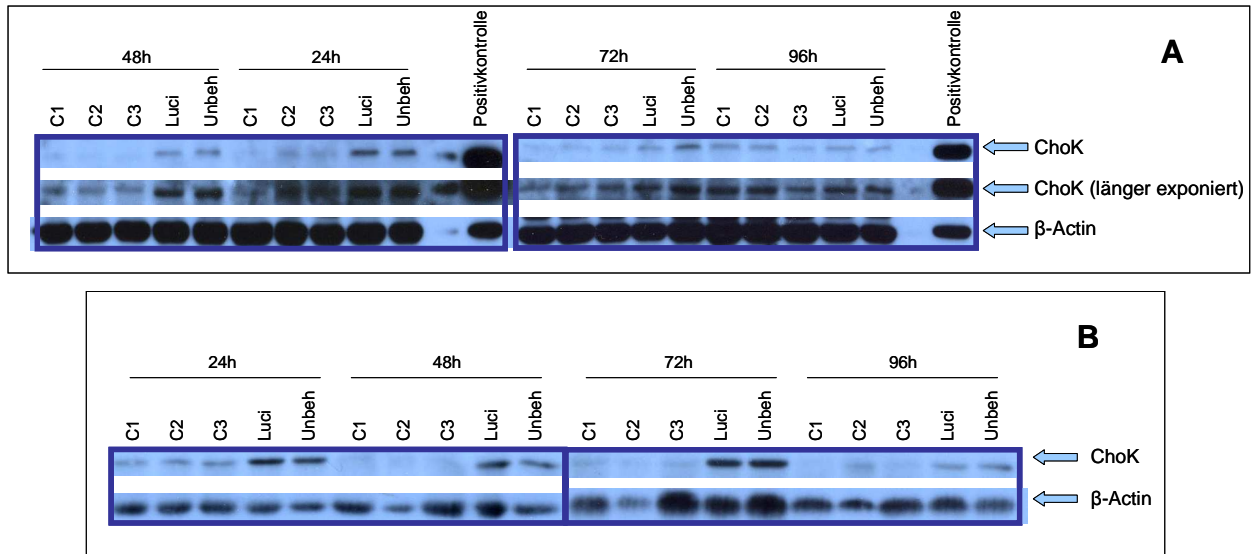
**A2:** Amplifikationskurven von ChoK-mRNA in HT-29-Zellen zum Zeitpunkt 48 h (zusammengehörige Duplikate sind jeweils mit -1 und -2 bezeichnet). **A3:** Amplifikationskurven der zur Normalisierung verwendeten ALAS-mRNA in HT-29-Zellen zum Zeitpunkt 48 h.

**B1:** relative Expressionslevel von ChoK-mRNA in MDA-MB-231-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion. **B2:** Amplifikationskurven von ChoK-mRNA in MDA-MB-231-Zellen zum Zeitpunkt 48 h (zusammengehörige Duplikate sind jeweils mit -1 und -2 bezeichnet). **B3:** Amplifikationskurven der zur Normalisierung verwendeten ALAS-mRNA in MDA-MB-231-Zellen zum Zeitpunkt 48 h.

Die relative Quantifizierung der Ziel-mRNA diente auch zur Optimierung des Transfektionsprotokolls und zur Reduktion der siRNA-Konzentration auf die niedrigstmögliche effektive Molarität. Alle drei siRNAs konnten in beiden Zelllinien auf eine Konzentration von 10 nM herabtitriert werden, ohne dass sich der spezifische Knock-down der ChoK-mRNA verringerte. Dies belegt, dass es sich bei den verwendeten siRNAs um hocheffiziente Reagenzien handelte.

### 3.3.3.2.3 Silencing von ChoK auf Proteinebene

Der RNAi-vermittelte Knock-down von ChoK konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die entsprechenden Versuche wurden im Arbeitskreis von Herrn Professor Lacal von Mónica Báñez-Coronel durchgeführt. Die Resultate sind in Abb. 3-77 gezeigt. Die Banden wurden nicht quantifiziert, jedoch ist die Reduktion der ChoK-Proteinmenge nach 24, 48 und 72 h offensichtlich.



**Abb. 3-77: Nachweis des ChoK-Silencings auf Proteinebene.**

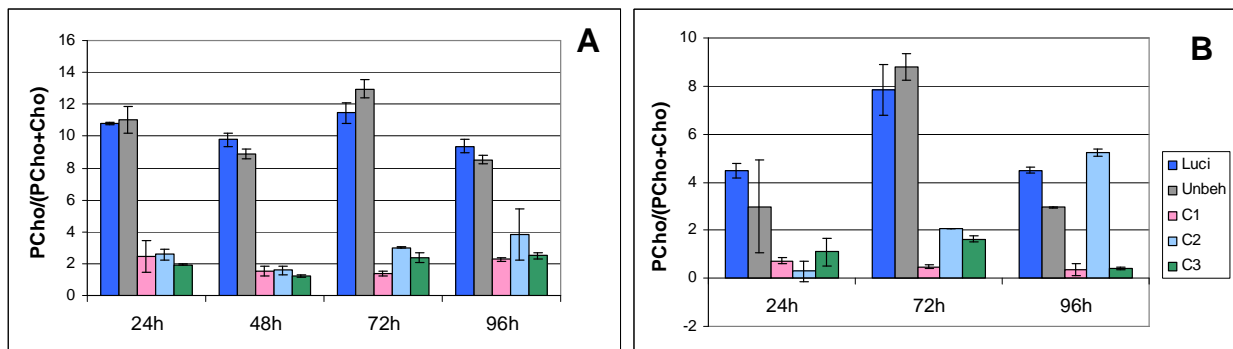
Die verwendeten Lysate stammen aus dem gleichen Versuchsansatz wie die mRNA-Proben aus Abb. 3-76. 24, 48, 72 und 96 h nach der Transfektion wurden Lysate gewonnen (Lysepuffer Labor Lacal, s. 2.1.3.6) und diese in der Arbeitsgruppe von Hr. Prof. Lacal mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen ChoK im Western Blot analysiert.

**A:** HT-29-Zellen: Banden von ChoK, kürzer und länger belichtet, und  $\beta$ -Actin-Kontrollbanden zu den angegebenen Zeitpunkten.

**B:** MDA-MB-231-Zellen: Banden von ChoK und  $\beta$ -Actin-Kontrollbanden zu den angegebenen Zeitpunkten.

### 3.3.3.2.4 Reduktion der Enzymaktivität von ChoK

In Madrid wurde neben der Quantifizierung der Proteinlevel auch die Enzymaktivität von ChoK gemessen. Diese Analysen beruhen auf der Quantifizierung von aus  $^{14}\text{C}$ -markiertem Cholin gebildetem PCho und wurden ebenfalls von Mónica Báñez-Coronel durchgeführt. Wie aus Abb. 3-78 ersichtlich, war die enzymatische Aktivität bereits 24 h nach der Transfektion stark verringert und der Effekt hielt mindestens 72 h lang an.



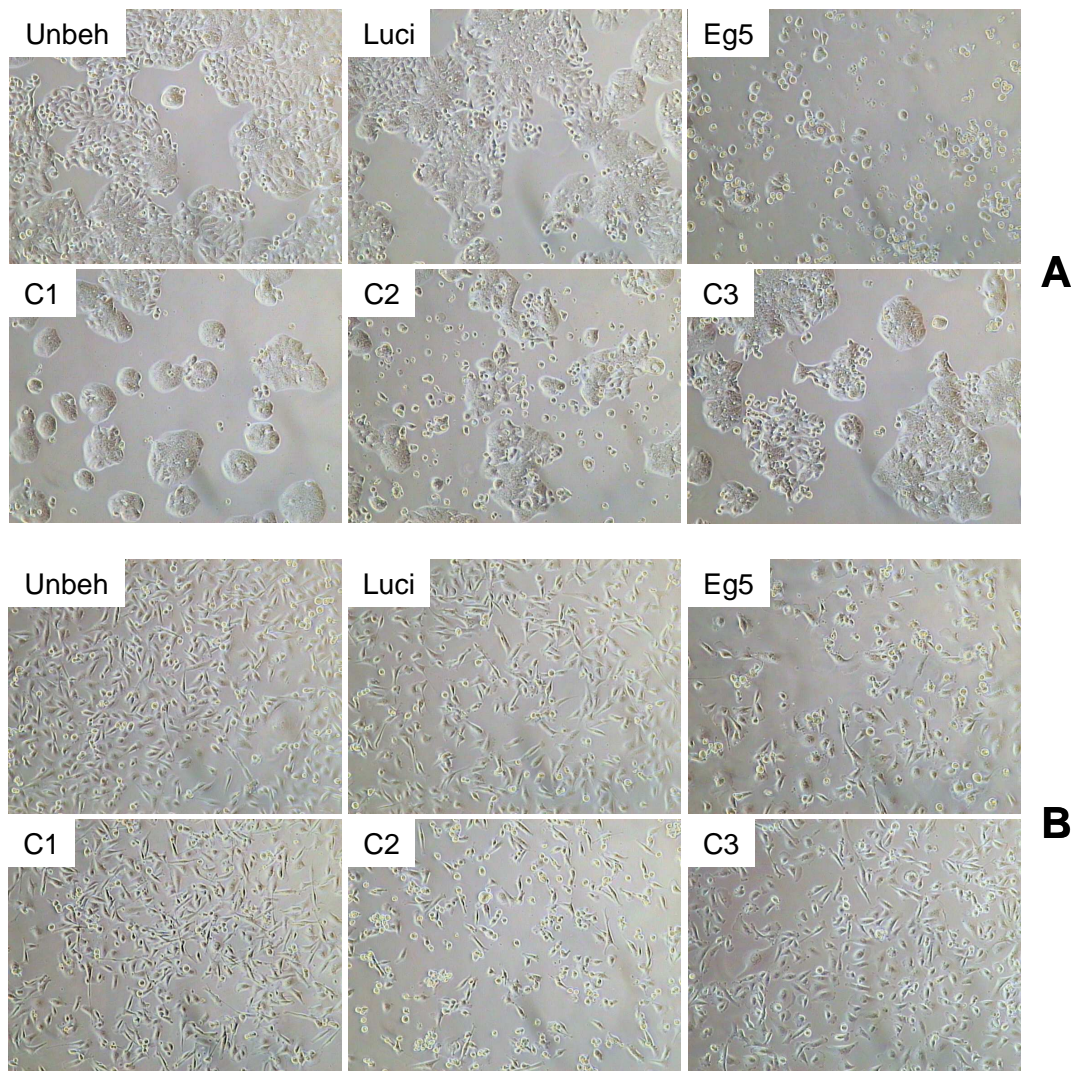
**Abb. 3-78: Reduktion der Enzymaktivität nach Silencing von ChoK.**

Die Proben waren identisch zu denen beim Western Blot, s. Abb. 3-77. Die Enzymaktivität wird als Quotient aus der Menge an PCho und der Summe aus PCho und Cholin (Cho) ausgedrückt. **A:** Enzymaktivität in HT-29-Zellen 24, 48, 72 und 96 h nach der Transfektion. **B:** Enzymaktivität in MDA-MB-231-Zellen 24, 72 und 96 h nach der Transfektion. Der 48 h-Zeitpunkt fiel aufgrund einer Probenverwechslung aus.



### 3.3.3.2.5 Effekte auf die Zellzahl und -morphologie

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen nach Transfektion mit den ChoK-siRNAs konnten Veränderungen festgestellt werden, die allerdings zwischen den drei siRNAs nicht übereinstimmten. In Abb. 3-79 sind Fotografien von HT-29- und MDA-MB-231-Zellen jeweils 72 h nach der Transfektion gezeigt.



**Abb. 3-79: Zellmorphologie nach Transfektion mit ChoK-siRNAs.**

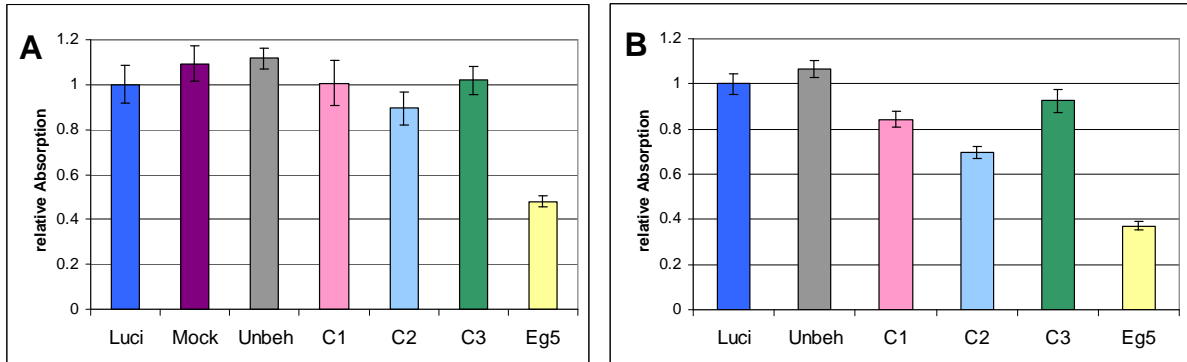
Fotografien von HT-29- und MDA-MB-231-Zellen im Rahmen des bereits beschriebenen Versuchs (s. Abb. 3-76 bis Abb. 3-78). Die Aufnahmen wurden 72 h nach der Transfektion bei 100facher Vergrößerung gemacht. **A:** HT-29-Zellen, **B:** MDA-MB-231-Zellen.

Die Negativkontroll-siRNA gegen Luciferase hatte im Vergleich mit den gänzlich unbehandelten Zellen nur marginale Auswirkungen auf Zellzahl und -morphologie. Im Vergleich zu den Kontrollen rief die siRNA C3 keinerlei erkennbare Veränderungen hervor, während C1 zu einer leichten Verringerung der Zellzahl führte. Diese war im Fall der inselförmig wachsenden HT-29-Zellen deutlicher zu erkennen, da sich diese Inseln auffällig verkleinerten. C2 bewirkte reproduzierbar eine Verringerung der Zellzahl und eine deutliche Erhöhung des Anteils toter Zellen. Eg5-siRNA hatte ausgeprägte proliferationshemmende und proapoptotische Wirkungen, die den Erfolg der Transfektion an sich bestätigten.



### 3.3.3.2.6 Quantifizierung der Effekte auf die Zellproliferation und -viabilität

Um eine quantitative Aussage über die Effekte der ChoK-siRNAs auf die Zahl und Viabilität der transfizierten Zellen treffen zu können, wurden WST-1-Tests durchgeführt. In Abb. 3-80 sind die Ergebnisse einer solchen Messung gezeigt, die 72 h nach der Transfektion erfolgte.



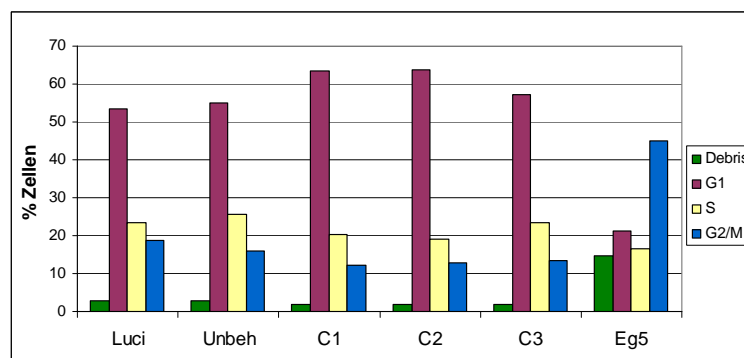
**Abb. 3-80: WST-1-Test in HT-29- und MDA-MB-231-Zellen 72 h nach ChoK-Silencing.**

HT-29- und MDA-MB-231-Zellen wurden im 24-Well-Maßstab mit den gegen ChoK gerichteten siRNAs C1, C2 und C3 bzw. mit Luciferase-siRNA transfiziert. Bei HT-29-Zellen betrug die siRNA-Konzentration 10 nM, bei MDA-MB-231-Zellen 100 nM. Parallel wurden jeweils unbehandelte Zellen kultiviert, bei HT-29-Zellen zusätzlich mock-transfizierte Zellen. 72 h nach der Transfektion wurde die metabolische Aktivität der Zellen mittels WST-1-Test ermittelt. Die relativen Absorptionswerte sind auf Luciferase-siRNA bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 8 Replikaten an. **A:** HT-29-Zellen, **B:** MDA-MB-231-Zellen.

Die Negativkontrollen waren untereinander sehr ähnlich, wodurch sich bestätigte, dass Luciferase-siRNA keine nennenswerten Effekte auf das Zellwachstum ausübt. Eg5-siRNA führte in beiden Zelllinien zu einer massiven Reduktion der metabolischen Aktivität. Während sich die bei C2 lichtmikroskopisch beobachtete Zellzahlverminderung bzw. Apoptose sowohl in HT-29- als auch MDA-MB-231-Zellen in einer Abnahme der Absorption im Vergleich zu den Kontrollbehandlungen äußerte, konnte für C1 nur in MDA-MB-231 eine schwache Reduktion gemessen werden.

### 3.3.3.2.7 Effekte auf die Zellzyklusverteilung

Um zu untersuchen, ob die ChoK-siRNAs die Zellzyklusverteilung der transfizierten Zellen beeinflussen, wurden durchflusszytometrische Analysen unter Verwendung von Propidiumiodid durchgeführt (s. 2.5.5).



**Abb. 3-81: Zellzyklusverteilung von HT-29-Zellen 48 h nach ChoK-Silencing.**

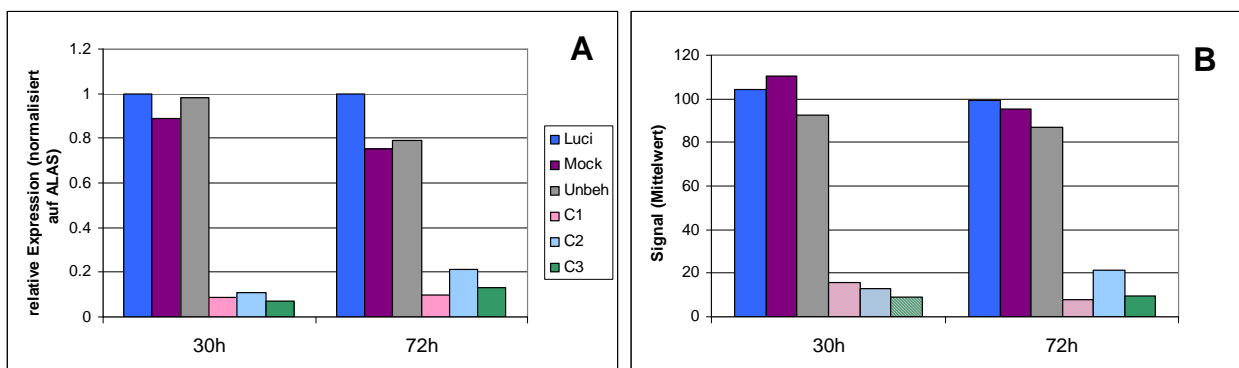
48 h nach der Transfektion im 6-Well-Maßstab wurden HT-29-Zellen einer Zellzyklusanalyse unterworfen. Als Negativkontrollen dienten Luciferase-siRNA-transfizierte und unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle Eg5-siRNA-transfizierte Zellen. Die siRNA-Konzentration betrug 10 nM.

Wie in Abb. 3-81 anhand von Ergebnissen aus 48 h nach der Transfektion geernteten HT-29-Zellen gezeigt wird, führten C1 und C2 zu einer leichten Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase, während C3 keine Auswirkungen hatte. Der ausgeprägte G2/M-Arrest und der hohe Anteil an zellulärem Debris in der Eg5-siRNA-transfizierten Probe dienten als Nachweis einer sehr guten Transfektionseffizienz.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse von MDA-MB-231 waren sehr ähnlich, auch hier bewirkten C1 und C2 einen schwachen G0/G1-Arrest, während C3 ohne messbaren Effekt blieb (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3.2.8 Genexpressionsanalyse von HT-29-Zellen nach siRNA-Transfektion

Aus den bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Versuchsergebnissen ließ sich ableiten, dass alle drei gegen Cholinase gerichteten siRNAs ihr Target sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene effizient und etwa im gleichen Ausmaß herabzuregulieren vermochten. Die beobachteten Unterschiede im Einfluss auf das Wachstumsverhalten, die Zellzyklusverteilung und Apoptotendenz der transfizierten Zellen wiesen deshalb bereits darauf hin, dass C1 und insbesondere C2 Off-Target-Effekte ausübten. Im Rahmen einer Genexpressionsanalyse auf dem Affymetrix GeneChip® Array HG-U133A sollte deshalb untersucht werden, welche Auswirkungen auf Transkriptionsebene den drei siRNAs gemeinsam waren, da diese ja mit hoher Wahrscheinlichkeit die spezifische Signatur eines Verlusts an Cholinase darstellen. Diese Übereinstimmungen sollten anschließend mit dem ChoK-Inhibitor MN58 verglichen werden. Da von diesem Inhibitor ein Datensatz vorlag, in dem HT-29-Zellen 30 h lang behandelt worden waren, wurde diese Versuchsdauer auch für die siRNA-Transfektion übernommen, zusätzlich wurden die Zellen 72 h nach der Transfektion geerntet und ebenfalls auf Affymetrix-Chips analysiert. Als Negativkontrollen wurden gänzlich unbehandelte, Luciferase-siRNA- und mock-transfizierte Zellen mitgeführt. Alle Behandlungen erfolgten in Duplikaten. Vor der Hybridisierung auf die DNA-Chips wurde nachgewiesen, dass das Silencing der Ziel-mRNA auch in diesem Ansatz geglückt war. Abb. 3-82A zeigt die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse nach 30 und 72 h Transfektionsdauer.



**Abb. 3-82: Silencing von ChoK auf mRNA-Ebene in den Affymetrix-Proben.**

HT-29-Zellen wurden im 6-Well-Maßstab mit den ChoK-siRNAs C1, C2 und C3 und der Luciferase-siRNA (jeweils 10 nM) transfiziert, parallel wurden mock-transfizierte und unbehandelte Zellen mitgeführt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Es sind jeweils die Mittelwerte von Duplikaten angegeben.

**A:** RT-PCR-Ergebnisse, normalisiert auf ALAS, bezogen auf die Luciferase-siRNA-transfizierten Proben. **B:** Affymetrix-Ergebnisse.

Der aus den RT-PCR-Daten ersichtliche exzellente Knock-down der ChoK-mRNA konnte im Rahmen der Affymetrix-Analyse bestätigt werden. Wie in Abb. 3-82B gezeigt, war das Signal des Probe Sets für Cholin-kinase sowohl nach 30 als auch nach 72 h im Vergleich zu sämtlichen Kontrollen massiv reduziert und sank in den meisten Fällen unter die Detektionsschwelle ab (*absent Call*).

Im nächsten Schritt wurden die Expressionsdaten der drei Negativkontrollen, also der mit Luciferase-siRNA transfizierten, mock-transfizierten und unbehandelten Zellen, miteinander verglichen. Wie aus Tab. 3-8 zu entnehmen ist, waren alle Kontrollen untereinander sehr ähnlich; die geringsten Unterschiede bestanden zwischen Luciferase-siRNA- und Mock-Behandlung.

	30 h	72 h
<b>Luci - Mock</b>	3 IDs↑, 14 IDs↓	12 IDs↑, 21 IDs↓
<b>Luci - Unbeh</b>	37 IDs↑, 14 IDs↓	33 IDs↑, 14 IDs↓
<b>Mock - Unbeh</b>	40 IDs↑, 4 IDs↓	55 IDs↑, 17 IDs↓

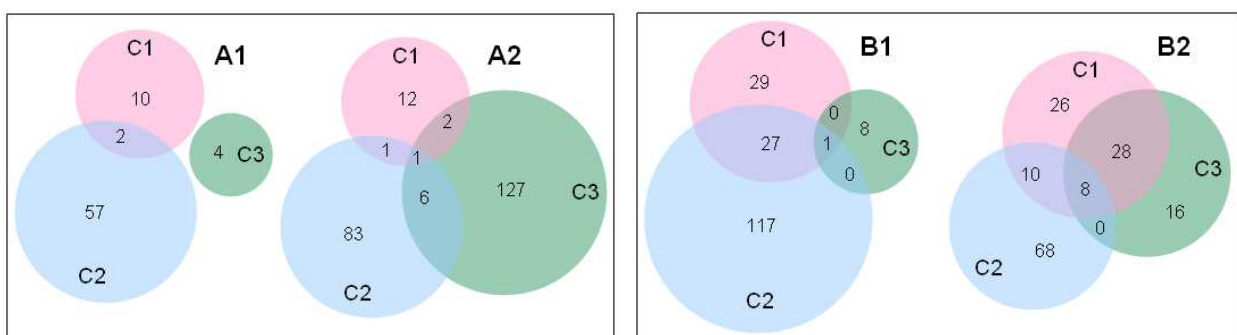
**Tab. 3-8:** Anzahl der Affymetrix Probe Set IDs, die gemäß der Standardfilterkriterien zwischen den verschiedenen Kontrollbehandlungen zum Zeitpunkt 30 h bzw. 72 h dereguliert waren.

↑ = erhöhte, ↓ = erniedrigte Expression.

Dieser Befund untermauert die Eignung von Luciferase-siRNA als Negativkontrolle, da sie keine nennenswerten Off-Target-Effekte auszuüben scheint. Für alle folgenden Auswertungen wurde der Mittelwert der Luciferase- und mock-transfizierten Proben als Vergleichsgrundlage verwendet.

Mit dieser Baseline wurden sodann die Expressionsdaten der ChoK-siRNA-transfizierten Proben verglichen. Signifikant deregulierte Gene wurden gemäß der Standardfilterkriterien (s. 2.7.4.3) ermittelt.

Aus Abb. 3-83 ist zu entnehmen, wie viele Gene<sup>13</sup> jeweils nach 30 oder 72 h durch die siRNAs C1, C2 und C3 induziert bzw. reprimiert wurden und inwieweit diese unter den siRNAs übereinstimmten.

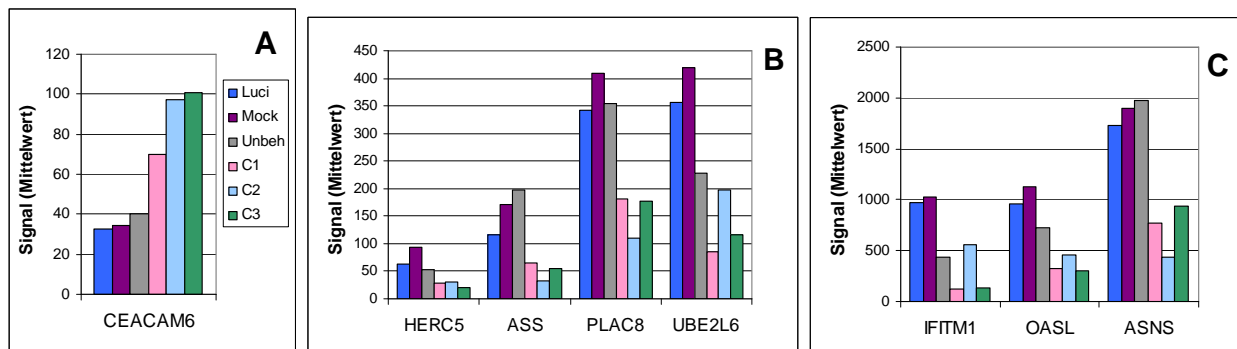


**Abb. 3-83:** Übereinstimmungen der durch die ChoK-siRNAs in HT-29-Zellen deregulierten Gene.

**A:** Venn-Diagramme der 30 h-Daten, aufgeteilt in induzierte (A1) und reprimierte (A2) Gene. **B:** Venn-Diagramme der 72 h-Daten, aufgeteilt in induzierte (B1) und reprimierte (B2) Gene. Die Größe der Kreisflächen deutet das Verhältnis der absoluten Zahlen deregulierter Gene an.

<sup>13</sup> Auch bei der Auswertung der RNAi- und Inhibitor-daten der Cholin-kinase- und MDM2-Versuche wurde die Auswertung auf Gene statt auf Affymetrix Probe Sets bezogen, vgl. Fußnote 7.

Alle drei siRNAs hatten Auswirkungen auf die Genexpression von HT-29-Zellen, diese waren bei C1 am schwächsten ausgeprägt. C3 führte nach 30 h zur Repression zahlreicher Gene, glich sich jedoch nach 72 h wieder stärker an die Negativkontrollen an. C2 deregulierte insbesondere nach 72 h eine Vielzahl von Genen. Die Überlappungen zwischen diesen differenziell exprimierten Genen waren jedoch unerwartet gering. Die nach 30 h Transfektion gewonnenen Proben stimmten nur in einem einzigen reprimierten Transkript überein. Dieses war Cholinase selbst, deren Expressionsdaten bereits in Abb. 3-82B gezeigt wurden. Nach 72 h bestand eine Übereinstimmung in nur einem hochregulierten und 8 herabregulierten Genen, eines davon war erneut ChoK. Die Expressionsdaten dieser gemeinsamen Gene – mit Ausnahme von ChoK – sind in Abb. 3-84 gezeigt.



**Abb. 3-84: Expression der durch alle drei ChoK-siRNAs nach 72 h im Vergleich zur kombinierten Baseline aus Luciferase-siRNA- und mock-transfizierten Proben deregulierten Gene.**

**A:** Induktion von CEACAM6. **B:** Repression von HERC5 (*hect domain and RLD 5*), ASS (*argininosuccinate synthetase*), PLAC8 (*placenta-specific 8*) und UBE2L6 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6*). **C:** Repression von IFITM1 (*interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)*), OASL (*2'-5'-oligoadenylate synthetase-like*) und ASNS (*asparagine synthetase*).

Die funktionelle Analyse der übereinstimmend deregulierten Gene lieferte keinerlei Hinweise auf einen Zusammenhang mit Cholinase. CEACAM6 (Abb. 3-84A) ist ein Zelladhäsionsmolekül, dessen Beteiligung an Invasion und Apoptoseresistenz bereits unter 3.2.9.1 beschrieben wurde. Zwei der reprimierten Genen kodieren Ubiquitin-konjugierende Enzyme (HERC5 und UBE2L6), zwei weitere kodieren am Aminosäurestoffwechsel beteiligte Synthetasen (ASS und ASNS), s. Abb. 3-84B und C. Die Funktion von PLAC8 (Abb. 3-84B) ist unbekannt. Interessanterweise waren darüber hinaus die beiden interferonresponsiven Gene IFITM1 (auch bekannt als 9-27) und OASL reprimiert. Aus den Balkendiagrammen (Abb. 3-84C) ist abzulesen, dass die Expression dieser beiden Gene in der Luciferase-siRNA- und mock-transfizierten Kontrolle gegenüber der gänzlich unbehandelten Kontrolle erhöht war und folglich ihre Signalthöhen in den ChoK-siRNA-Proben im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle weniger stark bzw. gar nicht reduziert waren. Offenbar führten sowohl Luciferase-siRNA als auch die Mock-Transfektion zu einer leichten Induktion dieser beiden interferonresponsiven Gene. Dies überrascht insofern, als zwar für ein doppelsträngiges RNA-Molekül wie Luciferase-siRNA gemäß der Studienlage mit einer potenziellen Interferonantwort gerechnet werden musste, ein solcher Effekt jedoch für die Behandlung mit dem Transfektionsagens Lipofectamine 2000 nicht zu erwarten war. Zudem manifestiert sich gemäß Literaturbefunden und eigenen Ergebnissen (s. 3.3.4.11.3.5) eine Interferonantwort in der Induktion zahlreicher interferonresponsiver Gene auf

ein Vielfaches ihres Ausgangsniveaus. Somit kann die beobachtete Deregulation von IFITM1 und OASL nicht als unspezifische Interferonantwort gegen Luciferase-siRNA und Mock-Transfektion gewertet werden. Über die allen drei siRNAs gemeinsamen Änderungen hinaus zeigten C1 und C3 zum 72 h-Zeitpunkt hinsichtlich der reprimierten Genen relativ große Ähnlichkeit. Da bei C2 nach dieser Transfektionsdauer die Transkriptmenge von ChoK bereits wieder etwas anstieg, konnte spekuliert werden, dass das ChoK-Protein in C1- und C3-transfizierten Zellen möglicherweise stärker herabreguliert war und die Übereinstimmungen dieser zwei siRNAs eine spezifische Antwort auf das Fehlen von ChoK darstellen könnten. Die funktionelle Analyse dieser Gene ergab jedoch keine Hinweise auf einen unmittelbaren Zusammenhang mit dem biologischen Umfeld von Cholinkinase. Bei der im folgenden Kapitel beschriebenen Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit dem ChoK-Inhibitor MN58 fand sich kein einziges der zwischen C1 und C3 übereinstimmenden Gene wieder.

Insgesamt betrachtet konnte somit kein Satz von Genen identifiziert werden, der für die Folgen des Knock-downs von Cholinkinase spezifisch gewesen wäre. Die mit den verschiedenen ChoK-siRNAs beobachteten Änderungen scheinen in erster Linie unspezifischer Natur zu sein; ihr nahezu einziger gemeinsamer Nenner ist die massive Herabregulierung des ChoK-Transkripts.

Aufgrund dieser in HT-29-Zellen erhaltenen Resultate wurde auf eine Untersuchung der differenziellen Genexpression von MDA-MB-231-Zellen nach ChoK-siRNA-Transfektion verzichtet.

#### **3.3.3.2.9 Untersuchung des Cholinkinase-Inhibitors MN58**

Bereits vor Durchführung der siRNA-Experimente waren die Effekte eines niedermolekularen Inhibitors von Cholinkinase auf die globale Genexpression von HT-29- und MDA-MB-231-Zellen untersucht worden. Dieser Inhibitor, der die Bezeichnung MN58 trägt, wurde von der Arbeitsgruppe Lacal mitentwickelt und zeigte sowohl in Tumorzelllinien als auch in Xenograftmodellen ausgeprägte antitumorale Effekte [269, 270]. Außerdem löst MN58 in Tumorzellen Apoptose aus, während es in Normalzellen nur zu einem reversiblen Wachstumsarrest führt [272].

Die Behandlung von HT-29-Zellen mit MN58 für die nachfolgende Analyse auf dem Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Array HG-U133A wurde von Mitarbeitern von Herrn Prof. Lacal durchgeführt, die Zellysate wurden dann nach Penzberg geschickt und vor Ort weiterverarbeitet. Die Konzentration des Inhibitors bei dieser Behandlung betrug 10  $\mu\text{M}$  und es wurden jeweils Dreifachwerte von behandelten und unbehandelten Proben generiert.

Die MN58-Behandlung von MDA-MB-231-Zellen wurde hingegen von vornherein in Penzberg durchgeführt. Zunächst wurden Inhibitionskurven ermittelt, hierzu dienten die Resultate von WST-1-Tests nach fünftägiger Substanzexposition. Der Durchschnitt der IC<sub>80</sub>-Werte von MN58 aus drei unabhängigen Experimenten betrug 6,5  $\mu\text{M}$ . Diese Konzentration wurde für die Behandlung von MDA-MB-231-Zellen mit anschließender Genexpressionsanalyse verwendet.

Auch für HT-29-Zellen wurde der IC80-Wert auf diese Weise bestimmt, er lag bei 4,8 µM. Somit hatte die in Madrid zur Behandlung dieser Zellen eingesetzte Konzentration in etwa der zweifachen IC80 entsprochen. Die Behandlungsdauer im Versuchsansatz mit HT-29-Zellen betrug 30 h. MDA-MB-231-Zellen wurden im selben Ansatz mit Zytostatika und MN58 behandelt, deshalb wurden sie nach 24 und 72 h geerntet. Auch hier wurden Triplikate angesetzt.

Um die durch MN58 signifikant deregulierten Gene zu identifizieren, wurden die Affymetrix-Daten nach dem Standardfilterschema ausgewertet. Tab. 3-9 gibt an, wie viele Gene in HT-29- bzw. MDA-MB-231-Zellen nach MN58-Behandlung induziert und reprimiert waren.

	HT-29	MDA-MB-231	
	30 h	24 h	72 h
Anzahl der induzierten Gene	342	8	163
Anzahl der reprimierten Gene	317	2	342

Tab. 3-9: Anzahl der durch MN58 in HT-29-Zellen nach 30 h und in MDA-MB-231-Zellen nach 24 bzw. 72 h induzierten und reprimierten Gene.

HT-29-Zellen reagierten mit der differentiellen Expression sehr vieler Gene auf die 30 h MN58-Behandlung. MDA-MB-231-Zellen zeigten nach 24 h praktisch keine Änderungen, nach 72 h jedoch ausgeprägte Effekte. Vergleicht man die in HT-29-Zellen nach 30 h und in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h deregulierten Gene, so findet man nur geringe Übereinstimmungen. Von den induzierten Genen wurden 9, von den reprimierten 11 Gene in beiden Zelllinien identifiziert.

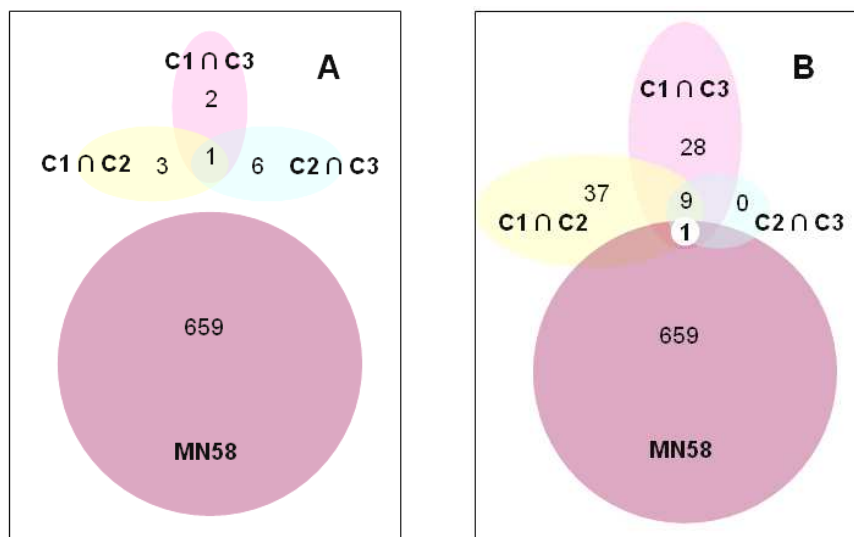


Abb. 3-85: Übereinstimmungen zwischen den ChoK-siRNAs und MN58 hinsichtlich der deregulierten Gene in HT-29-Zellen.

Die Überlappungen der Schnittmengen aus jeweils durch zwei ChoK-siRNAs deregulierten Gene untereinander und mit den durch MN58 deregulierten Gene sind gezeigt. Die induzierten und reprimierten Gene wurden zusammengefasst. **A:** Vergleich der 30 h siRNA-Transfektion mit der 30 h MN58-Behandlung. **B:** Vergleich der 72 h siRNA-Transfektion mit der 30 h MN58-Behandlung.

Um die durch ChoK-siRNAs hervorgerufenen Effekte auf die globale Genexpression noch besser bewerten zu können, wurden diese den MN58-Daten in HT-29-Zellen gegenübergestellt. Neben den äußerst kleinen Schnittmengen der von allen drei siRNAs deregulierten Gene wurden auch die Schnittmengen, die von jeweils zwei siRNAs erzeugt worden waren, in den Vergleich mit aufgenommen. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 3-85 dargestellt.

Vergleicht man die nach jeweils 30 h Behandlung mit siRNAs bzw. MN58 deregulierten Gene, so findet man keine einzige Übereinstimmung (Abb. 3-85A). Da man davon ausgehen kann, dass nach der siRNA-Transfektion eine gewisse Zeit nötig ist, bis das Zielprotein verschwindet, ist anzunehmen, dass die Wirkungen von siRNAs und direkten Enzyminhibitoren wie MN58 eine unterschiedliche Kinetik besitzen. Deshalb wurde auch der Vergleich zwischen den RNAi-Daten nach 72 h Transfektion und den nach 30 h durch MN58 hervorgerufenen Effekten gezogen (Abb. 3-85B). Hier bestand die Gemeinsamkeit in einem einzigen induzierten Gen (CEACAM6).

Abschließend wurde untersucht, inwieweit die nach MN58-Behandlung differenziell exprimierten Gene mit den von Zytostatika beeinflussten Genen übereinstimmten. Dies sollte Aufschluss über mögliche unspezifische bzw. genotoxische Wirkungen von MN58 geben. Zu diesem Zweck wurden die durch MN58 in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h deregulierten Gene mit den nach gleicher Behandlungsdauer durch die Mehrzahl der Zytostatika modulierten „gemeinsamen“ Genen verglichen. Im Fall von HT-29-Zellen konnten die 30 h-Daten von MN58 sinnvollerweise nur mit 72 h-Ergebnissen der Zytostatikabehandlung verglichen werden, da nach 24 h Zytostatikaexposition ja noch keine nennenswerten Effekte aufgetreten waren.

Während die Gemeinsamkeiten zwischen MN58 und Zytostatika in HT-29-Zellen sehr gering waren (nur 1,7 % der in HT-29-Zellen von MN58 deregulierten Gene wurden auch durch die Mehrzahl der Zytostatika beeinflusst), wurde für MDA-MB-231-Zellen eine deutliche Überlappung von MN58- und zytostatikaabhängig deregulierten Genen identifiziert. Hier fanden sich 13 % der durch MN58 modulierten Gene bei den Zytostatika wieder.

### 3.3.4 RNAi gegen MDM2

#### 3.3.4.1 Einleitung

Wie bereits unter 3.1.7 beschrieben, ist das MDM2-Protein eine Ubiquitin-E3-Ligase, die als Antagonist von p53 wirkt, indem sie seine Aktivität als Transkriptionsfaktor hemmt und seinen Abbau vermittelt. Darüber hinaus besitzt MDM2 auch p53-unabhängige Funktionen.

#### 3.3.4.2 Zelllinien

Aufgrund der physiologischen Rolle von MDM2 als funktioneller Gegenspieler von p53 ist zu erwarten, dass in Zelllinien mit Wildtyp-p53-Protein das Silencing von MDM2 ausgeprägte Veränderungen hervorrufen dürfte, während diese in Zellen mit mutantern p53 schwächer ausfallen und dort nur auf den p53-unabhängigen Funktionen von MDM2 beruhen sollten. Insofern kann der Vergleich zwischen Zellen mit Wildtyp- und solchen mit mutantern p53-Protein wertvolle Aufschlüsse sowohl über die p53-Abhängigkeit MDM2-vermittelter Wirkungen als auch über die Spezifität der eingesetzten siRNAs liefern. Ideal erscheint hierfür der Vergleich eines isogenen Zelllinienpärchens, das sich nur oder hauptsächlich im p53-Status unterscheidet.

Aufgrund zahlreicher – auch aktueller – Veröffentlichungen, die auf einem Vergleich zwischen MCF-7-Zellen (Wildtyp-p53) und der adriamycinresistenten Variante MCF-7/ADR-RES (mutantes p53) aufbauen (z. B. [273, 274]), wurde dieses Paar für die MDM2-RNAi-Versuche ausgewählt. Durch weitere Literaturrecherchen stellte sich allerdings heraus, dass bereits vor einigen Jahren nachgewiesen worden war, dass die als „MCF-7/ADR-RES“ bezeichnete Zelllinie diesen Namen irrtümlich trägt, da sie gar nicht von MCF-7 abgeleitet ist. Sie wurde deshalb in „NCI/ADR-RES“ umbenannt [275]. Da kein anderes isogenes Paar zur Verfügung stand, wurden die Versuche mit den beiden genannten Zelllinien fortgeführt. NCI/ADR-RES stellt ebenso wie MCF-7 eine epitheliale Brusttumorzelllinie dar und ihr mutanter p53-Status ist gesichert, deshalb ließen sich aus ihrem Vergleich trotz allem aussagekräftige Daten erwarten. Zusätzlich wurden die siRNAs in der Kolonkarzinomlinie HCT-116, die Wildtyp-p53-Protein exprimiert, intensiv getestet; zudem wurden in der vom gleichen Ursprungsgewebe abgeleiteten Zelllinie HT-29 (mutantes p53) einige grundlegende Experimente durchgeführt, um auch hier den Einfluss des p53-Status einschätzen zu können. Die zur Transfektion angewendeten Protokolle sind unter 2.5.7 beschrieben.

#### 3.3.4.3 MDM2-siRNAs und Kontroll-siRNAs

In den Zelllinien MCF-7 und HCT-116 wurde eine ganze Reihe von gegen MDM2 gerichteten siRNA-Duplexen ausgetestet, um diejenigen zu identifizieren, die sowohl die Expression von MDM2 auf mRNA- und Proteinebene effizient herabregulieren als auch möglichst geringe Off-Target-Effekte hervorrufen.

Zunächst wurden drei siRNAs, die mittels online verfügbarer Designalgorithmen der Firmen Qiagen und Dharmacon abgeleitet wurden (Kurzbezeichnung M1, M2, M3), charakterisiert. Da von diesen, wie im Fol-



genden gezeigt, nur M2 zu einem deutlichen und reproduzierbaren Silencing von MDM2 führte, wurden noch vier weitere siRNAs in Form des siGENOME-Sets (Dharmacon) bestellt, die als M5, M6, M7 und M8 bezeichnet wurden<sup>14</sup>. Von diesen erwiesen sich drei siRNAs, nämlich M5, M6 und M8, als funktionell (s. 3.3.4.4). Da sich bei einem ersten Affymetrix-Experiment herausstellte, dass M8 eine ausgeprägte unspezifische Interferonantwort induziert (s. 3.3.4.11.3.5) und da von verschiedenen Herstellern damit geworben wird, dass dies durch Modifikationen des Sensestrangs vermieden werden kann, wurde eine sog. Stealth-RNA mit annähernd gleicher Sequenz, jedoch 25 bp Länge und modifiziertem Sensestrang, hinzugenommen (Bezeichnung M9). Eine weitere Stealth-RNA mit neuer Sequenz, die vom Designalgorithmus der Firma Invitrogen ermittelt wurde (M10), kam ebenfalls bei den letzten Experimenten zum Einsatz. Die Sequenzen aller MDM2-siRNAs sind unter 2.1.2.8 angegeben.

Zusätzlich zu den MDM2-siRNAs wurden bei den Versuchen die bereits einleitend (3.3.2) beschriebenen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

### 3.3.4.4 Nachweis des Silencings von MDM2

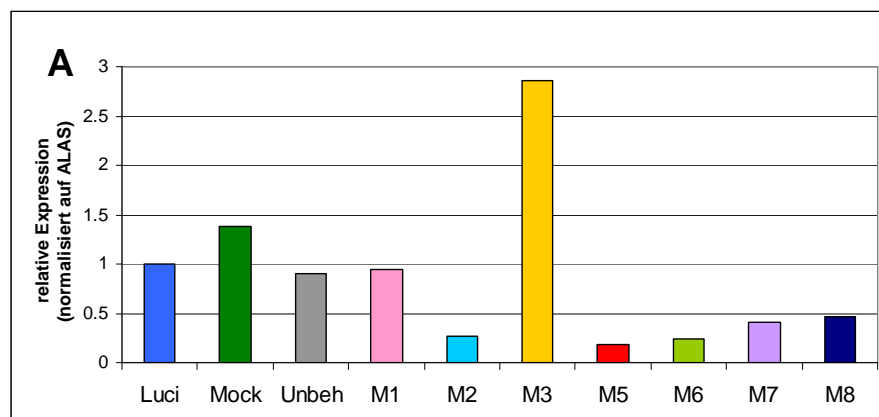
Zunächst wurde überprüft, ob die siRNAs sowohl zu einem deutlichen Knock-down ihres direkten Targets, also der MDM2-mRNA, führen als auch die Synthese von MDM2-Protein signifikant reduzieren.

#### 3.3.4.4.1 Silencing auf mRNA-Ebene

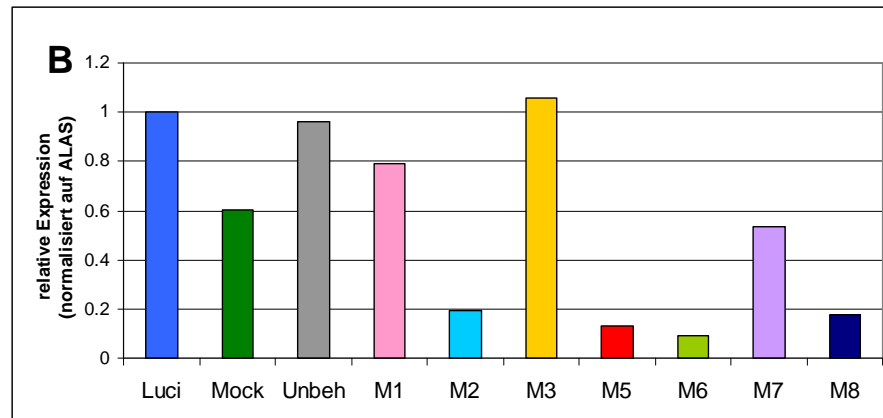
Basierend auf einem Protokoll zum Nachweis des MDM2-Transkripts mit spezifischen Hybridisierungssonden am LightCycler® Gerät (s. 2.6.7.2) konnte der Knock-down der Target-mRNA relativ zu dem House-keeping-Gen ALAS quantifiziert werden.

#### MCF-7-Zellen

In Abb. 3-86 sind Daten aus einem Experiment gezeigt, in dem MCF-7-Zellen mit den MDM2-siRNAs M1, M2, M3, M5, M6, M7 und M8 transfiziert wurden und mehrere Negativkontrollen mitgeführt wurden. 24 und 48 h nach der Transfektion wurde die relative Expression von MDM2-mRNA per RT-PCR bestimmt.



<sup>14</sup> Diese siRNAs wurden in Anlehnung an ihre Dharmacon-Bezeichnung benannt, deshalb existiert keine MDM2-siRNA mit der Bezeichnung M4.



**Abb. 3-86: Silencing von MDM2 auf mRNA-Ebene in MCF-7-Zellen.**

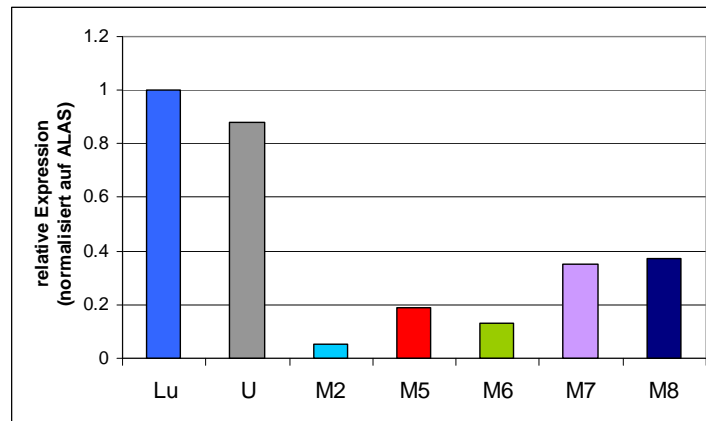
MCF-7-Zellen wurden im 24-Well-Format mit den MDM2-siRNAs M1, M2, M3, M5, M6, M7 und M8 und parallel mit Luciferase-siRNA transfiziert, jeweils bei einer Endkonzentration von 33 nM. Zudem wurden mock-transfizierte und völlig unbehandelte Zellen mitgeführt. Alle Behandlungen erfolgten im Duplikat. Nach 24 und 48 h wurden Lysate gewonnen und diese einer RNA-Isolierung und nachfolgenden Two-Step-RT-PCR unterzogen. Die Daten wurden auf das Housekeeping-Gen ALAS normalisiert, die relative Expression ist auf die Luciferase-siRNA-transfizierten Proben bezogen. Es ist jeweils der Mittelwert der Duplikate gezeigt. **A:** Expression der MDM2-mRNA 24 h nach der Transfektion. **B:** Expression der MDM2-mRNA 48 h nach der Transfektion.

Die Negativkontrollen lagen nahe zusammen, während die MDM2-siRNA M3 nach 24 h zu einer massiven Induktion von MDM2-mRNA führte. Vermutlich hat M3 keine oder nur schwache Potenz als siRNA und stattdessen unspezifische bzw. toxische Wirkungen, die eine Aktivierung des p53-Signalwegs und dadurch die Transaktivierung des MDM2-Gens hervorrufen. Nach 48 h war der MDM2-Spiegel zwar im Verhältnis zu den Kontrollen nicht mehr erhöht, jedoch auch nicht wie gewünscht reduziert. M1 erwies sich ebenfalls als nicht funktionell und M7 führte zu einer suboptimalen Reduktion der MDM2-mRNA. M2, M5 und M6 waren hingegen in der Lage, die MDM2-Expression sehr gut zu reduzieren, und auch M8 vermittelte zumindest bei der 48 h-Messung einen hervorragenden Knock-down.

Weitere aus der siRNA-Transfektion von MCF-7-Zellen generierte RT-PCR-Daten sind unter 3.3.4.11.1 bei den Affymetrix-Experimenten gezeigt.

### HCT-116-Zellen

Das Silencing der MDM2-mRNA wurde auch in HCT-116-Zellen mittels RT-PCR quantifiziert. Abb. 3-87 zeigt die Ergebnisse eines Transfektionsexperiments, bei dem die eindeutig nicht-funktionellen siRNAs M1 und M3 bereits ausgeschlossen worden waren. Der Knock-down der Ziel-mRNA wurde nach 48 h bestimmt. Die beiden Negativkontrollen unterschieden sich nur unwesentlich, wodurch ebenso wie im vorangegangenen Versuch in MCF-7-Zellen nachgewiesen wurde, dass Luciferase-siRNA keine unspezifischen Effekte auf den MDM2-mRNA-Spiegel ausübt. Die siRNAs M2, M5 und M6 führten zu einem hervorragenden Knock-down ihres Zielmoleküls, während M7 und M8 die Expressionshöhe zwar deutlich, jedoch etwas weniger effizient reduzierten.



**Abb. 3-87: Silencing von MDM2 auf mRNA-Ebene in HCT-116-Zellen.**

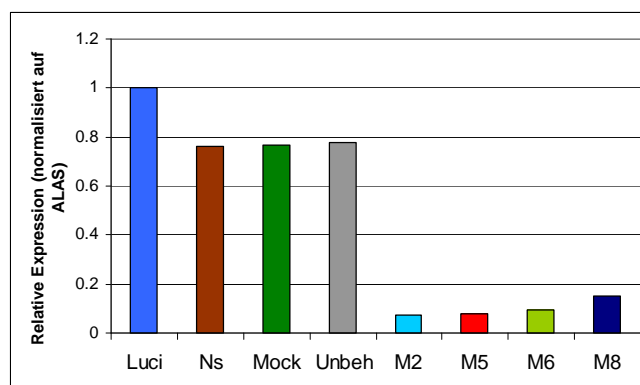
HCT-116-Zellen wurden im 24-Well-Maßstab mit den MDM2-siRNAs M2, M5, M6, M7 und M8 und mit der Kontroll-siRNA gegen Luciferase transfiziert (jeweils 100 nM), parallel wurden unbehandelte Zellen kultiviert. Alle Behandlungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Das Diagramm gibt die aus den RT-PCR-Daten errechnete relative Expression von MDM2-mRNA wieder, bezogen auf die Luciferase-siRNA-transfizierten Proben. Es ist jeweils der Mittelwert der Duplikate gezeigt.

Weitere nach Transfektion von HCT-116-Zellen gewonnene Daten aus Analysen am LightCycler® Gerät werden bei der Darstellung des Affymetrix-Versuchs unter 3.3.4.12 gezeigt.

### NCI/ADR-RES-Zellen

Auch in der Zelllinie NCI/ADR-RES mit mutiertem p53-Protein ließ sich das MDM2-Transkript durch siRNA-Transfektion effizient herabregulieren. Entsprechende RT-PCR-Ergebnisse sind dem Kapitel über die Affymetrix-Versuche (3.3.4.11.1) zu entnehmen.

### HT-29-Zellen



**Abb. 3-88: Silencing von MDM2 auf mRNA-Ebene in HT-29-Zellen.**

HT-29-Zellen wurden im 24-Well-Maßstab mit den MDM2-siRNAs M2, M5, M6 und M8, Luciferase-siRNA und Non-silencing control siRNA transfiziert (jeweils 33 nM). Parallel wurden mock-transfizierte und unbehandelte Zellen kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Das Diagramm gibt die aus den RT-PCR-Daten errechnete relative Expression von MDM2-mRNA wieder, bezogen auf die Luciferase-siRNA-transfizierte Probe. Es ist jeweils der Mittelwert der Duplikate gezeigt.

Nach Transfektion von HT-29-Zellen mit MDM2-siRNAs konnte ebenfalls eine erhebliche Reduktion von MDM2 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Abb. 3-88 zeigt Daten aus einem 48 h-Transfektions-experiment mit den potentesten siRNAs M2, M5, M6 und M8.

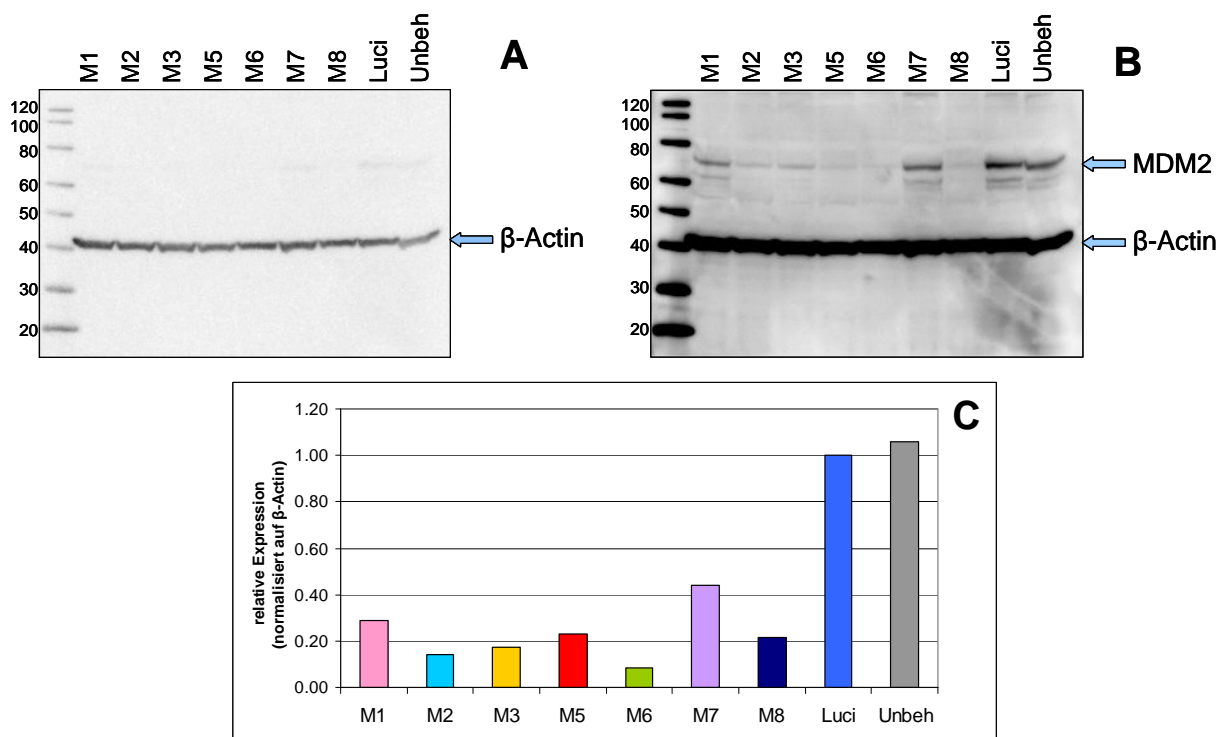
Alle vier Negativkontrollen lagen nahe zusammen und sämtliche verwendeten MDM2-siRNAs erzeugten einen exzellenten Knock-down der MDM2-mRNA auf unter 20 % der Kontrollwerte.

### 3.3.4.4.2 Silencing auf Protein-Ebene

Als nächster Schritt wurde nachgewiesen, dass das auf mRNA-Ebene gefundene Silencing von MDM2 sich auch in reduzierten Proteinmengen widerspiegelte.

#### MCF-7-Zellen

Abb. 3-89 zeigt einen Western Blot zur Analyse des Knock-downs von MDM2-Protein in MCF-7-Zellen 48 h nach Transfektion mit den siRNAs M1, M2, M3, M5, M6, M7 und M8.



**Abb. 3-89: Silencing von MDM2 auf Proteinebene in MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden im 6-Well-Format mit den MDM2-siRNAs M1, M2, M3, M5, M6, M7 und M8 und Luciferase-siRNA transfiziert (jeweils 33 nM). Parallel wurden unbehandelte Zellen kultiviert. 48 h nach der Transfektion wurden durch Zusatz von NP40-Lysepuffer (s. 2.1.3.6) Proteinlysate gewonnen. Es wurden jeweils 120  $\mu$ g Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran gleichzeitig mit den Antikörpern gegen MDM2 (SMP-14) und  $\beta$ -Actin inkubiert.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle und wurde für die Normalisierung der Bandenstärken von MDM2 verwendet.

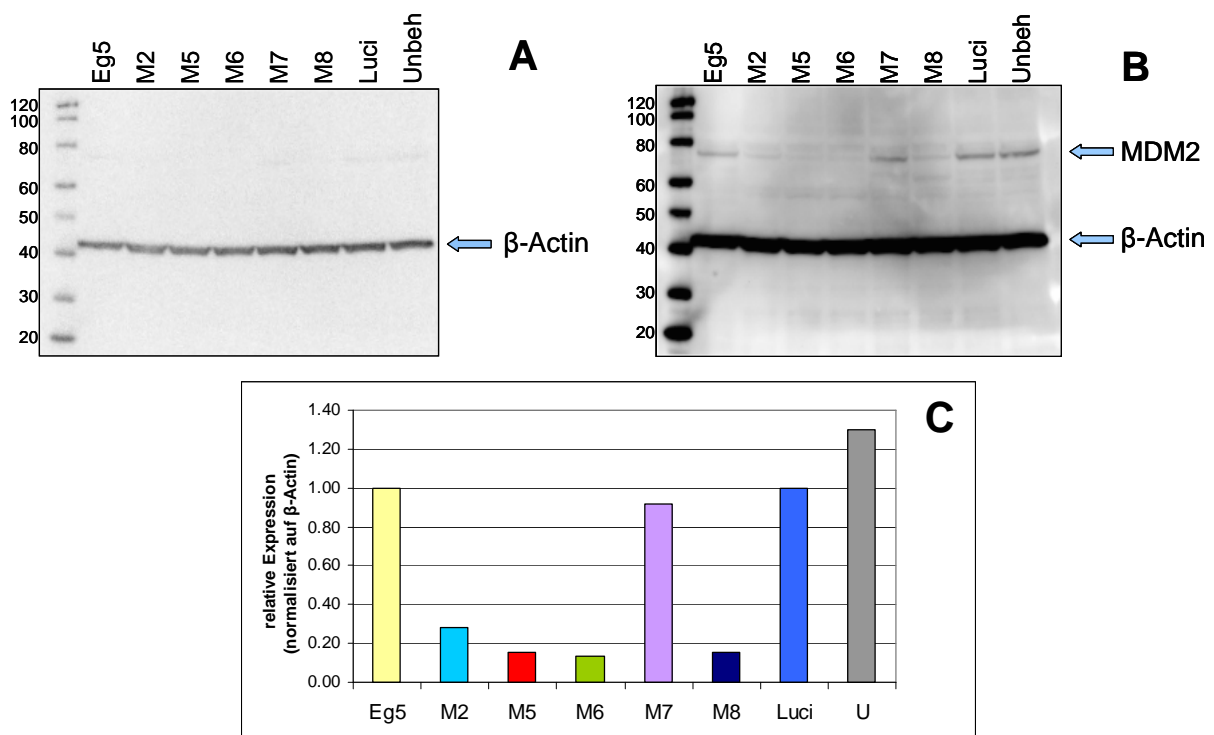
**A:** Kurze Expositionsdauer für die Quantifizierung von  $\beta$ -Actin, **B:** längere Expositionsdauer für die Quantifizierung von MDM2.

**C:** Relative Proteinmengen von MDM2, bezogen auf die Luciferase-siRNA-Kontrolle, normalisiert auf die  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle.

Die Quantifizierung der Bandenstärken von MDM2 (Abb. 3-89A) und ihre Normalisierung auf die  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle (Abb. 3-89B) ergaben die in Abb. 3-89C gezeigten relativen Proteinmengen von MDM2. Diese korrelierten relativ gut mit den oben gezeigten RT-PCR-Ergebnissen: M5, M6 und M8 führten zur stärksten Reduktion des MDM2-Proteinspiegels, M3 vermittelte einen weniger guten Knock-down – während am LightCycler<sup>®</sup> mit M3 keinerlei Reduktion festzustellen gewesen war – und M1 und M7 waren nicht funktionell. Dass die Ergebnisse nicht in allen Punkten mit den unter 3.3.4.4.1 beschriebenen RT-PCR-Daten übereinstimmten, dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die Proben aus unabhängig durchgeführten Transfektionsexperimenten stammten.

### HCT-116-Zellen

Im Rahmen des unter 3.3.4.4.1 beschriebenen Transfektionsexperiments wurden in HCT-116-Zellen nicht nur RT-PCR-Daten erhoben, sondern auch Proben im Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-90 gezeigt.



**Abb. 3-90: Silencing von MDM2 auf Proteinebene in HCT-116-Zellen.**

Die Behandlung von HCT-116-Zellen entspricht der bei Abb. 3-87 beschriebenen. 48 h nach der Transfektion wurden Proteinlysate gewonnen, auch von Zellen, die mit der Positivkontroll-siRNA gegen Eg5 transfiziert worden waren. Jeweils 60  $\mu$ g Gesamtprotein wurden pro Gelspur aufgetragen. Der Blot wurde durchgeführt wie bei Abb. 3-89 beschrieben. **A:** Kurze Expositionsdauer für die Quantifizierung von  $\beta$ -Actin, **B:** längere Expositionsdauer für die Quantifizierung von MDM2. **C:** Relative Proteinmengen von MDM2, bezogen auf die Luciferase-siRNA-Kontrolle, normalisiert auf die  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle.

M5, M6 und M8 reduzierten das MDM2-Protein sehr effektiv, M2 vermittelte ebenfalls noch einen sehr guten Knock-down, während M7 keine signifikante Verringerung der Proteinmenge erreichte. Die mitgeführte

Eg5-Positivkontrolle zeigte keine Reduktion, jedoch auch – trotz der Toxizität von Eg5 – keine Induktion des MDM2-Spiegels.

#### NCI/ADR-RES-Zellen

Western Blots aus mit MDM2-siRNAs transfizierten NCI/ADR-RES-Zellen sind unter 3.3.4.11.2 bei der Beschreibung des Affymetrix-Versuchs gezeigt.

#### **3.3.4.5 Optimierung der siRNA-Konzentration**

Nachdem durch Erhebung von RT-PCR- und Western-Blot-Daten die funktionellen MDM2-siRNAs ermittelt worden waren, wurde ihre Konzentration möglichst weit abgesenkt, um einerseits noch ein effizientes Silencing auf mRNA- und Proteinebene zu erreichen, andererseits aber potenzielle Off-Target-Effekte zu minimieren.

In MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen konnte die siRNA-Konzentration von M5, M6 und M8 von ursprünglich 33 auf 5 nM herabtitriert werden, ohne an Knock-down-Effizienz einzubüßen. M2 musste mit 33 nM eingesetzt werden, um ihren maximalen Effekt zu wahren. In HCT-116-Zellen konnte die Konzentration sämtlicher MDM2-siRNAs vom Ausgangswert 100 auf 10 nM abgesenkt werden. Die höhere siRNA-Menge im Oligofectamine-Standardprotokoll, das für HCT-116-Zellen verwendet wurde, im Vergleich zum Lipofectamine 2000-Protokoll (MCF-7 und NCI/ADR-RES) beruht darauf, dass sich mit Oligofectamine mehr siRNA-Präzipitate im Medium bilden und deshalb vermutlich ein geringerer Anteil der zugegebenen siRNA in die Zellen gelangt. Warum die M2-Konzentration in HCT-116- im Unterschied zu MCF-7-Zellen abgesenkt werden konnte, ohne an Knock-down-Effizienz zu verlieren, blieb unklar.

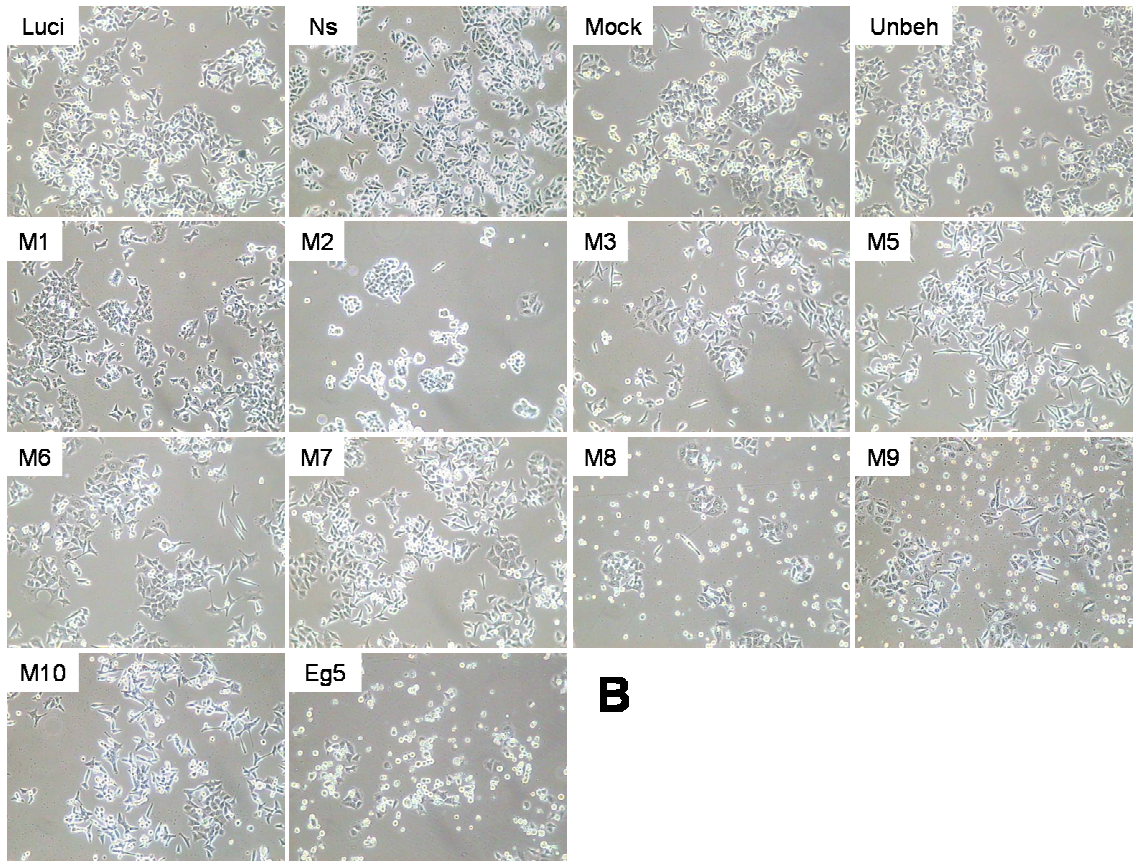
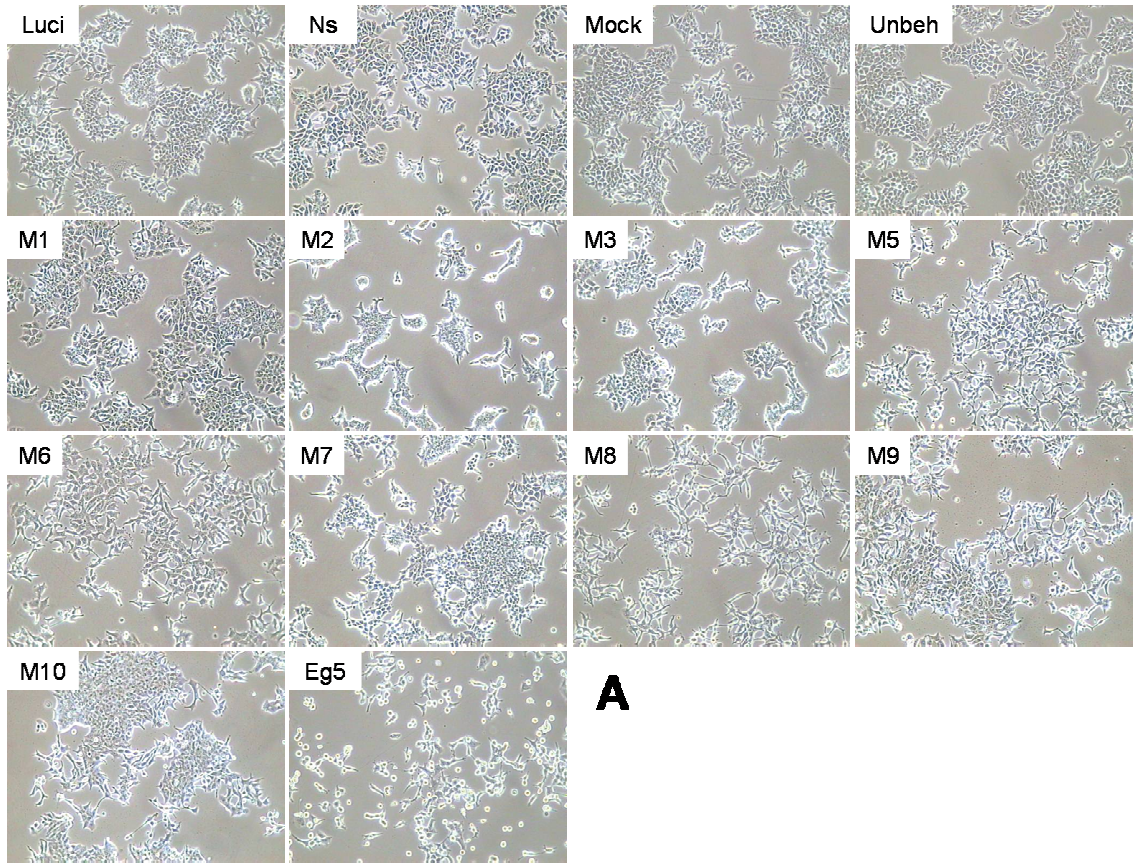
Bei allen gezeigten Versuchen ist die jeweils verwendete siRNA-Konzentration angegeben.

#### **3.3.4.6 Morphologische Effekte des MDM2-Silencings**

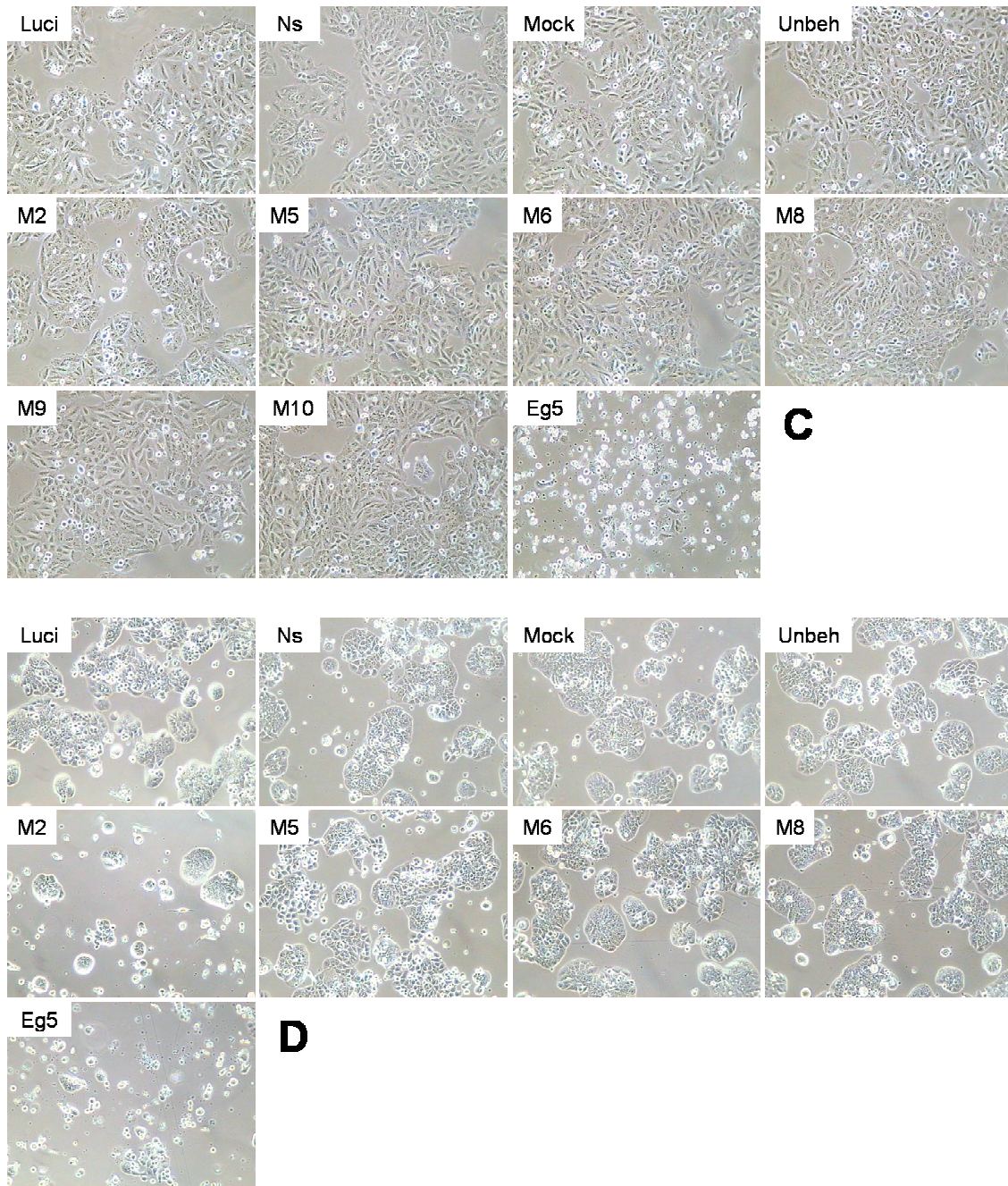
Die verschiedenen Zelllinien wurden nach der Transfektion lichtmikroskopisch auf phänotypische Veränderungen überprüft. Hierbei diente die durch Eg5-siRNA hervorgerufene Abrundung der Zellen, verbunden mit massivem Zelltod, als gute Kontrolle für den Transfektionserfolg. Abb. 3-91 zeigt Fotografien der Zellen nach Transfektion mit MDM2- und Kontroll-siRNAs im Vergleich mit mock-transfizierten und unbehandelten Zellen.

In sämtlichen untersuchten Zelllinien hatten die gegen Luciferase gerichtete Negativkontroll-siRNA und die Non-silencing control siRNA keine oder nur sehr schwache, der Mock-Transfektion ähnliche Wirkungen auf die Zellmorphologie. Im Vergleich zu gänzlich unbehandelten Zellen konnte allenfalls eine sehr schwache Verringerung der Zellzahl festgestellt werden.









**Abb. 3-91: Morphologische Effekte der MDM2-siRNA-Transfektion.**

Die angegebenen Zelllinien wurden mit MDM2- und Kontroll-siRNAs transfiziert bzw. mock-transfiziert oder unbehandelt belassen. Nach der angegebenen Zeitdauer wurden die Zellen bei 100facher Vergrößerung fotografiert.

**A:** MCF-7-Zellen 48 h nach der Transfektion (siRNA-Konzentration: 33 nM). **B:** HCT-116-Zellen 48 h nach der Transfektion (siRNA-Konzentration: 100 nM). **C:** NCI/ADR-RES-Zellen 72 h nach der Transfektion (in dieser Zelllinie wurden keine Transfektionen mit den siRNAs M1 und M3 durchgeführt; siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM im Fall von M2 und Eg5). **D:** HT-29-Zellen 72 h nach der Transfektion (in dieser Zelllinie wurden keine Transfektionen mit den siRNAs M1, M3, M7, M9 und M10 durchgeführt; siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM im Fall von M2 und Eg5).

Anm.: Bei den im Medium sichtbaren schwarzen Punkten handelt es sich um bei der Transfektion mit Lipofectamine 2000 bzw. Oligofectamine entstehende Präzipitate.

Eine Übersicht über die in den verschiedenen Zellmodellen beobachteten phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu den Negativkontrollen gibt Tab. 3-10.



	MCF-7	HCT-116	NCI/ADR-RES	HT-29
<b>M1</b>	Vakuolisierung ↑↑	Granularität ↑↑	n.d.	n.d.
<b>M2</b>	Zellzahl ↓↓ Zell-Substrat-Adhäsion ↓↓	Zellzahl ↓↓↓ Zell-Substrat-Adhäsion ↓↓	Zellzahl ↓↓	Zellzahl ↓↓ Zell-Substrat-Adhäsion ↓↓
<b>M3</b>	Zellzahl ↓↓	Zellzahl ↓↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓↓	n.d.	n.d.
<b>M5</b>	Zellzahl ↓↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓↓	Zellzahl ↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓↓	kein Effekt	kein Effekt
<b>M6</b>	Zellzahl ↓↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓	Zellzahl ↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓	kein Effekt	kein Effekt
<b>M7</b>	kein Effekt	kein Effekt	n.d.	n.d.
<b>M8</b>	Zellzahl ↓↓↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓↓↓	Zelltod ↑↑↑	kein Effekt	kein Effekt
<b>M9</b>	Zellzahl ↓↓↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓↓↓	Zelltod ↑↑↑	kein Effekt	n.d.
<b>M10</b>	Zellzahl ↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓	Zellzahl ↓↓ Zell-Zell-Adhäsion ↓↓	kein Effekt	n.d.

Tab. 3-10: Morphologische Effekte der MDM2-siRNAs in den verschiedenen Zellmodellen.

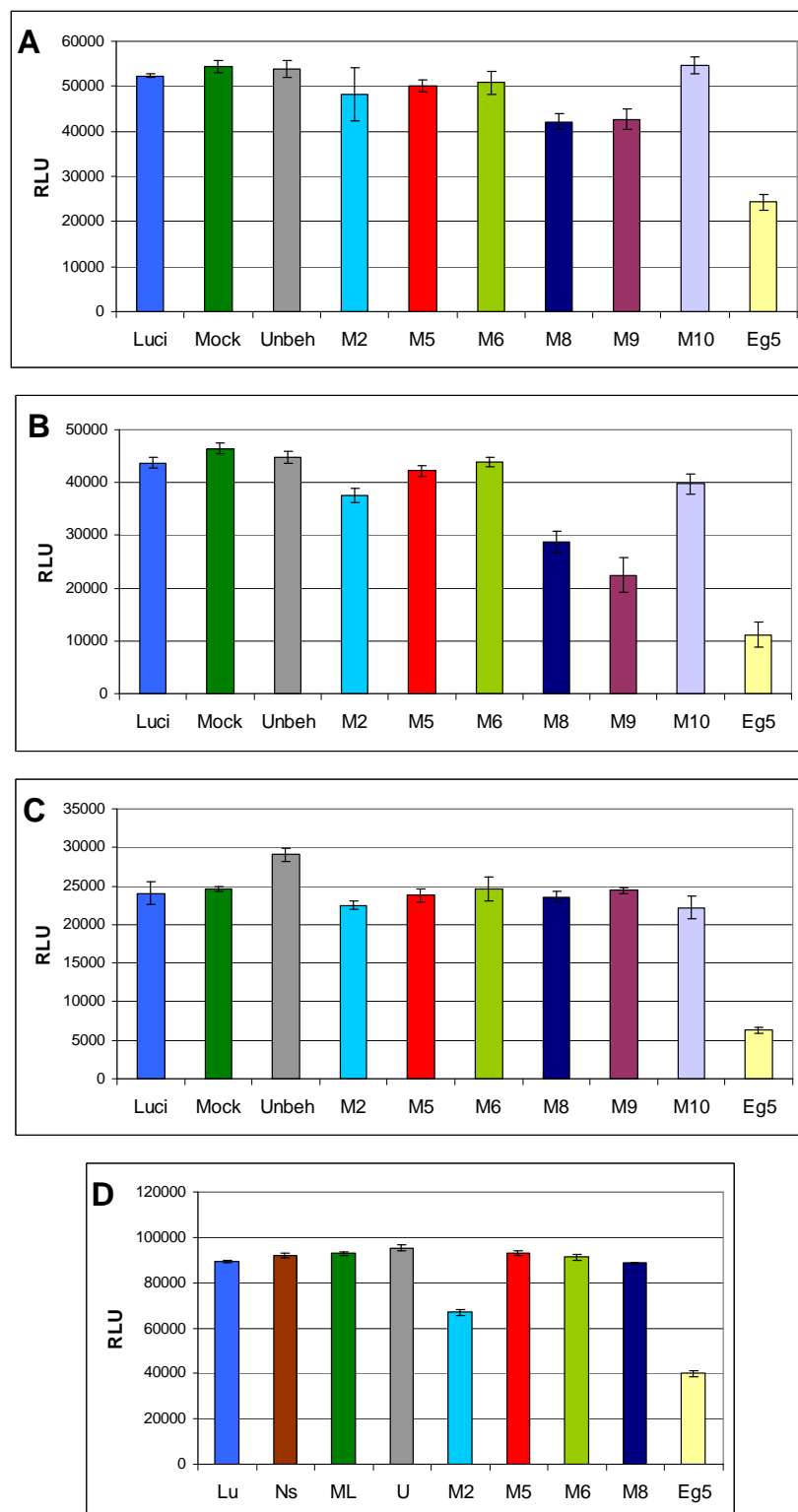
↑ = leicht erhöht, ↑↑ = erhöht, ↑↑↑ = stark erhöht, ↓ = leicht verringert, ↓↓ = verringert, ↓↓↓ = stark verringert; n.d.: Daten wurden nicht erhoben.

Nahezu alle gegen MDM2 gerichteten siRNAs riefen in MCF-7- und HCT-116-Zellen lichtmikroskopisch erkennbare phänotypische Veränderungen der transfizierten Zellen hervor, während in den Zelllinien mit mutantern p53 nur geringfügige Effekte, hauptsächlich bei M2, zu beobachten waren. Die Eg5-Kontrolle zeigt jeweils an, dass die Transfektion hervorragend funktioniert hat und somit das Fehlen morphologischer Veränderungen nicht Folge einer mangelnden Transfektionseffizienz war. Die funktionellen siRNAs führten in den Zelllinien mit Wildtyp-p53 zu interessanten Veränderungen des Adhäsionsverhaltens. M2 bewirkte, dass die Zellen in kleinen zusammenhängenden Inseln wuchsen, die dazu neigten, sich insgesamt von der Wachstumsfläche abzulösen. M5 und M6 reduzierten die Adhäsion der Zellen untereinander und ans Substrat, was sich an der Vereinzelung der Zellen und der Bildung füßchenartiger Fortsätze ablesen ließ (dieser Effekt war bei M6 in HCT-116-Zellen allerdings relativ schwach ausgeprägt). Ähnliches galt in MCF-7-Zellen auch für M8 und die sequenzanaloge Stealth-RNA M9, hier entstanden noch längere Zellfortsätze, verbunden mit einer deutlichen Zellzahlverminderung. In HCT-116-Zellen führten M8 und M9 hingegen hauptsächlich zu gesteigertem Zelltod. Auch die nachträglich hinzugenommene Stealth-RNA M10 hatte gewisse Auswirkungen auf die Adhäsion der transfizierten Zellen.

Da die gegen MDM2 gerichteten siRNAs im Idealfall innerhalb eines Zellsystems identische phänotypische Effekte haben sollten, kann man aus den beschriebenen Befunden bereits schließen, dass M2 und M8/M9 zusätzlich zum Silencing von MDM2 wohl noch weitere, nicht erwünschte Wirkungen auf die transfizierten Zellen ausüben.

### 3.3.4.7 Proliferationstests nach MDM2-Silencing

Um die Effekte der siRNAs auf die Zellproliferation und -viabilität zu quantifizieren, wurden wiederholt WST-1- oder CellTiter-Glo-Tests durchgeführt, die die metabolische Aktivität der Zellen erfassen (s. 2.5.3). In Abb. 3-92 sind beispielhaft die Ergebnisse von CellTiter-Glo-Messungen der vier verwendeten Zelllinien jeweils 72 h nach der Transfektion gezeigt.



**Abb. 3-92: Auswirkungen der MDM2-siRNAs auf die Proliferation.**

Ergebnisse der CellTiter-Glo-Tests 72 h nach der Transfektion im 24-Well-Maßstab mit den angegebenen siRNAs bzw. Kontrollbehandlung. Es wurden jeweils drei bis fünf Replikate pro Behandlung angesetzt. Die Fehlerbalken zeigen deren Standardabweichung an. RLU = relative Lumineszenzeinheiten. **A:** MCF-7-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM (M2 und Eg5)) **B:** HCT-116-Zellen (siRNA-Konzentration 10 nM bzw. 100 nM (Eg5)), **C:** NCI/ADR-RES-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM (M2 und Eg5)), **D:** HT-29-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM (M2 und Eg5)).

In allen Fällen lagen die Negativkontrollen nahe beieinander, d. h. die gegen Luciferase gerichtete Kontroll-siRNA und auch die Mock-Transfektion übten im Vergleich zu reinem Wachstumsmedium keine nennenswerte proliferationshemmende Wirkung aus. Das Lumineszenzsignal war bei den Eg5-siRNA-transfizierten Zellen jeweils deutlich reduziert, dies korrelierte mit der beobachteten massiven Wachstumshemmung und Apoptose.

Die MDM2-siRNAs zeigten heterogene Auswirkungen auf die metabolische Aktivität der transfizierten Zellen. Während M5 und M6 in allen Zellen auf dem Niveau der Negativkontrollen lagen, führte M2 zu einer gewissen, wenn auch schwachen Erniedrigung des Lumineszenzsignals. M8 und M9 riefen in MCF-7- und noch deutlicher in HCT-116-Zellen erhebliche Effekte hervor; in NCI/ADR-RES- und HT-29-Zellen blieben sie jedoch ohne erkennbare Wirkung.

Es ist hervorzuheben, dass sich eine nicht übermäßig ausgeprägte Verringerung der Zellzahl nicht in den CellTiter-Glo-Messungen niederschlagen scheint. So waren für M5 und M6 sowohl in MCF-7- als auch HCT-116-Zellen lichtmikroskopisch eindeutig und reproduzierbar proliferationshemmende Wirkungen beobachtet worden, die Lumineszenzbestimmungen spiegelten dies aber nicht wider.

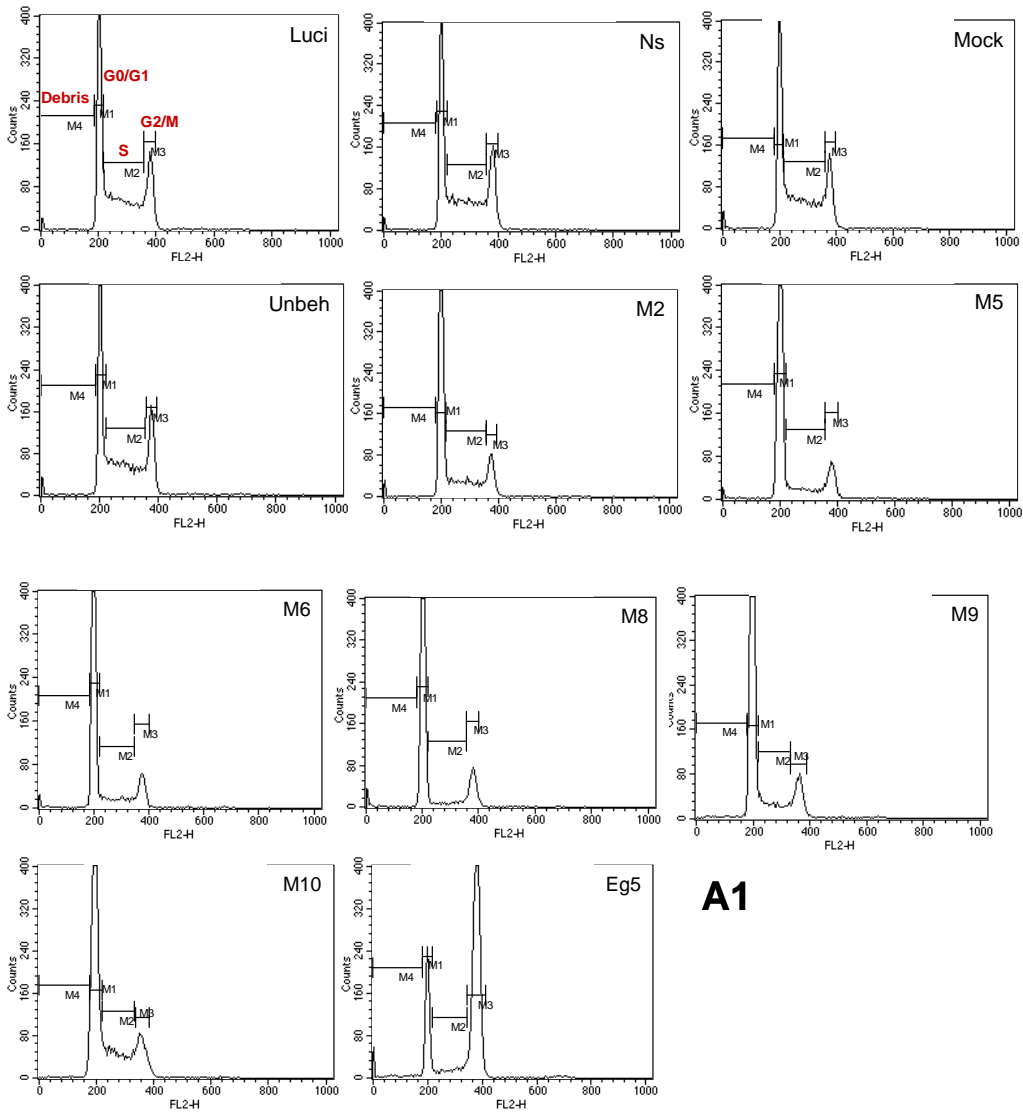
#### **3.3.4.8 Zellzyklusanalyse nach MDM2-Silencing**

Da zu erwarten war, dass das Silencing von MDM2 aufgrund einer Aktivierung des p53-Signalwegs zum Wachstumsarrest der Zellen mit Wildtyp-p53-Protein führen würde, wurde die Zellzyklusverteilung der transfizierten Zellen in durchflusszytometrischen Analysen ermittelt. Bereits 30 h nach der Transfektion waren in MCF-7- und HCT-116-Zellen Veränderungen zu beobachten.

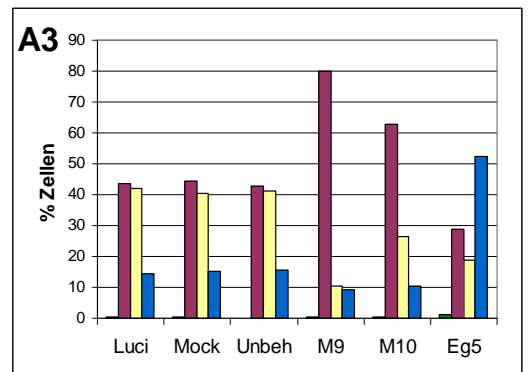
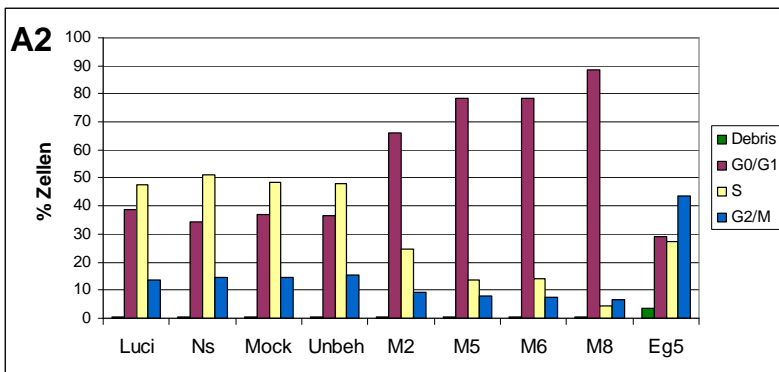
Abb. 3-93 stellt die Ergebnisse dieser Messungen zusammen. Am Beispiel von MCF-7-Zellen sind DNA-Histogramme gezeigt (Abb. 3-93A1), deren quantitative Auswertung findet sich in Abb. 3-93A2 und A3. Für HCT-116- und NCI/ADR-RES-Zellen sind die quantitativ analysierten Zellzyklusdaten in Abb. 3-93B und Abb. 3-93C1/C2 dargestellt.

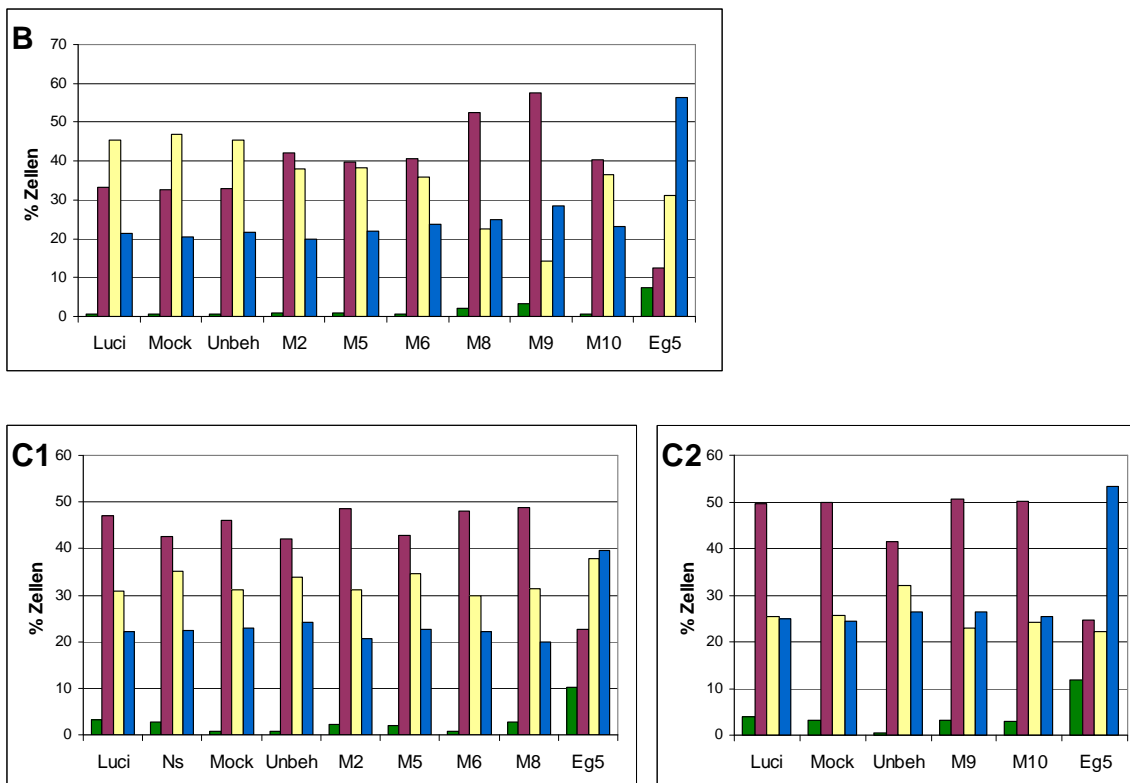
Die Zellzyklusverteilung der Negativkontrollen war innerhalb der untersuchten Zelllinien praktisch identisch. Die Positivkontroll-siRNA gegen Eg5 führte zu einer ausgeprägten Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase, da Eg5 eine wichtige Rolle in der Chromosomensegregation spielt (vgl. 3.2.8.2.4). Dieser Arrest kann als Nachweis der erfolgreichen Transfektion der verschiedenen Zelllinien dienen.

Sämtliche MDM2-siRNAs riefen einen Arrest in der G1-Phase hervor, sofern die transfizierte Zelllinie ein Wildtyp-p53-Protein besaß. Das Ausmaß des Arrests variierte, am schwächsten war er bei M2 und M10, am stärksten nach M8- und M9-Transfektion. Im Gegensatz dazu war in den p53-mutanten NCI/ADR-RES-Zellen kein signifikanter Einfluss der MDM2-siRNAs auf den Zellzyklus zu erkennen.



A1





**Abb. 3-93: Auswirkungen der MDM2-siRNAs auf die Zellzyklusverteilung.**

Zellzyklusanalyse 30 h nach der Transfektion von MCF-7-, HCT-116- und NCI/ADR-RES-Zellen mit den angegebenen siRNAs bzw. nach Kontrollbehandlung im 6-Well-Maßstab. Die prozentualen Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen wurden mit Hilfe der ModFit-Software ermittelt.

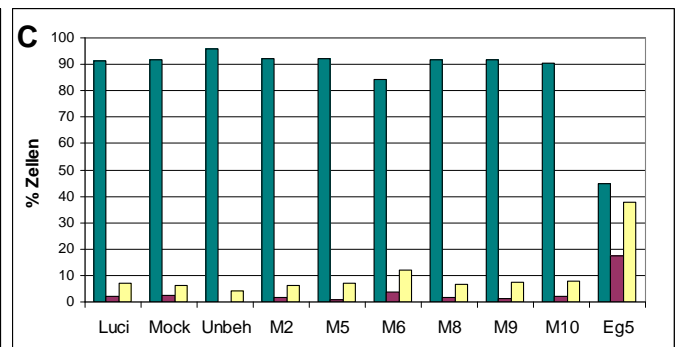
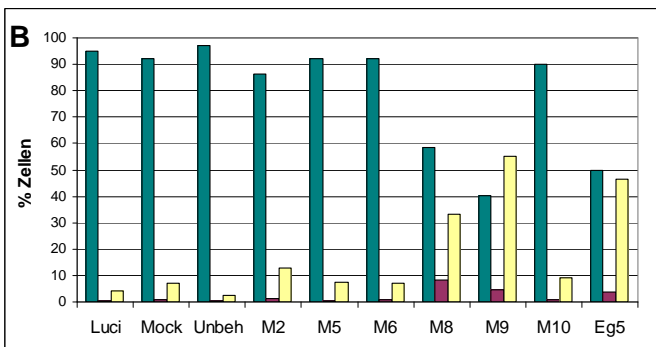
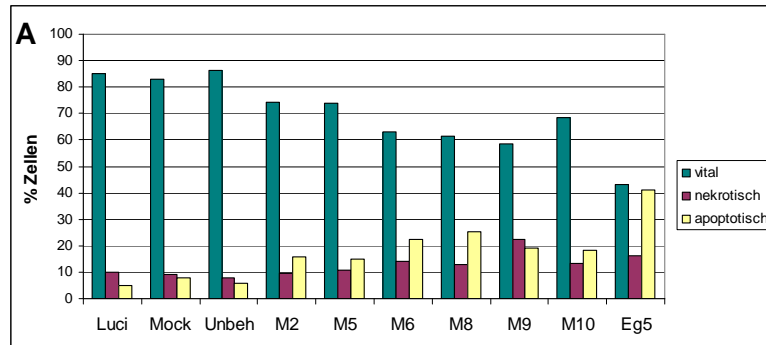
**A1:** DNA-Histogramme von MCF-7-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM im Fall von M2 und Eg5). Die Beschriftung im ersten Diagramm gibt die Zuordnung der Regionen zu den Zellzyklusphasen wieder. **A2** und **A3:** Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von MCF-7-Zellen. Da die Messungen mit M9 und M10 in einem separaten Experiment stattfanden, sind zwei Diagramme gezeigt. Die Negativkontrollen unterscheiden sich zwischen beiden Versuchsansätzen etwas in den prozentualen Anteilen der Zellzyklusphasen, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Konfluenz zum Zeitpunkt der Ernte. **B:** Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von HCT-116-Zellen (siRNA-Konzentration 10 nM bzw. 100 nM im Fall von Eg5). **C1** und **C2:** Quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung von NCI/ADR-RES-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM im Fall von M2 und Eg5). Da die Messungen mit M9 und M10 in einem separaten Experiment stattfanden, sind zwei Diagramme gezeigt. Die Negativkontrollen unterscheiden sich zwischen beiden Versuchsansätzen geringfügig in den prozentualen Anteilen der Zellzyklusphasen, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Konfluenz zum Zeitpunkt der Ernte.

### 3.3.4.9 Apoptosetest nach MDM2-Silencing

Da die Aktivierung von p53 neben Wachstumsarrest auch Apoptose hervorrufen kann, wurde untersucht, ob der spezifische Knock-down von MDM2 zu einer Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen führt.

72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Fluorescein-gekoppeltem Annexin (Annexin-FLUOS V) gefärbt und mit Propidiumiodid gegengefärbt und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (s. 2.5.6). Bei der Durchführung dieser Messungen kam es zu einer gewissen zeitlichen Verzögerung zwischen Anfärbung der Zellen und Analyse am FACS-Gerät. Da apoptotische, mit Annexin-FLUOS V markierte Zellen nach längeren Standzeiten beginnen, Propidiumiodid aufzunehmen, wurde der obere rechte Quadrant (UR) im ermittelten Dot Plot (vgl. Abb. 2-1D) zu den eigentlichen apoptotischen Zellen (LR) hinzugerechnet.

Abb. 3-94 gibt die quantitative Auswertung dieser Messungen wieder.



**Abb. 3-94: Einfluss der MDM2-siRNAs auf den Zelltod.**

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen nach Färbung mit Annexin-FLUOS V und Propidiumiodid. Die Analysen wurden jeweils 72 h nach der Transfektion mit den angegebenen siRNAs bzw. Kontrollbehandlung im 6-Well-Format durchgeführt.

**A:** MCF-7-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM (M2 und Eg5)). **B:** HCT-116-Zellen (siRNA-Konzentration 10 nM bzw. 100 nM (Eg5)).

**C:** NCI/ADR-RES-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM (M2 und Eg5)).

In NCI/ADR-RES-Zellen, denen funktionelles p53 fehlt, führten die MDM2-siRNAs zu keiner signifikanten Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen. Anhand der Eg5-siRNA-Positivkontrolle ist zu erkennen, dass in diesem Zelltyp prinzipiell aber durchaus Apoptose ausgelöst werden kann. In MCF-7-Zellen hatte Eg5-siRNA ebenfalls einen ausgeprägten proapoptotischen Effekt. Die gegen MDM2 gerichteten siRNAs riefen hier eine gewisse, wenn auch nicht sonderlich ausgeprägte Erhöhung des Anteils apoptotischer und auch nekrotischer Zellen hervor. In HCT-116 war eine Zunahme apoptotischer Zellen hingegen nur bei der siRNA M8 und der sequenzhomologen Stealth-RNA M9 zu beobachten, und zwar in erheblichem Maße. Dieses Ergebnis korreliert mit dem lichtmikroskopisch festgestellten massiven Zelltod nach M8- und M9-Behandlung.

### 3.3.4.10 p53-Western Blot

Zum Nachweis der Aktivierung von p53 nach RNAi-vermittelter MDM2-Inhibition wurden p53-Western Blots durchgeführt. Diese werden im folgenden Kapitel bei den Affymetrix-Experimenten gezeigt (s. 3.3.4.11.2).

### 3.3.4.11 Differenzielle Genexpression nach MDM2-Silencing in MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen

Die Auswirkungen des spezifischen Silencings von MDM2 auf die globale Genexpression wurden mit Hilfe von Affymetrix GeneChip® Arrays vom Typ HG-U133A untersucht.

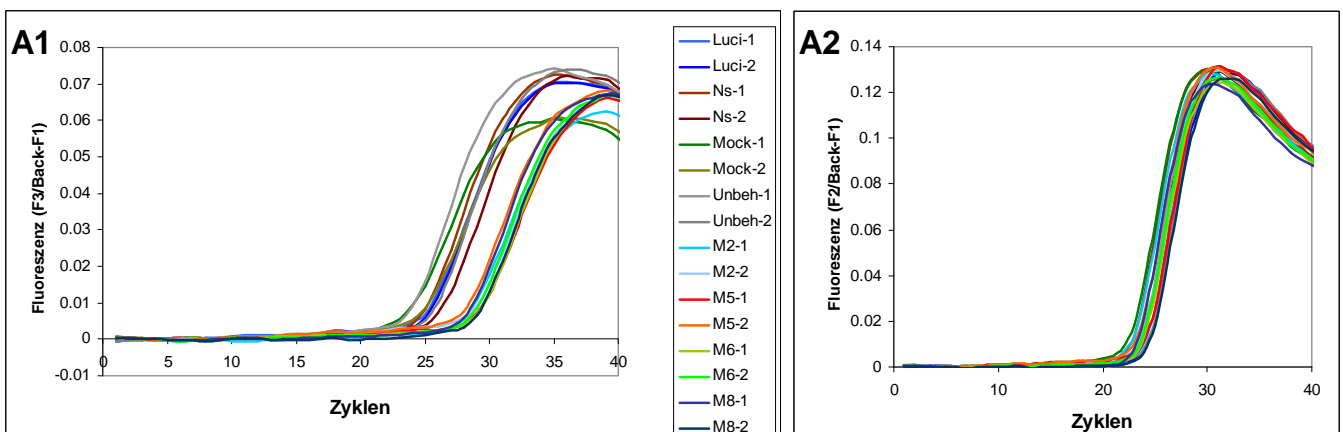
Für diese Analysen wurden diejenigen MDM2-siRNAs ausgewählt, die in den vorangegangenen Versuchen zu einer effizienten und reproduzierbaren Reduktion von MDM2 auf mRNA- und Proteinebene geführt hatten: M2, M5, M6 und M8. Als Kontroll-siRNAs kamen Luciferase-siRNA und Non-silencing control siRNA zum Einsatz, außerdem wurden mock-transfizierte und unbehandelte Zellen einbezogen. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Negativkontroll-siRNAs bisher unerkannte Off-Target-Effekte besitzen und welche von ihnen im Vergleich zu den mock-transfizierten bzw. unbehandelten Proben die geringsten Änderungen hervorrufen.

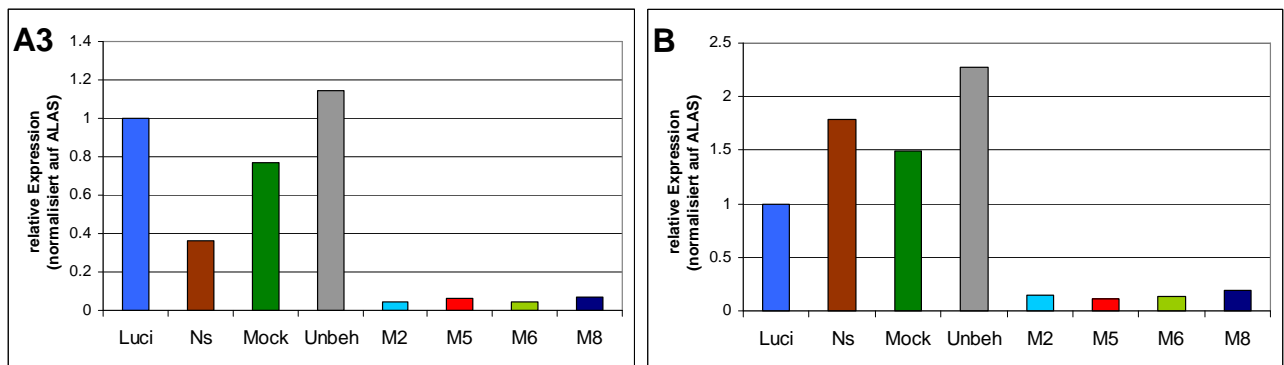
Zunächst wurden die Zelllinien MCF-7 und NCI/ADR-RES einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Da 48 h nach der Transfektion das MDM2-Protein stets deutlich herabreguliert war und außerdem bereits nach 30 h Zellzykluseffekte messbar waren, wurde der Zeitpunkt 48 h für die Affymetrix-Analysen ausgewählt. Es wurden die optimierten siRNA-Konzentrationen, also 5 nM für alle siRNAs mit Ausnahme von M2 (33 nM), verwendet. Alle Behandlungen wurden in Duplikaten durchgeführt.

#### 3.3.4.11.1 Bestätigung eines effizienten Silencings von MDM2 auf mRNA- und Proteinebene

Vor der Hybridisierung der Proben auf Affymetrix-Chips wurde zunächst bestätigt, dass die Transfektion erfolgreich gewesen war und zu einem zufrieden stellenden Silencing auf Transkript- und Proteinebene geführt hatte.

Die Analyse der gewonnenen RNA-Lysate per Two-Step-RT-PCR lieferte die in Abb. 3-95 dargestellten Ergebnisse. In beiden Zelllinien führten alle vier MDM2-siRNAs zu einem exzellenten Knock-down ihres Targets. Die Non-silencing control siRNA rief in diesem Versuchsansatz in MCF-7-Zellen eine auffallende Reduktion des MDM2-Spiegels hervor.





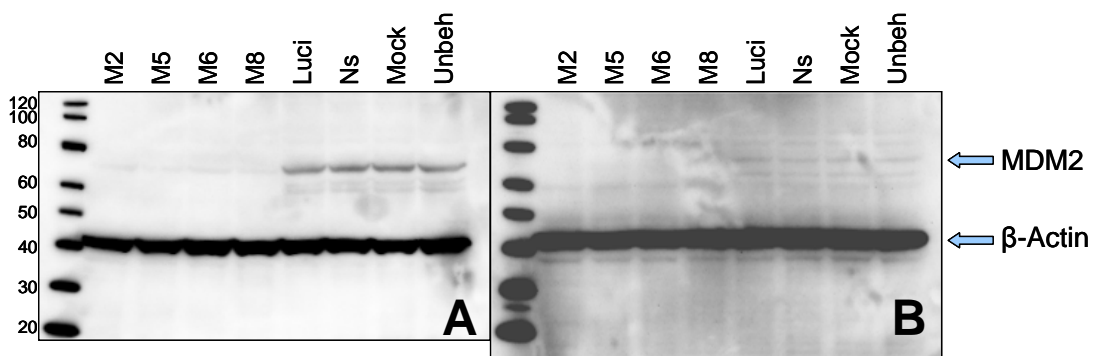
**Abb. 3-95: MDM2-Silencing auf mRNA-Ebene in den Affymetrix-Proben.**

Analyse der relativen Expression von MDM2-mRNA 48 h nach der Transfektion von MCF-7- bzw. NCI/ADR-RES-Zellen (siRNA-Konzentration 5 nM bzw. 33 nM im Fall von M2) im 6-Well-Maßstab durch RT-PCR. Die in die reverse Transkription eingesetzten RNA-Proben wurden auch für die Präparation der cRNAs verwendet, die letztlich auf Affymetrix GeneChip® Arrays HG-U133A hybridisiert wurden.

**A1:** Amplifikationskurven von MDM2 in den aus MCF-7-Zellen gewonnenen Proben; alle Replikate sind einzeln gezeigt und jeweils mit -1 bzw. -2 gekennzeichnet. **A2:** Amplifikationskurven von ALAS in den Proben aus MCF-7-Zellen; alle Replikate sind einzeln gezeigt. **A3:** relative Expression von MDM2 in MCF-7-Zellen, bezogen auf Luciferase-siRNA, normalisiert auf ALAS; es sind die Mittelwerte aus Duplikaten angegeben. **B:** relative Expression von MDM2 in NCI/ADR-RES-Zellen, bezogen auf Luciferase-siRNA, normalisiert auf ALAS; es sind die Mittelwerte aus Duplikaten angegeben.

Am Beispiel der MCF-7-Proben sind die bei der RT-PCR-Analyse entstandenen Amplifikationskurven gezeigt (Abb. 3-95A1 und A2). Während die Kurven des Housekeeping-Gens ALAS alle weitgehend übereinander liegen, sind im MDM2-Diagramm die mit targetspezifischer siRNA transfizierten Proben deutlich zu späteren Zyklen verschoben.

Im Western Blot bestätigte sich die effiziente Verminderung des MDM2-Spiegels durch siRNA-Transfektion. Die Ergebnisse zeigt Abb. 3-96. In beiden Zelllinien wurde das MDM2-Protein durch alle vier spezifischen siRNAs auf (nahezu) nicht mehr detektierbare Mengen reduziert. In NCI/ADR-RES-Zellen ist die Ausgangskonzentration bereits sehr gering, vermutlich weil aufgrund des Fehlens von funktionellem p53 die Transaktivierung des MDM2-Gens unterbleibt. Es ist aber zu erkennen, dass die bei allen Negativkontrollen vorhandenen schwachen Proteinbanden in den MDM2-siRNA-transfizierten Proben verschwunden sind.



**Abb. 3-96: MDM2-Silencing auf Protein-Ebene in den Affymetrix-Proben.**

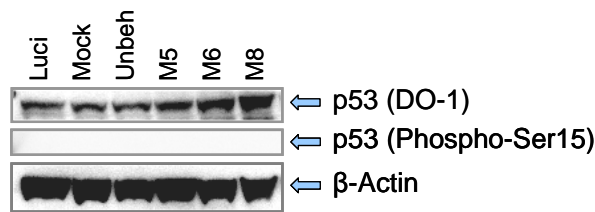
Detektion der MDM2-Proteinmenge per Western Blot 48 h nach siRNA-Transfektion bzw. Kontrollbehandlung von MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen. Die Lysate wurden aus Zellen gewonnen, die parallel zu den Proben für die Affymetrix-Analyse angesetzt worden waren. Die pro Gelspur aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug bei den MCF-7-Lysaten 100 µg, bei den NCI/ADR-RES-Proben 70 µg. β-Actin diente als Ladekontrolle.

**A:** Western Blot der MCF-7-Proben. **B:** Western Blot der NCI/ADR-RES-Proben.



### 3.3.4.11.2 Bestätigung der p53-Aktivierung im Western Blot

Um zu untersuchen, ob die Menge an p53-Protein in der Zelle nach MDM2-siRNA-Transfektion ansteigt, wurde ein Western Blot mit einem Teil der MCF-7-Proben durchgeführt; zur Detektion diente der p53-Antikörper DO-1, der alle Formen von p53-Protein erfasst. Wie in Abb. 3-97 gezeigt, konnte eine gewisse Erhöhung des p53-Spiegels durch M5, M6 und insbesondere M8 festgestellt werden. Außerdem wurde überprüft, ob eine für DNA-Schädigung charakteristische Phosphorylierung von p53 an Serin-15 stattgefunden hat (vgl. 3.2.6). Wie in der Abbildung ersichtlich, konnte kein phosphoryliertes detektiert werden.<sup>15</sup>



**Abb. 3-97: Induktion von p53 durch MDM2-siRNAs in MCF-7-Zellen.**

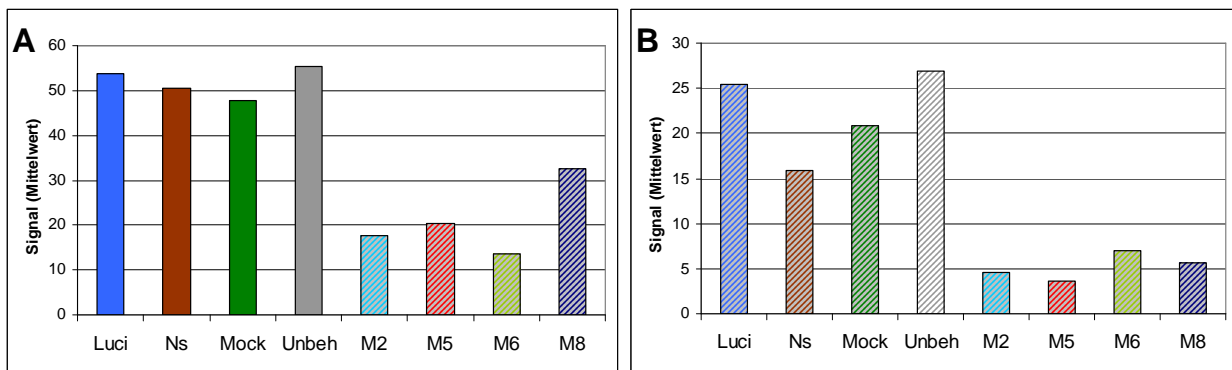
Detektion der p53-Proteinmenge (Antikörper DO-1) und der Phosphorylierung an Ser15 (Antikörper Phospho-Ser15) im Western Blot 48 h nach siRNA-Transfektion bzw. Kontrollbehandlung von MCF-7-Zellen. Es wurde ein Teil Proben, die bereits bei dem in Abb. 3-96 gezeigten MDM2-Western Blot analysiert wurden, verwendet. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge je Gelspur betrug 120 µg. β-Actin diente als Ladekontrolle. Zwischen den Detektionen mit den unterschiedlichen Antikörpern wurde der Blot jeweils gestrippt.

### 3.3.4.11.3 Übersicht über die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse

#### 3.3.4.11.3.1 Bestätigung des MDM2-Silencings durch Chip-Daten

Nach dem Nachweis des effizienten Silencings von MDM2 wurden die Proben auf den Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Array HG-U133A hybridisiert. Dieser enthält auch ein Probe Set zur Detektion von MDM2, anhand dessen die Herabregulierung auf mRNA-Ebene bestätigt werden konnte. Wie in Abb. 3-98A gezeigt, waren bei den mit MDM2-siRNA transfizierten MCF-7-Proben die Transkriptmengen von MDM2 im Vergleich zu den Kontrollen so deutlich reduziert, dass keine verlässlichen Signale des Probe Sets mehr detektiert werden konnten und MDM2 hier vom Affymetrix-Algorithmus als *absent* eingestuft wurde. In den NCI/ADR-RES-Zellen war der Ausgangsspiegel an MDM2-mRNA bereits so gering, dass sie auch in den Kontrollproben nicht sicher detektierbar war, die Abnahme der Signalhöhe gibt aber dennoch einen Hinweis darauf, dass unterschiedliche Mengen von MDM2 in den siRNA-transfizierten Proben und den Negativkontrollen vorlagen (Abb. 3-98B).

<sup>15</sup> Parallel wurde ein Blot mit Zytostatika-behandelten Proben analysiert, der bei geringerer Menge an Gesamtprotein pro Gelspur und gleichen Inkubations- und Detektionsbedingungen Banden von phosphoryliertem p53 erkennen ließ.



**Abb. 3-98: Signalthöhen des Probe Sets für MDM2 auf dem Affymetrix-Chip.**

**A:** Affymetrix-Daten für MDM2 in den MCF-7-Proben. **B:** Affymetrix-Daten für MDM2 in den NCI/ADR-RES-Proben. Es sind jeweils die Mittelwerte aus Duplikaten gezeigt.

### 3.3.4.11.3.2 Vergleich der Negativkontrollen

Die bei der Affymetrix-Analyse entstandenen Daten wurden nach den unter 2.7.4.3 beschriebenen Standardfilterkriterien ausgewertet.

	Anzahl deregulierter Affymetrix Probe Sets
<b>Luci - Mock</b>	0
<b>Luci - Unbeh</b>	24
<b>Luci - Ns</b>	81
<b>Ns - Mock</b>	75
<b>Ns - Unbeh</b>	95
<b>Mock - Unbeh</b>	36

**Tab. 3-11: Vergleich der Negativkontrollen des Affymetrix-Versuchs in MCF-7-Zellen.**

Die verschiedenen Negativkontrollen wurden jeweils nach den Standardfilterkriterien miteinander verglichen. Die Summe aus hoch- und herabregulierten Probe Set-IDs ist für alle paarweisen Vergleich angegeben.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die Negativkontrollen voneinander abwichen. In Tab. 3-11 ist angegeben, wie viele Affymetrix Probe Sets beim paarweisen Vergleich der Kontrollproben des MCF-7-Versuchs jeweils als dereguliert eingestuft wurden.

Es ist offensichtlich, dass sich die mit Luciferase-siRNA transfizierten und die mock-transfizierten Proben nicht signifikant unterschieden und dass sie auch von den unbehandelten Proben nicht allzu stark abwichen. Eine gewisse Veränderung gegenüber den gänzlich unbehandelten Zellen war durchaus zu erwarten, da die Zugabe von Transfektionsagens nicht völlig folgenlos bleiben kann. Interessant ist, dass das Einführen doppelsträngiger RNA an sich keine Auswirkungen auf das Genexpressionsmuster der Zellen hatte. Die Non-silencing control siRNA hatte jedoch Effekte, sowohl im Vergleich zu Luciferase-siRNA als auch zu den mock-transfizierten und unbehandelten Proben. Diese waren so ausgeprägt, dass Non-silencing control siRNA aus den folgenden Analysen ausgeschlossen wurde. Als Vergleichsgrundlage aller weiteren Auswertungen wurde die Kombination aus den Luciferase-siRNA- und den mock-transfizierten Proben verwendet.

In NCI/ADR-RES-Zellen unterschieden sich die Kontrollen insgesamt noch weniger voneinander, Non-silencing control siRNA wich geringer von den anderen Behandlungen ab (Daten nicht gezeigt). Da sich hier einerseits Luciferase-siRNA- und mock-transfizierte Proben ebenfalls sehr ähnlich waren und andererseits Konsistenz zwischen den verschiedenen Auswertungen bestehen sollte, wurde auch für die Analyse der Daten aus NCI/ADR-RES-Zellen die kombinierte Baseline aus Luciferase-siRNA- und Mock-Transfektion gewählt.

Gegen diese Baselines wurden alle Daten der mit MDM2-siRNAs transfizierten Proben verglichen.

In MCF-7-Zellen war aufgrund ihres Wildtyp-p53-Status und der gefundenen phänotypischen Veränderungen ein ausgeprägter Effekt der MDM2-siRNAs auf die Genexpression zu erwarten. In NCI/ADR-RES-Zellen sollten hingegen aufgrund des Fehlens funktionellen p53-Proteins allenfalls geringe Effekte, die mit p53-unabhängigen Funktionen von MDM2 zusammenhängen könnten, auftreten. Das Augenmerk lag hauptsächlich auf den Übereinstimmungen der Wirkungen mehrerer siRNAs, da diese gemeinsamen Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dem spezifischen Silencing von MDM2 beruhen dürften. Die durch eine siRNA deregulierten, aber nicht in der Schnittmenge mit anderen siRNAs befindlichen Gene sind hingegen möglicherweise durch Off-Target-Effekte bedingt.

### 3.3.4.11.3.3 Zahlenmäßige Betrachtung der Affymetrix-Daten

Tab. 3-12 gibt eine Übersicht über die Anzahl der durch jede siRNA induzierten bzw. reprimierten Gene in den beiden untersuchten Zelllinien. Die siRNAs M2, M5 und M6 riefen in MCF-7-Zellen Veränderungen in ähnlicher Größenordnung hervor, während M8 deutlich stärkere Effekte erzeugte und besonders viele Gene reprimierte. In den p53-mutanten NCI/ADR-RES-Zellen hatten M5 und M6 nur geringfügige Auswirkungen, M2 und M8 hingegen regulierten eine nicht zu vernachlässigende Zahl von Genen herab. Dies gibt bereits einen Hinweis darauf, dass M2 und M8 möglicherweise unspezifische Wirkungen auf die Zelle ausüben, da im Idealfall ja alle gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs auch übereinstimmende Wirkungen auf die Genexpression haben sollten.

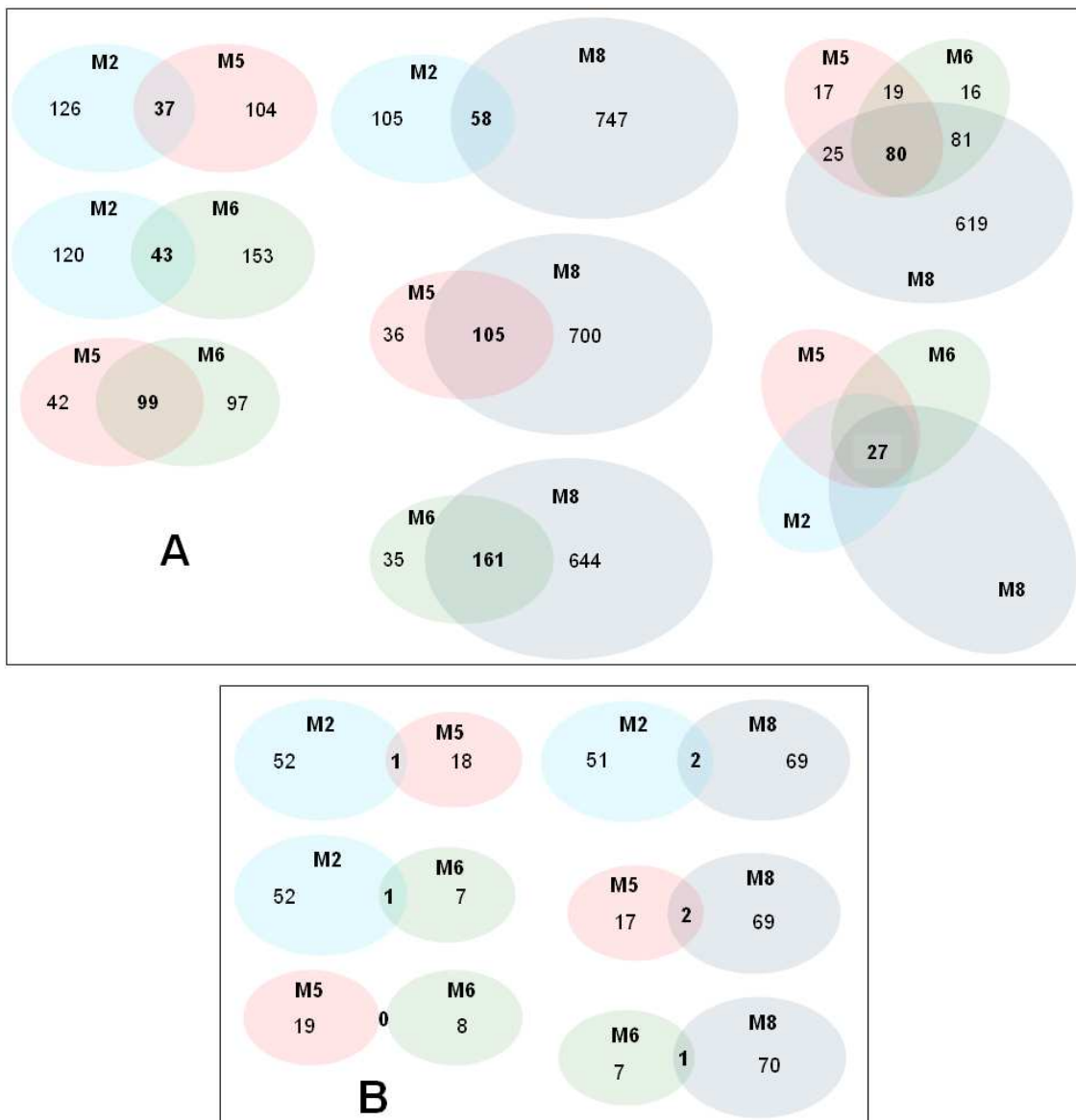
	MCF-7		NCI/ADR-RES	
<b>M2</b>	79↑	84↓	7↑	46↓
<b>M5</b>	79↑	62↓	1↑	18↓
<b>M6</b>	66↑	130↓	0↑	8↓
<b>M8</b>	197↑	608↓	4↑	67↓

**Tab. 3-12: Anzahl differenziell exprimierter Gene nach MDM2-siRNA-Transfektion in MCF-7- und NCI-ADR-RES-Zellen.**

Es ist die Anzahl der durch die angegebenen siRNAs im Vergleich zur kombinierten Baseline aus Luciferase-siRNA- und Mock-Transfektion induzierten und reprimierten Gene in MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen gezeigt. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

Im nächsten Schritt wurden die durch die verschiedenen siRNAs deregulierten Gene miteinander verglichen. In Abb. 3-99 sind die Schnittmengen der vier siRNAs jeweils innerhalb der Zelllinien MCF-7 und NCI/ADR-RES in Form von Venn-Diagrammen gezeigt.

Aus der Größe der Überschneidungen der MCF-7-Proben (Abb. 3-99A) ist erkennbar, dass sich die siRNAs M5 und M6 in ihren Wirkungen auffallend ähnelten. Diese beiden siRNAs zeigten auch mit M8 große Überlappungen; so finden sich von den 99 Genen, die M5 und M6 gemeinsam sind, 80 in der Schnittmenge der drei siRNAs wieder. Ebenso groß ist die Zahl der M6 und M8 gemeinsamen, nicht von M5 beeinflussten Gene. M8 deregulierte über diese Übereinstimmungen hinaus allerdings noch eine Vielzahl weiterer Gene. M2 unterschied sich in MCF-7-Zellen recht deutlich von allen anderen siRNAs, die paarweisen Schnittmengen sind wesentlich kleiner als bei den übrigen Vergleichen und die Zahl der allen vier Behandlungen gemeinsamen Gene beträgt nur 27.



**Abb. 3-99: Übereinstimmungen zwischen den durch die vier MDM2-siRNAs deregulierten Genen in MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen.** Es sind jeweils die Summen aus induzierten und reprimierten Genen gezeigt. Die Größe der Flächen deutet die Gesamtzahl deregulierter Gene je siRNA an. **A:** Schnittmengen der durch die vier MDM2-siRNAs in MCF-7-Zellen deregulierten Gene. **B:** Schnittmengen der durch die vier MDM2-siRNAs in NCI/ADR-RES-Zellen deregulierten Gene.

In NCI/ADR-RES-Zellen existieren nahezu keine Überlappungen zwischen den verschiedenen siRNA-transfizierten Proben (Abb. 3-99B).

#### 3.3.4.11.3.4 Auswahl funktioneller und spezifischer siRNAs

Aus der Gesamtheit der Genexpressionsdaten wurde der Schluss gezogen, dass die siRNAs M5 und M6 hocheffizient das MDM2-Transkript herabzuregulieren vermögen, weitgehend für Wildtyp-p53-Zellen spezifische Effekte ausüben und zudem eine ausreichend große Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Deshalb kann man davon ausgehen, dass ein wesentlicher Teil ihrer Effekte auf dem Silencing von MDM2 beruht. Die phänotypischen Analysen unterstützen diese Folgerung, da die beiden siRNAs ähnliche Veränderungen der Zellmorphologie, einen vergleichbar starken G0/G1-Arrest und ein übereinstimmendes Ausmaß an Apoptose hervorriefen. M2 hingegen wich bereits bei der Zellmorphologie von den übrigen siRNAs ab, führte laut Western Blot tendenziell zu einer schwächeren Reduktion des MDM2-Proteins, induzierte einen weniger ausgeprägten Zellzyklusarrest und veränderte in NCI/ADR-RES-Zellen auffällig viele Gene. Da M5 und M6 aber in diesen p53-mutanten Zellen nahezu wirkungslos waren und die wenigen deregulierten Gene keinerlei Überschneidungen zeigten, ist anzunehmen, dass die Effekte von M2 unspezifischer Natur sind. Dieser Befund gilt auch für M8. In MCF-7-Zellen wies M8 zwar signifikante Ähnlichkeit zu M5 und M6 auf, deregulierte darüber hinaus aber noch extrem viele weitere Gene. Offenbar ist M8 also hinsichtlich des MDM2-Silencings durchaus funktionell, ruft zusätzlich aber unerwünschte Off-Target-Effekte hervor.

#### 3.3.4.11.3.5 Off-Target-Effekte von M8

Die nähere Analyse der unspezifischen Effekte von M8 in MCF-7-Zellen ergab, dass diese hauptsächlich auf einer massiven Induktion der Interferonantwort beruhten. Wie in den einleitenden Bemerkungen zum Thema RNAi bereits dargelegt, häufen sich Berichte, dass abgesehen von langen dsRNA-Molekülen auch die kurzen siRNAs und shRNAs in Vertebratenzellen unspezifisch die Expression interferonresponsiver Gene stimulieren können, was die Aktivierung antiviraler Abwehrmechanismen anzeigt [262, 276]. In Tab. 3-13 findet sich eine Zusammenstellung der von M8 heraufregulierten und laut Literatur durch dsRNA bzw. Interferone induzierbaren Gene unter Angabe des Induktionsfaktors.

Viele der gezeigten ISGs waren sehr stark induziert, bis maximal auf das 72fache der Kontrollen. Zu den heraufregulierten Genen gehörten u. a. zwei Oligoadenylatsynthasen, OAS1 und OAS3, welche die Bildung von 2',5'-Adenosinoligomeren katalysieren. Durch diese wird wiederum RNase L aktiviert, die unspezifisch zelluläre und, soweit vorhanden, virale RNA-Moleküle spaltet. In der Folge kommt es zu einer generellen Repression der Proteintranslation [262]. Es ist anzunehmen, dass die große Zahl durch M8 reprimierter Gene zumindest teilweise von dieser Aktivierung des OAS/RNase L-Systems herrührt. Entweder sind die herabregulierten mRNAs direkt von RNase L gespalten worden und deshalb nicht mehr detektierbar, oder sie konnten aufgrund der mangelnden Synthese von Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und Enzymen der Transkriptionsmaschinerie nicht mehr gebildet werden. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass auch

die Proteinkinase PKR (*eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*, HUGO: EIF2AK2) im Rahmen der Interferonantwort in MCF-7-Zellen aktiviert wurde. Da ihre durch Interferone oder dsRNA vermittelte Aktivierung in Form einer Autophosphorylierung vonstatten geht, ist sie auf Transkriptebene nicht direkt zu erkennen. PKR phosphoryliert den Translationsinitiationsfaktor EIF2 $\alpha$  und hemmt dadurch unmittelbar die zelluläre Proteinsynthese [277].

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Change factor
interferon, alpha-inducible protein (clone ifi-15k)	G1P2	9636	ISG15, IFI15	9,01
interferon, alpha-inducible protein (clone ifi-6-16)	G1P3	2537	IFI6-16, 6-16	31,36
interferon-induced protein 35	IFI35	3430		1,83
interferon-induced protein 44	IFI44	10561		2,22
interferon induced with helicase C domain 1	IFIH1	64135	MDA-5	2,1
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	3434	IFI56	71,31
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5	24138	RI58	10,26
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	8519	IFI17, 9-27, LEU13	1,04
interferon regulatory factor 6	IRF6	3664		1,63
interferon regulatory factor 7	IRF7	3665		0,93
interferon stimulated gene 20kda	ISG20	3669		4,24 / 0,96
interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	ISGF3G	10379		5,85
2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kda	OAS1	4938		22,73 / 12,12
2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kda	OAS3	4940		1,05
sp110 nuclear body protein	SP110	3431	IFI41, IFI75	3,01 / 2,67 / 2,39
signal transducer and activator of transcription 1, 91kda	STAT1	6772	ISGF3	7,85 / 2,51 / 2,15 / 1,92 / 1,25

**Tab. 3-13: Induktion einer Interferonantwort durch M8 in MCF-7-Zellen.**

Sämtliche durch M8 hochregulierten Gene, die gemäß Literaturbefunden durch dsRNA bzw. Interferone induziert werden können, sind unter Angabe des Change factors (s. 2.7.4.2) aufgeführt. Für Gene, die mit mehreren Probe Sets auf dem Chip HG-U133A vertreten sind, sind mehrere Change factors angegeben.

In NCI/ADR-RES-Zellen war interessanterweise keine Induktion interferonresponsiver Gene durch M8 zu beobachten, dennoch waren hier viele Gene herabreguliert, wenn auch deutlich weniger als in MCF-7-Zellen.

#### 3.3.4.11.4 Test von Stealth-RNAs

Da es Hinweise gibt, dass Off-Target-Effekte von siRNAs häufig durch Inkorporation des Sensestrangs in den RISC-Komplex und anschließende Zerstörung „falscher“ Targets verursacht werden, sind Modifikationen des Sensestrangs eine mögliche Strategie zur Vermeidung solcher unerwünschter Wirkungen. Deshalb wurden die Stealth-RNA M9, die auf der Sequenz von M8 basiert, und zusätzlich eine weitere Stealth-RNA mit neuer Sequenz (M10) getestet. Die phänotypischen Resultate der Transfektion mit diesen Agenzien wurden bereits unter 3.3.4.6 und 3.3.4.7 beschrieben. Im Folgenden sollen nun die Daten zum Knock-down von MDM2 und die Ergebnisse der Affymetrix-Analyse nach Transfektion von MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen mit M9 und M10 gezeigt werden. Die Transfektionsbedingungen waren mit denen im ersten

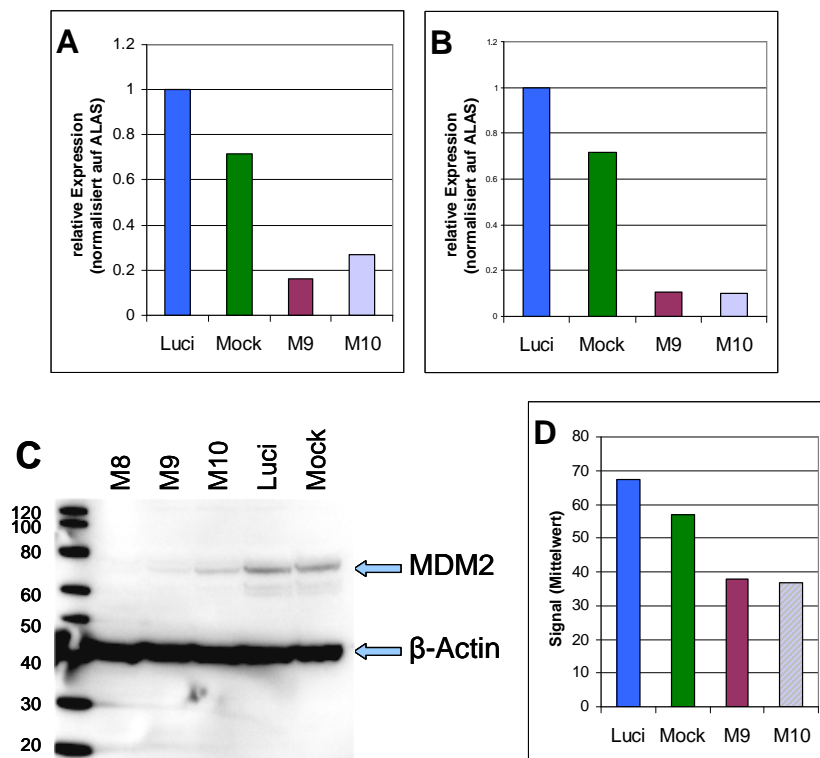
Affymetrix-Experiment identisch und M9 und M10 konnten gemäß einem zuvor durchgeführten Optimierungsversuch ebenfalls mit einer Konzentration von 5 nM eingesetzt werden. Als Kontrollen wurden Luciferase-siRNA- und mock-transfizierte Zellen mitgeführt.

### Bestätigung des Silencings von MDM2 auf Transkript- und Proteinebene

Analog zum vorherigen Versuch wurde zunächst per RT-PCR und Western Blot nachgewiesen, dass M9 und M10 zu einer effizienten Herabregulierung von MDM2-mRNA und -Protein führten. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 3-100A und B gezeigt.

In MCF-7-Zellen war der durch M10 erreichte Knock-down auf mRNA-Ebene nicht ganz optimal, während in NCI/ADR-RES-Zellen beide Stealth-RNAs ein exzellentes Silencing von MDM2 vermittelten.

Im Western Blot bestätigte sich die effiziente Reduktion von MDM2 durch M9 in MCF-7-Zellen, während M10 die Proteinmenge weniger gut herabregulierte (Abb. 3-100C). In dem mit NCI/ADR-RES-Lysaten durchgeführten Western Blot gelang die Detektion der MDM2-Bande nicht, er ist deshalb nicht gezeigt.



**Abb. 3-100: Silencing von MDM2 durch Stealth-RNAs.**

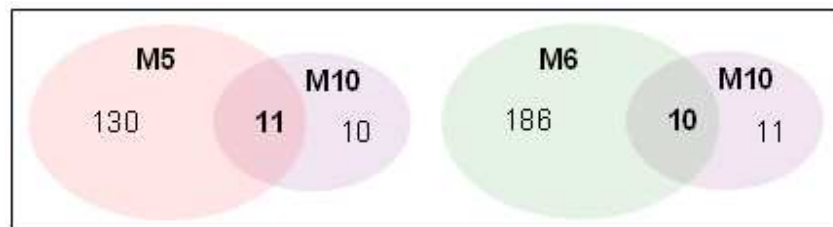
**A:** RT-PCR-Ergebnisse der MCF-7-Proben, bezogen auf die Luciferase-siRNA-transfizierte Proben, normalisiert auf ALAS. **B:** RT-PCR-Ergebnisse der NCI/ADR-RES-Proben, bezogen auf die Luciferase-siRNA-transfizierte Proben, normalisiert auf ALAS. **C:** Western Blot der MCF-7-Proben; zum Vergleich war das mit M8 gewonnene Proteinlysate mit aufgetragen worden. Gesamtproteinmenge 100 µg. **D:** Signalthöhen des Probe Sets für MDM2 in den MCF-7-Proben. Die Abbildungen A, B und D zeigen die Mittelwerte aus Duplikaten.

Bei der nachfolgenden Affymetrix-Analyse konnte die Reduktion der MDM2-siRNA durch M9 und M10 in MCF-7-Zellen bestätigt werden, wie in Abb. 3-100D ersichtlich. Die Reduktion der Signalintensität war nicht

ganz so stark wie beim vorherigen Versuch, die Signale der beiden M10-transfizierten Proben wurden allerdings als *absent* eingestuft und waren somit gegenüber den Kontrollen eindeutig verringert.

#### Zahlenmäßige Betrachtung der Affymetrix-Daten nach Stealth-RNA-Transfektion

Die Auswertung der Affymetrix-Daten gemäß Standardfilterkriterien ergab, dass M9 – ähnlich wie M8 – in MCF-7-Zellen eine Vielzahl von Genen deregulierte (262 induzierte und 246 reprimierte Gene). Bei der weiteren Evaluierung dieser Gene stellte sich heraus, dass M9 nahezu in gleichem Ausmaß wie M8 interferonresponsive Gene induzierte (Daten nicht gezeigt). Dies korrelierte mit dem Befund, dass phänotypisch keine Unterschiede zwischen der siRNA und ihrer entsprechenden Stealth-RNA zu beobachten gewesen waren. Insofern stellte M9 keine Verbesserung gegenüber M8 dar und wurde aus den folgenden Analysen ausgeschlossen. Außerdem wurden die mit M9 behandelten NCI/ADR-RES-Proben nicht auf Affymetrix-Chips hybridisiert, da sich hieraus vermutlich kein Informationsgewinn ergeben hätte.



**Abb. 3-101: Vergleich der deregulierten Gene zwischen M5, M6 und M10 in MCF-7-Zellen.**

Übereinstimmung der in der Affymetrix-Analyse identifizierten durch M5, M6 und M10 in MCF-7-Zellen deregulierten Gene. Es ist jeweils die Summe aus induzierten und reprimierten Genen angegeben.

M10 rief im Gegensatz zu M9 mit 16 herauf- und 5 herabregulierten Genen in MCF-7-Zellen nur sehr schwache Effekte hervor, möglicherweise aufgrund der nur unzureichenden Reduktion von MDM2 auf Transkript- und Proteinebene. Die Übereinstimmungen dieser differenziell exprimierten Gene mit den von M5 und M6 beeinflussten Genen waren recht gering, wie in Abb. 3-101 gezeigt.

In NCI/ADR-RES-Zellen hatte M10 hingegen verhältnismäßig ausgeprägte Effekte, sie führte zur Induktion von 46 und zur Repression von 13 Genen. Daraus lässt sich ableiten, dass auch diese Stealth-RNA gewisse Off-Target-Effekte ausübte. Da darüber hinaus ihre Ähnlichkeit zu den als funktionell und spezifisch bewerteten siRNAs M5 und M6 unzureichend war, wurde M10 bei den nachfolgenden Auswertungen nicht berücksichtigt.

Die funktionelle Analyse der in MCF-7-Zellen durch M5 und M6 deregulierten Gene wird unter 3.3.6.2 beschrieben und dort mit den Effekten des spezifischen MDM2-Inhibitors R206-0270 verglichen.

#### **3.3.4.12 Genexpressionsanalyse von HCT-116-Zellen nach Transfektion mit MDM2-siRNAs**

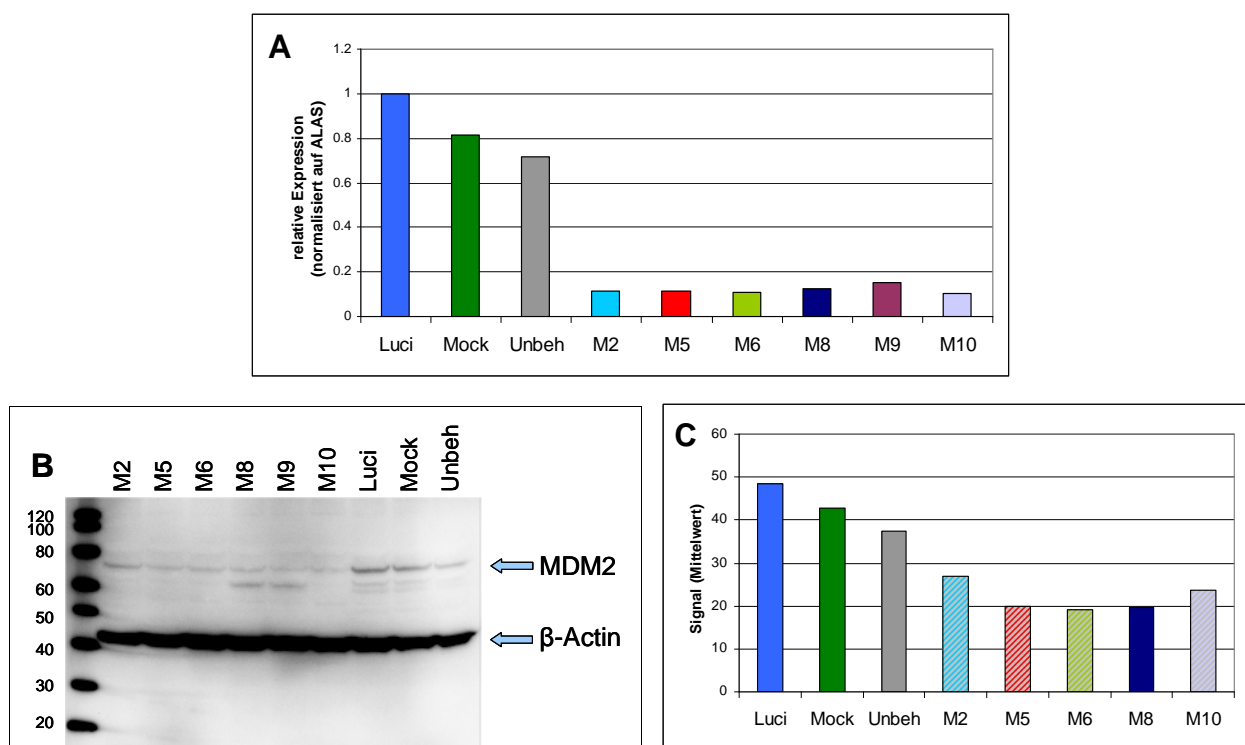
Auch HCT-116-Zellen wurden per Affymetrix-Analyse auf differenzielle Genexpression nach Transfektion mit MDM2-siRNAs untersucht. Da diese Versuche parallel zu dem unter 3.3.4.11.4 beschriebenen zweiten



Affymetrix-Ansatz mit MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen stattfanden, konnten die Stealth-RNAs M9 und M10 mit eingeschlossen werden und die als ungeeignet eingestufte Non-silencing control siRNA wurde von vornherein nicht verwendet. Die Effekte der siRNAs und Stealth-RNAs auf Morphologie, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose von HCT-116-Zellen wurden bereits unter 3.3.4.6 ff. dargestellt.

Die Transfektionen wurden mit der optimierten siRNA-Konzentration 10 nM durchgeführt, als Negativkontrollen wurden parallel Luciferase-siRNA-, mock-transfizierte und gänzlich unbehandelte Zellen kultiviert. Alle Behandlungen dauerten 48 h und erfolgten als Duplikate.

Die Ergebnisse der zur Bestätigung des effizienten Knock-downs von MDM2 durchgeführten RT-PCR-Analyse zeigt Abb. 3-102A, der entsprechende Western Blot ist in Abb. 3-102B dargestellt.



**Abb. 3-102: Silencing von MDM2 auf mRNA- und Proteinebene 48 h nach der Transfektion von HCT-116-Zellen.**

HCT-116-Zellen wurden im 6-Well-Maßstab mit den angegebenen siRNAs transfiziert bzw. Kontrollbehandlungen unterworfen. Nach 48 h wurden Lysate für die RNA- und Proteinanalytik gewonnen. Die RNA-Proben wurden sowohl für die RT-PCR als auch die Affymetrix-Analysen verwendet. **A:** RT-PCR-Ergebnisse, bezogen auf die Luciferase-siRNA-transfizierten Proben, normalisiert auf ALAS. **B:** Western Blot zum Nachweis von MDM2 mit  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle. Gesamtproteinmenge 75  $\mu$ g. Anm.: Vom Lysat der unbehandelten Zellen wurde offensichtlich zu wenig auf das Gel aufgetragen, deshalb ist die MDM2-Bande, aber auch die  $\beta$ -Actin-Kontrollbande schwächer als bei den anderen Kontrollproben. **C:** Signalhöhen des Probe Sets für MDM2 in der Affymetrix-Analyse.

Alle siRNAs führten auf mRNA-Ebene zu einem hervorragenden Silencing von MDM2. Im Western Blot waren bei allen MDM2-siRNA-transfizierten Proben noch schwache Banden zu erkennen, die Reduktion gegenüber den Negativkontrollen war dennoch deutlich. Nur im Fall von M2 war der Knock-down weniger ausgeprägt.

Im Rahmen der nachfolgenden Analyse auf Affymetrix Expressionsarrays konnte die starke Verringerung des MDM2-Transkripts bestätigt werden, dies ist in Abb. 3-102C gezeigt. Die M9-transfizierten Proben wurden aufgrund der zwischenzeitlich mit MCF-7-Zellen erhaltenen Ergebnisse nicht auf Chips hybridisiert. So wie in MCF-7-Zellen nahmen auch bei den mit MDM2-siRNA transfizierten HCT-116-Zellen die Signalintensitäten des MDM2-Probe Sets so stark ab, dass es, mit Ausnahme der M8-behandelten Probe, vom Affymetrix-Algorithmus als *absent* eingestuft wurde. Insofern ist die Höhe der Signalwerte etwas irreführend, da sie eine verhältnismäßig schwache Reduktion der Transkriptmenge suggeriert.

Nach Analyse der Affymetrix-Daten gemäß den Standardfilterkriterien wurden zunächst die Negativkontrollen miteinander verglichen. Die Anzahl der in den paarweisen Vergleichen signifikant unterschiedlichen Gene ist in Tab. 3-14 gezeigt.

	Anzahl deregulierter Affymetrix Probe Sets
<b>Luci - Mock</b>	68
<b>Luci - Unbeh</b>	49
<b>Mock - Unbeh</b>	3

**Tab. 3-14: Vergleich der Negativkontrollen des Affymetrix-Versuchs in HCT-116-Zellen.**

Die verschiedenen Negativkontrollen wurden jeweils nach den Standardfilterkriterien miteinander verglichen. Die Summe aus hoch- und herabregulierten Probe Set-IDs ist für alle paarweisen Vergleiche angegeben.

Während in diesem Fall mock-transfizierte und unbehandelte Proben nahezu identisch waren, wichen die Effekte von Luciferase-siRNA relativ deutlich von diesen ab. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Einführen kurzer dsRNA in HCT-116-Zellen gewisse Auswirkungen hat, die in MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen nicht zu beobachten waren. Da zum einen die Datenanalyse für alle drei Zellsysteme konsistent gehalten werden sollte und es zum anderen schwer zu entscheiden war, ob Luciferase-siRNA- oder mock-transfizierte Proben sinnvoller als Baseline einzusetzen waren, wurde auch bei diesem Versuch die Kombination der Daten aus Luciferase-siRNA- und Mock-Transfektion als Vergleichsgrundlage gewählt.

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der pro MDM2-siRNA gemäß den Filterkriterien deregulierten Gene im Vergleich zur Baseline ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-15 zusammengestellt.

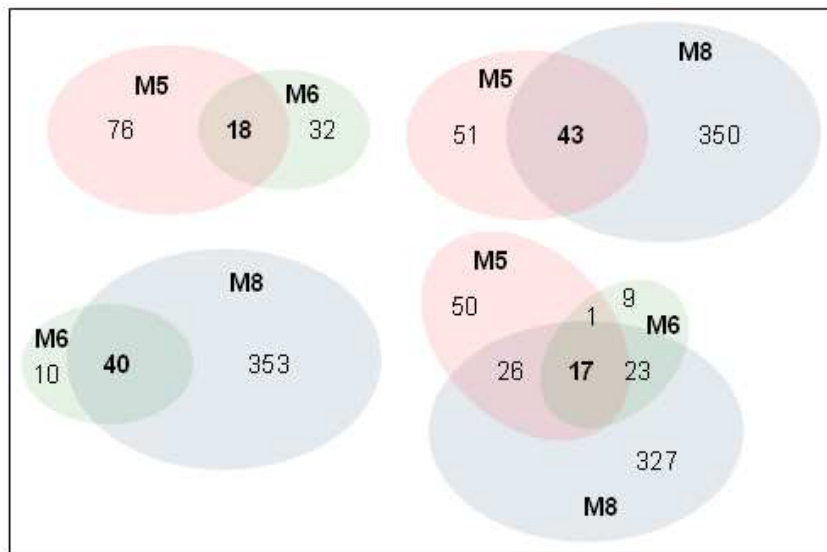
	HCT-116	
<b>M2</b>	31↑	127↓
<b>M5</b>	40↑	54↓
<b>M6</b>	16↑	34↓
<b>M8</b>	81↑	312↓
<b>M10</b>	42↑	340↓

**Tab. 3-15: Anzahl differenziell exprimierter Gene nach MDM2-siRNA-Transfektion von HCT-116-Zellen.**

Es ist die Anzahl der durch die angegebenen siRNAs im Vergleich zur kombinierten Baseline aus Luciferase-siRNA und Mock-Transfektion deregulierten Gene gezeigt. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

Die geringsten Änderungen waren für die siRNAs M5 und M6 festzustellen, während M2 etwas mehr und M8 und M10 sehr viele Gene deregulierten. Somit scheint M10 in HCT-116- ähnlich wie in NCI/ADR-RES-Zellen unspezifische Effekte zu besitzen, die in MCF-7-Zellen nicht zu beobachten waren (möglicherweise aufgrund ungenügender Transfektionseffizienz).

Beim Vergleich der deregulierten Gene zeigte sich, dass erneut M5, M6 und M8 untereinander am ähnlichsten waren. Insbesondere fand sich der Großteil der von M6 deregulierten Gene auch bei M8 wieder. M2 und M10 wichen hingegen stärker von den übrigen siRNAs ab (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3-103 sind die Venn-Diagramme für die Vergleich von M5, M6 und M8 dargestellt.



**Abb. 3-103: Übereinstimmungen zwischen den durch die MDM2-siRNAs M5, M6 und M8 deregulierten Gene in HCT-116-Zellen.**

Es sind jeweils die Summen aus induzierten und reprimierten Genen gezeigt. Die Größe der Flächen deutet die Gesamtzahl deregulierter Gene je siRNA an.

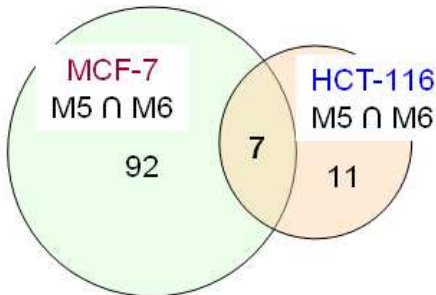
Die Übereinstimmungen zwischen M5 und M6 waren in HCT-116-Zellen nicht so ausgeprägt wie in MCF-7-Zellen. Da durch beide siRNAs und insbesondere durch M6 insgesamt nur relativ wenige Gene dereguliert wurden, kann man vermuten, dass möglicherweise die Reduktion im MDM2-Proteinspiegel nicht ganz optimal war (vgl. Western Blot-Daten, Abb. 3-102B).

M8 führte wie schon bei MCF-7- auch in HCT-116-Zellen zur differentiellen Expression zahlreicher über die Schnittmengen mit M5 und M6 hinausgehender Gene. Deren genauere Untersuchung zeigte jedoch keine Anreicherung mit interferonresponsiven Genen. Gemäß einer Angabe in der Literatur könnten HCT-116-Zellen einen Defekt in der Interferonantwort besitzen [278]. Da sie jedoch mit der Repression sehr vieler Gene und massivem Zelltod auf die M8-Transfektion reagierten, übte diese siRNA auch in HCT-116-Zellen ganz offensichtlich ausgeprägte Off-Target-Effekte aus. Deren Natur blieb allerdings unklar.

Analog zur Datenanalyse in MCF-7-Zellen wurde im Folgenden das Hauptaugenmerk auf die gemeinsam von M5 und M6 modulierten Gene gelegt, Übereinstimmungen mit M8 wurden mit einbezogen. Aufgrund

der zahlreichen Befunde, die auf unspezifische Wirkungen von M2 und M10 hindeuteten, wurden diese nicht in die weiter gehenden funktionellen Analysen einbezogen.

Die Zahl der in MCF-7- und HCT-116-Zellen übereinstimmend sowohl durch M5 als auch M6 deregulierten Gene ist sehr begrenzt, wie in Abb. 3-104 gezeigt.



**Abb. 3-104: Übereinstimmende Effekte von M5 und M6 in MCF-7- und HCT-116-Zellen.** Das Venn-Diagramm zeigt die Überlappung der in MCF-7-Zellen gefundenen Schnittmenge aus durch M5 und M6 deregulierten Genen mit der in HCT-116-Zellen gefundenen Schnittmenge derselben siRNAs. Es ist die Summe aus induzierten und reprimierten Genen angegeben.

Die funktionelle Auswertung der infolge des MDM2-Silencings in MCF-7- und/oder HCT-116-Zellen differenziell exprimierten Gene wird gemeinsam mit den Daten aus der Behandlung mit dem spezifischen MDM2-Inhibitor unter 3.3.6.2 dargestellt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede an Ort und Stelle analysieren zu können.

### 3.3.5 Inhibition der MDM2-Funktion durch den spezifischen Hemmstoff R206-0270

Im Rahmen der Suche nach onkologischen Wirkstoffen, die spezifisch die Funktion tumorrelevanter Proteine inhibieren, wurden vor einigen Jahren am Roche-Standort Penzberg potenzielle MDM2-Inhibitoren entwickelt und beforscht. Diese waren gegen die p53-Bindedomäne von MDM2 gerichtet und sollten somit spezifisch die Interaktion dieser beiden Proteine blockieren. Zur Charakterisierung der inhibitorischen Aktivität dieser Substanzen dienten biochemische Tests, und mit viel versprechenden Kandidaten wurden dann verschiedene Experimente in Zellsystemen durchgeführt. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden aus der Substanzbibliothek zwei Substanzen ausgewählt. Eine davon, R206-0270 (abgekürzt als R270), hatte in biochemischen und zellulären Versuchen eine hohe Affinität und inhibitorische Aktivität gegenüber MDM2 und die Fähigkeit zur Aktivierung von p53 bewiesen. Die andere, die das gleiche chemische Grundgerüst besitzt und die Bezeichnung R206-0402 (abgekürzt als R402) trägt, zeigte hingegen keine nennenswerte hemmende Wirkung auf MDM2 und diente in den Untersuchungen als Negativkontrolle für mögliche unspezifische Nebeneffekte der Substanzklasse.

Da analog zu den RNAi-Experimenten analysiert werden sollte, welche Wirkungen des Inhibitors p53-abhängig und somit spezifisch sind und ob er darüber hinausgehende Nebeneffekte besitzt, wurden erneut die Wildtyp-p53-Zelllinien MCF-7 und HCT-116 und die Zelllinie NCI/ADR-RES mit mutantem p53-Protein für die Versuche eingesetzt. Dies ermöglichte auch den späteren Vergleich dieses niedermolekularen

Hemmstoffs mit den siRNAs hinsichtlich der Gemeinsamkeiten und Unterschiede ihrer phänotypischen und transkriptionellen Effekte.

Aus den vor einigen Jahren bereits mit den MDM2-Inhibitoren durchgeführten Versuchsreihen war bekannt, dass diese nur bei reduzierter Serumkonzentration im Wachstumsmedium gut in die behandelten Zellen aufgenommen werden und ihre volle Wirkung entfalten können. Deshalb wurden die Zellen in allen im Folgenden beschriebenen Versuchen in Medium mit 2,5 % Serum kultiviert.

### 3.3.5.1 Ermittlung von Inhibitionskurven für R206-0270

Mit Hilfe des WST-1-Tests wurde der proliferationshemmende Effekt von R206-0270 auf MCF-7-, HCT-116- und NCI/ADR-RES-Zellen nach fünftägiger Behandlung analysiert und in Form der IC50- bzw. IC80-Werte quantifiziert. Die aus mehreren unabhängigen Bestimmungen hervorgegangenen Mittelwerte sind in Tab. 3-16 angegeben.

	<b>MCF-7</b>	<b>HCT-116</b>	<b>NCI/ADR-RES</b>
<b>IC50</b>	9,2 ± 2,0 µM	5,1 ± 0,9 µM	21,3 ± 5,5 µM
<b>IC80</b>	17,1 ± 2,7 µM	11,8 ± 3,4 µM	32 ± 7,4 µM

**Tab. 3-16: IC50- und IC80-Werte des MDM2-Inhibitors R206-0270.**

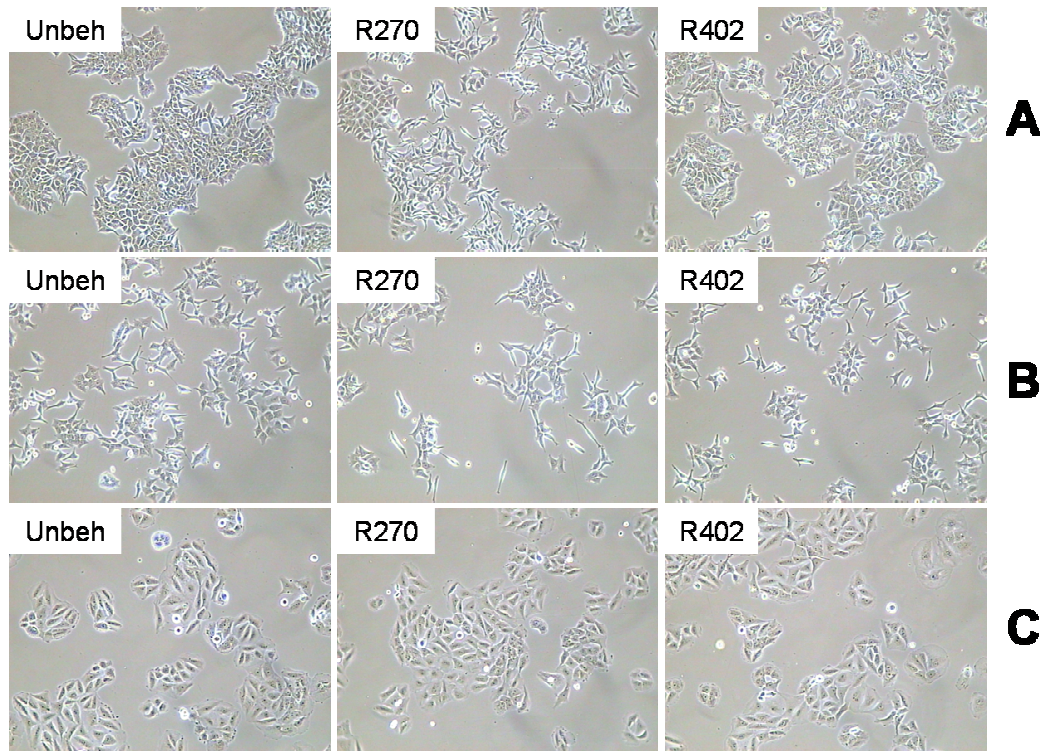
Die Wachstumsinhibition in den angegebenen Zelllinien wurde durch mehrere unabhängige WST-1-Tests nach 5 Tagen Behandlung ermittelt. Die Daten wurden in XLfit analysiert.

Die inhibitorischen Konzentrationen in der p53-mutanten Linie NCI/ADR-RES waren deutlich höher als in den Wildtyp-p53-Zellen. Die Tatsache, dass sich solche Werte überhaupt bestimmen lassen, deutet allerdings darauf hin, dass R206-0270 zumindest ab einer gewissen Dosis p53-unabhängige, möglicherweise toxische Wirkungen ausübt.

In allen folgenden Versuchen wurden die jeweiligen IC50- und/oder IC80-Konzentrationen (gerundet) für die Behandlung von MCF-7- und HCT-116-Zellen mit R206-0270 eingesetzt. NCI/ADR-RES-Zellen, die ja als Gegenstück zu MCF-7-Zellen dienten, wurden mit den für MCF-7 ermittelten IC50- und IC80-Konzentrationen behandelt. Parallel wurden die Zellen stets der Kontrollsubstanz R206-0402 ausgesetzt, in gleicher Dosis wie dem aktiven Inhibitor. In dieser Konzentration rief R206-0402 selbst eine gewisse Wachstumsinhibition hervor, was als Anzeichen dafür gedeutet werden muss, dass die Substanzklasse per se MDM2-unabhängige unspezifische Wirkungen besitzt.

### 3.3.5.2 Effekte von MDM2-Inhibitor und Kontrollsubstanz auf die Zellmorphologie

Die Fotografien in Abb. 3-105 zeigen MCF-7-, HCT-116- und NCI/ADR-RES-Zellen jeweils nach 48 h Behandlung mit R206-0270, -0402 oder Kontrollmedium mit 2,5 % Serum. Da bei den IC50-Konzentrationen keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen festzustellen waren, sind nur die mit den IC80-Konzentrationen behandelten Zellen gezeigt.



**Abb. 3-105: Zellmorphologie nach 48 h Behandlung mit R206-0270 und R206-0402.**

MCF-7-, HCT-116- und NCI/ADR-RES-Zellen wurden mit dem MDM2-Inhibitor bzw. der Kontrollsubstanz in den angegebenen Konzentrationen behandelt, als Kontrolle diente Medium mit 2,5 % Serum. Die Zellen wurden in 100facher Vergrößerung fotografiert.

**A:** MCF-7-Zellen, behandelt mit Wachstumsmedium, mit 17 µM R206-0270 oder 17 µM R206-0402.

**B:** HCT-116-Zellen, behandelt mit Wachstumsmedium, mit 12 µM R206-0270 oder 12 µM R206-0402.

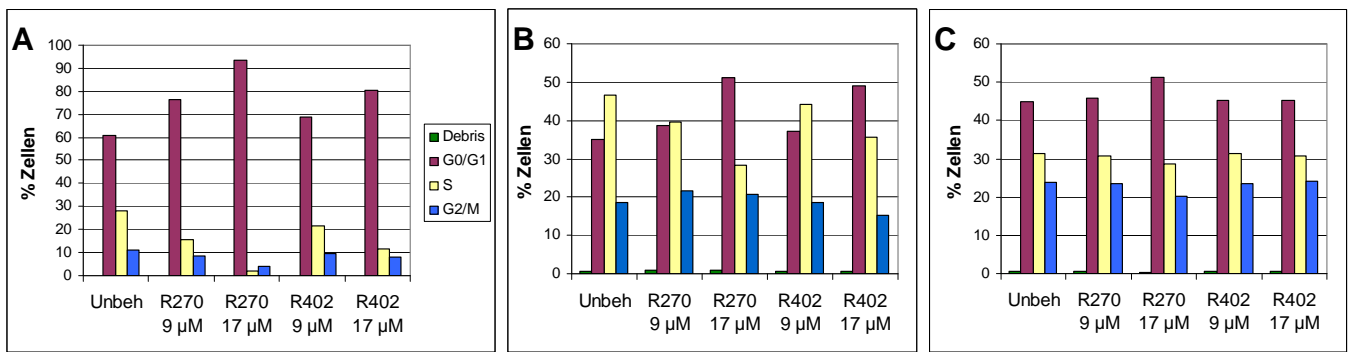
**C:** NCI/ADR-RES-Zellen, behandelt mit mit Wachstumsmedium, mit 17 µM R206-0270 oder 17 µM R206-0402.

### 3.3.5.3 Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit MDM2-Inhibitor und Kontrollsubstanz

Nach 30 h Behandlung mit dem spezifischen MDM2-Inhibitor bzw. der Kontrollsubstanz wurde die Zellzyklusverteilung im Vergleich zu unbehandelten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-106 gezeigt.

In den Wildtyp-p53-Zelllinien MCF-7 und HCT-116 lösten die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen des aktiven MDM2-Inhibitors bereits einen gewissen G<sub>1</sub>-Arrest aus, der bei Behandlung mit den IC<sub>80</sub>-Konzentrationen noch stärker ausfiel. Im Fall von MCF-7 befanden sich bei der höheren Konzentration sogar nahezu alle Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase. Die Kontrollsubstanz R206-0402 übte in der niedrigeren Konzentration nur geringe Effekte auf die Zellzyklusverteilung aus, in der höheren Dosis führte sie jedoch in den Wildtyp-p53-Zellen zu einem merklichen G<sub>1</sub>-Arrest. In NCI/ADR-RES-Zellen war nur mit der höheren Konzentration von R206-0270 eine gewisse Erhöhung des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Anteils zu beobachten, die Behandlung mit der Kontrollsubstanz blieb folgenlos.





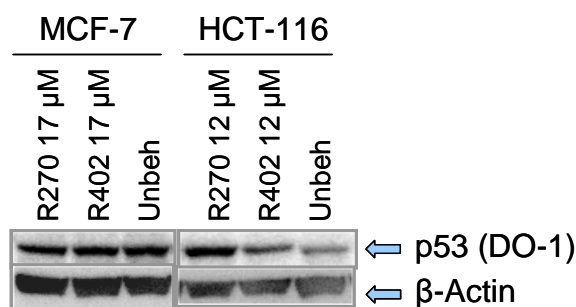
**Abb. 3-106: Einfluss von R206-0270 und -0402 auf die Zellzyklusverteilung.**

MCF-7-, HCT-116- und NCI/ADR-RES-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von R206-0270 und R206-0402 behandelt bzw. in Medium mit 2,5% Serum kultiviert. Nach 30 h wurden sie einer durchflusszytometrischen Messung zur Ermittlung der Zellzyklusverteilung unterworfen. **A:** Zellzyklusverteilung von MCF-7-Zellen; zur Behandlung wurden die IC50- (9 µM) und IC80-Konzentration (17 µM) von R206-0270 verwendet. **B:** Zellzyklusverteilung von HCT-116-Zellen; zur Behandlung wurden die IC50- (5 µM) und IC80-Konzentration (12 µM) von R206-0270 verwendet. **C:** Zellzyklusverteilung von NCI/ADR-RES-Zellen; zur Behandlung wurde R206-0270 in der für MCF-7 ermittelten IC50- (9 µM) und IC80-Konzentration (17 µM) eingesetzt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass R206-0402 unspezifische Wirkungen besitzt, die vermutlich auf den Inhibitor R206-0270 zu übertragen sind. Diese Effekte treten aber scheinbar nur in Wildtyp-p53-Zellen auf, was nahe legt, dass sie auf einer stressbedingten Aktivierung des p53-Systems beruhen. Daraus ließe sich auch der beobachtete G1-Arrest erklären.

### 3.3.5.4 p53-Western Blot

Um nachzuweisen, ob der MDM2-Inhibitor zur Erhöhung der p53-Proteinmenge führt, wurde mit Proteinlysaten aus MCF-7- und HCT-116-Zellen ein Western Blot durchgeführt (Abb. 3-107). Die Lysate stammten aus der Behandlung mit den IC80-Konzentrationen des Inhibitors und der Kontrollsubstanz in gleicher Konzentration.



**Abb. 3-107: Einfluss von R206-0270 und -0402 auf die p53-Proteinmenge.**

MCF-7- und HCT-116-Zellen wurden mit 17 bzw. 12 µM R206-0207 und -402 behandelt und nach 48 h lysiert. Das p53-Protein wurde im Western Blot unter Verwendung des Antikörpers DO-1 nachgewiesen. Der Blot wurde gestrippt und mit β-Actin-Antikörper reinkubiert, um die gleichmäßige Beladung der Gelspuren nachzuweisen. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug jeweils 70 µg.

In HCT-116-Zellen führte R206-0270 zu einer deutlichen, die Kontrollsubstanz R206-0402 zu einer schwachen Induktion von p53 auf Proteinebene. In den MCF-7-Proben ist jedoch überraschenderweise keine Erhöhung der Proteinmenge zu erkennen.

Derselbe Blot wurde gestrippt und mit dem Phospho-Serin-15-spezifischen p53-Antikörper reinkubiert, welcher bereits bei früheren p53-Western Blots beschrieben wurde (s. z. B. 3.2.6). Eine Phosphorylierung von p53 an Serin-15 deutet auf genotoxischen Stress hin. Es konnte keine solche Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt).<sup>16</sup>

### 3.3.5.5 Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit MDM2-Inhibitor und Kontrollsubstanz

Zur Untersuchung des Einflusses von R206-0270 und -0402 auf die globale Genexpression wurden Analysen auf Affymetrix GeneChip® Arrays durchgeführt. Analog zu den RNAi-Versuchen wurde eine Behandlungsdauer von 48 h gewählt. Es wurde jeweils die höhere der beiden in den bisherigen Versuchen verwendeten Substanzkonzentrationen verwendet, d. h. 17 µM in MCF-7- und NCI/ADR-RES-Zellen und 12 µM in HCT-116-Zellen sowohl für den aktiven Inhibitor als auch die Kontrollsubstanz. NCI/ADR-RES-Zellen wurden nicht mit der Kontrollsubstanz behandelt. Es wurden jeweils Duplikate angesetzt und analysiert.

Die entstandenen Daten wurden gemäß den Standardfilterparametern analysiert. Die Anzahl der nach Inhibitor- bzw. Kontrollsubstanz-Exposition als dereguliert identifizierten Gene ist in Tab. 3-17 angegeben.

	MCF-7		HCT-116		NCI/ADR-RES	
<b>R206-0270</b>	195↑	336↓	194↑	215↓	94↑	106↓
<b>R206-0402</b>	118↑	25↓	109↑	17↓	n.d.	n.d.

Tab. 3-17: Anzahl der durch R206-0270 bzw. R206-0402 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen induzierte bzw. reprimierte Gene.

↑ = induziert, ↓ = reprimiert; n.d. = Daten nicht erhoben.

Der MDM2-Inhibitor R206-0270 führte in allen drei Zelllinien zur differentiellen Expression einer Vielzahl von Genen, wobei die Effekte in den Wildtyp-p53-Zellen noch ausgeprägter waren. Die in NCI/ADR-RES-Zellen beeinflussten Gene sind als Resultate unspezifischer Effekte des MDM2-Inhibitors einzustufen, da dieser ja prinzipiell nur die p53-MDM2-Interaktion stören und somit in Zellen mit mutiertem p53-Protein wirkungslos bleiben sollte.

Die Kontrollsubstanz R206-0402 rief in MCF-7- und HCT-116-Zellen zwar schwächere, aber durchaus signifikante Änderungen hervor. Die aufgrund der phänotypischen Analysen bereits vermuteten Nebeneffekte bestätigten sich also auf Genexpressionsebene.

Um bei der Auswertung den Fokus auf die spezifischen Effekte der Blockade der p53-MDM2-Interaktion richten zu können, wurden nun zum einen solche Gene aus der Analyse ausgeschlossen, die sowohl in einer der Wildtyp-p53-Zellen als auch in NCI/ADR-RES-Zellen durch den MDM2-Inhibitor dereguliert wor-

<sup>16</sup> Parallel wurde ein Western Blot mit Zytostatika-behandelten Lysaten unter gleichen Bedingungen inkubiert und am Lumi-Imager exponiert, auf dem der phosphatspezifische Antikörper Banden erzeugte.



den waren. Zum anderen wurden die Daten von MCF-7- und HCT-116-Zellen so gefiltert, dass nur diejenigen Gene übrig blieben, die durch die Kontrollsubstanz nicht oder deutlich schwächer beeinflusst worden waren.

In Tab. 3-18 ist gezeigt, welche Auswirkungen diese Vorgehensweise auf die Anzahl der in die Analyse eingeschlossenen Gene hatte.

	MCF-7		HCT-116	
<b>ohne zusätzliche Filterung</b>	195↑	336↓	194↑	215↓
<b>(1)</b>	100↑	247↓	41↑	132↓
<b>(2)</b>	187↑	322↓	159↑	197↓
<b>(1) + (2)</b>	100↑	238↓	36↑	119↓

**Tab. 3-18: Resultat des Filterprozesses zum Ausschluss unspezifischer Expressionsänderungen.**

↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

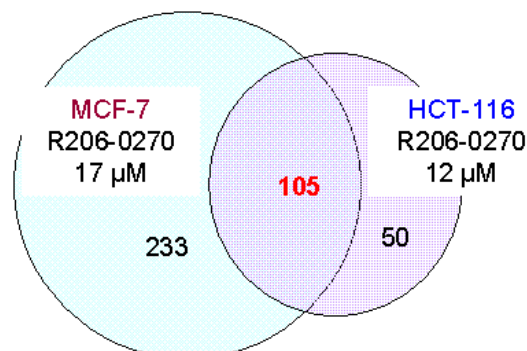
**ohne zusätzliche Filterung:** Anzahl der durch R206-0270 deregulierten Gene, basierend auf den Standardfilterkriterien (s. Tab. 3-17).

**(1)** Anzahl der in der Analyse verbleibenden Gene nach Ausschluss aller Gene, die in der jeweiligen Zelllinie auch durch R206-0402 in ähnlichem Ausmaß beeinflusst wurden wie durch R206-0270.

**(2)** Anzahl der in der Analyse verbleibenden Gene nach Ausschluss aller Gene, die in NCI/ADR-RES-Zellen ebenfalls durch R206-0270 dereguliert wurden.

**(1)+(2)** Anzahl der letztendlich in der Analyse verbleibenden Gene nach Durchführung der Filterschritte (1) und (2).

Anhand dieser Übersicht wird deutlich, dass durch den Ausschluss der auch durch die Kontrollsubstanz deregulierten Gene (Filterung (1)) eine Vielzahl von Genen „verloren geht“, während die Filterung (2), bei der die auch in NCI/ADR-RES-Zellen veränderten Gene wegfallen, die Zahlen nicht wesentlich erniedrigt. Dies bedeutet vermutlich, dass die von R206-0270 in verschiedenen Zelllinien hervorgerufenen transkriptionellen Effekte nur begrenzte Ähnlichkeit besitzen. Diese Annahme wird durch den aus den Zytostatikaversuchen erhaltenen Befund unterstützt, dass dieselbe Substanz in verschiedenen Zellsystemen sehr unterschiedliche Wirkungen erzeugt, insbesondere wenn die Zellen im p53-Status nicht übereinstimmen. Die als Kontrolle verwendete Substanz R206-0402 hat trotz fehlender inhibitorischer Wirkung auf die p53-MDM2-Interaktion viele Ähnlichkeiten zu R206-0270, vermutlich ruft ihr gemeinsames Grundgerüst also unspezifische Effekte hervor, die durch die oben beschriebene Filterung aus der endgültigen Auswertung entfernt werden konnten.



**Abb. 3-108: Übereinstimmung der Gene, die von R206-0270 in MCF-7- und HCT-116-Zellen dereguliert wurden.**

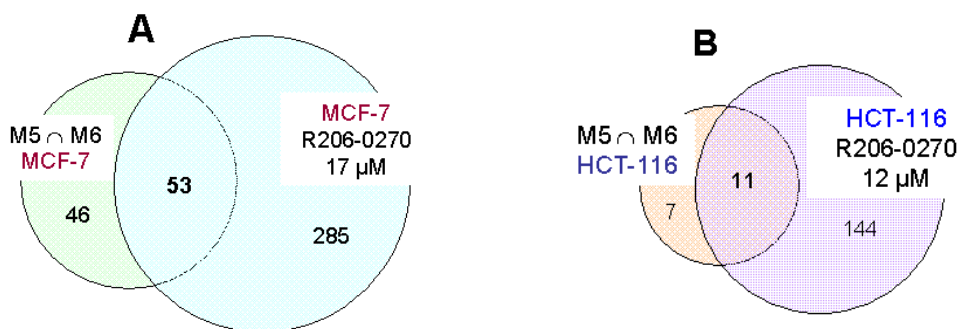
Die Daten wurden jeweils gemäß Tab. 3-18 gefiltert. Es ist die Summe aus induzierten und reprimierten Genen angegeben.

Vergleicht man nun die so gefilterten Daten zwischen MCF-7- und HCT-116-Zellen, erhält man die in Abb. 3-109 gezeigte Überlappung. Diese umfasst etwa zwei Drittel aller in HCT-116-Zellen deregulierten Gene, ist also als sehr ausgeprägt einzustufen.

### 3.3.6 Vergleich der Genexpressionsdaten von MDM2-Inhibitor und -siRNAs

#### 3.3.6.1 Zahlenmäßige Betrachtung der RNAi- und Inhibitor-Daten aus den Affymetrix-Experimenten

Im nächsten Schritt wurde verglichen, inwieweit sich die durch den MDM2-Inhibitor und die MDM2-siRNAs M5 und M6 bewirkten transkriptionellen Änderungen innerhalb eines Zellsystems ähnelten. In Abb. 3-110 sind Venn-Diagramme gezeigt, die die Übereinstimmungen zwischen der Schnittmenge aus M5 und M6 und den von R206-0270 deregulierten Genen in MCF-7- bzw. HCT-116-Zellen darstellen.



**Abb. 3-110: Übereinstimmung der Gene, die von M5 und M6 einerseits und von R206-0270 andererseits dereguliert wurden.**

Die Daten für R206-0270 wurden gemäß Tab. 3-18 gefiltert. Es ist jeweils die Summe aus induzierten und reprimierten Genen angegeben.

**A:** Vergleich in MCF-7-Zellen, **B:** Vergleich in HCT-116-Zellen.

In beiden Zelllinien änderte sich mehr als die Hälfte der durch M5 und M6 modulierten Gene auch bei der Behandlung mit R206-0270. Der Inhibitor beeinflusste darüber hinaus noch eine Vielzahl weiterer Gene, was Anzeichen einer stärkeren p53-Aktivierung sein könnte, möglicherweise aber auch durch weitere unspezifische Effekte verursacht ist, die durch die durchgeführte Filterung nicht entfernt werden konnten.

#### 3.3.6.2 Funktionelle Analyse der von den MDM2-siRNAs und/oder dem MDM2-Inhibitor modulierten Gene

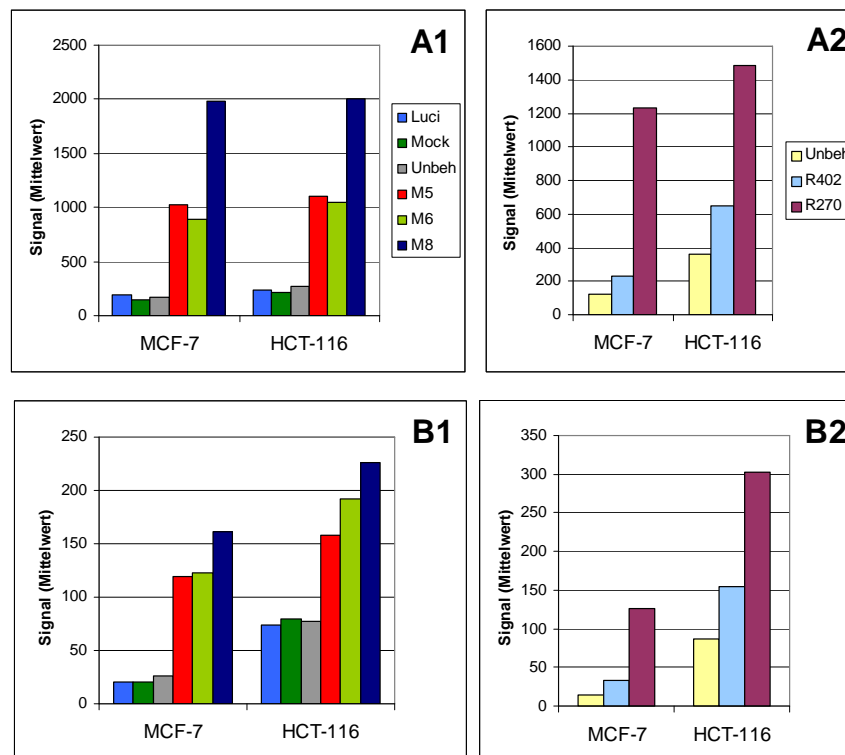
Da sowohl das Silencing von MDM2 mittels RNAi als auch seine Hemmung durch den niedermolekularen Inhibitor R206-0270 die negative Autoregulationsschleife zwischen p53 und MDM2 durchbrechen und zu einer Erhöhung der p53-Aktivität führen sollten, war zu erwarten, dass sich unter den nach siRNA-Transfektion bzw. Inhibitorbehandlung differenziell exprimierten Genen viele p53-Targets befinden würden, insbesondere in der Schnittmenge aus den verschiedenen Agenzien. Zudem war mit sekundären transkrip-

tionellen Änderungen zu rechnen, die möglicherweise den beobachteten G1-Arrest und den Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen widerspiegeln.

### 3.3.6.2.1 Häufung von p53-Targets unter den durch MDM2-siRNAs und/oder den Inhibitor deregulierten Genen

In Tab. 6-8 (S. 295) sind die aus der Literatur als p53-transaktivierbar bekannten Gene aufgeführt, die durch M5, M6 und/oder R206-0270 signifikant induziert wurden, entweder in MCF-7- oder HCT-116-Zellen oder in beiden Zellmodellen. Es ist jeweils mit angegeben, wenn auch M8 das betreffende Gen induzierte. Tab. 6-9 (S. 297) listet in analoger Weise die p53-reprimierbaren Targets auf.

Viele p53-Targets mit bekannten Funktionen in Wachstumsarrest, Seneszenz und Apoptose wurden durch die Inhibition von MDM2 transkriptionell aktiviert, u. a. die unter 3.2.8.1.1 und 3.2.8.4 schon ausführlich besprochenen Effektoren p21 und FAS (Abb. 3-111).



**Abb. 3-111: Expression von p21 und FAS nach MDM2-Silencing bzw. -Inhibition in MCF-7- und HCT-116-Zellen.**

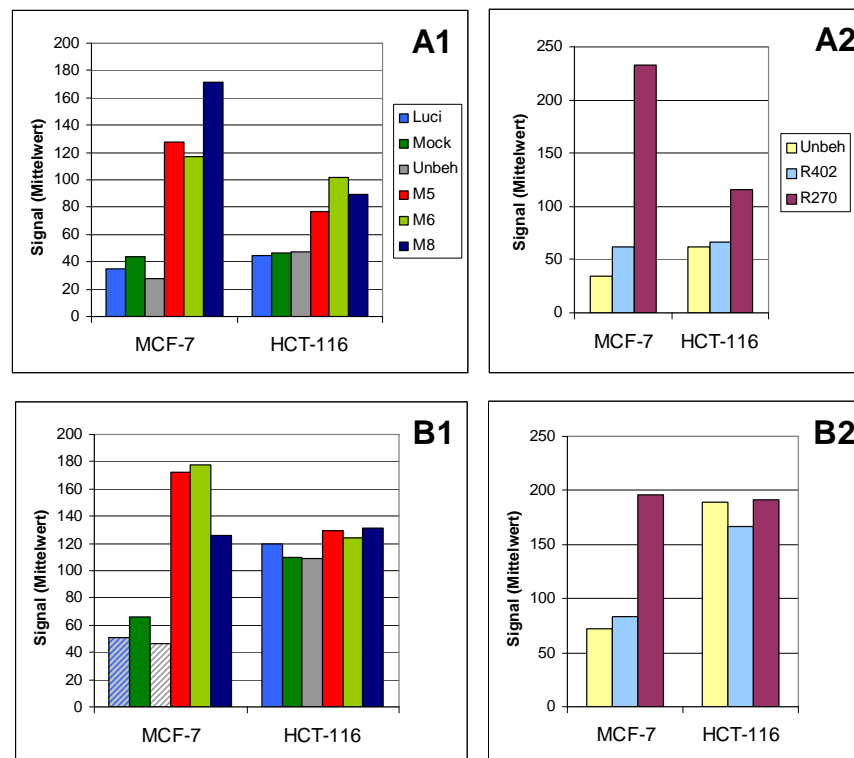
**A:** p21-Expression nach MDM2-siRNA-Transfektion (**A1**) und Inhibitorbehandlung (**A2**).

**B:** FAS-Expression (gezeigt anhand des Probe Sets 204780\_s\_at) nach MDM2-siRNA-Transfektion (**B1**) und -Inhibitorbehandlung (**B2**).

Beide Transkripte wurden zwar durch die Kontrollsubstanz hochreguliert, jedoch wesentlich weniger stark als durch den aktiven MDM2-Inhibitor. Da sowohl von p21 als auch von FAS bekannt ist, dass ihre Expression durch vielfältige Stressfaktoren sowohl p53-abhängig als auch -unabhängig aktiviert werden kann [13, 38, 60, 62], überrascht es nicht, dass sie durch R206-0402 aufgrund seiner unspezifischen Effekte schwach induziert wurden. Bei beiden Transkripten fällt zudem auf, dass sie durch die siRNA M8 noch

stärker heraufreguliert wurden als durch M5 und M6. Dies dürfte aus der Kombination der spezifischen, MDM2-abhängigen p53-Aktivierung mit den unspezifischen Off-Target-Effekten von M8 resultieren.

Ein weiteres p53-transaktivierbares Target, das durch MDM2-siRNAs und R206-0270 in beiden Zelllinien massiv induziert wurde, von der Kontrollsubstanz jedoch weitgehend unbeeinflusst blieb, ist  $\alpha$ 2-Actin (HUGO: ACTA2; Abb. 3-112A1 und A2). Die Expression dieses eigentlich typischerweise in glatten Muskelzellen exprimierten Zytoskelettproteins kann gemäß verschiedenen Publikationen durch p53 aktiviert werden [63, 77]. Außerdem wird berichtet, dass  $\alpha$ 2-Actin Wachstum und Motilität transformierter Zellen zu inhibieren vermag und somit als Vermittler der Tumor supprimierenden Wirkung von p53 fungieren kann [279].



**Abb. 3-112: Expression von  $\alpha$ 2-Actin und Gelsolin nach MDM2-Silencing bzw. -Inhibition.**

**A:**  $\alpha$ 2-Actin-Expression nach MDM2-siRNA-Transfektion (A1) und Inhibitorbehandlung (A2).

**B:** Gelsolin-Expression nach MDM2-siRNA-Transfektion (B1) und Inhibitorbehandlung (B2).

Auch der Tumorsuppressor Gelsolin (HUGO: GSN) kann infolge einer p53-Aktivierung verstärkt exprimiert werden [77, 280] und wurde in MCF-7-Zellen sowohl durch die MDM2-siRNAs als auch den aktiven Inhibitor in erheblichem Ausmaß induziert (Abb. 3-112B1 und B2). In HCT-116-Zellen hingegen war keinerlei Erhöhung der Signalwerte des entsprechenden Probe Sets zu beobachten, was die allgemeine Feststellung unterstützt, dass p53 in unterschiedlichen Zellarten verschiedene Sätze von Targets aktiviert.

Sowohl  $\alpha$ 2-Actin als auch Gelsolin wurden interessanterweise durch die MDM2-siRNA M8 nicht stärker induziert als durch M5 und M6 und wurden auch durch die Kontrollsubstanz R206-0402 nicht merklich beeinflusst. Ihre Expression reagiert somit nicht auf die unspezifischen Effekte dieser Agenzien.

Das MDM2-Transkript selbst, das im Fall der siRNAs ja herabreguliert war, wurde durch den MDM2-Inhibitor in MCF-7-Zellen deutlich induziert, höchstwahrscheinlich in Folge der Aktivierung des p53-Proteins (Abb. 3-113). In HCT-116-Zellen nahm die MDM2-Transkriptmenge nur geringfügig zu.

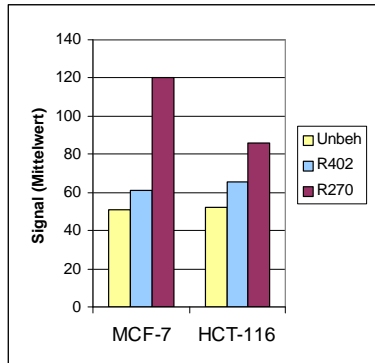
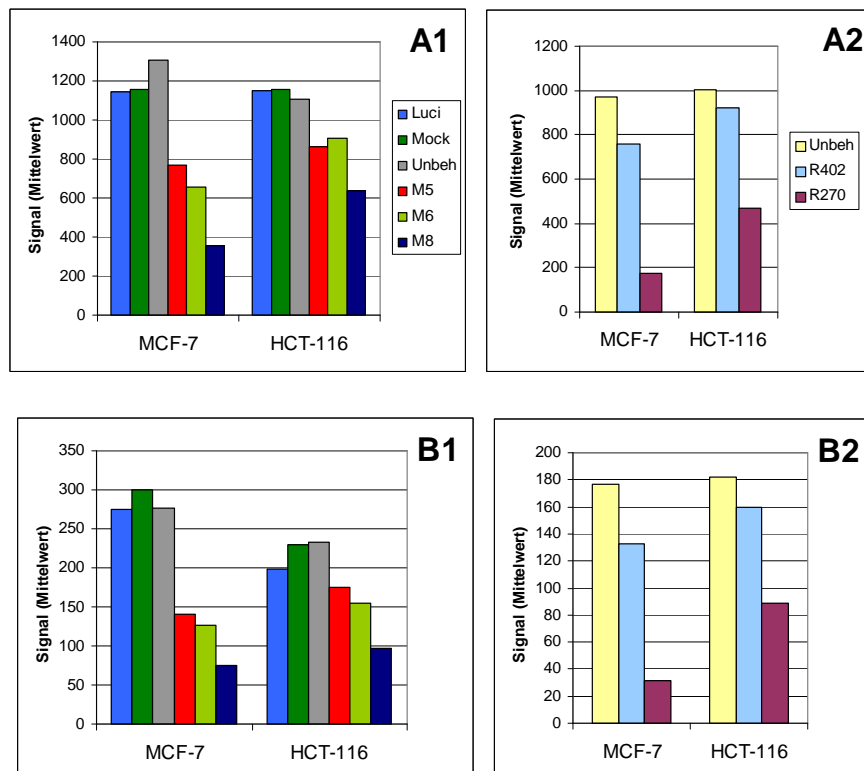
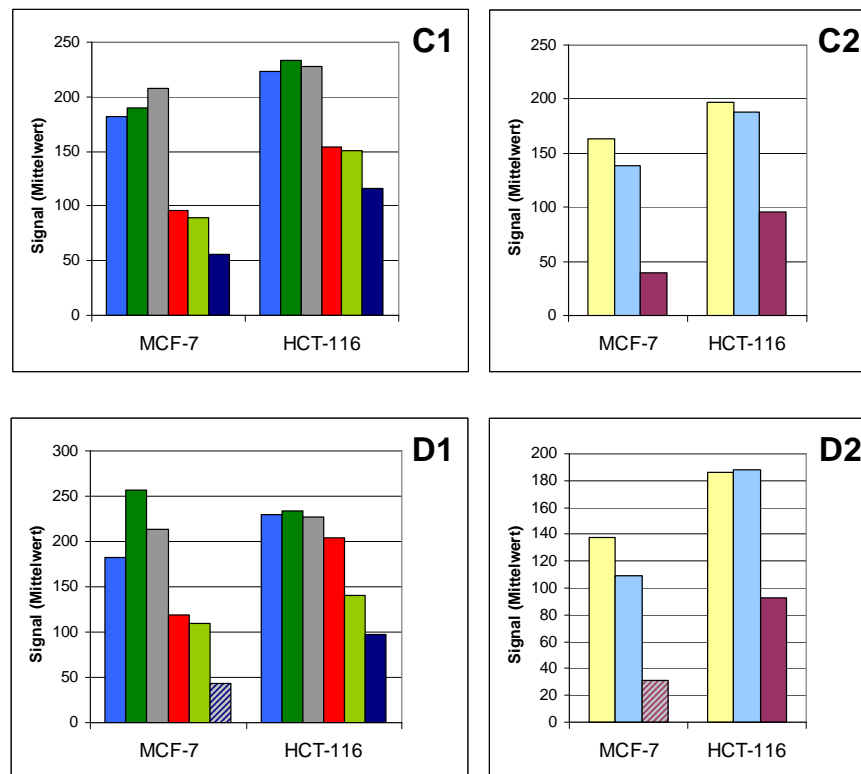


Abb. 3-113: Expression von MDM2 nach Behandlung von MCF-7- und HCT-116-Zellen mit R206-0270, RO206-0402 bzw. Kontrollmedium.

Die p53-abhängig reprimierten Gene (Tab. 6-9) umfassen zahlreiche zellzyklusrelevante Effektoren, z. B. Cyclin B1, PLK1 und BUB1, die auch durch E2F transkriptionell reguliert werden. Der an der Mitose beteiligte antiapoptotische Effektor Survivin wurde ebenfalls durch MDM2-siRNAs und den Inhibitor herabreguliert (Abb. 3-114).





**Abb. 3-114: Expression von Cyclin B1, PLK1, BUB1 und Survivin nach MDM2-Silencing und -Inhibition in MCF-7- und HCT-116-Zellen.**

**A:** Expression von Cyclin B1 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**A1**) und Inhibitorbehandlung (**A2**). **B:** Expression von PLK1 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**B1**) und Inhibitorbehandlung (**B2**). **C:** Expression von BUB1 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**C1**) und Inhibitorbehandlung (**C2**). **D:** Expression von Survivin nach MDM2-siRNA-Transfektion (**D1**) und Inhibitorbehandlung (**D2**).

Die Expressionshöhe aller gezeigten Gene wurde in HCT-116-Zellen sowohl durch R206-0270 als auch die MDM2-siRNAs weniger stark reduziert als in MCF-7-Zellen. Die siRNAs erfüllten hier teilweise nicht die Filterkriterien für signifikant deregulierte Gene. Bei mehreren Beispielen wurde die Expressionshöhe auch durch die Kontrollsubstanz leicht erniedrigt. Diese Repression korreliert mit der Tatsache, dass R206-0402 laut Zellzyklusanalyse einen gewissen G1-Arrest in MCF-7- und HCT-116-Zellen erzeugte.

Im Rahmen der Auswertung der Zytostatikaexperimente wurde vermutet, dass die Gene LGALS3 und FOXM1 p53-regulierbar sein könnten, da ihre Promotoren p53-Response-Elemente enthalten und sie nach Zytostatikaexposition induziert bzw. reprimiert waren (s. 3.2.8.1.3). Diese These kann durch die Daten aus der Behandlung mit MDM2-siRNAs und dem Inhibitor nur teilweise unterstützt werden (Abb. 3-115). LGALS3 wurde in MCF-7-Zellen zwar durch die MDM2-siRNAs, nicht aber den Inhibitor induziert; in HCT-116-Zellen war es genau umgekehrt. Im Fall von FOXM1 bewirkten jedoch sowohl die siRNAs als auch der Inhibitor in beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion der Expressionshöhe.

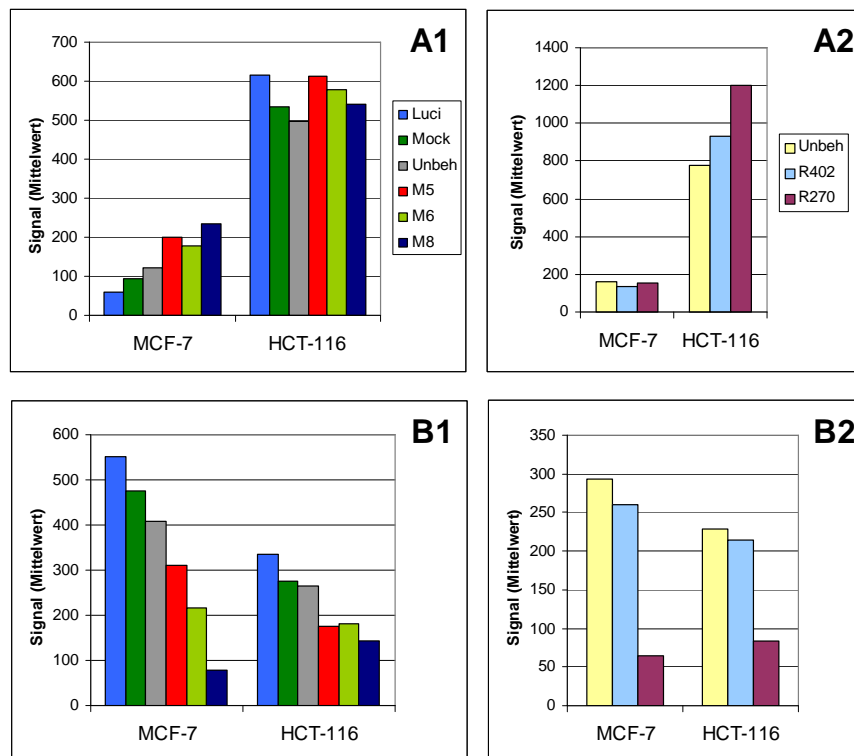


Abb. 3-115: Expression von LGALS3 und FOXM1 nach MDM2-Silencing und -Inhibition in MCF-7- und HCT-116-Zellen.

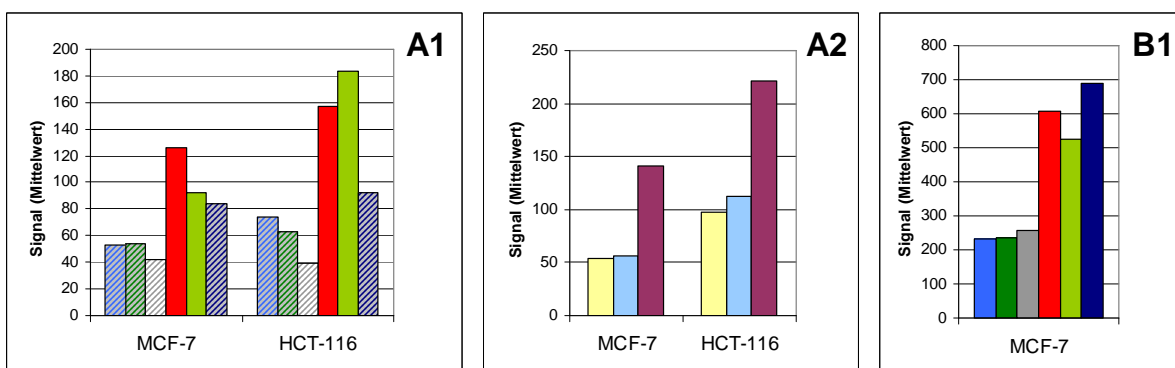
A: Expression von LGALS3 nach MDM2-siRNA-Transfektion (A1) und Inhibitorbehandlung (A2).

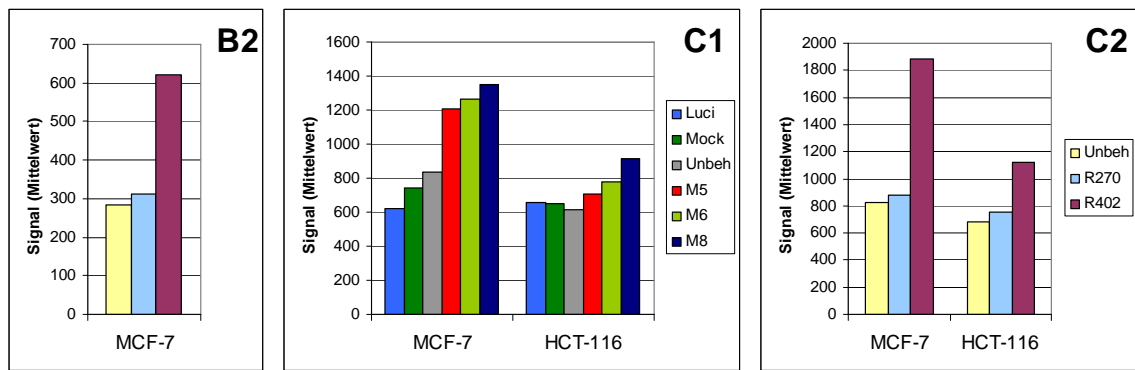
B: Expression von FOXM1 nach MDM2-siRNA-Transfektion (B1) und Inhibitorbehandlung (B2).

### 3.3.6.2.2 Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen

In Korrelation mit dem beobachteten starken G1-Arrest riefen sowohl die MDM2-siRNAs als auch der aktive Inhibitor Veränderungen der Expression von Genen hervor, die an Zellzyklusprogression, Wachstumsregulation, zellulären Kontrollpunkten oder der DNA-Reparatur beteiligt sind. In Tab. 6-10 (S. 301) sind die differenziell exprimierten Gene dieser Kategorie zusammengestellt.

Unter den induzierten Genen befinden sich hauptsächlich Wachstumsinhibitoren. Neben den bereits mehrfach beschriebenen zentralen p53-Effektoren p21 und GADD45A gehören dazu u. a. BTG2, die PI3K-Untereinheit 3 (PIK3R3) und Cyclin G1 (HUGO: CCNG1). Ihre Expressionsdaten sind in Abb. 3-116 gezeigt.





**Abb. 3-116: Expression von Wachstumsinhibitoren nach MDM2-Silencing und -Inhibition in MCF-7- und HCT-116-Zellen.**

**A:** Expression von BTG2 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**A1**) und Inhibitorbehandlung (**A2**). **B:** Expression von PIK3R3 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**B1**) und Inhibitorbehandlung (**B2**) in MCF-7-Zellen. **C:** Expression von Cyclin G2 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**C1**) und Inhibitorbehandlung (**C2**).

BTG2, auch bekannt als PC3 (*pheochromocytoma cell 3*), ist ein weiteres p53-Target [38, 77, 81] und hemmt die G1/S-Transition, indem es die Transkription der Cyclin D1- und E-Gene unterbindet und so die inaktivierende Phosphorylierung des RB-Proteins verhindert [281, 282]. Interessanterweise wurde Cyclin D1 allerdings durch die siRNA M5 in beiden Zelllinien induziert, dies könnte dadurch bedingt sein, dass auch Cyclin D1 p53-abhängig exprimiert werden kann [283, 284]. Sowohl nach Transfektion mit MDM2-siRNAs als auch Behandlung mit R206-0270 war BTG2 heraufreguliert, nicht aber nach Behandlung mit der Kontrollsubstanz R206-0402.

PIK3R3 wird auch als p55 $\gamma$  bezeichnet und ist eine regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). PIK3R3 assoziiert mit dem RB-Protein und vermittelt in Form dieses Komplexes einen Arrest in der G0/G1-Phase [285]. Der PI3K/AKT-Signalweg als Ganzes ist für die optimale Induktion von p21 nach Stressaktivierung von p53 erforderlich [58]. In MCF-7-Zellen wurde PIK3R3 sowohl durch M5, M6 und M8 als auch den aktiven Inhibitor stark induziert, in den HCT-116-Proben hingegen waren sämtliche Signale unterhalb der Detektionsschwelle (*absent Call*) und werden deshalb nicht gezeigt.

Cyclin G1 wurde bei der Darstellung der Interaktionspartner des MDM2-Proteins bereits kurz charakterisiert (s. 3.1.8). Es ist ein wichtiger Regulator des p53-MDM2-ARF-Netzwerks und scheint die p53-Aktivierung sowohl fördern als auch inhibieren zu können [2, 26, 27]. Die Expression von Cyclin G1 kann durch p53 transaktiviert werden und das Protein wird durch MDM2-abhängige Ubiquitinierung für den proteosomalen Abbau markiert [27, 284]. Seine Transkriptspiegel nahmen in MCF-7-Zellen nach siRNA-Transfektion und noch deutlicher nach Behandlung mit dem aktiven Inhibitor zu, in HCT-116-Zellen war eine entsprechende Tendenz zu erkennen, die jedoch nicht die Filterkriterien für eine signifikante Induktion erfüllte.

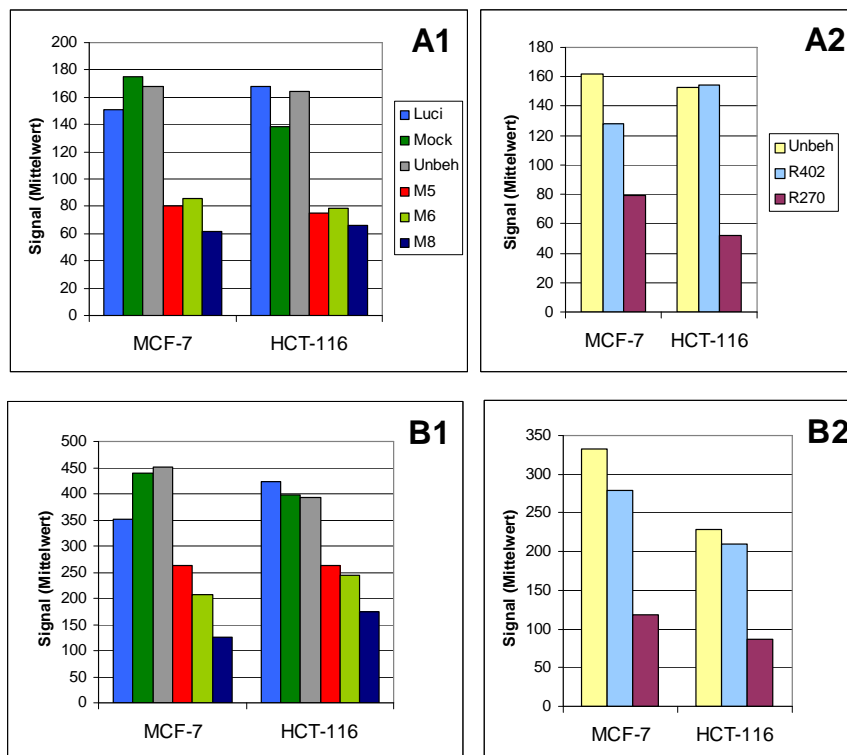
Wie aus Tab. 6-10 ersichtlich, führte die Blockade der MDM2-Funktion durch RNAi oder den niedermolekularen Inhibitor zur Repression zahlreicher an DNA-Replikation, Mitose, zellulären Checkpoints und der DNA-Reparatur beteiligter Effektoren. Sehr viele von ihnen wurden auch durch die Zytostatikabehandlung

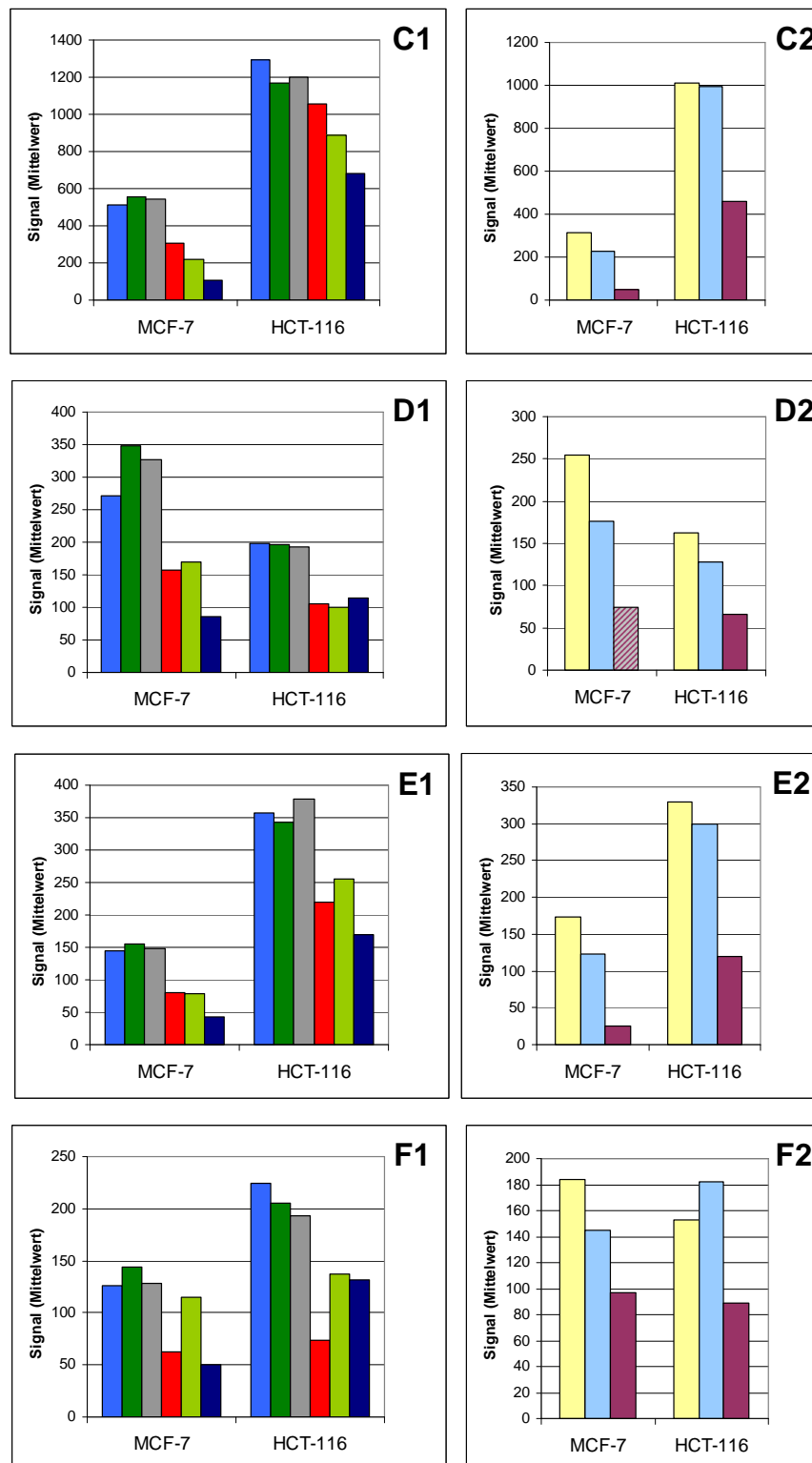


gen herabreguliert (s. 3.2.8.2). Informationen über wichtige Prozesse in der Zellzyklusprogression und der Antwort auf DNA-Schädigung, an denen die reprimierten Gene beteiligt sind, sind daher dem genannten Kapitel zu entnehmen, ebenso wie die Beschreibung ihrer transkriptionellen Regulation durch p53 und Faktoren der E2F-Familie.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass ein recht großer Anteil dieser Zellzyklusgene nur durch den MDM2-Inhibitor und die siRNA M8 herabreguliert wurde, nicht jedoch durch M5 oder M6. Dies könnte einerseits bedeuten, dass ihre Repression die Folge völlig unspezifischer bzw. toxischer Nebeneffekte von M8 und R206-0270 ist, könnte andererseits aber auch auf einer stärkeren Aktivierung des p53-Systems durch diese Agenzien im Vergleich zu M5 und M6 beruhen.

In Abb. 3-117 sind mehrere in Zellzyklusprogression oder DNA-Damage-Response involvierte Gene gezeigt, deren Expression zumindest in MCF-7-Zellen durch die weitgehend spezifisch wirkenden siRNAs M5 und M6 und den Inhibitor reduziert wurde.





**Abb. 3-117: Expression von Genen, die Effektoren der Zellzyklusprogression oder DNA-Damage-Response kodieren, nach MDM2-Silencing und -Inhibition in MCF-7- und HCT-116-Zellen.**

**A:** Expression von CDT1 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**A1**) und Inhibitorbehandlung (**A2**). **B:** Expression von MCM4 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**B1**) und Inhibitorbehandlung (**B2**). **C:** Expression von CDC20 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**C1**) und Inhibitorbehandlung (**C2**). **D:** Expression von MKLP2 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**D1**) und Inhibitorbehandlung (**D2**). **E:** Expression von HCAP-G nach MDM2-siRNA-Transfektion (**E1**) und Inhibitorbehandlung (**E2**). **F:** Expression von WEE1 nach MDM2-siRNA-Transfektion (**F1**) und Inhibitorbehandlung (**F2**).

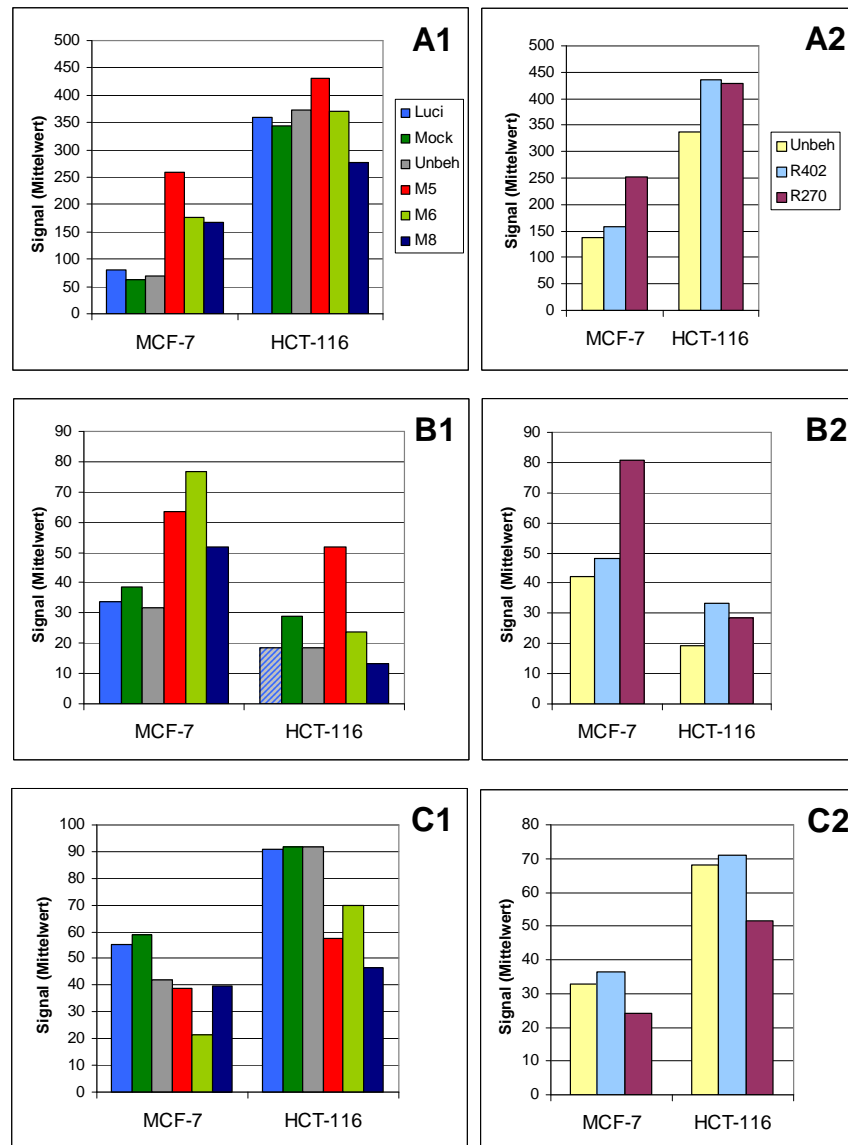
CDT1 und MCM4, deren Signalthöhen in Abb. 3-117A und B gezeigt werden, sind Bestandteile des präreplikativen Komplexes (pre-RC) und am Licensing von Replikationsursprüngen auf der DNA beteiligt, wie unter 3.2.8.2.2 bereits beschrieben. CDC20 (Abb. 3-117C) ist Bindepartner des APC-Proteinkomplexes und stimuliert dessen E3-Ligase-Aktivität. Durch APC/CDC20-vermittelte Ubiquitinierung kommt es zum Abbau von Securin und infolgedessen kann die Zelle in die Anaphase eintreten. CDC20 ist ein wichtiger Angriffspunkt des Spindelcheckpoints (s. 3.2.8.2.3.1). Das Motorprotein MKLP2 (*mitotic kinesin-like protein 2*), welches gemäß HUGO-Nomenklatur als KIFC1 bezeichnet wird, wurde ebenfalls durch MDM2-siRNAs und R206-0270 auf Transkriptebezug herabreguliert (Abb. 3-117D). Es ist an Chromosomensegregation und Zytokinese beteiligt und rekrutiert die mitotischen Kinasen Aurora B und PLK1, deren Expression ebenfalls signifikant erniedrigt wurde, zum Spindelapparat. Zudem wird es durch PLK1 phosphoryliert [286, 287]. Das ebenfalls reprimierte HCAP-G (Abb. 3-117E) gehört zur Familie der SMC-Proteine (*structural maintenance of chromosomes*). Als Bestandteil des Condensin-Komplexes ist es essenziell für die Kondensation der Chromosomen und spielt auch bei der Segregation der Schwesterchromatiden eine Rolle [288]. Weitere Komponenten des Condensin-Komplexes, wie HCAP-C (HUGO: SMC4L1, *smc4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1*), HCAP-D2 (HUGO: CNAP1, *chromosome condensation-related smc-associated protein 1*), HCAP-E (HUGO: SMC2L1, *smc2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1*), HCAP-H (HUGO: BRRN1, *barren homolog*) und das Kinesin KIF4A [289-291] wurden ebenfalls durch MDM2-siRNAs und -Inhibitor in MCF-7- und/oder HCT-116-Zellen reprimiert. WEE1 (Abb. 3-117F) ist eine am G2-Checkpoint beteiligte Kinase, die den CDC2/Cyclin B-Komplex durch Phosphorylierung inhibiert [292]. Die Expression von WEE1 kann durch aktiviertes p53-Protein reprimiert werden, gleiches gilt für CDC20 und HCAP-G [16]. Zudem finden sich für alle in Abb. 3-117 dargestellten Zellzyklusgene mit Ausnahme von HCAP-G experimentelle Daten, die belegen, dass ihre Expression durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie reguliert werden kann [65, 124].

### 3.3.6.2.3 Differenzielle Expression von Adhäsions- und Zytoskelettgenen

Nach Silencing von MDM2 waren sowohl in MCF-7- als auch HCT-116-Zellen Veränderungen des Adhäsionsverhaltens beobachtet worden. Diese waren in MCF-7-Zellen besonders ausgeprägt und äußerten sich in der Bildung langgezogener Zellfortsätze und der Vereinzelung der Zellen. In geringerem Ausmaß waren diese Effekte auch mit dem MDM2-Inhibitor R206-0270 festzustellen. Infolge dieser Befunde lag das Augenmerk bei der Evaluierung der nach MDM2-Interferenz bzw. -Inhibition differenziell exprimierten Gene auch auf deren möglicher Bedeutung in der Adhäsion und der Reorganisation des Zytoskeletts. In der Tat fanden sich speziell bei MDM2-siRNA-transfizierten MCF-7-Zellen, die die größten phänotypischen Veränderungen zeigten, eine ganze Reihe deregulierter Gene mit derartigen Funktionen. Durch den Inhibitor wurden verhältnismäßig wenige adhäsionsmodulierende Effektoren beeinflusst, gleiches galt in HCT-116-Zellen sowohl für den Inhibitor als auch die siRNAs. In Tab. 6-11 (S. 310) sind sämtliche Gene gezeigt, die in mindestens einer der beiden Zelllinien durch M5, M6 und/oder R206-0270 dereguliert wurden und denen eine Funktion in Zusammenhang mit Adhäsionsprozessen oder dem Zytoskelett zugeschrieben wird.

Die Interpretation dieser Ergebnisse wird durch die Tatsache erschwert, dass eine ganze Reihe der in der Tabelle enthaltenen Gene nicht nur die Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsion bzw. das Actinzytoskelett beeinflussen können, sondern noch an anderen physiologischen Prozessen beteiligt sind, z. B. an der Immunantwort (LGALS3, CXCL12, IFITM1) oder der Regulation der Apoptose (CSE1L, CSPG2, MUC1, GDF15 u. a.).

Beispielhaft sind in Abb. 3-118 die Expressionshöhen einiger Gene dargestellt, die eine wichtige Rolle in der Modulation der Adhäsion oder des Zytoskeletts spielen.



**Abb. 3-118: Expression von Genen, die Adhäsionsproteine oder Regulatoren des Zytoskeletts kodieren, nach MDM2-Silencing und -Inhibition in MCF-7- und HCT-116-Zellen.**

**A:** Expression von ALCAM nach MDM2-siRNA-Transfektion (**A1**) und Inhibitorbehandlung (**A2**). **B:** Expression von 14-3-3ζ nach MDM2-siRNA-Transfektion (**B1**) und Inhibitorbehandlung (**B2**). **C:** Expression von SSX2IP nach MDM2-siRNA-Transfektion (**C1**) und Inhibitorbehandlung (**C2**).

Das Zelladhäsionsmolekül ALCAM wurde in MCF-7-Zellen sowohl durch MDM2-siRNAs als auch den Inhibitor induziert, in HCT-116-Zellen blieb seine Expression aber weitgehend unverändert (Abb. 3-118A). Je

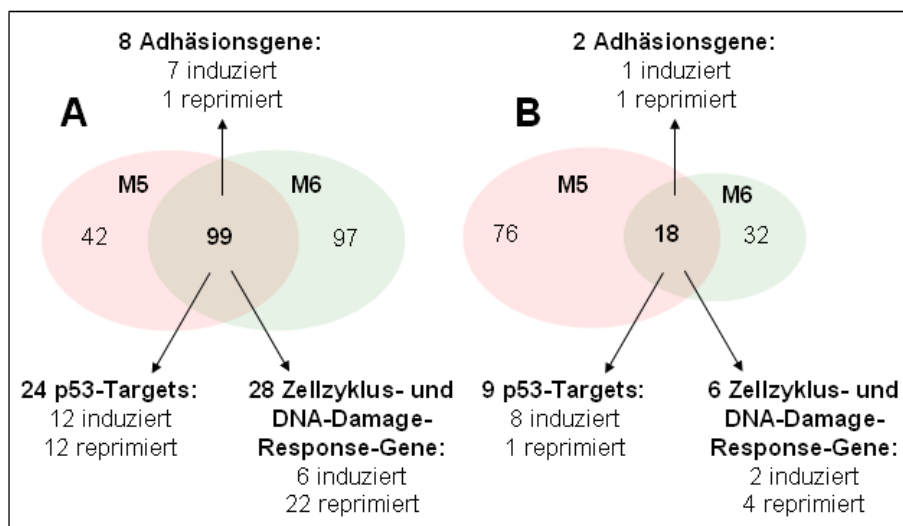
nach Studie und zellulärem Kontext wurden dem zugehörigen Protein invasionsfördernde oder -hemmende Eigenschaften zugeschrieben: Es wird dabei sowohl über positive als auch negative Korrelationen zwischen ALCAM-Expressionshöhe und Tumorgrad berichtet [293-296].

Das 14-3-3 $\zeta$ -Protein (HUGO: YWHAZ) beeinflusst die Adhäsion, u. a. indem es mit der in fokalen Adhäsionskomplexen lokalisierten Kinase p130CAS interagiert und den Integrin-Signalweg moduliert [297]. Auch durch seine Assoziation mit der Metalloproteinase ADAM22 verändert es die adhäsiven Eigenschaften und die Motilität der Zelle [298]. Darüber hinaus nimmt es Einfluss auf den MAPK- und Wnt-Signalweg [297, 299]. Seine Expression wurde in MCF-7-Zellen durch alle MDM2-siRNAs und den Inhibitor induziert, in HCT-116-Zellen nur durch siRNA M6 (Abb. 3-118B).

Das Protein SSX2IP (*synovial sarcoma, x breakpoint 2 interacting protein*) ist vermutlich an der Ausbildung des Zytoskeletts beteiligt und assoziiert im Bereich von Zell-Zell-Verbindungsstellen mit Adhäsionsmolekülen der Cadherin- und Nectin-Familie [300, 301]. In HCT-116-Zellen wurde es durch alle drei siRNAs reprimiert, in MCF-7-Zellen nur durch M6 (Abb. 3-118C). Der Inhibitor reduzierte die Signalthöhe zwar tendenziell, jedoch nicht stark genug, um die Filterkriterien zu erfüllen.

#### 3.3.6.2.4 Weitere durch M5 und M6 deregulierte Gene

Die Gene, die sowohl durch M5 und M6 dereguliert wurden, stehen mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit dem Silencing von MDM2 und den daraus resultierenden p53-abhängigen oder möglicherweise auch -unabhängigen Effekten und sind deshalb besonders interessant. Ein erheblicher Teil dieser Gene konnte den bereits untersuchten Kategorien zugeordnet werden. In Abb. 3-119 ist gezeigt, wie viele Gene aus der Schnittmenge von M5 und M6 in MCF-7- bzw. HCT-116-Zellen jeweils als p53-Target, als Zellzyklusgen und als adhäsionsrelevantes Gen eingestuft wurden.



**Abb. 3-119: Schnittmenge aus den durch die siRNAs M5 und M6 deregulierten Genen (vgl. Abb. 3-99A und Abb. 3-103) und funktionelle Zuordnung der darin enthaltenen Gene zu den Kategorien p53-Targets, Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Gene und Adhäsionsgene.**

Es sind Mehrfachnennungen möglich, d. h. ein Gen kann in zwei oder drei Kategorien enthalten sein.

**A:** Daten aus MCF-7-Zellen, **B:** Daten aus HCT-116-Zellen.

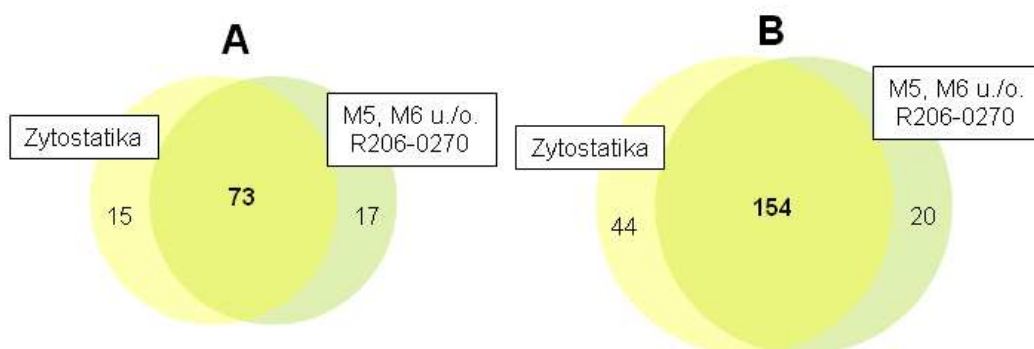
Aus dieser Darstellung lässt sich ablesen, dass viele der sowohl von M5 als auch M6 deregulierten Gene p53-Targets sind bzw. eine Rolle im Zellzyklus oder der Antwort auf DNA-Schäden spielen. Zu berücksichtigen ist, dass eine Reihe von Genen beiden Kategorien zugeordnet wurde. So sind von den 6 in MCF-7-Zellen induzierten Zellzyklus- bzw. DNA-Damage-Response-Genen 4 auch als p53-transaktivierbar beschrieben und von den 22 herabregulierten Genen dieser Kategorie können laut Literatur 7 durch p53 reprimiert werden.

In Tab. 6-12 (S. 312) und Tab. 6-13 (S. 315) sind diejenigen Gene der M5/M6-Schnittmengen in MCF-7- bzw. HCT-116-Zellen angegeben, die keiner der drei bisherigen Kategorien angehören.

Die biologischen Funktionen dieser restlichen Gene sind sehr heterogen bzw. in vielen Fällen noch nicht bekannt. Man kann allerdings mutmaßen, dass einige von ihnen an p53-abhängigen Prozessen beteiligt sein könnten. Zumindest ein Teil von ihnen wird auch durch den MDM2-Inhibitor dereguliert, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die betreffenden Gene einer p53-Regulation unterliegen. Nur ein einziges Gen findet sich sowohl in Tab. 6-12 (MCF-7-Proben) als auch Tab. 6-13 (HCT-116-Proben), und zwar KIAA0286, dessen physiologische Aufgabe unbekannt ist.

### 3.3.6.2.5 Vergleich der durch MDM2-Silencing und -Inhibition hervorgerufenen differentiellen Genexpression mit den Effekten von Zytostatika

Aus der Zusammenschau der unter 3.2 beschriebenen Zytostatikabehandlungen und ihrer Auswirkungen auf die Genexpression mit den aus MDM2-RNAi und -Inhibition erhaltenen Daten wird offensichtlich, dass große Gemeinsamkeiten zwischen den Effekten dieser antitumoralen Strategien bestehen.



**Abb. 3-120: Gemeinsamkeiten der Zytostatika-Daten und der MDM2-siRNA- bzw. Inhibitor-Daten hinsichtlich der Deregulation von p53-Targetgenen und Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen in MCF-7-Zellen.**

Es ist jeweils die Summe aus induzierten und reprimierten Genen angegeben.

**A:** Übereinstimmung zwischen den von der Mehrzahl der Zytostatika deregulierten („gemeinsamen“) p53-Targetgenen und Genen derselben Kategorie, die von M5, M6 und/oder dem Inhibitor R206-0270 moduliert wurden.

**B:** Übereinstimmung zwischen den von der Mehrzahl der Zytostatika deregulierten („gemeinsamen“) Genen, die Zellzykluseffektoren oder Proteine der DNA-Damage-Response kodieren, und Genen derselben Kategorie, die von M5, M6 und/oder dem Inhibitor R206-0270 moduliert wurden.

Am aufschlussreichsten ist der Vergleich innerhalb der Zelllinie MCF-7, da sie sowohl für Zytostatika- als auch MDM2-Experimente zum Einsatz kam. Vergleicht man nun die in den verschiedenen Ansätzen beobachteten Veränderungen in diesem Zellmodell, so stellt man fest, dass die durch MDM2-siRNAs und/oder den spezifischen Inhibitor beeinflussten Gene im Großen und Ganzen eine Teilmenge der durch Zytostatika modulierten Gene bilden. Die Übereinstimmungen erstrecken sich vornehmlich auf die Induktion und Repression von p53-Targets sowie die Dereglulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen.

In Abb. 3-120 ist in Form von Venn-Diagrammen dargestellt, wie viele Gene dieser beiden Kategorien jeweils einerseits zu den „gemeinsamen“ durch Zytostatika modulierten Genen gehörten und andererseits durch M5, M6 und/oder R206-0270 in gleicher Weise beeinflusst wurden. Wie die Größe der Überlappungen zeigt, waren die Effekte von Zytostatika und MDM2-siRNAs bzw. spezifischem Inhibitor auf die Expression von p53-Targets und zellzyklusrelevanten Genen extrem ähnlich. Für die wenigen nicht in den Schnittmengen liegenden Gene galt häufig, dass sie in der jeweils anderen Behandlungsgruppe die Filterkriterien nur knapp nicht erfüllten. So wurde beispielsweise das p53-induzierbare Target ALDH4A1 (*aldehyde dehydrogenase 4 family, member a1*) einerseits durch die siRNAs M5 und M8 hochreguliert, andererseits auch durch Zytostatika induziert, jedoch nur durch drei von ihnen (Adriamycin, Camptothecin und Cisplatin), weshalb es nicht zu den „gemeinsamen“ Genen zählte.

### 3.4 Literaturverzeichnis Kapitel 3

1. Wang, L., et al., *Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43604-10.
2. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
3. el-Deiry, W.S., et al., *Definition of a consensus binding site for p53*. Nat Genet, 1992. **1**(1): p. 45-9.
4. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
5. Petros, A.M., et al., *Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR*. FEBS Lett, 2004. **559**(1-3): p. 171-4.
6. Vassilev, L.T., et al., *In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2*. Science, 2004. **303**(5659): p. 844-848 Epub 2004 Jan 2.
7. Cadwell, C. and G.P. Zambetti, *The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth*. Gene, 2001. **277**(1-2): p. 15-30.
8. O'Farrell, T.J., et al., *Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8199-207.
9. Chene, P., *Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(2): p. 102-9.
10. Dan, S. and T. Yamori, *Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 861-7.
11. Lakin, N.D. and S.P. Jackson, *Regulation of p53 in response to DNA damage*. Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7644-55.
12. Shah, M.A. and G.K. Schwartz, *Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(8): p. 2168-81.
13. Kramer, D.L., et al., *Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype*. Cancer Res, 2001. **61**(21): p. 7754-62.
14. Chang, B.D., et al., *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 389-94.
15. Hirose, T., et al., *p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y*. Oncogene, 2003. **22**(49): p. 7762-73.
16. Kho, P.S., et al., *p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21183-92 Epub 2004 Mar 11.
17. Longley, D.B. and P.G. Johnston, *Molecular mechanisms of drug resistance*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 275-92.
18. Blagosklonny, M.V., *P53: an ubiquitous target of anticancer drugs*. Int J Cancer, 2002. **98**(2): p. 161-6.

19. Moll, U.M. and O. Petrenko, *The MDM2-p53 interaction*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1001-8.
20. Iwakuma, T. and G. Lozano, *MDM2, an introduction*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 993-1000.
21. Tortora, G., et al., *A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer*. Int J Cancer, 2000. **88**(5): p. 804-9.
22. Bartel, F., et al., *MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using anti-sense oligonucleotides*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(1): p. 29-35.
23. Meek, D.W. and U. Knippschild, *Posttranslational modification of MDM2*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1017-26.
24. Yang, H.Y., et al., *14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(20): p. 7096-107.
25. Kimura, S.H. and H. Nojima, *Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein*. Genes Cells, 2002. **7**(8): p. 869-80.
26. Ohtsuka, T., et al., *The negative role of cyclin G in ATM-dependent p53 activation*. Oncogene, 2004. **23**(31): p. 5405-8.
27. Zhao, L., et al., *Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(3): p. 195-206.
28. Ganguli, G. and B. Wasylyk, *p53-independent functions of MDM2*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1027-35.
29. Wang, H., et al., *Experimental therapy of human prostate cancer by inhibiting MDM2 expression with novel mixed-backbone antisense oligonucleotides: In vitro and in vivo activities and mechanisms*. Prostate, 2003. **54**(3): p. 194-205.
30. Liu, T.G., et al., *Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer*. Cancer Gene Ther, 2004. **17**: p. 17.
31. Halaschek-Wiener, J., et al., *A novel Ras antagonist regulates both oncogenic Ras and the tumor suppressor p53 in colon cancer cells*. Mol Med, 2000. **6**(8): p. 693-704.
32. Stampfer, M., *Review of HMEC Culture System*, <http://www.lbl.gov/LBL-Programs/mrgs/review.html>. 2000.
33. Brana, M.F., et al., *Intercalators as anticancer drugs*. Curr Pharm Des, 2001. **7**(17): p. 1745-80.
34. Willmore, E., et al., *Formation and longevity of idarubicin-induced DNA topoisomerase II cleavable complexes in K562 human leukaemia cells*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(10): p. 1807-15.
35. Larsen, A.K., A.E. Escargueil, and A. Skladanowski, *Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2003. **99**(2): p. 167-81.
36. Ravi, D. and K.C. Das, *Redox-cycling of anthracyclines by thioredoxin system: increased superoxide generation and DNA damage*. Cancer Chemother Pharmacol, 2004. **54**(5): p. 449-58.
37. Hande, K.R., *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor*. Eur J Cancer, 1998. **34**(10): p. 1514-21.
38. Daoud, S.S., et al., *Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2782-93.
39. Pommier, Y., *Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints*. Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2004. **4**(5): p. 429-34.
40. Crul, M., et al., *DNA-based drug interactions of cisplatin*. Cancer Treat Rev, 2002. **28**(6): p. 291-303.
41. Boulikas, T. and M. Vougiouka, *Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review)*. Oncol Rep, 2004. **11**(3): p. 559-95.
42. Wang, Y., et al., *Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 269-73.
43. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-8.
44. Ghoshal, K. and S.T. Jacob, *An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug*. Biochem Pharmacol, 1997. **53**(11): p. 1569-75.
45. Peters, G.J., et al., *Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed*. Eur J Cancer, 2000. **36**(7): p. 916-24.
46. Grem, J.L., et al., *Sequence-dependent antagonism between fluorouracil and paclitaxel in human breast cancer cells*. Biochem Pharmacol, 1999. **58**(3): p. 477-86.
47. Makino, K., D. Yu, and M.C. Hung, *Transcriptional upregulation and activation of p55Cdc via p34(cdc2) in Taxol-induced apoptosis*. Oncogene, 2001. **20**(20): p. 2537-43.
48. Lee, L.F., et al., *Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK)*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28253-60.
49. Lee, L.F., et al., *Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5097-105.
50. Huang, Y., et al., *Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells*. Cancer Res, 2000. **60**(16): p. 4426-32.
51. Moos, P.J. and F.A. Fitzpatrick, *Taxane-mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3896-901.
52. Blagosklonny, M.V., *Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation*. Leukemia, 2001. **15**(6): p. 869-74.
53. Herr, I. and K.M. Debatin, *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2603-14.
54. Brachat, A., et al., *A microarray-based, integrated approach to identify novel regulators of cancer drug response and apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(54): p. 8361-71.
55. Friesen, C., S. Fulda, and K.M. Debatin, *Cytotoxic drugs and the CD95 pathway*. Leukemia, 1999. **13**(11): p. 1854-8.
56. Rode, H.-J., D. Eisel, and I. Frost, *Apoptosis and Cell Proliferation*. 3rd edition ed. 2004: Roche Applied Science.



57. Kaeser, M.D., S. Pebernard, and R.D. Iggo, *Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7598-605 Epub 2003 Dec 9.
58. Mitsuuchi, Y., et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel*. Cancer Res, 2000. **60**(19): p. 5390-4.
59. Pouliot, F. and C. Labrie, *Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1, Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells*. J Endocrinol, 2002. **172**(1): p. 187-98.
60. Huang, Y.Q., J.J. Li, and S. Karpatkin, *Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6462-8.
61. Micheau, O., et al., *Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(11): p. 783-9.
62. Kim, S.G., et al., *p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, CI-IB-MECA*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(5): p. 871-80.
63. Zhao, R., et al., *Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays*. Genes Dev, 2000. **14**(8): p. 981-93.
64. Hummer, B.T., X.L. Li, and B.A. Hassel, *Role for p53 in gene induction by double-stranded RNA*. J Virol, 2001. **75**(16): p. 7774-7.
65. Bracken, A.P., et al., *E2F target genes: unraveling the biology*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(8): p. 409-17.
66. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4212-9.
67. Liu, T., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 5034-40.
68. Troester, M.A., et al., *Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(12): p. 4218-26.
69. Monks, A., et al., *Genotoxic profiling of MCF-7 breast cancer cell line elucidates gene expression modifications underlying toxicity of the anticancer drug 2-(4-amino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazole*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(3): p. 766-72.
70. Yang, H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(10): p. 1023-9.
71. Tilly, J.L., *Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 838-48.
72. Okada, H. and T.W. Mak, *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 592-603.
73. Mirza, A., et al., *Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway*. Oncogene, 2002. **21**(17): p. 2613-22.
74. Jiang, Y., et al., *Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40511-20 Epub 2004 Jul 22.
75. Li, Y., et al., *Gene expression profiling revealed novel mechanism of action of Taxotere and Furtulon in prostate cancer cells*. BMC Cancer, 2005. **5**(1): p. 7.
76. Wang, Z., S. Fukuda, and L.M. Pelus, *Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family*. Oncogene, 2004. **23**(49): p. 8146-53.
77. Kannan, K., et al., *DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53*. Oncogene, 2001. **20**(18): p. 2225-34.
78. Yu, J., et al., *Identification and classification of p53-regulated genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14517-22.
79. Nakamura, Y., *Isolation of p53-target genes and their functional analysis*. Cancer Sci, 2004. **95**(1): p. 7-11.
80. Mirza, A., et al., *Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3645-54.
81. Maxwell, S.A. and G.E. Davis, *Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13009-14.
82. Califice, S., et al., *Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7527-36.
83. Lin, H.M., et al., *Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells*. Oncogene, 2002. **21**(52): p. 8001-10.
84. Califice, S., V. Castronovo, and F. Van Den Brule, *Galectin-3 and cancer (Review)*. Int J Oncol, 2004. **25**(4): p. 983-92.
85. Shimura, T., et al., *Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6363-7.
86. Wang, X., et al., *The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16881-6 Epub 2002 Dec 13.
87. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
88. Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner, *Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 163-71.
89. Bashir, T., et al., *Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase*. Nature, 2004. **428**(6979): p. 190-3.
90. Diffley, J.F., *Regulation of early events in chromosome replication*. Curr Biol, 2004. **14**(18): p. R778-86.
91. Kim, J.M., M. Yamada, and H. Masai, *Functions of mammalian Cdc7 kinase in initiation/monitoring of DNA replication and development*. Mutat Res, 2003. **532**(1-2): p. 29-40.
92. Sato, N., K. Arai, and H. Masai, *Human and Xenopus cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7*. Embo J, 1997. **16**(14): p. 4340-51.
93. Bailis, J.M. and S.L. Forsburg, *MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 17-21.

94. Cortez, D., G. Glick, and S.J. Elledge, *Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10078-83 Epub 2004 Jun 21.
95. Yoshida, K. and I. Inoue, *Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor*. Oncogene, 2004. **23**(37): p. 6250-60.
96. Schub, O., et al., *Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase alpha-primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38076-83 Epub 2001 Aug 13.
97. Ducoux, M., et al., *Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1)-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase delta*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49258-66 Epub 2001 Oct 10.
98. Shevelev, I.V., K. Ramadan, and U. Hubscher, *The TREX2 3'-->5' exonuclease physically interacts with DNA polymerase delta and increases its accuracy*. ScientificWorldJournal, 2002. **2**: p. 275-81.
99. Bermudez, V.P., et al., *The alternative Ctf18-Dcc1-Ctf8-replication factor C complex required for sister chromatid cohesion loads proliferating cell nuclear antigen onto DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10237-42 Epub 2003 Aug 20.
100. Fuss, J. and S. Linn, *Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8658-66 Epub 2001 Dec 10.
101. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
102. Li, L. and L. Zou, *Sensing, signaling, and responding to DNA damage: Organization of the checkpoint pathways in mammalian cells*. J Cell Biochem, 2004. **2**: p. 2.
103. Bartek, J., C. Lukas, and J. Lukas, *Checking on DNA damage in S phase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 792-804.
104. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
105. Wang, W., et al., *The human Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex stimulates flap endonuclease 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16762-7 Epub 2004 Nov 19.
106. Chan, T.A., et al., *14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 616-20.
107. Brunet, S. and I. Vernos, *Chromosome motors on the move. From motion to spindle checkpoint activity*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 669-73.
108. Amon, A., *The spindle checkpoint*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(1): p. 69-75.
109. Fang, G., *Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 755-66.
110. Ren, B., et al., *E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints*. Genes Dev, 2002. **16**(2): p. 245-56.
111. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1999. **13**(7): p. 768-85.
112. Friedberg, E.C., *How nucleotide excision repair protects against cancer*. Nature Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 22-33.
113. Krokan, H.E., et al., *Base excision repair of DNA in mammalian cells*. FEBS Lett, 2000. **476**(1-2): p. 73-7.
114. Kolodner, R.D. and G.T. Marsischky, *Eukaryotic DNA mismatch repair*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(1): p. 89-96.
115. Irving, J.A. and A.G. Hall, *Mismatch repair defects as a cause of resistance to cytotoxic drugs*. Expert Rev Anticancer Ther, 2001. **1**(1): p. 149-58.
116. van Gent, D.C., J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(3): p. 196-206.
117. D'Andrea, A.D. and M. Grompe, *The Fanconi anaemia/BRCA pathway*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 23-34.
118. Futaki, M. and J.M. Liu, *Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex*. Trends Mol Med, 2001. **7**(12): p. 560-5.
119. Bastians, H., et al., *Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3927-41.
120. Kunitoku, N., et al., *CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function*. Dev Cell, 2003. **5**(6): p. 853-64.
121. Andrews, P.D., et al., *Mitotic mechanics: the auroras come into view*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 672-83.
122. Toyoshima-Morimoto, F., et al., *Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 215-20.
123. Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, and E. Nishida, *Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase*. EMBO Rep, 2002. **3**(4): p. 341-8 Epub 2002 Mar 15.
124. Stevaux, O. and N.J. Dyson, *A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(6): p. 684-91.
125. Weinmann, A.S., et al., *Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis*. Genes Dev, 2002. **16**(2): p. 235-44.
126. Reed, R., *Coupling transcription, splicing and mRNA export*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(3): p. 326-31.
127. Yong, J., L. Wan, and G. Dreyfuss, *Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(5): p. 226-32.
128. Pellizzoni, L., et al., *The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1*. Curr Biol, 2001. **11**(14): p. 1079-88.
129. Nilsen, T.W., *The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?* Bioessays, 2003. **25**(12): p. 1147-9.
130. Jurica, M.S. and M.J. Moore, *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 5-14.
131. Le Hir, H., et al., *The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization*. EMBO Rep, 2001. **2**(12): p. 1119-24 Epub 2001 Nov 21.

132. Le Hir, H., et al., *The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay*. *Embo J*, 2001. **20**(17): p. 4987-97.
133. Mukherjee, D., et al., *The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements*. *Embo J*, 2002. **21**(1-2): p. 165-74.
134. Jiang, T. and S. Altman, *A protein subunit of human RNase P, Rpp14, and its interacting partner, OIP2, have 3'-->5' exoribonuclease activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(8): p. 5295-300 Epub 2002 Apr 02.
135. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(10): p. 725-34.
136. Shibakura, M., et al., *Induction of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by doxorubicin in human small cell lung carcinoma cells*. *Int J Cancer*, 2003. **103**(3): p. 380-6.
137. Verhagen, A.M., et al., *TNF and CD95 promote IL-8 gene transactivation via independent elements in colon carcinoma cells*. *Cytokine*, 2001. **15**(2): p. 108-12.
138. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. *Apoptosis*, 2003. **8**(3): p. 237-49.
139. White, C.M., et al., *Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 1998. **46**(2): p. 104-12.
140. Starace, D., et al., *Characterization of signaling pathways leading to Fas expression induced by TNF-alpha: pivotal role of NF-kappaB*. *Faseb J*, 2005. **19**(3): p. 473-5 Epub 2004 Dec 15.
141. Porta, C., et al., *Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively*. *Oncogene*, 2005. **24**(4): p. 605-15.
142. Luttmann, W., et al., *Differential regulation of CD95 (Fas/APO-1) expression in human blood eosinophils*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(7): p. 2057-65.
143. Augstein, P., et al., *Fas ligand down-regulates cytokine-induced Fas receptor expression on insulinoma (NIT-1), but not islet cells, from autoimmune nonobese diabetic mice*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2747-52 Epub 2004 Mar 19.
144. Wajant, H., *TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship*. *Vitam Horm*, 2004. **67**: p. 101-32.
145. Chan, C.F., et al., *Evaluation of nuclear factor-kappaB, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4140-9.
146. Spence, M.J., et al., *Oncostatin M induces tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in Calu-1 lung carcinoma cells*. *Cytokine*, 2002. **18**(1): p. 26-34.
147. Rao, J.S., *Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(7): p. 489-501.
148. Kjoller, L., *The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility*. *Biol Chem*, 2002. **383**(1): p. 5-19.
149. Hensen, A., et al., *Comparative evaluation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression in primary breast carcinomas and on metastatic tumor cells*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(6): p. 903-9.
150. Niiya, M., et al., *Induction of TNF-alpha, uPA, IL-8 and MCP-1 by doxorubicin in human lung carcinoma cells*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003. **52**(5): p. 391-8 Epub 2003 Aug 08.
151. Lucka, L., *Struktur und Funktion von Zelladhäsionsmolekülen*, <http://userpage.chemie.fu-berlin.de/biochemie/aghucho/Einfuehrung2000/Zelladhaesion.html>. 2000.
152. Hernandez-Alcoceba, R., L. del Peso, and J.C. Lacal, *The Ras family of GTPases in cancer cell invasion*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(1): p. 65-76.
153. Chang, C.C., et al., *Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(5): p. 364-75.
154. Moritani, N.H., et al., *Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line*. *Cancer Lett*, 2003. **192**(2): p. 205-14.
155. Crean, J.K., et al., *The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 44187-94 Epub 2002 Sep 5.
156. Finzel, A.H., et al., *ICAM-1 supports adhesion of human small-cell lung carcinoma to endothelial cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2004. **21**(3): p. 185-9.
157. Roche, Y., et al., *Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway*. *Thromb Haemost*, 2003. **89**(6): p. 1089-97.
158. Subauste, M.C., D.C. Choi, and D. Proud, *Transient exposure of human bronchial epithelial cells to cytokines leads to persistent increased expression of ICAM-1*. *Inflammation*, 2001. **25**(6): p. 373-80.
159. Gorgoulis, V.G., et al., *p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner*. *Embo J*, 2003. **22**(7): p. 1567-78.
160. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(4): p. 353-7.
161. Wu, G.J., et al., *Isolation and characterization of the major form of human MUC18 cDNA gene and correlation of MUC18 over-expression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression*. *Gene*, 2001. **279**(1): p. 17-31.
162. Kristiansen, G., et al., *Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer*. *Anal Cell Pathol*, 2003. **25**(2): p. 77-81.
163. Maeda, K., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2002. **9**(3): p. 511-4.
164. Madhavan, M., et al., *Down regulation of endothelial adhesion molecules in node positive breast cancer: possible failure of host defence mechanism*. *Pathol Oncol Res*, 2002. **8**(2): p. 125-8.
165. Bergmann-Leitner, E.S. and S.I. Abrams, *Treatment of human colon carcinoma cell lines with anti-neoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 2001. **50**(9): p. 445-55.

166. Grunberg, E., K. Eckert, and H.R. Maurer, *Docetaxel treatment of HT-29 colon carcinoma cells reinforces the adhesion and immunocytotoxicity of peripheral blood lymphocytes in vitro*. *Int J Oncol*, 1998. **12**(4): p. 957-63.
167. Morlon, A. and P. Sassone-Corsi, *The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3977-82 Epub 2003 Mar 18.
168. Scholl, F.A., et al., *DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(3): p. 495-506.
169. Philippar, U., et al., *The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF*. *Mol Cell*, 2004. **16**(6): p. 867-80.
170. Laderach, D., A. Wesa, and A. Galy, *4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12*. *Cell Immunol*, 2003. **226**(1): p. 37-44.
171. Aldrian, S., et al., *Overexpression of Hsp27 in a human melanoma cell line: regulation of E-cadherin, MUC18/MCAM, and plasminogen activator (PA) system*. *Cell Stress Chaperones*, 2003. **8**(3): p. 249-57.
172. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?* *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(12): p. 966-77.
173. Gazit, G., J. Lu, and A.S. Lee, *De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999. **54**(2): p. 135-46.
174. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
175. Miyagi, T., et al., *Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells*. *Int J Urol*, 2002. **9**(10): p. 577-85.
176. Sumi, T., et al., *Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2003. **10**(3): p. 567-70.
177. Zheng, H.C., et al., *Role of PTEN and MMP-7 expression in growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma*. *Pathol Int*, 2003. **53**(10): p. 659-66.
178. Kasza, A., et al., *Epidermal growth factor and pro-inflammatory cytokines regulate the expression of components of plasminogen activation system in U373-MG astrocytoma cells*. *Cytokine*, 2001. **16**(5): p. 187-90.
179. Buchholz, M., et al., *SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo*. *Cancer Res*, 2003. **63**(16): p. 4945-51.
180. Rossignol, P., et al., *Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(11): p. 10346-56 Epub 2003 Dec 29.
181. Shridhar, R., et al., *Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(12): p. 2206-15.
182. Zhang, J., et al., *Cystatin m: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6957-64.
183. Moilanen, M., et al., *Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen*. *Biochemistry*, 2003. **42**(18): p. 5414-20.
184. Yamamoto, H., et al., *Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer*. *J Pathol*, 2003. **199**(2): p. 176-84.
185. Hardwick, J.C., et al., *Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(1): p. 111-21.
186. Langenfeld, E.M., et al., *The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells*. *Carcinogenesis*, 2003. **24**(9): p. 1445-54 Epub 2003 Jun 19.
187. Kawamura, C., M. Kizaki, and Y. Ikeda, *Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells*. *Leuk Lymphoma*, 2002. **43**(3): p. 635-9.
188. Loeb, D.M., et al., *Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(22): p. 19627-32 Epub 2002 Mar 27.
189. Idelman, G., et al., *WT1-p53 interactions in insulin-like growth factor-I receptor gene regulation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(5): p. 3474-82 Epub 2002 Nov 19.
190. Fraizer, G., et al., *Suppression of prostate tumor cell growth in vivo by WT1, the Wilms' tumor suppressor gene*. *Int J Oncol*, 2004. **24**(3): p. 461-71.
191. Wang, J., J. Shou, and X. Chen, *Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53*. *Oncogene*, 2000. **19**(14): p. 1843-8.
192. Zhang, T.F., et al., *Inhibition of breast cancer cell growth by the Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with a destabilization of beta-catenin*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(5A): p. 3575-84.
193. Ren, C., et al., *RTVP-1, a tumor suppressor inactivated by methylation in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 969-76.
194. Ren, C., et al., *mRTVP-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(10): p. 3345-57.
195. Tsanou, E., et al., *Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma*. *Histol Histopathol*, 2004. **19**(3): p. 807-13.
196. Suresh, A., et al., *Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment*. *Br J Haematol*, 2003. **120**(3): p. 457-63.
197. Delhalle, S., et al., *NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2002. **21**(24): p. 3917-24.
198. Weydert, C., et al., *Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase*. *Mol Cancer Ther*, 2003. **2**(4): p. 361-9.
199. Mantymaa, P., et al., *Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide*. *Br J Haematol*, 2000. **108**(3): p. 574-81.

200. Brenner, W., et al., *Protein kinase C eta is associated with progression of renal cell carcinoma (RCC)*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(5A): p. 4001-6.
201. Sonnemann, J., et al., *Down-regulation of protein kinase Ceta by antisense oligonucleotides sensitises A549 lung cancer cells to vincristine and paclitaxel*. *Cancer Lett*, 2004. **209**(2): p. 177-85.
202. Matsumura, M., et al., *The eta isoform of protein kinase C inhibits UV-induced activation of caspase-3 in normal human keratinocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **303**(1): p. 350-6.
203. Aeder, S.E., et al., *PKC-eta mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways*. *Oncogene*, 2004. **23**(56): p. 9062-9.
204. Bani, M.R., et al., *Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(2): p. 111-21.
205. de Angelis, P.M., et al., *Molecular characterizations of derivatives of HCT116 colorectal cancer cells that are resistant to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil*. *Int J Oncol*, 2004. **24**(5): p. 1279-88.
206. Baron, A., et al., *Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer?* *J Cell Biochem*, 2004. **91**(1): p. 47-53.
207. Menendez, J.A., et al., *Pharmacological and small interference RNA-mediated inhibition of breast cancer-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) synergistically enhances Taxol (paclitaxel)-induced cytotoxicity*. *Int J Cancer*, 2005. **18**: p. 18.
208. Ellisen, L.W., et al., *REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species*. *Mol Cell*, 2002. **10**(5): p. 995-1005.
209. Shoshani, T., et al., *Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(7): p. 2283-93.
210. Schwarzer, R., et al., *REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase*. *Oncogene*, 2005. **24**(7): p. 1138-49.
211. Elliott, R.L. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor Beta in human cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(9): p. 2078-93.
212. Lu, T., et al., *Secreted transforming growth factor beta2 activates NF-kappaB, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(18): p. 7112-7 Epub 2004 Apr 26.
213. Raju, J., B. McCarthy, and R.P. Bird, *Steady state levels of transforming growth factor-beta1 and -beta2 mRNA and protein expression are elevated in colonic tumors in vivo irrespective of dietary lipids intervention*. *Int J Cancer*, 2002. **100**(6): p. 635-41.
214. *Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(10): p. 2843-77.
215. Iltantzis, C., et al., *Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation*. *Neoplasia*, 2002. **4**(2): p. 151-63.
216. Duxbury, M.S., et al., *CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(2): p. 465-73.
217. Duxbury, M.S., et al., *Overexpression of CEACAM6 promotes insulin-like growth factor I-induced pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness*. *Oncogene*, 2004. **23**(34): p. 5834-42.
218. Volpert, O., et al., *Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35696-702 Epub 2002 Jul 16.
219. Kirshner, J., et al., *CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(2): p. 521-6 Epub 2003 Jan 9.
220. Neumaier, M., et al., *Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(22): p. 10744-8.
221. Kirshner, J., D. Schumann, and J.E. Shively, *CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(50): p. 50338-45 Epub 2003 Sep 30.
222. Ergun, S., et al., *CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor*. *Mol Cell*, 2000. **5**(2): p. 311-20.
223. Singer, B.B., I. Scheffrahn, and B. Obrink, *The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation*. *Cancer Res*, 2000. **60**(5): p. 1236-44.
224. Kuroda, J., et al., *Promotion of cell differentiation, and suppression of cell growth and cyclooxygenase-2 expression by differentiation-inducing agents in human oral squamous carcinoma SCC25 cells*. *Int J Oncol*, 2005. **26**(2): p. 361-7.
225. Luo, A., et al., *Discovery of Ca2+-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray*. *Oncogene*, 2004. **23**(6): p. 1291-9.
226. Carrilho, C., et al., *Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas*. *Hum Pathol*, 2004. **35**(5): p. 546-51.
227. Baker, H., et al., *Proteome-wide analysis of head and neck squamous cell carcinomas using laser-capture microdissection and tandem mass spectrometry*. *Oral Oncol*, 2005. **41**(2): p. 183-99.
228. Peng, Y.F., et al., *Ankyrin: a novel actin cytoskeleton-associated protein*. *Genes Cells*, 2000. **5**(12): p. 1001-8.
229. Kutty, R.K., et al., *Molecular characterization and developmental expression of NORPEG, a novel gene induced by retinoic acid*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(4): p. 2831-40 Epub 2000 Oct 19.
230. Du, Q., et al., *LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation*. *Curr Biol*, 2002. **12**(22): p. 1928-33.
231. Wang, C., et al., *The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(3): p. 567-76.

232. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.
233. Lagow, E.L. and D.D. Carson, *Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. J Cell Biochem, 2002. **86**(4): p. 759-72.
234. Ren, J., et al., *Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents*. Cancer Cell, 2004. **5**(2): p. 163-75.
235. Huang, L., et al., *MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation*. Cancer Biol Ther, 2003. **2**(6): p. 702-6.
236. Li, Y., et al., *Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene*. Oncogene, 2003. **22**(38): p. 6107-10.
237. Patel, J.H., et al., *Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 562-8.
238. Blais, J.D., et al., *Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7469-82.
239. Hung, W.J., et al., *Human BAG-1 proteins bind to the cellular stress response protein GADD34 and interfere with GADD34 functions*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3477-86.
240. Hollander, M.C., et al., *Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors*. Int J Cancer, 2001. **96**(1): p. 22-31.
241. Jang, J.S., et al., *The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates*. Oncol Res, 2004. **14**(10): p. 491-9.
242. Markert, J.M., et al., *Differential gene expression profiling in human brain tumors*. Physiol Genomics, 2001. **5**(1): p. 21-33.
243. Tansey, T.R. and I. Shechter, *Structure and regulation of mammalian squalene synthase*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 49-62.
244. Eto, M., et al., *Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44013-20 Epub 2002 Sep 6.
245. Fletcher, L., et al., *Inhibition of centrosome separation after DNA damage: a role for Nek2*. Radiat Res, 2004. **162**(2): p. 128-35.
246. Dey, A., et al., *A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6537-49.
247. Maruyama, T., et al., *A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(18): p. 6509-20.
248. Corrigan, V.M., et al., *Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4141-7.
249. Schnyder-Candrian, S. and A. Walz, *Neutrophil-activating protein ENA-78 and IL-8 exhibit different patterns of expression in lipopolysaccharide- and cytokine-stimulated human monocytes*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3888-94.
250. Larsen, L. and C. Ropke, *Suppressors of cytokine signalling: SOCS*. Apmis, 2002. **110**(12): p. 833-44.
251. Santagata, S., et al., *JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6854-7.
252. Jundt, F., et al., *Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3398-403.
253. Takekawa, M. and H. Saito, *A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK*. Cell, 1998. **95**(4): p. 521-30.
254. Morin, C.I. and J. Huot, *Recent advances in stress signaling in cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(5): p. 1893-8.
255. Bijur, G.N. and R.S. Jope, *Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37436-42.
256. Hamelers, I.H., et al., *Insulin-like growth factor I triggers nuclear accumulation of cyclin D1 in MCF-7S breast cancer cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47645-52.
257. Tsang, F.C., et al., *ING1b decreases cell proliferation through p53-dependent and -independent mechanisms*. FEBS Lett, 2003. **553**(3): p. 277-85.
258. Nouman, G.S., et al., *The role of the tumour suppressor p33 ING1b in human neoplasia*. J Clin Pathol, 2003. **56**(7): p. 491-6.
259. Cheung, K.J., Jr. and G. Li, *p33(ING1) enhances UVB-induced apoptosis in melanoma cells*. Exp Cell Res, 2002. **279**(2): p. 291-8.
260. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 457-67.
261. Sirna Therapeutics, <http://www.sirna.com/sirnaproduct/amd.html>. 2005.
262. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(9): p. 834-9 Epub 2003 Aug 24.
263. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 635-7.
264. Snove, O., Jr. and T. Holen, *Many commonly used siRNAs risk off-target activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(1): p. 256-63.
265. Sledz, C.A. and B.R. Williams, *RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 952-6.
266. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
267. Lacal, J.C., *Choline kinase: A novel target for antitumor drugs*. IDrugs, 2001. **4**(4): p. 419-426.
268. de Molina, A.R., et al., *Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6732-9.

269. Hernandez-Alcoceba, R., et al., *Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design*. *Oncogene*, 1997. **15**(19): p. 2289-301.
270. Hernandez-Alcoceba, R., F. Fernandez, and J.C. Lacal, *In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery*. *Cancer Res*, 1999. **59**(13): p. 3112-8.
271. Ramirez de Molina, A., et al., *Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K*. *Oncogene*, 2002. **21**(6): p. 937-46.
272. Rodriguez-Gonzalez, A., et al., *Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action*. *Oncogene*, 2004. **23**(50): p. 8247-59.
273. Lahiri, M. and J.H. Martin, *Reduced expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in a multidrug resistant variant of the MCF-7 human breast cancer cell line*. *Oncol Rep*, 2004. **12**(5): p. 1007-11.
274. Gehrmann, M.L., C. Fenselau, and Y. Hathout, *Highly altered protein expression profile in the adriamycin resistant MCF-7 cell line*. *J Proteome Res*, 2004. **3**(3): p. 403-9.
275. Scudiero, D.A., A. Monks, and E.A. Sausville, *Cell line designation change: multidrug-resistant cell line in the NCI anticancer screen*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(11): p. 862.
276. Moss, E.G. and J.M. Taylor, *Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(9): p. 771-2.
277. Hannon, G.J., *RNA interference*. *Nature*, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
278. Bridge, A.J., et al., *Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells*. *Nat Genet*, 2003. **34**(3): p. 263-4.
279. Okamoto-Inoue, M., et al., *The induction of smooth muscle alpha actin in a transformed rat cell line suppresses malignant properties in vitro and in vivo*. *Cancer Lett*, 1999. **142**(2): p. 173-8.
280. Kannan, K., et al., *DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1*. *Oncogene*, 2001. **20**(26): p. 3449-55.
281. Tirone, F., *The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair?* *J Cell Physiol*, 2001. **187**(2): p. 155-65.
282. Duriez, C., et al., *The human BTG2/TIS21/PC3 gene: genomic structure, transcriptional regulation and evaluation as a candidate tumor suppressor gene*. *Gene*, 2002. **282**(1-2): p. 207-14.
283. Vikhanskaya, F., et al., *Changes in cyclins and cyclin-dependent kinases induced by DNA damaging agents in a human ovarian cancer cell line expressing mutated or wild-type P53*. *Exp Cell Res*, 1996. **227**(2): p. 380-5.
284. Amundson, S.A., et al., *Physiological function as regulation of large transcriptional programs: the cellular response to genotoxic stress*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001. **129**(4): p. 703-10.
285. Xia, X., et al., *The N-terminal 24 amino acids of the p55 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(5): p. 1717-25.
286. Gruneberg, U., et al., *Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(2): p. 167-72.
287. Neef, R., et al., *Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(5): p. 863-75 Epub 2003 Aug 25.
288. Geiman, T.M., et al., *Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(9): p. 2716-29 Print 2004.
289. Schmiesing, J.A., et al., *A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of Xenopus XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(18): p. 6996-7006.
290. Mazumdar, M., S. Sundareshan, and T. Misteli, *Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation*. *J Cell Biol*, 2004. **166**(5): p. 613-20 Epub 2004 Aug 23.
291. Cabello, O.A., et al., *Cell cycle-dependent expression and nucleolar localization of hCAP-H*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(11): p. 3527-37.
292. Leach, S.D., et al., *Negative regulation of Wee1 expression and Cdc2 phosphorylation during p53-mediated growth arrest and apoptosis*. *Cancer Res*, 1998. **58**(15): p. 3231-6.
293. Kristiansen, G., et al., *ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions*. *Prostate*, 2003. **54**(1): p. 34-43.
294. van Kempen, L.C., et al., *Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis*. *J Invest Dermatol*, 2004. **122**(5): p. 1293-301.
295. King, J.A., et al., *Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator*. *Breast Cancer Res*, 2004. **6**(5): p. R478-87 Epub 2004 Jun 28.
296. Weichert, W., et al., *ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(11): p. 1160-4.
297. Wilker, E. and M.B. Yaffe, *14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(3): p. 633-42.
298. Zhu, P., et al., *The interaction between ADAM 22 and 14-3-3zeta: regulation of cell adhesion and spreading*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **301**(4): p. 991-9.
299. Tian, Q., et al., *Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(43): p. 15370-5 Epub 2004 Oct 18.
300. Asada, M., et al., *Afadin- and alpha-actinin-binding protein ADIP directly binds beta'-COP, a subunit of the coatamer complex*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**(2): p. 350-4.
301. Catley, M.C., et al., *IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase*. *FEBS Lett*, 2003. **547**(1-3): p. 75-9.

## 4 Diskussion

### 4.1 Folgerungen aus der differentiellen Expression nach Zytostatika-behandlung

Die Analyse der Effekte von Zytostatika auf das Transkriptom verschiedener Zellmodelle zeigte zum einen große Übereinstimmungen der Substanzen untereinander auf, zum anderen konnte eine erhebliche Abhängigkeit von der Zellart und ihrem p53-Status festgestellt werden.

Die Tatsache, dass die Zytostatika trotz ihrer unterschiedlichen Mechanismen ähnliche Wirkungen auf die Genexpression eines definierten Zellsystems ausüben, ist auf den ersten Blick möglicherweise überraschend. Vergegenwärtigt man sich jedoch, dass sämtliche untersuchte Substanzen direkt oder indirekt zu Schäden am Genom führen, auf die die Zelle durch die Aktivierung geeigneter Signalkaskaden zu reagieren versucht, kann man nachvollziehen, warum sie einen beträchtlichen Satz von Transkripten gleichartig induzieren oder reprimieren. Selbst das Zytostatikum Taxol, das primär nicht an der DNA selbst oder an Enzymen, die mit Nukleinsäuren interagieren, angreift, kann durch die Störung der Spindelfunktion und die daraus resultierende aberrante Mitose zu DNA-Schäden führen [1] und übt darüber hinaus vermutlich noch weitere tubulinunabhängige proapoptische Effekte aus (s. 3.2.3.6).

#### 4.1.1 Beurteilung der substanzspezifischen und -übergreifenden Effekte

Insgesamt betrachtet stimmten die verwendeten Zytostatika in ihren Wirkungen auf die globale Genexpression zwar auffallend überein, dennoch konnten mit Taxol zumindest in HT-29-Zellen gewisse substanzspezifische Änderungen auf Expressionsebene festgestellt werden und 5-FU rief sogar in mehreren Zellmodellen ein eigenständiges Muster hervor. Zudem ließen 5-FU und Taxol in vielen Fällen die von den anderen vier Substanzen modulierten Gene unbeeinflusst, obwohl sie in der äquieffektiven wachstumshemmenden Konzentration eingesetzt worden waren. Dies deutet darauf hin, dass diese beiden Agenzien etwas subtiler in zelluläre Signalwege eingreifen.

Keines der übrigen Zytostatika (Adriamycin, Cisplatin, Camptothecin und Etoposid) rief in einem der untersuchten Zellmodelle substanzspezifische Wirkungen hervor und insgesamt betrachtet waren ihre Effekte sehr ähnlich. Sie alle haben einen Wirkmechanismus, mit dem sie die Struktur der DNA ganz unmittelbar und massiv stören. 5-FU führt zwar ebenfalls zu Schäden an der DNA, und auch Taxol kann, wie bereits erläutert, die Integrität des Genoms beeinträchtigen, doch offenbar werden dadurch zumindest in manchen Zelltypen andere Signale aktiviert als bei den Topoisomerasehemmern bzw. Cisplatin.

In HT-29-Zellen hob sich 5-FU in mehrfacher Hinsicht von den restlichen Zytostatika ab. Zum einen war es als einzige Substanz in der Lage, bereits nach 24 h die Genexpression dieser Zelllinie signifikant zu verändern. Zum anderen ließ es viele Gene unbeeinflusst, die nach 72 h durch die anderen Wirkstoffe, insbe-



sondere Adriamycin, Cisplatin, Camptothecin und Etoposid, dereguliert wurden, und modulierte stattdessen die Expression eines anderen Gensatzes. Vergegenwärtigt man sich, dass 5-FU in Kombination mit Leucovorin die Standardtherapie kolorektaler Karzinome darstellt und dass HT-29-Zellen von diesem Tumortyp abgeleitet sind, gewinnen die Beobachtungen eine erhöhte Relevanz. Möglicherweise üben einige der 5-FU-spezifisch modulierten Gene eine wachstumshemmende oder proapoptotische Wirkung auf Darmtumorzellen aus, die sich mit anderen Therapeutika nicht erreichen lässt.

Ein zelllinienübergreifender, für eine einzelne Substanz charakteristischer „Fingerprint“ war jedoch nicht einmal in Ansätzen zu erkennen. Diejenigen Gene, die von einem bestimmten Zytostatikum in mehreren Zellmodellen dereguliert wurden, wurden in den meisten Fällen auch durch die anderen Zytostatika in gleicher Weise beeinflusst und stellen somit eine Art genotoxische Signatur dar. Besonders prominent war diese in Zellen mit Wildtyp-p53-Protein.

Die Publikationen, die *in vitro* oder *in vivo* die differenzielle Genexpression nach Behandlung mit einzelnen antitumoralen Agenzien untersucht haben und daraufhin ein substanzspezifisches Expressionsmuster postuliert haben, müssen entsprechend kritisch beurteilt werden, da in den meisten Fällen ein Vergleich mit anderen Substanzen fehlt [2-10]. So wurde beispielweise von Wang et al. die Genexpression der Osteosarkomzelllinie U2-OS nach Etoposidbehandlung durch Analyse auf Affymetrix-Chips analysiert und die gefundenen Gene wurden als Etoposid-responsiv eingestuft [3]. Dies ist zwar prinzipiell korrekt, sollte aber nicht zu dem Trugschluss führen, dass die identifizierten Gene auch für Etoposid charakteristisch sind und durch andere gängige Zytostatika nicht beeinflusst werden. In der Tat wurden von Wang et al. eine Reihe von Genen als dereguliert gefunden, die in der vorliegenden Arbeit zu den „gemeinsamen“ zytostatikaregulierten Genen zählten, u. a. wurden p21, Glutathionperoxidase (GPX1) und TGF $\beta$ -Rezeptor 2 (TGFBR2) induziert, die alle als p53-transaktivierbar beschrieben sind. Da U2-OS-Zellen ein Wildtyp-p53-Protein besitzen, ist dieser Befund nicht verwunderlich.

Auch die Vorstellung, man könne von einem erhaltenen Genexpressionsmuster Rückschlüsse auf den primären Angriffspunkt des verwendeten Agens ziehen, ist als problematisch einzuschätzen. Unter den im Ergebnisteil erläuterten Beispielen 5-FU- bzw. Taxol-spezifisch deregulierter Gene befanden sich ebenso wenig wie unter den restlichen Genen erkennbare Zusammenhänge mit der Substanzeigenschaft als Antimetabolit bzw. Mitosehemmstoff. Allenfalls könnte die Induktion einiger an zellulären Kontrollpunkten beteiligter Gene durch 5-FU in MDA-MB-231-Zellen ein Hinweis darauf sein, dass die Hemmung der Thymidylatsynthese und die Inkorporation falscher Nukleotide in die DNA eine Aktivierung von Damage-Response-Genen auslösen. Dies steht jedoch im Widerspruch zu der ebenfalls beobachteten Repression der zentralen Checkpointkinase ATR. Zudem konnte eine 5-FU-vermittelte Induktion von Genen, die Checkpointproteine kodieren, in keiner der anderen Zelllinien festgestellt werden.

In Anbetracht der insgesamt großen Ähnlichkeit der verwendeten Zytostatika ist es prinzipiell erstaunlich, warum bei der Anwendung am Menschen i. d. R. Zytostatikakombinationen zum Einsatz kommen. Es ist hierbei sicherlich von Vorteil, dass die Dosis der Einzelsubstanzen im Vergleich zur Monotherapie sinkt und dadurch substanzspezifische Nebenwirkungen verringert werden können. Zudem mögen zwar die DNA-Schäden, die ein Topoisomerasehemmstoff verursacht, zur Aktivierung der gleichen Signalkaskaden führen wie die durch ein Alkylans hervorgerufenen Läsionen, doch wenn sie parallel auftreten, ist die Zelle vermutlich weniger gut in der Lage, sie zu beheben. So ist z. B. für Tumoren mit Wildtyp-p53-Protein denkbar, dass es bei der Kombination verschiedener toxischer Angriffe auf die Zelle zu mehr oder anderen posttranslationalen Modifikationen des p53-Proteins durch verschiedene Enzyme der Checkpointmaschinerie kommt, p53 dadurch stärker aktiviert wird und zusätzliche oder andere Targets auf Transkriptionsebene moduliert. Somit könnte sich die Balance zwischen den verschiedenen p53-induzierten Antwortmöglichkeiten vom Wachstumsarrest mehr in Richtung Zelltod verschieben. Weitere synergistische Wirkungen von Zytostatika spielen sich möglicherweise auf Proteinebene ab und können deshalb mit einem DNA-Microarray nicht erfasst werden.

Zudem wirft die hier beobachtete Ähnlichkeit der Zytostatikawirkungen die Frage auf, warum sich die Therapieempfehlungen für verschiedene Tumortypen relativ stark unterscheiden. Die beim klinischen Vergleich verschiedener Therapieregimes festgestellten Unterschiede in Tumorregression, Überlebenszeit des Patienten usw. machen deutlich, dass die Substanzen nicht austauschbar sind.

Zu einem gewissen Teil beruht dies sicherlich auf unterschiedlichen pharmakokinetischen Parametern, die dazu führen, dass einzelne Wirkstoffe besser in bestimmte Gewebe aufgenommen werden können als andere oder dass manche Tumortypen aufgrund ihrer Enzymausstattung oder Expression von Transportproteinen leichter eine Resistenz gegen die jeweilige Substanz entwickeln oder schon a priori resistent sind. Zudem muss man sich bewusst machen, dass Standardregimes empirisch entstehen und nicht unbedingt jede Substanz in jeder Tumorart auf optimale Dosis, Applikationsform, -intervall etc. getestet wurde. Darüber hinaus wurde ja in der vorliegenden Arbeit durchaus festgestellt, dass gewisse Wirkstoffe substanzspezifische Effekte auf Tumorzellen ausüben, und dies dürfte auch in vivo der Fall sein. Und schließlich besitzen die verschiedenen Zytostatika möglicherweise unterschiedliche Wirkungen auf Nichttumorzellen, die den Therapieerfolg mit beeinflussen, insbesondere auf Immunzellen und Tumorstromazellen. Derartige Effekte konnten im Zellkulturmodell nicht erfasst werden.

#### **4.1.2 p53-abhängige differenzielle Genexpression nach Zytostatikabehandlung**

Der Einfluss des zellulären Hintergrunds auf die Effekte der Zytostatika erwies sich als enorm. Von entscheidender Bedeutung war es, ob die behandelte Zelle über ein funktionelles p53-Protein verfügte. Daraus lässt sich folgern, dass der Tumorsuppressor p53 der ihm zugeschriebenen Rolle als zentraler Vermittler der Antwort auf genotoxischen Stress in den untersuchten Zellmodellen voll gerecht wird. Die Aus-

wirkungen seiner Aktivierung scheinen die Individualität der Wildtyp-Zellen in gewissem Ausmaß zu überdecken, denn sie zeigten ausgeprägte Übereinstimmungen in den zytostatikaabhängig deregulierten Genen, beim Fehlen von funktionellem p53 wurden jedoch große zelllinienspezifische Unterschiede offenbar.

Dennoch variierten auch die Zellen mit Wildtyp-p53-Protein durchaus in ihrer Antwort auf Zytostatika. Insbesondere die nicht-transformierten HMECs reagierten verzögert auf die Substanzexposition und zeigten nach 72 h ein insgesamt verringertes Ausmaß an Veränderungen, gerade auch der p53-abhängigen Expression. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Western Blots, die – mit Ausnahme von Cisplatin – keine prominente Änderung in p53-Menge und Phosphorylierung detektieren ließen.

Für die Abweichung der HMECs von den beiden anderen Zellmodellen mit Wildtyp-p53 sind verschiedene Ursachen denkbar: Zunächst einmal waren sie mit den für MCF-7-Zellen geltenden inhibitorischen Konzentrationen behandelt worden und es ist anzunehmen, dass sie in ihrer Sensitivität von diesen abweichen. Zudem scheint die Abstufung in der Sensitivität gegenüber den verschiedenen Zytostatika nicht mit der in MCF-7-Zellen übereinzustimmen, weshalb insbesondere Cisplatin, aber auch Adriamycin und 5-FU in vielen Fällen Gene stärker deregulierten als die restlichen Zytostatika. Insofern war die für einen optimalen Vergleich notwendige Voraussetzung, dass alle Substanzen mit äquieffektiver Dosis eingesetzt wurden, im HMEC-System wahrscheinlich nicht erfüllt.

Die generell geringere Empfindlichkeit von HMECs gegenüber Zytostatika hängt vermutlich einerseits damit zusammen, dass sie als nicht-transformierte Zellen grundsätzlich besser in der Lage sind, DNA-Schäden zu beheben, während Tumorzellen intrinsische Defekte in Checkpoint- und Reparaturmechanismen besitzen [11]. Andererseits werden HMECs in einem speziellen Medium kultiviert, das zahlreiche Additiva wie z. B. Wachstumsfaktoren und Hormone enthält und die Zellen vor toxischen Angriffen schützen bzw. ihnen eine bessere Regeneration ermöglichen und sie zur Proliferation stimulieren könnte. Gegen diese Vermutung spricht allerdings, dass gerade die mit der Zellzyklusprogression zusammenhängenden Gene, die typischerweise einer Regulation durch p53 und/oder E2F unterliegen, auch in HMEC-Zellen nach 72 h Behandlung reprimiert waren. Folglich fand trotz der Stimulation durch Wachstumsfaktoren ein Proliferationsarrest statt. Zum anderen wurde beobachtet, dass der Ausgangsspiegel des p53-Targets p21 im Vergleich zu den Tumorzellen bereits sehr hoch war und dass zum 72 h-Zeitpunkt auch in unbehandelten Zellen eine schwache Phosphorylierung von p53 an Serin-15 vorlag. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen schon im Grundzustand unter Stress stehen und deshalb die Induktion der p53-abhängigen Antwort geringer ausfällt. Da die HMECs keine immortalisierte Zelllinie darstellen, die sich im Verlauf vieler Teilungszyklen an die Wachstumsbedingungen in Kultur anpassen konnte, sondern aus Primärgewebe stammen und nur wenige Passagen durchlaufen haben, kommen sie möglicherweise mit den Kulturbedingungen nicht optimal zurecht und aktivieren Signalwege der Stressantwort. Die Tatsache, dass sie ein speziell supplementiertes Medium für ihr Überleben und ihre Teilungsfähigkeit benötigen, unterstützt diese Annahme.

Wie bereits angesprochen, stimmen die Tumorzelllinien mit Wildtyp-p53-Protein in ihrer differentiellen Genexpression nach Zytostatikaexposition nur partiell überein. Diese Beobachtung bestätigt den Eindruck, den man aus der wissenschaftlichen Literatur hinsichtlich der Heterogenität p53-abhängiger transkriptioneller Effekte erhält. Es wurde bereits erläutert, dass die Aktivierung unterschiedlicher p53-Targets in verschiedenen Zellsystemen auf dem Vorhandensein p53-modifizierender Enzyme, Kofaktoren u. ä. beruhen könnte und auch ein variierendes Muster aktiver Chromatinregionen dafür verantwortlich sein könnte (s. 3.1.4). Die zwischen den Zellmodellen abweichende Kinetik spielt vermutlich ebenfalls eine Rolle, denn in A549-Zellen waren viele p53-Targets bereits nach 24 h deutlich dereguliert, während in MCF-7-Zellen eine ganze Reihe von ihnen, insbesondere die p53-reprimierbaren Gene, erst nach 72 h signifikant verändert waren. Möglicherweise könnte man also manche der in A549-Zellen modulierten Gene zu einem späteren Zeitpunkt auch in MCF-7-Zellen identifizieren.

Beim Vergleich der durch Zytostatika induzierten p53-abhängigen Gene zwischen den Zelllinien A549 und MCF-7 fiel zudem auf, dass in A549-Zellen eine größere Zahl proapoptotischer p53-Targets stimuliert wurde. Während in MCF-7-Zellen in Form der Induktion von FAS und DR5 offenbar hauptsächlich der extrinsische Weg der Apoptose aktiviert wurde, waren in A549-Zellen auch mehrere Effektoren der intrinsischen mitochondrialen Signalkaskade hochreguliert, nämlich BAX, NOXA und PUMA. Dies könnte einerseits bedeuten, dass A549- im Vergleich zu MCF-7-Zellen nach Zytostatikabehandlung verstärkt in Apoptose gehen, was sich allerdings zumindest nach 72 h noch nicht durch morphologische Veränderungen belegen lässt. Andererseits ist denkbar, dass p53 in MCF-7-Zellen ausschließlich die durch *Death receptors* vermittelte Apoptose in Gang setzt oder dass der intrinsische Weg hier erst verzögert oder nach stärkerer p53-Aktivierung stimuliert wird.

Die Beobachtung, dass ein Teil der als p53-reprimierbar beschriebenen Gene im Vergleich zu den p53-induzierbaren Targets verspätet reagiert, lässt vermuten, dass ihre Herabregulation ein sekundärer Effekt der p53-Aktivierung ist. Nur für eine Untermenge der in der Literatur beschriebenen p53-Targets wurde nachgewiesen, dass ihre Transkription unmittelbar durch p53 moduliert wird. Insbesondere bei den p53-reprimierten Genen gibt es relativ wenige Studien, die eine direkte Interaktion von p53 mit regulatorischen Gensequenzen oder konkurrierenden Transkriptionsfaktoren zeigen (z. B. für BCL2 [12]), deshalb dürften unter den Genen, für die solche Befunde nicht vorliegen, viele sekundäre p53-Targets sein. Ein beträchtlicher Teil der in den vorliegenden Daten herabregulierten potenziellen p53-Targets ist auch als E2F-abhängig charakterisiert worden. Es ist deshalb anzunehmen, dass ihre Expression indirekt infolge des p53-vermittelten Wachstumsarrests und der damit zusammenhängenden Inaktivierung bzw. fehlenden Aktivierung stimulatorischer E2F-Komplexe abnimmt. Auch in einer Publikation, die auf Untersuchungen zur differentiellen Genexpression nach adenoviraler Expression von p53 beruht, wurde beschrieben, dass die reprimierten Gene im Vergleich zu den induzierten verzögert reagierten [13].

Die Vielzahl potenzieller p53-Targets im vorliegenden Datensatz spricht eindeutig für eine starke Aktivierung der p53-abhängigen Stressantwort in A549- und MCF-7-Zellen, auch wenn manche der gefundenen Gene möglicherweise sekundäre p53-Targets sind.

Gerade bei den induzierten Genen kann zudem häufig aus Promotorbindungsstudien und/oder dem Vorliegen eines p53-Response-Elements gefolgert werden, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit primäre p53-Targets sind. Bei der Interpretation von Daten zu p53-Response-Elementen ist zudem zu bedenken, dass z. B. durch die von Wang et al. zugrunde gelegten Parameter nicht jedes bereits beschriebene p53-Target gefunden wird. So liegt das p53-Response-Element eines der bekanntesten und funktionell wichtigsten p53-aktivierbaren Gene, nämlich p21, zu weit vom ATG-Start entfernt (> 1000 bp), um die Kriterien der Studie zu erfüllen [13].

### 4.1.3 Repression von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen

In den Wildtyp-p53-Zelllinien wurden nach Zytostatikabehandlung prominente transkriptionelle Änderungen von Genen gefunden, die im Zusammenhang mit dem Zellzyklus oder der Antwort auf DNA-Schädigung stehen. Diese wurden hauptsächlich herabreguliert.

Die Repression von Genen, die an der Zellzyklusprogression beteiligte Proteine (z. B. Cycline, CDKs), DNA-Replikationsproteine (z. B. MCM-Proteine, DNA-Polymerasen) oder mitotische Effektoren (z. B. Aurora-Kinasen, Kinesine) kodieren, lässt sich problemlos in Zusammenhang mit einem Wachstumsarrest der Zellen infolge der Zytostatikaexposition bringen. Auf den ersten Blick mag es allerdings erstaunlich sein, dass nach Behandlung mit diesen genotoxischen Agenzien die Expression von Genen, deren Produkte als Reparaturenzyme, als deren Kofaktoren oder als Checkpointproteine fungieren, ebenfalls abnimmt. Dieser Befund lässt sich aber daraus erklären, dass die DNA-Reparatur ein physiologischer Prozess ist, der bevorzugt während der S- und M-Phasen des Zellzyklus aktiv oder aktivierungsbereit ist, um DNA-Schäden, die während der Replikation auftreten oder entdeckt werden, oder Fehler bei der Ausbildung des Spindelapparats zu beheben. Um Läsionen zu detektieren und eine adäquate Reaktion der Zelle anzustoßen, müssen außerdem vielfältige DNA-Damage-Response- und Checkpointproteine vorhanden sein, die gegebenenfalls einen Zellzyklusarrest und/oder DNA-Reparaturprozesse einleiten. Somit ist nachvollziehbar, dass die Expression dieser Effektoren mit der von Proteinen, die an der „normalen“ Zellzyklusprogression, der DNA-Replikation und der Zellteilung beteiligt sind, koreguliert ist.

Da die Wildtyp-p53-Zellen auf die Zytostatikabehandlung mit einer Aktivierung von p53 und einer Wachstumshemmung reagiert haben, besteht kein Zweifel, dass die verursachten Schäden detektiert wurden, dieses Alarmsignal über verschiedene Zwischenstufen weitergeleitet wurde und letztlich zur Aktivierung zellulärer Kontrollpunkte und möglicherweise auch zum Einsetzen der DNA-Reparatur geführt hat. Dies könnte als Widerspruch zur beobachteten transkriptionellen Repression der entsprechenden Gene interpretiert werden. Jedoch sind für diese Vorgänge vermutlich die zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung vorhandenen Effektorproteine ausreichend, sodass ihre Resynthese und entsprechend eine Erhöhung der

mRNA-Spiegel nicht erforderlich sind. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass Checkpoints und Reparaturmechanismen sehr rasch greifen müssen und daher eher auf posttranslationalen Aktivierungsschritten, wie z. B. Phosphorylierungen und Protein-Protein-Interaktionen, beruhen als auf der deutlich langsameren Regulation auf Transkriptions- und Translationsebene.

Für das Zustandekommen der Repression all dieser Gene wurde bereits das E2F-System diskutiert. Mechanistisch lässt sich diese Beobachtung so deuten, dass infolge eines Arrests in der G1-Phase die inhibitorischen RB-Proteine nicht von den aktivierenden Transkriptionsfaktoren E2F1–3 dissoziieren und somit im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen die Expression von E2F-Targetgenen nicht stimuliert wird. Außerdem ist denkbar, dass die Zellen nach Zytostatikaexposition in den Ruhezustand, also die G0-Phase, übergehen, was zur Folge hätte, dass die E2F-Familienmitglieder E2F4, E2F5 und E2F6 (die beiden ersteren im Komplex mit Pocket-Proteinen) an die Targetpromotoren binden, diese reprimieren und zusätzlich die Genexpression durch Rekrutierung von Chromatin-Remodellierungsfaktoren inhibieren [14]. Die E2F1–3-aktivierbaren und E2F4–6-reprimierbaren Targets stimmen nach gegenwärtigem Wissensstand überein, sodass es sich nicht entscheiden lässt, ob die Zellen aus dem Zellzyklus „austreten“ und in die Quieszenz gehen, sich in einem kurz- oder längerfristigen G1-Arrest befinden oder Seneszenz eingeleitet wird.

Abgesehen von diesen E2F-abhängigen Effekten spielt für die verminderte Expression der Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Gene vermutlich auch die bereits beschriebene direkte p53-Repression eine Rolle und möglicherweise hat auch die geringere Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie z. B. FOXM1, welches ja als potenzielles p53-reprimiertes Target diskutiert wurde, einen Einfluss.

#### **4.1.4 Hinweise auf die Induktion von Seneszenz**

Es bestehen große Übereinstimmungen zwischen den in den vorliegenden Experimenten in Wildtyp-p53-Zellen nach ein- oder dreitägiger Zytostatikaexposition differenziell exprimierten Genen und den in der Studie von Chang et al. [6] als seneszenzassoziiert identifizierten Genen (s. 3.2.8.2.7). Die Methodik dieser Studie unterschied sich allerdings merklich von der hier verwendeten, da Chang et al. die Zellen nach der Behandlung mit Adriamycin bis zu zehn Tage in wirkstofffreiem Medium beließen und dann mit proliferierenden Zellen verglichen. Die beobachtete Ähnlichkeit lässt zwei Interpretationsmöglichkeiten zu: Entweder führt eine relativ kurzfristige Zytostatikabehandlung von 24 bzw. 72 h nur zu einem vorübergehenden Wachstumsarrest, bei dem jedoch sehr viele Gene beeinflusst werden, die sich auch bei einem terminalen Arrest in gleicher Weise ändern. Es ist aber auch denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Effekte frühe Anzeichen einer durch die Zytostatika eingeleiteten Seneszenz darstellen. Die Hypothese, dass die Zellen in einen seneszenzartigen Zustand übergehen, wird durch die phänotypisch beobachtbare

Zellvergrößerung und die verstärkte Expression von Genen, die ECM-Komponenten und weitere Adhäsionsgene kodieren, unterstützt.

Die Seneszenz von Tumorzellen kann in Kultur unter Behandlungsbedingungen hervorgerufen werden, die nur minimal zytotoxisch sind. Da seneszente Zellen in einen permanenten Zellzyklusarrest übergehen und ihr klonogenes Potenzial verlieren (sog. *living death*), ist die Induktion der Seneszenz ein legitimes Ziel der Krebstherapie [15]; es muss nicht zwingend gefordert werden, dass antitumorale Wirkstoffe ihre Zielzellen in die Apoptose treiben. Bisher gibt es keine Studien am Patienten, die belegen, dass durch Zytostatikatherapie Seneszenz in Tumorzellen ausgelöst werden kann. Es gibt allerdings Hinweise, dass ionisierende Bestrahlung in humanen Tumoren zu Seneszenz führen kann. Außerdem konnte dieses Phänomen mit zahlreichen Zytostatika und anderen DNA-schädigende Agenzien *in vitro* und in Tiermodellen beobachtet werden. Jedoch scheint das Einleiten von Seneszenz nicht nur mit erwünschten Effekten verbunden zu sein, da in der Studie von Chang et al. neben der Repression von replikations- und mitoseassoziierten Genen und der Induktion von Wachstumsinhibitoren auch eine verstärkte Expression antiapoptotischer und angiogener Faktoren sowie eine Induktion von APP, dem mit der Alzheimererkrankung assoziierten Amyloid- $\beta$ -Vorläuferprotein, beobachtet wurde [6]. Das APP-Gen blieb im vorliegenden Datensatz zwar unverändert, die Induktion von Effektoren mit unerwünschten bzw. kontraproduktiven Funktionen wurde jedoch ebenfalls festgestellt.

#### 4.1.5 Repression der RNA-Prozessierungsmaschinerie

Weniger leicht als die Repression von Zellzyklusgenen lässt sich erklären, warum in den Tumorzelllinien mit Wildtyp-p53-Protein auch zahlreiche in die RNA-Prozessierung involvierte Gene durch Zytostatikabehandlung herabreguliert wurden. Dass mehrere Exosomproteine transkriptionell durch E2F aktiviert werden können, wurde bereits erwähnt. Von einigen Spleißfaktoren, wie z. B. SFRS3 und SF3B3 ist beschrieben, dass sie p53-reprimierbar sind [16-18]. Für die meisten anderen RNA-prozessierenden Proteine ist jedoch in der Literatur kein Hinweis auf eine Regulation durch E2F oder p53 zu finden, und auch zu einer möglichen Beeinflussung ihrer Expression durch andere Transkriptionsfaktoren oder Signalwege sind kaum Daten vorhanden. Man kann vermuten, dass die Zelle unter Stressbedingungen parallel zum Zellzyklusarrest den gesamten Stoffwechsel auf ein Mindestmaß reduziert und hierbei auch die Maschinerie für die Reifung von mRNAs abschaltet.

#### 4.1.6 Differenzielle Expression von Immunantwortgenen

Insbesondere in HT-29-Zellen und in geringerem Ausmaß auch in den anderen Zellmodellen wurde nach Zytostatikabehandlung eine erhöhte Expression von Zytokinen, zytokinresponsiven Genen und weiteren an der Immunantwort beteiligten Effektoren beobachtet.

Übertragen auf das physiologische Umfeld im Patienten kann man annehmen, dass auch hier nach Zytostatikabehandlung Zytokine vom Tumor gebildet und ausgeschüttet werden. Es ist wahrscheinlich, dass

deren chemotaktische und immunstimulierende Wirkungen eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort auslösen können. Gleichzeitig haben viele Zytokine und zytokinresponsive Proteine, beispielsweise Interferone und die ISGs, direkte antiproliferative, proapoptotische und antiangiogene Effekte [19] und dürften deshalb hemmend auf Tumorwachstum und -progression einwirken. Allerdings muss diese Aussage insoweit relativiert werden, als viele der deregulierten Effektoren nicht nur wünschenswerte Eigenschaften besitzen, sondern ganz im Gegenteil auch angiogen, proliferationsfördernd und proinvasiv wirken können. Ihre Induktion ist also ambivalent zu beurteilen [20]. So besitzt beispielsweise IL8 einerseits potente immunstimulierende Wirkungen und könnte das Krebswachstum inhibieren, indem es die Infiltration neutrophiler Granulozyten in den Tumor stimuliert und T-Lymphozyten aktiviert, andererseits gibt es aber auch starke Hinweise, dass IL8 die Tumorprogression aufgrund seiner angiogenen und metastasierungsfördernden Wirkungen anregt. Es existiert eine Reihe von Studien, die eine Induktion von IL8 nach Zytostatikaexposition, insbesondere nach Taxolbehandlung, beschreiben und sowohl positive als auch negative Effekte dieses Chemokins auf die Tumorprogression postulieren [21-23].

#### **4.1.7 Differenzielle Expression von Adhäsionsgenen**

Eine Vielzahl von Effektoren, die in die Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion involviert sind oder an der Reorganisation des Zytoskeletts teilnehmen, wurde durch die Zytostatikabehandlung in ihrer Expression auf mRNA-Ebene moduliert. Die Übereinstimmungen zwischen den Zellen sind hierbei verhältnismäßig gering, die Regulation dieser Prozesse scheint also weitgehend zelltypspezifisch zu sein.

Wie bei der Darstellung der Ergebnisse bereits angesprochen, ist es sehr schwer einschätzbar, welchen Effekt die veränderte Expression adhäsionsassoziiierter Gene auf die Zelle und ihr malignes Potenzial ausübt. Denn einerseits können sich migrierende Tumorzellen über die auf ihrer Oberfläche vorhandenen Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen anheften und in Zielgewebe vordringen, um dort Metastasen zu bilden, andererseits ist die Fähigkeit zum substratunabhängigen Wachstum ein typisches Zeichen der Transformation zu einem aggressiveren, invasiven Phänotyp [24]. Somit könnte die verstärkte Expression von Adhäsionsgenen einerseits das Zeichen einer Steigerung der Invasivität, andererseits auch Ausdruck einer Art „Normalisierung“ der Zelle sein. Des Weiteren kann die Induktion solcher Gene, wie bereits erwähnt, auch mit dem Eintritt der Zelle in die Seneszenz zusammenhängen.

Viele Genprodukte, die Adhäsion oder Zytoskelettfunktion beeinflussen, erfüllen zudem weitere Funktionen in der Zelle und sind nicht selten in Signalwege involviert, die Wachstum, Differenzierung und Apoptose regulieren. So beeinflusst der Wachstumsfaktor CTGF, dessen Induktion durch Zytostatika sowohl in A549- als auch in HMEC-Zellen beobachtet wurde, neben der integrinvermittelten Adhäsion und der Reorganisation des Zytoskeletts auch die PI3K/AKT-, ERK- und Wnt-abhängige Signalübertragung [25, 26]. Somit sind sehr heterogene Auswirkungen seiner verstärkten Expression vorstellbar.



### **4.1.8 Repression von Effektoren der Unfolded Protein Response**

In MDA-MB-231-Zellen wurde nach Zytostatikaexposition eine Repression von Genen festgestellt, die Effektoren der Unfolded Protein Response kodieren. Wie bereits erwähnt, konnte eine Studie zeigen, dass die UPR in Tumorzelllinien einschließlich MDA-MB-231 im unbehandelten Zustand aktiviert ist [27]. Dieser Befund mag etwas überraschen, da die UPR hauptsächlich eine Stressreaktion auf Mangel an Nährstoffen und Verschiebungen im pH- oder oxidativen Gleichgewicht darstellt. Für die inneren Bereiche von Tumoren ab einer gewissen Größe ist dies kritisch, kaum jedoch für eine in 2D-Kultur wachsende Zelllinie. Möglicherweise handelt es sich bei der konstitutiven UPR-Aktivierung um eine Eigenschaft, die die Zellen von ihrem Ursprung im Tumorgewebe her bewahrt haben. Denkbar ist aber auch, dass die antiapoptotischen, zytoprotektiven Eigenschaften der UPR-Effektoren einen Wachstumsvorteil unter Zellkulturbedingungen nach sich ziehen. Die beobachtete Repression von UPR-Komponenten nach Zytostatikabehandlung könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Tumorzellen in Apoptose gehen und hierbei Selbstschutzmechanismen deaktivieren. Man kann postulieren, dass die Repression der UPR durch Chemotherapeutika eine wichtige Komponente ihrer Wirkung darstellt, durch die zytoprotektive Vorgänge außer Kraft gesetzt werden und es zur Anhäufung ungefalteter Proteine im ER kommt – mit potenziell fatalen Folgen für die Tumorzelle.

Außerdem wird durch Reduktion der UPR-Aktivität auch die Transkription und Sekretion des zentralen proangiogenen Faktors VEGF verringert. Dies äußert sich im vorliegenden Datensatz sowohl in der Repression der VEGF-mRNA als auch der Herabregulierung von HYOU1, welches auf ungeklärte Weise – evtl. aufgrund seiner Chaperoneigenschaft – die Sekretion von VEGF fördert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass nach Knock-down der HYOU1-mRNA die VEGF-Sekretion deutlich abnimmt [28]. Übertragen auf die klinische Situation könnte die Inaktivierung der UPR in soliden Tumoren also auch zur Verringerung der Angiogenese beitragen.

Die fehlende Herabregulierung des UPR-Signalwegs in den anderen mit Zytostatika behandelten Tumorzelllinien lässt sich womöglich dadurch erklären, dass die UPR in ihnen nicht aktiv ist und somit auch nicht inaktiviert werden kann. In der Literatur finden sich für die hier untersuchten Zellmodelle abgesehen von MDA-MB-231- ausschließlich Daten für MCF-7-Zellen. Bei diesen wurde festgestellt, dass sie offenbar einen Defekt in der Induktion der UPR besitzen, da sie nicht adäquat auf Tunicamycin reagieren, welches durch Hemmung der N-Glykosylierung von Proteinen zu ER-Stress führt [27].

### **4.1.9 Differenzielle Expression von Genen mit invasions- und apoptose-assoziierten Funktionen**

Ähnlich schwer zu interpretieren sind die Einflüsse, die die Zytostatikabehandlung auf die Expression von invasions- und metastasierungsassoziierten Genen und von Regulatoren der Apoptose ausgeübt hat.

Zellmodellabhängig traten zahlreiche Veränderungen solcher Effektoren mit häufig gegenläufigen Funktionen auf.

So wurden Gene, die pro- oder antiinvasive Proteine kodieren, sowohl hoch- als auch herabreguliert und es ließ sich keine Tendenz in die eine oder andere Richtung ablesen. Unterm Strich könnte also die Migrationsfähigkeit einer bestimmten Zellart durch Zytostatikaexposition gehemmt oder auch gefördert werden. Für die klinische Situation wäre es natürlich bedenklich, wenn antitumorale Arzneistoffe die Metastasierung anregen würden. Allerdings muss man berücksichtigen, dass sich insbesondere in vivo Tumoren häufig in einem prekären Gleichgewicht befinden, da sie z. B. einer Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff unterliegen. Durch toxische Einflüsse von außen können sie leichter als Normalzellen aus der Balance gebracht werden und sich nur eingeschränkt regenerieren [29]. Insofern spielt es möglicherweise keine ausschlaggebende Rolle, ob neben den starken wachstumshemmenden oder apoptoseinduzierenden Stimuli auch einige proliferations- und invasionsfördernde Signale aktiviert werden.

Auch bei den pro- und antiapoptotischen Proteinen traten widersprüchliche Veränderungen auf, sodass unklar bleibt, ob die jeweilige Zellart durch den Einfluss der Zytostatika eher in die Apoptose getrieben wurde oder ihr entkommen konnte.

Die Heterogenität der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass parallel gegenläufige Signalwege aktiviert werden, die der Zelle zunächst unterschiedliche Reaktionen auf die Schädigung von außen ermöglichen. Je nachdem, ob es ihr gelingt, den Schaden zu beheben oder sich durch Entwicklung von Resistenzstrategien gegen den einwirkenden Stressfaktor zu schützen, kann dann das Pendel in die eine oder andere Richtung ausschlagen. Darüber hinaus laufen vermutlich Gegenregulations- und Feedbackmechanismen ab, die der übermäßigen Aktivierung einzelner Prozesse zuwiderlaufen. Die Feineinstellung dieser komplexen Signale verläuft mit großer Wahrscheinlichkeit auch über posttranslationale Modifikationen, Relokalisation von Effektoren und Protein-Protein-Interaktionen, die mit den Mitteln der Genexpressionsanalyse nicht erfasst werden können.

In einer Studie von Brachat et al., die die Auswirkungen mehrerer Zytostatika auf die globale Genexpression untersucht hat, wurden ebenfalls widersprüchliche und unerwartete Effekte auf proliferations-, invasions- und apoptosemodulierende Gene beobachtet [30]. Die Autoren folgerten, dass es nicht möglich ist, basierend auf dem Wissen über die Funktion eines Proteins vorherzusagen, in welche Richtung seine Expression durch die Behandlung mit genotoxischen Agenzien reguliert wird. Umso interessanter ist es, solche Effekte zu untersuchen, möglichst auch in vivo, und sie z. B. in Verbindung mit der Entwicklung von Resistenz oder dem Therapieansprechen zu bringen.

## 4.2 Bewertung der im Vergleich aus RNAi- und Inhibitor-Daten erhaltenen Ergebnisse

Aus der Zusammenschau der Resultate, die mit siRNAs und Inhibitoren gegen Cholinkinase und MDM2 gewonnen wurden, lässt sich ableiten, dass der Vergleich niedermolekularer Inhibitoren mit siRNAs als Modellantagonisten auf dem Weg der Genexpressionsanalyse sinnvoll ist, da man hiermit bis zu einem gewissen Grad unspezifische (d. h. targetunabhängige) und spezifische Effekte unterscheiden kann.

Solche unspezifischen Effekte wurden interessanterweise nicht nur mit den Inhibitoren gefunden, bei denen dies durchaus zu erwarten war, sondern auch in frappierendem Ausmaß mit siRNAs. Fast jede siRNA rief mehr oder weniger ausgeprägte Änderungen auf Genexpressionsebene hervor, die mit keiner der anderen gegen dasselbe Target gerichteten siRNAs zu beobachten waren und die auch in keinen Zusammenhang mit einer stärkeren oder schwächeren Silencingeffizienz gebracht werden konnten. Einerseits wurde die Induktion interferonresponsiver Gene beobachtet, vermutlich infolge einer Aktivierung der antiviralen Abwehrmechanismen durch dsRNA. Dies scheint aber kein genereller Effekt von siRNAs zu sein, sondern sequenzspezifisch aufzutreten, da nur eine siRNA und die entsprechende Stealth-RNA eine Interferonantwort induzierten. Auch in der Literatur wird berichtet, dass nur mit bestimmten siRNA-Sequenzen die Expression interferonabhängiger Gene stimuliert wurde [31, 32].

Andererseits traten individuelle Effekte jeder siRNA auf, die möglicherweise auf der Herabregulierung nicht perfekt homologer Targets beruhen. Abgesehen von der Zerstörung „falscher“ Target-mRNAs in Form des postulierten siRNA-Mechanismus kommt dafür auch eine Inhibition auf translationaler Ebene durch den miRNA-Signalweg in Frage. miRNAs (microRNAs) sind natürlich vorkommende kurze dsRNA-Moleküle, deren Aktivität über ähnliche Effektor Komplexe wie die von siRNAs vermittelt wird (sog. miRISCs). Die miRISCs supprimieren die Translation von mRNAs, zu denen die miRNAs oft nur begrenzte Homologie besitzen [33, 34]. Mehrere, auch zentrale Fehlpaarungen sind erlaubt, sodass möglicherweise jede siRNA, sofern sie in den miRNA-Signalweg eingeschleust wird, ein posttranslationales Silencing eines oder mehrerer unerwünschter Targets hervorrufen könnte. Dies könnte sich sekundär wiederum auf die Genexpression auswirken.

Aufgrund dieser vielfältigen Off-Target-Effekte war es von entscheidender Wichtigkeit, sowohl bei der Evaluierung von Cholinkinase als auch von MDM2 jeweils mehrere siRNAs zu verwenden, die zu einem effizienten Silencing ihres Targets sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene führen. Nur für deren übereinstimmende Effekte besteht höchstmögliche Sicherheit, dass sie aus dem Fehlen des Zielproteins in der Zelle resultieren.

### 4.2.1 Diskussion der Cholinkinase-Ergebnisse

Im Fall von Cholinkinase waren die Überschneidungen zwischen den transkriptionellen Effekten der drei verwendeten siRNAs so gering, dass sie vermutlich eher zufallsbedingt waren. Zudem ließen sich keine

Gemeinsamkeiten zwischen siRNAs und dem Inhibitor MN58 feststellen. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass die Herabregulierung von Cholinkinase in HT-29-Zellen keine Auswirkungen hat, zumindest nicht auf Genexpressionsebene und nicht in dem betrachteten Zeitfenster. Dies wird auch dadurch untermauert, dass die siRNA C3 keine Effekte auf Zellmorphologie, -proliferation, -viabilität und Zellzyklusverteilung ausübte, obwohl sie ChoK sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene ebenso gut herabregulierte wie die anderen siRNAs, die gewisse phänotypische Auswirkungen besaßen.

Es erscheint durchaus vorstellbar, dass die Reduktion der ChoK-Menge in der Zelle sich zunächst nicht auf Genexpressionsebene bemerkbar macht, da die nachfolgenden Prozesse möglicherweise hauptsächlich Proteinmodifikationen und -interaktionen umfassen bzw. den Lipidstoffwechsel betreffen. Dagegen spricht aber, dass mit dem niedermolekularen Inhibitor schon sehr frühzeitig massive Effekte auf Zellwachstum und Apoptoseneigung der behandelten Zellen festgestellt wurden. Selbst wenn man berücksichtigt, dass die Wirkung eines Inhibitors schneller eintritt als die RNAi-abhängige Herabregulierung des Proteins, lässt sich diese Diskrepanz nur schwer begründen. Die einleuchtendste Erklärung besteht darin, dass der untersuchte ChoK-Inhibitor weitere unbekannte Angriffspunkte in der Zelle besitzt und die laut Literatur beobachtete antitumorale Wirkung auf derartigen Off-Target-Effekten beruht.

Der Vergleich des Einflusses von MN58 auf die Genexpression mit dem von Zytostatika lieferte vor allem im Fall von MDA-MB-231-Zellen recht auffällige Gemeinsamkeiten. Die größere Übereinstimmung in MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu HT-29-Zellen dürfte einerseits darauf beruhen, dass bei ersterer Zelllinie die Daten aus jeweils 72-stündigen Behandlungen miteinander verglichen werden konnten, während bei HT-29-Zellen ein 30 h- einem 72 h-Datensatz gegenüberstand. Zudem stammten die Messungen von MDA-MB-231-Proben alle aus einem gemeinsamen Ansatz, d. h. für Zytostatika und MN58 lag den Auswertungen die gleiche unbehandelte Kontrolle als Baseline zugrunde und die behandelten Zellen wurden parallel kultiviert, hatten also gleiche Passagezahl, Konfluenz usw.

Die signifikanten Übereinstimmungen zwischen MN58 und den Zytostatika könnten darauf hindeuten, dass die unspezifischen Effekte des ChoK-Inhibitors genotoxischer Natur sind.

#### **4.2.2 Diskussion der MDM2-Ergebnisse**

Der Angriff auf MDM2 mittels RNAi oder Inhibitoren eignet sich vermutlich im Vergleich zu Cholinkinase besser für eine Evaluierung durch Genexpressionsanalyse. Denn die Verhinderung der MDM2-Synthese bzw. die Hemmung seiner Interaktion mit p53 sollte direkt in der Aktivierung von p53 und der transkriptionellen Beeinflussung von p53-Targets resultieren. Wählt man hingegen ein Zielmolekül, das nicht unmittelbar die Aktivität von Transkriptionsfaktoren moduliert oder selbst die Transkription (ko-)reguliert, sind Effekte auf Genexpressionsebene eventuell erst verzögert festzustellen und auch schwerer zuzuordnen.

Auf der anderen Seite stößt man jedoch auch bei der Interpretation der Ergebnisse, die durch Eingriff in das MDM2-p53-System erhalten wurden, auf Schwierigkeiten. Problematisch ist nämlich, dass p53, wie ja

aus den Zytostatikaexperimenten offensichtlich ist, durch DNA-Schädigung aktiviert wird und es somit schwer zu entscheiden ist, ob nach siRNA- oder Inhibitor-Behandlung beobachtete p53-abhängige Effekte auf dem gewünschten spezifischen Mechanismus oder unspezifischem genotoxischen Stress beruhen.

Um MDM2 durch RNAi herabzuregulieren, wurden insgesamt neun verschiedene siRNAs getestet, von denen sich letztlich nur zwei als gleichzeitig hocheffizient und weitgehend spezifisch erwiesen. Basierend auf ihrer phänotypischen Evaluierung war zwar bereits erkennbar, dass nicht alle siRNAs identische Wirkungen hervorriefen, jedoch war erst die Affymetrix-Analyse in der Lage, das Ausmaß der Off-Target-Effekte aufzudecken und die am besten übereinstimmenden siRNAs zu identifizieren.

Die siRNA M8 induzierte eine starke Interferonantwort und wirkte dadurch wachstumshemmend und proapoptotisch, und selbst die nicht funktionellen siRNAs M1 und M3 erzeugten phänotypische Effekte. Diese Befunde zeigen sehr deutlich, dass sowohl der Ausschluss von Off-Target-Effekten als auch der Nachweis des Target-Knock-downs auf mRNA- und Proteinebene unerlässlich sind. In vielen in der letzten Zeit durchgeführten oder initiierten Hochdurchsatz-Screeningstudien mit siRNAs wird hingegen die Strategie verfolgt, ausschließlich phänotypische Effekte wie z. B. abnorme Morphologie oder Proliferationshemmung zu messen, um potenzielle Targets zu identifizieren [35, 36]. Die so gefundenen Kandidaten werden dann zwar möglicherweise durch weitere Versuche, in denen auch die Silencingeffizienz und unspezifische Wirkungen überprüft werden, bestätigt, dennoch ist die grundsätzliche Eignung eines primär phänotypisch ausgelegten Testsystems in Frage zu stellen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Affymetrix-Analysen konnten signifikante Übereinstimmungen zwischen den weitgehend spezifischen siRNAs und dem MDM2-Inhibitor festgestellt werden. Die in den Wildtyp-p53-Zelllinien identifizierten Schnittmengen aus MDM2-siRNA- und Inhibitor-abhängig deregulierten Genen waren auffällig mit p53-induzierbaren und -reprimierbaren Targets sowie Zellzyklus- bzw. DNA-Damage-Response-Genen angereichert, insbesondere in MCF-7-Zellen. Diese Daten bestätigen, dass es durch Knock-down von MDM2 bzw. Bindung des Hemmstoffs an die Interaktionsdomäne zur Aktivierung von p53 kommt, und korrelieren mit dem beobachteten G0/G1-Arrest der Zellen.

Es muss allerdings eingeräumt werden, dass eine ganze Reihe bekannter p53-Targets nicht in der Schnittmenge der als spezifisch eingestuft siRNAs lag, sondern nur entweder von M5 oder M6 dereguliert wurde. Da sich keine Tendenz erkennen ließ, dass eine siRNA insgesamt mehr p53-abhängige Transkripte modulierte als die andere, kann ein unterschiedliches Ausmaß des MDM2-Knock-downs nicht als Erklärungsansatz herangezogen werden. Wahrscheinlicher ist es, dass einerseits manche Gene im Datensatz einer siRNA die Filterkriterien nur relativ knapp verfehlt haben und deshalb nicht in der Schnittmenge auftauchten und dass andererseits gewisse Off-Target-Effekte eine Rolle gespielt haben. Da weitere, nicht als p53-regulierbar bekannte oder im Zusammenhang mit dem Zellzyklus stehende Gene ebenfalls außerhalb der Schnittmenge der M5- und M6-Daten lagen, kann man vermuten, dass manche von

diesen selbst zur Aktivierung oder Inaktivierung von Signalkaskaden, die die p53-Aktivierung verstärken oder auch abschwächen, geführt haben.

Dass die siRNAs genotoxisch wirken und dadurch p53 aktiviert haben, ist eher unwahrscheinlich. Einerseits gelangen siRNAs prinzipiell nicht in den Nukleus und sollten somit nicht direkt auf die DNA einwirken können. Zudem war die Zahl der durch M5 und M6 deregulierten Gene, beispielsweise im Vergleich zur Zytostatikabehandlung, recht gering, was ebenfalls gegen toxische Effekte spricht.

Im Fall des MDM2-Inhibitors lässt sich schwerer einschätzen, inwieweit er spezifisch ins p53-System eingreift. Generell führte er zur vermehrten Deregulation von p53-Targets, diverse von M5 und/oder M6 beeinflusste Gene tauchten jedoch überraschenderweise bei ihm nicht auf. Dies könnte zum Teil auf Unterschieden in den Zellkulturbedingungen beruhen, da für die Behandlung mit dem Inhibitor und der Kontrollsubstanz ja mit reduzierter Serumkonzentration gearbeitet werden musste. Darüber hinaus spielen wohl auch die stringenten Filterkriterien eine Rolle für die Diskrepanzen, gerade weil die von der Kontrollsubstanz deregulierten Gene ausgeschlossen wurden. Zudem sind auch hier Gegenregulationsmechanismen durch unspezifisch beeinflusste Gene denkbar.

Aufgrund der absoluten Anzahl der durch R206-0270 modulierten Transkripte, die weit über der der siRNAs lag, kann man davon ausgehen, dass die Substanz erhebliche unspezifische Wirkungen ausübt. Da auch die Zytostatika zur Aktivierung von p53 führen, könnte man also mutmaßen, dass R206-0270 schlichtweg genotoxisch wirkt und seine Effekte auf p53-Targets und Zellzyklus unspezifischer Natur sind. Dagegen spricht das Fehlen einer Phosphorylierung von p53 an Serin-15 nach R206-0270-Behandlung, doch auch mit den getesteten Zytostatika war diese Bande teilweise schwach.

Weiteren Aufschluss ermöglichte der Vergleich von Zytostatika und MDM2-Inhibitor auf Basis der Affymetrix-Ergebnisse in MCF-7-Zellen. Die Gemeinsamkeiten zwischen ihnen beschränkten sich fast ausschließlich auf Gene, die einer direkten Regulation durch p53 unterliegen oder zellzyklusabhängig exprimiert werden, meist unter der Kontrolle von E2F. Von den in MCF-7-Zellen durch Zytostatikabehandlung deregulierten Genen anderer funktioneller Kategorien, wie z. B. RNA-Prozessierung oder Immunantwort, fanden sich in den Datensätzen der Inhibitor-Experimente kaum Gene wieder, ebenso wenig wie in denen der MDM2-siRNAs. Dies legt nahe, dass die gefundenen p53-assoziierten Effekte von R206-0270 vorwiegend auf seinem postulierten Wirkmechanismus, also der Hemmung der MDM2-p53-Interaktion, beruhen.

In HCT-116-Zellen wurden im Vergleich zu MCF-7-Zellen geringere Übereinstimmungen der spezifischen siRNAs M5 und M6 auf Genexpressionsebene gefunden und die Zahl der deregulierten p53-Targets war unerwartet niedrig. Interessanterweise wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie berichtet, dass das RNAi-vermittelte Silencing von MDM2 in normalen Fibroblasten zur Aktivierung der p53-abhängigen Expression führte, nicht aber in HCT-116-Zellen. Aufgrund weiterer experimenteller Befunde postulierten die Autoren, dass die MDM2-Feedbackschleife in HCT-116-Zellen defekt ist und die p53-Stabilität und -Funktion hier über andere Mechanismen reguliert wird [37]. Diese Befunde können nicht

uneingeschränkt bestätigt werden, da ja durchaus einige p53-induzierbare und -reprimierbare Gene nach MDM2-Silencing differenziell exprimiert waren, jedoch ist es möglich, dass das p53-MDM2-Autoregulationssystem in HCT-116-Zellen nicht seine volle Funktionsfähigkeit besitzt.

Während R206-0270 aufgrund seiner Bindung an die p53-Interaktionsdomäne von MDM2 nur die p53-assoziierten Funktionen von MDM2 unterbinden sollte, war im Fall der siRNAs erwartet worden, dass diese auch Effekte hervorrufen, die mit anderen Interaktionspartnern von MDM2, z. B. dem Zellzyklusregulator RB, in Zusammenhang stehen.

Diese hätten auch nach MDM2-siRNA-Transfektion der p53-mutanten NCI/ADR-RES-Zellen auftreten müssen, blieben aber aus. Die Störung dieser Wechselwirkungen von MDM2 scheint folglich im beobachteten Zeitfenster irrelevant zu sein, da weder in den phänotypischen Analysen, wie z. B. der Untersuchung der Zellzyklusverteilung, noch auf Transkriptionsebene signifikante Veränderungen feststellbar waren.

In einer 2004 veröffentlichten Studie von Liu et al. wurde über die Effekte des siRNA-vermittelten Knock-downs von MDM2 auf MCF-7-Zellen sowohl in Kultur als auch im Xenograftmodell in Nacktmäusen berichtet [38]. In vitro wurden ausgeprägte proliferationshemmende und proapoptotische Wirkungen gefunden, die sich in vivo in einer deutlich reduzierten Tumormasse äußerten. Zudem führten die Autoren ein cDNA-Array-Experiment durch, das die differenzielle Expression zahlreicher p53-Targets belegte. Die in dieser Studie beschriebenen Effekte sind deutlich stärker als die in der vorliegenden Arbeit im gleichen Zellmodell beobachteten. Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass in den Versuchen von Liu et al. nur eine einzige siRNA gegen MDM2 zum Einsatz kam und keinerlei Überprüfung auf unspezifische Effekte stattfand. Zudem sind nur Auszüge aus den cDNA-Array-Daten gezeigt, die als interessant eingestuft wurden, und es wird keine Angabe über die Gesamtzahl der deregulierten Gene gemacht.

## 4.3 Validität der verwendeten Experiment- und Auswertungsstrategien

### 4.3.1 Eignung der für die Analyse der Microarray-Daten verwendeten Auswertungsmethodik

In der vorliegenden Arbeit wurde die Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Technologie eingesetzt, um die globalen molekularen Effekte verschiedener Agenzien zu untersuchen. Die jeweils in Duplikaten oder Triplikaten vorgenommenen Messungen wurden nach einem Filterschema mit den Kontrollen verglichen, das stringent genug sein sollte, um nur signifikante Unterschiede aufzuzeigen, andererseits aber auch nicht zum Verlust relevanter Daten führen sollte.

Rückblickend sollte man kritisch prüfen, ob die erhaltenen Ergebnisse ein Abbild der wahren Verhältnisse bzw. Veränderungen in der Zelle geliefert haben. Dafür spricht ganz klar, dass sich unter den jeweils als dereguliert identifizierten Genen solche häuften, die transkriptionell koreguliert sind, z. B. durch p53, E2F oder Zytokine, oder die in engem funktionellen Zusammenhang stehen, indem sie z. B. an der RNA-Prozessierung oder der Unfolded Protein Response mitwirken. Da solche biologisch verknüpften Gene meist nur in einem Teil der Zellmodelle oder sogar nur einem einzelnen Zelltyp gefunden wurden, kann man folgern, dass die Chip-Technologie und die Auswertungsmethode nicht etwa ein Ungleichgewicht der Daten zugunsten der genannten Kategorien liefern, sondern dass diese tatsächlich die Vorgänge in der Zelle widerspiegeln.

Unterstützt wird diese Feststellung durch den Vergleich der Affymetrix-Ergebnisse mit denen der RT-PCR am LightCycler<sup>®</sup> Instrument. Die Übereinstimmung zwischen den Daten, die für Cholinkinase einerseits und MDM2 andererseits erhoben wurden, war trotz grundlegender Unterschiede der Technologie an sich und der Normalisierungsmethode sehr groß.

Betrachtet man die publizierten Studien, in denen Oligonukleotid- oder cDNA-Microarrays verwendet wurden, um die Effekte von Substanzen auf die globale Genexpression zu untersuchen, stellt man fest, dass diese meist deutlich größere Unterschiede in der Signalthöhe zwischen behandelter Probe und Kontrolle fordern, um Änderungen als signifikant einzustufen. Meist werden nur Gene einbezogen, deren Messwerte sich mindestens verdoppelt bzw. halbiert haben. Folglich könnte man in Frage stellen, ob in der vorliegenden Arbeit ausreichend stringente Schwellenwerte angesetzt wurden, da ja eine Erhöhung auf das 1,75fache bzw. Erniedrigung auf das 0,57fache bereits in die Analyse einging. Allerdings zeigt sich bei der Durchsicht der Ergebnisse, dass zahlreiche Gene, die zwar diese Kriterien erfüllten, nicht aber um das 2fache oder mehr moduliert wurden, in biologischem Zusammenhang mit anderen stehen, die stärker dereguliert waren. Insofern hätte es einen nicht akzeptablen Verlust an relevanten Daten bedeutet, wenn diese Gene aus der Auswertung ausgeschlossen worden wären<sup>17</sup>.

---

<sup>17</sup> Zu berücksichtigen ist auch, dass bei einem Teil der angesprochenen Studien die Proben aus Tiermodellen oder Patientenproben stammten, die von Haus aus eine große Variabilität besitzen und deshalb mit robusteren Schwellenwerten gefiltert werden müssen. Die Verwendung von kultivier-



Das Hauptaugenmerk der Datenanalyse lag auf funktionell verknüpften Genen, bei denen die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass die Veränderung ihrer Signalhöhe einerseits kein methodisches Artefakt ist, andererseits aber auch biologische Relevanz für die Zelle besitzt. Während nämlich nicht ohne weiteres angenommen werden kann, dass die Induktion oder Repression eines einzelnen Effektors in der Zelle nachhaltige Wirkungen erzeugt, ist dies bei der Kombination einer ganzen Reihe von Molekülen mit zusammenhängender Funktion wesentlich wahrscheinlicher.

Die Einschränkung bei diesem Ansatz liegt darin, dass das Wissen über die Funktion von Genen bzw. der von ihnen kodierten Proteine nach wie vor begrenzt ist. Die biologische Aufgabe vieler Moleküle ist entweder völlig unbekannt oder kann nur aufgrund von Proteinmotiven wie z. B. Zinkfingerstrukturen oder SH3-Domänen vermutet werden. Selbst bei denjenigen Proteinen, die bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung sind, werden laufend neue Aspekte ihrer Funktion entdeckt, sodass sie nicht als vollständig charakterisiert betrachtet werden können.

Die funktionelle Analyse der deregulierten Gene war auf das zugängliche Datenbank- und Literaturwissen beschränkt; man kann annehmen, dass viele der differenziell exprimierten Gene, die bisher kaum charakterisiert sind und sich somit der Auswertung entzogen haben, in einem biologischen Zusammenhang mit den übrigen Genen bzw. von ihnen kodierten Proteinen stehen.

### **4.3.2 Relevanz der Ergebnisse für die Tumorthherapie**

Bei der Darstellung und Diskussion der Genexpressionsdaten wurde teilweise versucht, die Ergebnisse auf die Situation bei der Therapie humaner Tumoren zu übertragen. Dieses Vorgehen ist sicherlich nur eingeschränkt angemessen, da grundlegende Unterschiede zwischen den in-vitro-Bedingungen und den Verhältnissen im Patienten bestehen. Die verwendeten Zellmodelle sind an das Wachstum unter Zellkulturbedingungen adaptiert und haben entsprechend nur noch eingeschränkte Ähnlichkeit mit ihrem Ursprungsgewebe. Zudem kann der Effekt der eingesetzten Agenzien auf Tumorstromazellen, Immunzellen usw. nicht erfasst werden, und ebenso bleibt offen, welchen Einfluss diese Zellen umgekehrt auf den Tumor nehmen. Auch die gesamte Pharmakokinetik der Wirksubstanzen, wie Applikationsart (Zufuhr durch Bolus-Injektion, Dauerinfusion oder intestinale Resorption), enzymatische Metabolisierung und Exkretion, konnte nicht simuliert werden, und eine konstante Substanzexposition über 24 bzw. 72 h ist von den Verhältnissen in vivo natürlich relativ weit entfernt.

Im Fall der Zytostatika besteht allerdings insofern ein Bezug zur Wirklichkeit, als die verwendeten Konzentrationen in etwa in der gleichen Größenordnung wie klinisch relevante Serumspiegel lagen. In vielen publizierten in-vitro-Studien wurden hingegen Substanzmengen verwendet, die die in vivo auftretenden

---

ten Zellen liefert hingegen deutlich besser reproduzierbare und konstantere Daten. Zudem unterliegen die Messwerte von Oligonukleotid-Arrays im Vergleich zu cDNA-Chips im Allgemeinen geringeren Schwankungen.

Konzentrationen um ein Vielfaches, teils um das 1000fache und mehr, überschritten, was die Aussagekraft der gefundenen Ergebnisse erheblich einschränkt [21, 23, 39, 40].

Trotz der geschilderten Abweichungen der in-vitro-Situation vom Umfeld im Patienten kann man vermuten, dass die Änderungen, die eine Substanz auf Genexpressionsebene hervorruft, zwischen beiden Szenarien ähnlich sind, da ja das Repertoire an zellulären Signalgebern prinzipiell übereinstimmt. Ganz generell sollten die molekularen Effekte, die bei der Analyse der differentiellen Genexpression von Zellmodellen beobachtet werden, nicht als Abbild der Verhältnisse in vivo betrachtet werden, sondern als Hinweis auf untersuchenswerte Mechanismen. In nachfolgenden Studien am Patienten kann dann das Augenmerk verstärkt auf solche Prozesse gerichtet und ihre Relevanz für den Therapieerfolg eingeschätzt werden. Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Effekten wäre es beispielsweise von Interesse, die Bedeutung der Induktion von Zytokinen und zytokinresponsiven Genen in Tumorzellen, den Einfluss der Repression der Unfolded Protein Response oder die Einleitung der Seneszenz in vivo zu untersuchen.

### **4.3.3 Eignung der verwendeten Methode für die Charakterisierung von Substanzen hinsichtlich ihres Wirkmechanismus und ihrer Spezifität**

Eines der wichtigsten Ziele der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu evaluieren, ob man verschiedene Agenzien mit dem Mittel der globalen Genexpressionsanalyse auf ihren molekularen Wirkmechanismus untersuchen und sie hinsichtlich ihrer Spezifität – auch im Vergleich mit Modellinhibitoren – charakterisieren kann.

Wie bereits angesprochen, kann der primäre Angriffspunkt einer Substanz, z. B. ihre Interaktion mit Mikrotubuli, nur schwer am entstehenden Expressionsmuster abgelesen werden. Versteht man unter dem Wirkmechanismus eines Agens jedoch die von ihm ausgelöste Aktivierung oder Inaktivierung von Signalkaskaden, welche Wachstum, Differenzierung, Überleben und weitere wichtige Prozesse regulieren, so eignet sich die Genexpressionsanalyse durchaus zur Erfassung dieser Effekte. Naturgemäß sind nur die Auswirkungen auf das Transkriptom messbar, während posttranslationale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen allenfalls indirekt erkannt werden können, wenn sie wiederum die Transkription beeinflussen.

Die RNAi-Methodik ist dann ein geeignetes Modellsystem, wenn Gemeinsamkeiten mehrerer funktioneller siRNAs ermittelt und den Vergleichen mit niedermolekularen Hemmstoffen zugrunde gelegt werden. Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Spezifität der untersuchten Inhibitoren offenbar relativ gering war, denn sie übten über die durch siRNAs erzeugten Effekte hinaus zahlreiche weitere Einflüsse auf die Genexpression aus. Zieht man in Betracht, dass eine zufrieden stellende Funktionalität der Substanzen vorher in biochemischen Testsystemen nachgewiesen worden war und dass im Fall des Cholinkinaseinhibitors sogar bereits in vivo-Daten vorlagen, die als Folgen der Inhibition des Zielenzym interpretiert worden waren,

zeigt sich, dass ein hoher Bedarf besteht, die Spezifität eines Inhibitors zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der Entwicklung zu evaluieren.

Man könnte argumentieren, dass es letztlich unerheblich ist, ob die antitumorale Wirkung einer Substanz auf der Inhibition des angepeilten Zielmoleküls oder auf Off-Target-Effekten beruht. Die Wahrscheinlichkeit schwer wiegender Nebenwirkungen ist jedoch umso höher, je mehr ungewollte Wirkungen ein Agens ausübt. Zudem wird seit einigen Jahren zunehmend versucht, gezielt Patientenkollektive auszuwählen, in deren Tumorzellen das Target des spezifischen Hemmstoffs übermäßig exprimiert oder aktiviert ist, da man davon ausgeht, dass diese Patienten besonders von der Therapie profitieren können. Ein solches Vorgehen wäre nicht sinnvoll und erfolgversprechend, wenn die Testsubstanz ganz anders wirkt als vermutet.

Für die Zukunft scheint es angebracht, noch weitere als spezifisch deklarierte Inhibitoren auf Genexpressionsebene zu untersuchen, v. a. solche, die bereits einen Optimierungsprozess durchlaufen haben und somit möglicherweise geringere Off-Target-Effekte ausüben als die hier verwendeten. Diese sollten wie in der vorliegenden Arbeit mit mehreren funktionellen siRNAs verglichen werden, um ihre Spezifität auf den Prüfstand zu stellen.

So wäre es beispielsweise interessant, kürzlich am Roche-Standort Nutley entwickelte MDM2-Antagonisten, die sog. Nutline, auf diesem Weg zu analysieren. In biochemischen Tests zeichneten sich die Nutline durch ausgeprägte und spezifische Inhibition der MDM2-p53-Interaktion aus und konnten in Zell- und Tiermodellen eine gute Wirksamkeit unter Beweis stellen [41]. Da diese Hemmstoffe nicht zur Phosphorylierung von p53 an Serin-15 führen, wurde der Schluss gezogen, dass sie das p53-System nicht aufgrund genotoxischer Wirkungen aktivieren. Insofern wäre es aufschlussreich, zu überprüfen, ob sich ihr Genexpressionsmuster von dem der Zytostatika in ähnlicher Weise unterscheidet wie das des hier untersuchten Inhibitors R206-0270 oder ob sie noch spezifischere oder andere Einflüsse auf die Transkription ausüben.

Einleitend wurde dargestellt, dass häufig ein krasser Gegensatz zwischen als breit und ungerichtet wirkend eingestuftem Zytostatika und targetspezifischen antitumoralen Wirkstoffen konstruiert wird.

Die Gesamtheit der Ergebnisse legt jedoch die Vermutung nahe, dass die Übergänge zwischen diesen Kategorien eher fließend sind und eine klare Trennung in der Praxis nicht unbedingt angebracht ist. Die Zytostatika beeinflussen molekular betrachtet ja im Grunde dieselben Vorgänge, auf die auch zielgerichtete Inhibitoren einwirken sollen, nämlich Wachstumsregulation, Differenzierung, Apoptose usw., und schon deshalb erscheint eine strikte Abgrenzung nicht sinnvoll. Problematisch ist natürlich die mutagene Wirkung der Zytostatika, die u. U. zur Induktion von Sekundärtumoren führen kann und teilweise das hämatopoetische System massiv beeinträchtigt. Deshalb ist es geboten, einerseits die Zytostatikatherapie selbst weiter zu optimieren, z. B. durch veränderte Therapieregimes und zusätzliche Applikation von Wachstumsfaktoren, die den Normalzellen eine bessere Regeneration ermöglichen, und andererseits die Entwicklung nicht-genotoxischer Inhibitoren voranzutreiben.

In der klinischen Praxis zeigt sich zunehmend, dass eine Kombination konventioneller Zytostatika mit targetspezifischen Wirkstoffen dem Patienten den größtmöglichen Nutzen bringt [42, 43]. Die Anwendung der spezifischen Hemmstoffe allein ist häufig zwar in der Lage, das Tumorwachstum oder die Ausbreitung von Metastasen zu bremsen, führt aber in vielen Fällen nicht zu einer Remission bzw. erreicht nicht den maximal möglichen Effekt, sodass zusätzlich bewährte Chemotherapeutika eingesetzt werden. Zudem können zwischen targetspezifischen Substanzen und Zytostatika Synergismen bestehen, die eine deutliche Dosisreduktion ermöglichen und somit die Nebenwirkungen abschwächen. Ein solcher Synergismus ist auch zwischen MDM2-Inhibitoren und Zytostatika denkbar. Bei Anwendung in Tumoren mit Wildtyp-p53-Protein könnte der Inhibitor den negativen Autoregulationsmechanismus zwischen p53 und MDM2 durchbrechen und dadurch die zytostatikavermittelte p53-Aktivierung verstärken und verlängern helfen.

#### 4.4 Literaturverzeichnis Kapitel 4

1. Jones, N.A., et al., *Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(5): p. 819-26.
2. Dan, S. and T. Yamori, *Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 861-7.
3. Wang, Y., et al., *Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 269-73.
4. Makino, K., D. Yu, and M.C. Hung, *Transcriptional upregulation and activation of p53Cdc via p34(cdc2) in Taxol-induced apoptosis*. Oncogene, 2001. **20**(20): p. 2537-43.
5. Kudoh, K., et al., *Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4161-6.
6. Chang, B.D., et al., *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 389-94.
7. Zhou, Y., et al., *Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1688-95.
8. Tao, W., et al., *Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34+ cells treated with etoposide*. Exp Hematol, 2003. **31**(3): p. 251-60.
9. Maxwell, P.J., et al., *Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4602-6.
10. Bani, M.R., et al., *Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(2): p. 111-21.
11. Pommier, Y., *Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints*. Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2004. **4**(5): p. 429-34.
12. Budhram-Mahadeo, V., et al., *p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 15237-44.
13. Wang, L., et al., *Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43604-10.
14. Stevaux, O. and N.J. Dyson, *A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(6): p. 684-91.
15. Okada, H. and T.W. Mak, *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 592-603.
16. Daoud, S.S., et al., *Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study*. Cancer Res, 2003. **63**(11): p. 2782-93.
17. Mirza, A., et al., *Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3645-54.
18. Kho, P.S., et al., *p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21183-92 Epub 2004 Mar 11.
19. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 237-49.
20. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
21. Shibakura, M., et al., *Induction of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by doxorubicin in human small cell lung carcinoma cells*. Int J Cancer, 2003. **103**(3): p. 380-6.
22. Lee, L.F., et al., *Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5097-105.

23. White, C.M., et al., *Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 1998. **46**(2): p. 104-12.
24. Aldrian, S., et al., *Overexpression of Hsp27 in a human melanoma cell line: regulation of E-cadherin, MUC18/MCAM, and plasminogen activator (PA) system*. *Cell Stress Chaperones*, 2003. **8**(3): p. 249-57.
25. Crean, J.K., et al., *The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 44187-94 Epub 2002 Sep 5.
26. Mercurio, S., et al., *Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex*. *Development*, 2004. **131**(9): p. 2137-47.
27. Gazit, G., J. Lu, and A.S. Lee, *De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999. **54**(2): p. 135-46.
28. Miyagi, T., et al., *Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells*. *Int J Urol*, 2002. **9**(10): p. 577-85.
29. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(8): p. 594-604.
30. Brachat, A., et al., *A microarray-based, integrated approach to identify novel regulators of cancer drug response and apoptosis*. *Oncogene*, 2002. **21**(54): p. 8361-71.
31. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(9): p. 834-9 Epub 2003 Aug 24.
32. Moss, E.G. and J.M. Taylor, *Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(9): p. 771-2.
33. Tang, G., *siRNA and miRNA: an insight into RISCs*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(2): p. 106-14.
34. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
35. Fraser, A., *RNA interference: human genes hit the big screen*. *Nature*, 2004. **428**(6981): p. 375-8.
36. Bettencourt-Dias, M., et al., *Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression*. *Nature*, 2004. **432**(7020): p. 980-7.
37. Kaeser, M.D., S. Pebernard, and R.D. Iggo, *Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 7598-605 Epub 2003 Dec 9.
38. Liu, T.G., et al., *Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2004. **17**: p. 17.
39. Ma, Y., et al., *P53-independent down-regulation of Mdm2 in human cancer cells treated with adriamycin*. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2000. **3**(2): p. 122-8.
40. Andres, J.L., et al., *Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents*. *Oncogene*, 1998. **16**(17): p. 2229-41.
41. Vassilev, L.T., et al., *In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2*. *Science*, 2004. **303**(5659): p. 844-848 Epub 2004 Jan 2.
42. Rothenberg, M.L., D.P. Carbone, and D.H. Johnson, *Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(4): p. 303-9.
43. Zhou, B.B. and J. Bartek, *Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(3): p. 216-25.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen die Auswirkungen gängiger Zytostatika auf die globale Genexpression humaner Tumor- und Normalzellen mit Hilfe von Microarrays untersucht und Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser Effekte evaluiert. Zum anderen wurden niedermolekulare Inhibitoren, die spezifisch ein onkologisches Target angreifen, in ähnlicher Weise analysiert und mit einer RNAi-vermittelten Herabregulierung desselben Zielmoleküls verglichen.

Die durch Zytostatika erzeugten Genexpressionsprofile waren sich auffallend ähnlich, obwohl die Substanzen unterschiedliche primäre Angriffspunkte besitzen. Diese unerwartet großen Gemeinsamkeiten erklären sich aus der Tatsache, dass alle verwendeten Agenzien grundlegende zelluläre Vorgänge stören, letztlich die Integrität des Genoms beeinträchtigen und somit übereinstimmende Reaktionen auf Transkriptionsebene hervorrufen.

Die Veränderungen der Genexpression hingen in erster Linie vom zellulären Hintergrund ab. Insbesondere der Mutationsstatus des Tumorsuppressorgens p53 beeinflusste das durch die Wirkstoffe erzeugte Muster. Die Zellmodelle mit Wildtyp-p53-Protein reagierten sehr ähnlich auf die Zytostatikaexposition; viele der differenziell exprimierten Gene erwiesen sich als transkriptionelle Targets von p53 oder konnten mit dem p53-abhängigen Zellzyklusarrest in Zusammenhang gebracht werden. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Zelllinien mit nicht-funktionellem p53-Protein nach Zytostatikabehandlung sowohl stärker untereinander als auch von den Zellen mit Wildtyp-p53. Diese Befunde untermauern die herausragende Bedeutung, die dieser „Wächter des Genoms“ [1] bei der Reaktion von Tumorzellen auf Angriffe von außen besitzt.

Wirkstoffspezifische Effekte wurden nur sehr eingeschränkt beobachtet. Sie waren zellmodellabhängig, d. h. es konnte keine zellübergreifende charakteristische Signatur einer Einzelsubstanz identifiziert werden.

Bei zahlreichen nach Zytostatikaexposition in ihrer Expression beeinflussten Genen ließ sich aus der wissenschaftlichen Literatur belegen, dass sie transkriptionell koreguliert werden, z. B. durch p53, E2F oder Zytokine. Diese und viele weitere Gene konnten in gemeinsame funktionelle Kategorien eingeordnet werden, da die von ihnen kodierten Proteine beispielsweise an der Zellzyklusprogression, der RNA-Prozessierung oder der Immunantwort beteiligt sind. Daraus konnten Rückschlüsse auf die in den Zellen angestoßenen Prozesse und deren Bedeutung für das Tumorgeschehen gezogen werden.

Zudem diente die Häufung funktionell zusammenhängender Gene als Nachweis dafür, dass sich auf dem Weg der globalen Genexpressionsanalyse und mit den verwendeten Filterkriterien biologisch relevante und aussagekräftige Daten gewinnen lassen.

Den breit wirkenden Zytostatika wurden targetspezifische antitumorale Strategien gegenübergestellt. Zwei Zielmoleküle, das zytoplasmatische Enzym Cholinase und der funktionelle Gegenspieler von p53, MDM2, wurden jeweils sowohl durch einen niedermolekularen Inhibitor als auch durch mehrere siRNAs in ihrer Funktion bzw. Expression gehemmt. Die Auswirkungen wurden zunächst phänotypisch charakterisiert

und sodann auf Genexpressionsebene erfasst. Hierbei wurden eklatante unspezifische Effekte sowohl der Inhibitoren als auch der siRNAs offenbar. Im Fall der siRNAs ist dies ein überaus wichtiger Befund, da im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass diese Agenzien hochspezifisch wirken und somit als ideale Modellantagonisten dienen können.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es unerlässlich ist, mehrere gegen dasselbe Target gerichtete siRNAs einzusetzen und ihre Effekte untereinander und mit niedermolekularen Hemmstoffen zu vergleichen. Nur die Gemeinsamkeiten zwischen Inhibitoren und verschiedenen siRNAs können mit hoher Sicherheit als tatsächliche Auswirkungen der Hemmung des Zielmoleküls gedeutet werden.

Nach RNAi-vermitteltem Silencing von Cholinkinase konnten trotz hoher Effizienz der verwendeten siRNAs keine gemeinsamen Effekte auf Genexpressionsebene festgestellt werden. Insofern mussten die Wirkungen des Cholinkinase-Inhibitors als weitgehend unspezifisch gewertet werden. Die Eignung von Cholinkinase als Angriffspunkt antitumoraler Therapien wird durch diese Ergebnisse in Frage gestellt.

Bei der Analyse der differentiellen Genexpression nach MDM2-Silencing bzw. -Inhibition wurde beobachtet, dass auch hier sowohl die siRNAs als auch der niedermolekulare Hemmstoff Off-Target-Effekte hervorriefen; ihr gemeinsamer Nenner war dennoch beträchtlich. Unter den Genen, die übereinstimmend von siRNAs und dem MDM2-Inhibitor dereguliert wurden, fanden sich gehäuft p53-Targets und zellzyklus-assoziierte Gene. Dies belegt die Aktivierung von p53 durch Hemmung seines funktionellen Gegenspielers MDM2 und steht in Korrelation mit dem Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus.

Aus diesen Resultaten lässt sich ableiten, dass sich die RNAi-Methode – unter der Voraussetzung, dass mehrere effiziente siRNAs verwendet werden – hervorragend eignet, um einerseits im Rahmen einer Targetvalidierung zu untersuchen, welche Effekte das Verschwinden des Zielmoleküls auf die Zelle ausübt, und andererseits die Spezifität niedermolekularer Inhibitoren auf den Prüfstand zu stellen.

Ob sich breit angreifende Zytostatika und targetspezifische Inhibitoren in ihren Auswirkungen auf die Transkription klar voneinander abgrenzen lassen, konnte nicht abschließend bewertet werden. Die erhaltenen Daten deuten jedoch darauf hin, dass die Übergänge eher fließend sind. Beim Vergleich der Genexpressionsprofile der verwendeten niedermolekularen Hemmstoffe mit denen der Zytostatika konnten zwar gewisse Unterschiede festgestellt werden, jedoch sind weitere Studien erforderlich, um zu untersuchen, ob diese Effekte als targetspezifische oder genotoxische Signaturen interpretiert werden können.

Insgesamt belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass sich mit den Mitteln der Genexpressionsanalyse die Auswirkungen eines Agens auf zelluläre Prozesse wie z. B. Zellzyklusprogression, Adhäsion oder Apoptose ausgezeichnet abbilden lassen. Es ist zwar nicht möglich, aus den Daten unmittelbar abzuleiten, dass beispielsweise Adriamycin die Topoisomerase II hemmt oder der MDM2-Inhibitor die Interaktion zwischen p53 und MDM2 stört; anhand der Änderungen auf Transkriptionsebene lässt sich jedoch zeigen, welche Signalkaskaden in der Zelle als Reaktion auf die Behandlung aktiviert oder inaktiviert wurden,

und ableiten, welche Bedeutung diese Effekte bei der Tumorthherapie besitzen. Am Vergleich der Expressionsmuster verschiedener Substanzen und siRNAs kann abgelesen werden, inwieweit ihre Effekte übereinstimmen, und aufgrund dessen eine Aussage über ihre Spezifität getroffen werden.

1. Janus, F., et al., *The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(1): p. 12-27.



## 6 Appendix: Gentabellen

### 6.1 Übersicht

Tab. 6-1: Induktion von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung.....	242
Tab. 6-2: Repression von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung. ....	248
Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. ....	253
Tab. 6-4: Deregulation von RNA-Prozessierungs-Genen nach Zytostatikabehandlung.....	272
Tab. 6-5: Deregulation von Immunantwortgenen nach Zytostatikabehandlung.....	276
Tab. 6-6: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach Zytostatikabehandlung. ....	288
Tab. 6-7: Repression von Genen der Unfolded Protein Response nach Zytostatikabehandlung. ....	294
Tab. 6-8: Induktion von p53-Targets nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.....	295
Tab. 6-9: Repression von p53-Targets nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. ....	297
Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. ....	301
Tab. 6-11: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.....	310
Tab. 6-12: Weitere nach MDM2-Silencing in MCF-7-Zellen deregulierte Gene. ....	312
Tab. 6-13: Weitere nach MDM2-Silencing in HCT-116-Zellen deregulierte Gene.....	315
Literaturverzeichnis Kapitel 6. ....	316

### 6.2 Gentabellen und zugehörige Legenden

Zunächst sind die Legenden der Gentabellen aufgeführt, die entsprechenden Tabellen finden sich im Anschluss.

#### Tab. 6-1: Induktion von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung.

In der Literatur als p53-transaktivierbar beschriebene Gene, die in mindestens einem Zellmodell mit Wildtyp-p53-Protein (A549, MCF-7 und HMEC) nach 24 und/oder 72 h durch mindestens vier Zytostatika induziert wurden.

\*[GeneID]: Induktion auch in HT-29-Zellen nach 72 h Zytostatikaexposition.

†[GeneID]: Induktion auch in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikaexposition.

Aus den entsprechenden Spalten ist abzulesen, durch welche Zytostatika das Gen in der betreffenden Zelllinie zum angegebenen Zeitpunkt induziert (↑) wurde. Die Literaturstellen, welche eine p53-abhängige Aktivierung der Expression beschreiben, sind jeweils angegeben (Spalte „p53-Regul.“), ebenso Publikationen, die über eine Induktion nach Zytostatikabehandlung berichten (Spalte „Zytost.-Literatur“; die in der Studie verwendeten Substanzen sind angegeben).<sup>18</sup>

<sup>18</sup> Sämtliche Gentabellen sind nach aufsteigendem HUGO-Gensymbol (Spalte „Symbol“) sortiert. Die im Haupttext näher erläuterten Gene sind in den Tabellen stets hellgelb hinterlegt. Wird im Haupttext ein vom HUGO-Symbol abweichender Gennamen bzw. ein abweichendes Gensymbol verwendet, so ist dieser Name bzw. dieses Symbol in den Tabellen durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Zytostatika werden im bekannten Einbuchstabenkode abgekürzt; wurde die Behandlung in der Literatur mit einer in der vorliegenden Arbeit nicht verwendeten Substanz durchgeführt, so wird diese mit Z abgekürzt. Wurden die Daten durch Bestrahlung gewonnen, so ist dies durch die Angabe IR bzw. UV erkennbar.

**Tab. 6-2: Repression von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung.**

In der Literatur als p53-reprimierbar beschriebene Gene, die in mindestens einem Zellmodell mit Wildtyp-p53-Protein nach 24 und/oder 72 h durch mindestens vier Zytostatika herabreguliert wurden.

<sup>†</sup>[GeneID]: Repression auch in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikaexposition.

Aus den entsprechenden Spalten ist abzulesen, durch welche Zytostatika das Gen in der betreffenden Zelllinie zum angegebenen Zeitpunkt reprimiert (↓) wurde. Die Literaturstellen, welche eine p53-abhängige Reduktion der Expression beschreiben, sind jeweils angegeben (Spalte „p53-Regul.“), ebenso Publikationen, die über eine Repression nach Zytostatikabehandlung berichten (Spalte „Zytost.-Literatur“).

**Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung.**

Gene, die in mindestens einem Zellmodell nach 24 und/oder 72 h durch mindestens vier Zytostatika differenziell reguliert wurden und die Proteine kodieren, die laut Literatur eine Rolle im Zellzyklus oder in der DNA-Damage-Response spielen.

Aus den entsprechenden Spalten ist abzulesen, durch welche Zytostatika das Gen in der betreffenden Zelllinie zum angegebenen Zeitpunkt induziert oder reprimiert wurde. Symbole: ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

Die Literaturstellen, welche eine E2F-abhängige Expression beschreiben, sind jeweils genannt (Spalte „E2F-Regul.“), ebenso Publikationen, die über eine den vorliegenden Befunden entsprechende Deregulation nach Zytostatikabehandlung berichten (Spalte „Zytost.-Literatur“). Die Publikation von Chang et al., in der nach Adriamycinbehandlung seneszenzassoziierte Gene gefunden wurden (s.3.2.8.2.7), ist in der Spalte „Zytost.-Literatur“ grün markiert.

**Tab. 6-4: Deregulation von RNA-Prozessierungs-Genen nach Zytostatikabehandlung.**

Gene, deren Produkte verschiedene Funktionen im RNA-Metabolismus erfüllen und die in mindestens einer Wildtyp-p53-Zellart durch die Mehrzahl der Zytostatika herabreguliert wurden (↓ = reprimiert). Da keines der gezeigten Gene bereits nach 24 h durch vier oder mehr Zytostatika reprimiert wurde, sind nur die 72 h-Daten gezeigt.

Aus den entsprechenden Spalten ist abzulesen, durch welche Zytostatika das Gen im betreffenden Zellsystem reprimiert wurde. Publikationen, die über eine Repression nach Zytostatikabehandlung berichten, sind angegeben (Spalte „Zytost.-Literatur“).

**Tab. 6-5: Deregulation von Immunantwortgenen nach Zytostatikabehandlung.**

Gene, die in mindestens einem Zellmodell nach 24 und/oder 72 h durch mindestens vier Zytostatika dereguliert wurden und die als Zytokine fungieren, deren Expression durch Zytokine induziert wird oder die anderweitig die zelluläre Immunantwort modulieren. Publikationen, die über eine den vorliegenden Befunden entsprechende Deregulation nach Zytostatikabehandlung berichten, sind angegeben (Spalte „Zytost.-Literatur“).

Die 24 h-Daten von HMEC-Zellen sind nicht gezeigt, da hier keinerlei Immunantwortgene differenziell exprimiert waren. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

**Tab. 6-6: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach Zytostatikabehandlung.**

Gene, die in mindestens einem Zellmodell nach 24 und/oder 72 h durch mindestens vier Zytostatika dereguliert wurden und die eine Rolle bei der Adhäsion bzw. der Reorganisation des Zytoskeletts spielen. Die 24 h-Daten von HT-29-Zellen sind nicht gezeigt, da hier keinerlei Deregulation von Adhäsionsgenen festzustellen war. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert. Publikationen, die über eine den vorliegenden Befunden entsprechende Deregulation nach Zytostatikabehandlung berichten, sind angegeben (Spalte „Zytost.-Literatur“).

**Tab. 6-7: Repression von Genen der Unfolded Protein Response nach Zytostatikabehandlung.**

Gene, die in MDA-MB-231-Zellen nach 72 h Zytostatikabehandlung reprimiert waren und für an der UPR beteiligte Proteine kodieren. Publikationen, die über eine Repression nach Zytostatikabehandlung berichten, sind angegeben (Spalte „Zytost.-Literatur“).

**Tab. 6-8: Induktion von p53-Targets nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.**

Gene, die laut Literatur durch p53 induziert werden können (Spalte „p53-Regul.“) und durch M5, M6 und/oder den MDM2-Inhibitor R206-0270 in MCF-7- und/oder HCT-116-Zellen hochreguliert wurden. Sofern ein Gen auch durch M8 moduliert wurde, ist dies angegeben. ↑ = induziert.

---

Informationen über die biologische Funktion der kodierten Proteine sind der Spalte „Funktion“ zu entnehmen. Ein Fragezeichen in dieser Spalte zeigt an, dass die Aufgabe des jeweiligen Proteins unbekannt ist bzw. die beschriebene Funktion nur vermutet wird. Die Quellen für die funktionelle Beschreibung der Gene sind angegeben, hierbei steht EG für Informationen aus der NCBI-Datenbank Entrez Gene.

**Tab. 6-9: Repression von p53-Targets nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.**

Gene, die laut Literatur durch p53 reprimiert werden können (Spalte „p53-Regul.“) und durch M5, M6 und/oder den MDM2-Inhibitor R206-0270 in MCF-7- und/oder HCT-116-Zellen herabreguliert wurden. Sofern ein Gen auch durch M8 moduliert wurde, ist dies angegeben. ↓ = reprimiert.

**Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.**

Gene mit Einfluss auf Zellzyklus oder DNA-Damage-Response, die von den siRNAs M5, M6 und/oder dem Inhibitor R206-0270 in MCF-7- und/oder HCT-116-Zellen signifikant dereguliert wurden. Sofern auch M8 die Expression des betreffenden Gens modulierte, ist dies mit angegeben. Literaturdaten zur transkriptionellen Regulation durch E2F finden sich in der Spalte „E2F-Regul.“, Daten zur Regulation durch p53 in der Spalte „p53-Regul.“. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

**Tab. 6-11: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.**

Gene, die an Adhäsion oder Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sind und die von den siRNAs M5, M6 und/oder dem Inhibitor R206-0270 in MCF-7- und/oder HCT-116-Zellen signifikant dereguliert wurden. Sofern auch M8 die Expression des betreffenden Gens modulierte, ist dies mit angegeben. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

**Tab. 6-12: Weitere nach MDM2-Silencing in MCF-7-Zellen deregulierte Gene.**

Gene, die in MCF-7-Zellen sowohl durch M5 als auch M6 signifikant dereguliert wurden und weder bekanntermaßen p53-Targets sind noch Rollen in Zellzyklus, DNA-Damage-Response oder Adhäsion spielen. Sofern auch M8 oder R206-0270 die Expression des betreffenden Gens modulierten, ist dies mit angegeben. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

**Tab. 6-13: Weitere nach MDM2-Silencing in HCT-116-Zellen deregulierte Gene.**

Gene, die in HCT-116-Zellen sowohl durch M5 als auch M6 signifikant dereguliert wurden und weder bekanntermaßen p53-Targets sind noch Rollen in Zellzyklus, DNA-Damage-Response oder Adhäsion spielen. Sofern auch M8 oder R206-0270 die Expression des betreffenden Gens modulierten, ist dies mit angegeben. ↑ = induziert, ↓ = reprimiert.

Tab. 6-1: Induktion von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung. Seite 1

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↑	A549 72 h↑	HMEC 24 h↑	HMEC 72 h↑	MCF-7 24 h↑	MCF-7 72 h↑
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	59		reguliert Motilität und Proliferation, wirkt anti-invasiv (EG, [28])	[17, 18]		ACEFPT	ACEFPT		P	ACEFPT	ACEFPT
adenylate kinase 1	AK1	203		reversible Phosphorylierung von Adeninnukleotiden, Rolle in p53-vermitteltem Zellzyklusarrest? (EG, [19])	[19]		ACEF	ACEFPT		P		
angiopoietin-like 4	ANGPTL4	51129	PGAR	proangiogen, Rolle in Lipid- oder Glucosestoffwechsel?; induziert durch Hypoxie [29, 30]	[9]		F	FPT		ACEFPT		
aquaporin 3	AQP3	360		Transporter für Wasser und Glycerol; induziert durch osmotischen Stress [20, 31]	p73-Target [20]						ACEFPT	ACEFPT
activating transcription factor 3	ATF3	467		Transkriptionsfaktor (vorwiegend reprimierend), involviert in Stressantwort, Wachstumsregulation, Zellzykluskontrolle; induziert durch JNK-Signalweg, IL6, p53 (EG, [6, 22])	[3, 17, 21, 22]	[2]:A, [3]:C, [4]:Z, [5]:T, [6]:UV, IR	ACEFPT	ACEFPT		P		T
BCL2-associated X protein	BAX	581		proapoptotisches BCL2-Familienmitglied, bildet Homooligomere, heterodimerisiert mit BCL2 und BCL-xL, vermittelt Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien, wichtig für p53-vermittelte Apoptose, durch p53 transkriptionell und auf Proteinebene aktiviert, stimuliert durch BID, BAD und BBC3 (EG, [32-34])	[23, 24]	[7, 8]:A, [9]:AF, [10]:F, [11]:E		ACPT				
BCL2 binding component 3	BBC3	27113	PUMA	proapoptotisch, interagiert mit BCL-xL, fördert Multimerisierung von BAX, fördert Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien, wichtig für p53-vermittelte Apoptose [25, 26, 33]	[10, 17, 23, 25, 26]	[12]:F, [4]:Z, [13]:A		AEFPT				
btg family, member 2	BTG2	7832	PC3, TIS21	inhibiert G1/S-Transition durch Einfluss auf RB und die Transkription von Cyclin D1 und Cyclin E, transkriptioneller Koregulator [35]	[3, 17, 21, 23, 24]	[2]:A, [14]:CPT, [15]:AF	ACEFPT	ACEFPT			ACEFPT	ACEFPT
cyclin D1 (prad1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	595		komplexiert mit CDK4 und CDK6, essenziell für G1/S-Transition, inaktivierende Phosphorylierung von RB, bei Überexpression onkogen oder proapoptotisch; induziert durch p53, RB und Mitogene (vermittelt durch PI3K/AKT- oder Wnt/β-Catenin-Signalweg) (EG, [36, 37])	[16, 27]	[2, 16]:A		ACEFPT		AEFPT		
cyclin g1	CCNG1	900		interagiert mit p53, MDM2 und ARF, positiver oder negativer Regulator der p53-abhängigen Stressantwort; durch MDM2 ubiquitiniert (→ Abbau), vermittelt G1- und G2/M-Arrest; zellzyklusabhängige Expression, Induktion durch DNA-Schädigung [46-49]	[23, 27]	[14]:CPT	ACFP	F			CEP	ACFP
cd59 antigen p18-20	CD59	966	protectin	Rolle in Immunantwort, inhibiert Komplement-vermittelte Zellyse [50]	[40]	[38]:T		ACEPT		AT		ACP

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↑	A549 72 h↑	HMEC 24 h↑	HMEC 72 h↑	MCF-7 24 h↑	MCF-7 72 h↑
cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21, cip1)	CDKN1A	*1026	p21, WAF1, CIP1	CDK-Inhibitor, inhibiert G1/S-Transition, beteiligt an G2/M-Checkpoint und DNA-Reparatur, proapoptotisch, induziert Seneszenz (EG, [2, 7, 51-53])	[3, 9, 17, 18, 21]	[2, 7, 8]:A	ACEFPT	ACEFPT		FP	ACEFPT	ACEFPT
carboxylesterase 2 (intestine, liver)	CES2	8824		beteiligt an Lipid- und Arzneistoffmetabolismus (EG)	[17]	[15]:AF	ACEFT	ACEFPT		P		
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	1462	PG/M	Substratadhäsionsmolekül (SAM), Bestandteil der ECM, moduliert Adhäsion, interagiert mit $\beta$ -Integrinen, Rolle in Tumorstadium und Metastasierung?, antiapoptotisch [54, 55]	[17]			F		ACEFP		
connective tissue growth factor	CTGF	1490	IGFBP8	Wachstumsfaktor, moduliert integrinabhängige Adhäsion, vermittelt Reorganisation des Zytoskeletts, fördert Expression von FN1, stimuliert oder inhibiert Proliferation, Migration und Metastasierung, beeinflusst ERK-, AKT- und Wnt-Signalwege; induziert durch mitogene Faktoren, z. B. TGF $\beta$ [56-60]	[41]		F	AEFPT		ACEFPT		
cytoplasmic fmr1 interacting protein 2	CYFIP2	26999	PIR121	potenzieller Vermittler der p53-abhängigen Apoptose [42]	[21, 42]		ACEFP	ACEFPT		FP	CEP	ACEPT
damage-specific dna binding protein 2, 48kda	DDB2	1643		beteiligt an DNA-Reparatur (NER) [43]	[3, 17, 43]	[39]:C	ACEFP	ACEFP			ACEFP	CFP
DNA-damage-inducible transcript 4	DDIT4	54541	RTP801, REDD1	schützt Zellen vor Apoptose nach Stress (ROS, Hypoxie, DNA-Schädigung), proapoptotisch? [44, 61, 62]	[44]						ACEFPT	ACEFP
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	1843	MKP1, CL100	inhibiert MAPK-Signalweg, beteiligt am p53-abhängigen G1-Arrest, antiapoptotisch durch Hemmung des JNK-Signalwegs, antiproliferativ, beteiligt an Seneszenz; durch ERK phosphoryliert und stabilisiert (negativer Feedback), erhöhte oder erniedrigte Expression in Tumoren beschrieben; induziert durch Hitzeschock, oxidativen Stress und Onkogene (EG, [45, 63-66])	[45]					ACFPT		
ectodermal-neural cortex (with btb-like domain)	ENC1	8507	NRP/B, PIG10	Target des Wnt-Signalwegs, stimuliert Proliferation und inhibiert Differenzierung [80]	[18, 27]			ACEFT		ACEFPT		ACP
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	FAS	*355	CD95, Apo-1, TNFRSF6	<i>Death receptor</i> , stimuliert nach Aktivierung durch FASL den extrinsischen Weg der Apoptose via FADD und Caspaseaktivierung, reguliert MAPK-Signalwege und vermittelt Aktivierung von NF $\kappa$ B; induziert durch p53 und proinflammatorische Zytokine (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ ) (EG, [81-85])	[3, 17, 18, 21]	[9]:AF, [67]:ACFP, [39]:C, [68]:P	ACEFPT	ACEFPT		P	ACEFPT	ACEFPT

Tab. 6-1: Induktion von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung. Seite 2

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↑	A549 72 h↑	HMEC 24 h↑	HMEC 72 h↑	MCF-7 24 h↑	MCF-7 72 h↑
ferredoxin reductase	FDXR	2232		Elektronentransport von NADPH zu Cytochrom P450, sensibilisiert Zellen gegen oxidativen Stress und Zytostatika, feed-forward-loop mit p53, beteiligt an p53-vermittelter Apoptose [73, 75]	[21, 23, 73-75]	[15]:AF	ACEFPT	ACEFPT		CP	ACEFPT	CEP
four and a half lim domains 2	FHL2	2274	DRAL	transkriptioneller Koaktivator, Transaktivierung von Targets von AP-1, NFκB und des Wnt-Signalwegs, Interaktion mit BRCA1 verstärkt transkriptionelle Aktivität, proapoptotisch; induziert durch RHO-Signalweg und <i>serum response factor</i> [76, 77, 86-89]	[17, 76, 77]		ACEFP	ACEFPT			E	AEP
interferon, alpha-inducible protein (clone ifi-15k)	G1P2	9636	ISG15, IFI15	vermittelt dsRNA-induzierte Signale, beteiligt an antiviraler Abwehr, stimuliert Proliferation von NK-Zellen, ubiquitinähnlich, wird nach IFN-Stimulation durch Ubiquitinligasen mit zellulären Proteinen konjugiert; induziert durch IFNs [78, 90-92]	[3, 18, 78]		E	ACEFPT		ACPT		PT
growth arrest and dna-damage-inducible, alpha	GADD45A	1647	GADD45	beteiligt an G2-Checkpoint: Reduktion der nukleären Cyclin B-Konzentration, Rolle in DNA-Reparatur, antiproliferativ, interagiert mit p21, PCNA und NPM1; stressinduziert (EG, [93-95])	[17, 18, 21, 23, 74]	[7]:A, [9, 15]:AF	ACEFPT	ACEFPT			EP	ACPT
growth differentiation factor 15	GDF15	9518	PLAB, MIC-1	TGFβ-Familie, antiproliferativ und antitumorigen, Stress-Antwort, hemmt Adhäsion und induziert Apoptose [69, 96, 97]	[3, 17, 18, 21]	[2, 69]: A, [3]:C, [15]:AF	ACEFPT	ACEFPT	CP	ACEP	ACEFPT	ACEFPT
glutathione peroxidase 1	GPX1	2876		antioxidativ (Glutathion), schützt Zellen vor FAS-vermittelter Apoptose [98]	[3]	[70]:E, [3]:C	ACEFP	ACEFPT				
gelsolin (amyloidosis, finnish type)	GSN	2934		Tumorsuppressor, pro- oder antiapoptotisch, Rolle in Seneszenz [99, 100]	[17, 79]	[71]:F, [4]:Z	A	C			E	ACEFPT
glutathione synthetase	GSS	2937	GSHS	Glutathionbiosynthese, antioxidative Stressantwort (EG)	[17]		ACEFP					
heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	3162	HO-1	schützt Zellen vor oxidativem Stress, anti-apoptotisch, induziert durch Stressfaktoren und Zytokine (vermittelt durch NFκB) [101-103]	[9]	[9]:AF, [72]:T		FT		ACEFPT	T	
immediate early response 5	IER5	51278		Vermittlung mitogener Signale? (EG)	[21]		C	CP			CEP	ACEPT
integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	ITGA3	3675	VLA-3A	Zelladhäsionsmolekül (CAM), Komponente von Integrin-Heterodimeren, assoziiert mit ECM-Proteinen, vermittelt Adhäsion, Migration und Invasion (EG, [113])	[17]			EFPT				
keratin 19	KRT19	3880	CK19	Zytokeratin, überexprimiert in Tumoren, Expression korreliert mit Metastasierung [114, 115]	[18]		ACEF	ACEFPT				

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↑	A549 72 h↑	HMEC 24 h↑	HMEC 72 h↑	MCF-7 24 h↑	MCF-7 72 h↑
I1 cell adhesion molecule	L1CAM	3897		Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulinfamilie (Ig-CAM), fördert Tumorprogression und -migration, aktiviert ERK-Signalweg, stimuliert Expression motilitätsfördernder Proteine (Integrine, RHO-GTPasen und Cathepsine) [116, 117]	[41]					ACEFPT		FP
leucine-rich repeats and death domain containing	LRDD	55367	PIDD	Adaptorprotein in <i>Death receptor</i> -vermittelten Signalwegen, interagiert mit FADD, MADD und CRADD, proapoptotisch, wichtig für p53-abhängige Apoptose, aktiviert Caspase-2 (EG, [107])	[23, 106, 107]	[104]:IR	ACEF			P		
mdm2, transformed 3t3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	MDM2	4193	HDM2	Antagonist von p53, vgl. Haupttext	[108, 109]	[9]:AF	ACEF	ACEFPT		P		APT
major vault protein	MVP	9961	LRP	Transportprotein, Rolle in Multidrug-Resistenz, Scaffoldprotein für SHP2 und ERK im Rahmen des EGF-Signalwegs?, anti-apoptotisch [105, 118]	[17]	[2]:A, [105]:ACE	A	ACEFPT		P	E	ACEP
neurofilament, light polypeptide 68kda	NEFL	4747		Neurofilament-Bestandteil (EG)	[17]		ACEFP	ACEFPT				
ninjurin 1	NINJ1	4814		neuronaes Adhäsionsprotein [119]	[3, 17, 21]	[3]:C, [15]:AF	ACEFP	ACEFPT				
PERP, TP53 apoptosis effector	PERP	64065		proapoptotisch, wichtig für p53-abhängige Apoptose [110]	[23, 110]			CEFPT				
polo-like kinase 2 (drosophila)	PLK2	10769	SNK	beteiligt an Zentriolenduplikation vor der G1/S-Transition [120]	[21, 74, 111]	[2]:A, [3]:C	C	ACEFPT		P		ACEFPT
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	5366	<b>NOXA</b>	proapoptotisches Mitglied der BCL2-Familie, interagiert mit antiapoptotischen BCL2-Proteinen, vermittelt Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und Aktivierung von Caspase-9, vermittelt p53- und stress-abhängige Apoptose, induziert durch Hypoxie und während Differenzierung [121-124]	[3, 17, 21, 23, 112]	[2]:A, [3]:C	ACEFP	ACEFPT		CP		
protein phosphatase 1d magnesium-dependent, delta isoform	PPM1D	8493	WIP1	inhibiert p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung von p53, supprimiert p53-abhängige Transkription und Apoptose, negative Feedbackschleife mit p53, Onkogen, interagiert mit UNG2 und unterdrückt DNA-Reparatur (BER) (EG, [127, 128])	[3, 21, 23, 27]	[2]:A, [3, 39]:C	ACEFP	ACEFPT			P	
protein kinase, amp-activated, beta 1 non-catalytic subunit	PRKAB1	5564		Untereinheit von AMPK ( <i>AMP-activated protein kinase</i> ) mit Adaptorfunktion; AMPK überwacht zellulären Energiestatus und fungiert als Stresssensor, inhibiert Proliferation von Tumorzellen (EG, [125])	[17]	[125]:E	ACEFP	ACEFPT		P		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↑	A549 72 h↑	HMEC 24 h↑	HMEC 72 h↑	MCF-7 24 h↑	MCF-7 72 h↑
pyd and card domain containing	PYCARD	29108	ASC	wichtig für p53-abhängige Apoptose, interagiert mit BAX, aktiviert Caspasen, induziert Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien, fördert Sensibilität gegenüber Zytostatika, moduliert NFκB-Signalweg; verringerte Expression in Tumoren [106, 129-131]	[106]	[106]:E	ACEF	ACEFPT				P
ribosomal protein s27-like	RPS27L	51065		?	[21]		CE	EF			ACEFPT	ACEFPT
spermidine/spermine n1-acetyltransferase	SAT	6303	SSAT	beteiligt am Schutz vor oxidativem Stress; induziert durch antiproliferative Signale [132, 133]	[41]	[71]:F	ACEFT	ACEFPT	A	FP	F	ACEPT
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade e (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	5054	PAI-1	inhibiert Plasminogenaktivatoren (uPA, tPA), beteiligt an Adhäsion, interagiert mit Vitronectin, moduliert Proliferation und Invasion; Überexpression korreliert mit schlechter Prognose von Tumorpatienten [134-136]	[18]		AF	ACEFPT		F		
sestrin 1	SESN1	27244	PA26	Mitglied der GADD-Familie ( <i>growth arrest- and DNA damage-inducible</i> ), Wachstumsregulation? [137]	[12, 21]	[4]:Z	ACEFPT	ACEFPT			ACEFPT	ACEFPT
stratifin	SFN	2810	14-3-3σ	beteiligt an G2-Checkpoint, hemmt CDC2, positive Feedbackschleife mit p53: inhibiert MDM2-vermittelten p53-Export und -Abbau und stimuliert p53-Aktivierung [52, 138, 139]	[18, 21, 27]	[9, 15]:AF, [39]:C, [126]:T	CEF	ACEPT				
smoothelin	SMTN	6525		Bestandteil des Zytoskeletts, assoziiert mit Actin-Stressfasern, beteiligt an Adhäsion (EG, [17])	[17, 74]		CEFP	CP				P
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	6659		transkriptioneller Regulator, beteiligt an Apoptose, aber auch Tumorigenese (EG)	[3]			F		ACEFPT		ACEPT
transporter 1, atp-binding cassette, subfamily b (mdr/tap)	TAP1	6890	ABCB2	interagiert mit (Immun-)Proteasom, Überträger degradierter Peptide auf MHC-I-Moleküle (→ Antigenpräsentation, Immunantwort); induziert durch p53, IFNγ, TNFα [140, 147-149]	[3, 9, 140]	[140]:AC	ACEFP	CFT				
transforming growth factor, alpha	TGFA	7039		Wachstumsfaktor, Ligand von EGFR, aktiviert ERK/MAPK-Signalweg, antiapoptotisch durch Antagonisierung SRC-, BCL-xL- und FAS-abhängiger Apoptose, inhibiert Anoiakis, moduliert Adhäsion und Motilität [150-152]	[18, 21, 27]	[2]:A	F	ACEFPT		T		
transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	TGFBR2	7048		TGFβ-Rezeptor, Tumorsuppressor?, jedoch auch proliferationsfördernde Effekte in Tumoren, vermittelt heterogene Effekte von TGFβ [153, 154]	[17, 41]	[70]:E		ACEPT				
thrombospondin 1	THBS1	7057	TSP-1	Substratadhäsionsmolekül (SAM), Bestandteil der ECM, vermittelt Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, interagiert mit FN1, Kollagenen, Integrinen u. a., stimuliert oder inhibiert Tumorigenese, Invasion und Angiogenese (EG)	[9, 18, 27, 41, 112, 143]	[9]:AF		F		ACFPT		



Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↑	A549 72 h↑	HMEC 24 h↑	HMEC 72 h↑	MCF-7 24 h↑	MCF-7 72 h↑
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	8795	DR5, KILLER, TRAIL-R2	<i>Death receptor</i> , vermittelt nach Aktivierung durch TRAIL extrinsischen Weg der Apoptose, Tumorsuppressor?, vermittelt Aktivierung von NFκB (EG, [155, 156])	[18, 23]	[9]:AF, [11]:E	ACEFP	ACEFPT			P	ACEFP
tp53 activated protein 1	TP53AP1	11257	TP53TG1	induziert durch genotoxische Agenzien [144]	[144]		AEF	ACEFPT				ACEP
tumor protein p53 inducible protein 3	TP53I3	9540	PIG3	an p53-vermittelter Apoptose beteiligt? (EG)	[3, 18, 21, 23, 24, 74]	[7]:A, [9, 15]:AF, [3]:C	ACEFP	ACEFPT		APT	CEPT	
tnf receptor-associated factor 4	TRAF4	9618	CART1	Adaptormolekül an Neurotrophinrezeptor NTSR1, inhibiert NFκB-Aktivierung, aktiviert p70S6K und JNK, pro- oder antiapoptotische Wirkung; induziert durch TNFα (EG, [141, 157, 158])	[141]	[141]:AE	C	ACEFPT				
tyrosinase-related protein 1	TYRP1	7306	TRP-1	in Melanozyten beteiligt an Melanin-Synthese als Schutz vor UVB-Strahlung [145], weitere Funktionen?	[145]							ACEFPT
p53 target zinc finger protein	WIG1	64393	PAG608	Rolle in p53-abhängiger Stressantwort? [146]	[146]		ACEFP	ACEFP		FP	CT	ACEFPT
xeroderma pigmentosum, complementation group c	XPC	7508	XPCC	DNA-Reparatur im Komplex mit RAD23B (GG-NER), Detektion der DNA-Schädigung, wird durch DDB2 zur geschädigten DNA rekrutiert und rekrutiert selbst weitere NER-Faktoren; induziert durch p53 und BRCA1, vermittelt Aktivierung des p53-Signalwegs nach DNA-Schädigung [159-161]	[27, 142]	[15]:AF, [142]:UV	ACEFP	ACEFP				P

Tab. 6-1: Induktion von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung. Seite 6

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↓	A549 72 h↓	HMEC 24 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 24 h↓	MCF-7 72 h↓
alanyl-tRNA synthetase	AARS	16		tRNA-Synthetase, beteiligt an Translation (EG)	[21]			ACEFP				
acylphosphatase 1, erythrocyte (common) type	ACYP1	97		katalysiert Hydrolyse von Acylphosphaten (EG)	[41]			ACFT				ACEPT
acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member e	ANP32E	81611		?	[21]		ACEF	ACEFPT		ACFP	E	ACEFPT
adp-ribosylation factor-like 2	ARL2	402		GTPase der ARF-Familie, reguliert Faltung von $\beta$ -Tubulin, beeinflusst Dynamik der Mikrotubuli, mögliche Rolle in Apoptose [167, 168]	[18]							ACEP
baculoviral iap repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	332	<b>Survivin</b>	reguliert Mitose und Zytokinese, interagiert mit Aurora B und INCENP, antiapoptotisch, reguliert Transkription von Proteinen der p53-Familie [169-172]	[21, 163, 164]	[2]:A, [4]:Z	ACE	ACEFPT	P	AEFPT		ACEFPT
breast cancer 1, early onset	BRCA1	672		beteiligt an verschiedenen Checkpoints, Rolle in DNA-Reparatur und -Rekombination, Bestandteil des BASC-Komplexes, Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor (EG, [169, 173-176])	[163, 165]	[162]:ACEPT, [2]:A	AE	ACEFPT		AEFPT		ACEP
bub1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1	699		beteiligt am Spindelcheckpoint [177]	[3]	[3]:C	ACEF	ACEFPT		AEFPT		ACEFPT
cyclin b1	CCNB1	891		Komplex mit CDC2 vermittelt G2/M-Transition; phosphoryliert durch PLK1 (EG, [178])	[3, 21]	[7]:A, [15]:AF, [4]:Z	ACEF	ACEFPT	P	AEFP		ACEP
cyclin b2	CCNB2	9133		Komplex mit CDC2 vermittelt G2/M-Transition (EG)	[21]	[4]:Z	ACEF	ACEFPT		AEFPT		ACEP
cell division cycle 2, g1 to s and g2 to m	CDC2	983	CDK1, p34Cdc2	bildet Komplex mit A- und B-Cyclinen, vermittelt G2/M-Transition, aktiviert durch CDC25C, auch an G1/S-Transition beteiligt (EG, [174])	[74, 166]	[2]:A, [14]:CPT, [11]:E, [15]:AF, [38]:T, [4]:Z	AE	ACEFPT		AEFPT	T	ACEP
cdc20 cell division cycle 20 homolog (s. cerevisiae)	CDC20	991	p55Cdc	bildet APC/CDC20-Komplex mit E3-Ligase-Aktivität, vermittelt Ubiquitinierung von Securin und leitet Anaphase ein, Angriffspunkt des Spindelcheckpoints [179-181]	[21]		ACEF	ACEFPT	P	ACEFPT	FP	ACEFPT
cell division cycle 25b	CDC25B	994		aktiviert CDC2-Cyclin B-Komplex durch Dephosphorylierung, fördert G2/M-Transition, phosphoryliert durch MELK, onkogene Eigenschaften (EG, [182])	[74]	[4]:Z	CE	ACEF		AFP		A
cdc6 cell division cycle 6 homolog (s. cerevisiae)	CDC6	990		Bestandteil des pre-RC, rekrutiert MCM-Komplex, beteiligt am S-Phasen-Checkpoint, reguliert auch Eintritt in Mitose [179, 186, 187]	[17]		E	ACEFPT		AEFPT	AE	ACEP

Tab. 6-2: Repression von p53-Targets nach Zytostatikabehandlung. Seite 1

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↓	A549 72 h↓	HMEC 24 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 24 h↓	MCF-7 72 h↓
cyclin-dependent kinase 2	CDK2	1017		bildet Komplex mit A- und E-Cyclinen, vermittelt G1/S-Transition; aktiviert via Phosphorylierung durch CAK (Cyclin H-CDK7-MAT1) und Dephosphorylierung durch CDC25A, negativ reguliert durch p21, p27Kip1 und p57Kip2; phosphoryliert MDM4, welches daraufhin nukleären Export von MDM2 vermittelt (EG, [51, 184, 188, 189])	[18, 184]	[4]:Z		ACFT		AFP		ACE
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (cdk2-associated dual specificity phosphatase)	CDKN3	1033	CDI, KAP	negative Regulation der CDK2-Aktivierung, inhibiert G1/S-Progression (EG)	[21]		ACE	ACEFPT	P	AEFPT		ACEP
chk1 checkpoint homolog (s. pombe)	CHEK1	1111	CHK1	beteiligt an G1/S-, S- und G2-Checkpoint, inhibiert CDC25-Proteine, phosphoryliert p53, stimuliert DNA-Reparatur; reguliert durch ATR (und ATM) [174, 190]	[21]		ACEFT	ACEFPT		AFP	ACE	ACEFP
cdc28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	1164	CksHs2	Bestandteil der CDC28-Kinase, interagiert mit CDC2-Cyclin B [191]	[74]	[183]:A, [4]:Z	AE	ACEFPT		AFP		ACEP
chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	CSPG6	9126	SMC3	beteiligt an Schwesterchromatidkohäsion und Chromosomensegregation, Bestandteil des Cohesin-Komplexes, Expression durch Wnt/β-Catenin-Signalweg gesteuert [192]	[74]		AE	ACEFPT		ACEFT		ACEP
deoxycytidine kinase	DCK	1633		phosphoryliert Desoxyribonukleoside (EG)	[21, 41]		E			AP		ACEP
dnaj (hsp40) homolog, subfamily c, member 9	DNAJC9	23234		vermittelt Proteinfaltung u./o. -export, interagiert vermutlich mit HSP70-Proteinen [193]	[41]		AE	ACEFPT		AFP	E	ACEP
deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	DTYMK	1841	TYMK, CDC8	phosphoryliert dTMP zu dTDP, beteiligt an Elongation während DNA-Replikation [194]	[21]			ACEFPT		AFP		ACEFPT
enhancer of zeste homolog 2 (drosophila)	EZH2	2146		transkriptioneller Repressor, Histonmethyltransferase, rekrutiert HDAC1 und verringert Zugänglichkeit der DNA für aktivierende Transkriptionsfaktoren, fördert Proliferation (u. a. durch Derepression von Cyclin A), Onkogen? [185, 195, 196]	[185]	[15]:AF	AE	ACEFPT		AEFP	E	ACEP
fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	2171		beteiligt an Fettsäuretransport oder -metabolismus (EG)	[74]		E	A		C	CE	ACEP
fatty acid desaturase 1	FADS1	3992	D5D	beteiligt an Fettsäuresynthese, Rolle in Zytostatikaresistenz? (EG, [197])	[41]			F				ACEFPT
fk506 binding protein 5	FKBP5	2289	FKBP51	Calcineurininhibitor, bindet an Immunsuppressiva FK506 und Rapamycin, proapoptisch (EG, [198])	[21]	[2]:A, [15]:AF				ACEFPT		
h2a histone family, member x	H2AFX	3014		Mitglied der H2A-Histonfamilie, Bestandteil von Nukleosomen (EG)	[21]		ACE	ACEFPT		AEFPT		ACEP
chromosome condensation protein g	HCAP-G	64151	CAPG	beteiligt an Chromosomenkondensation und -segregation, Bestandteil des Condensin-Komplexes, beteiligt an DNA-Reparatur? (EG, [199])	[21]		ACE	ACEFPT		AEFPT		ACEP

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↓	A549 72 h↓	HMEC 24 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 24 h↓	MCF-7 72 h↓
high-mobility group box 2	HMGB2	3148	HMG2	fördert DNA-Flexibilität, wichtig für DNA-Reparatur, -Rekombination und Transkription (EG, [200])	[18]	[2]:A	AE	ACEFPT	E	ACEFPT		ACEP
hyaluronan-mediated motility receptor (rhamm)	HMMR	3161	RHAMM	stabilisiert mitotischen Spindelapparat, interagiert mit Dynein; Onkogen, beteiligt an Migration und Metastasierung (EG, [201, 202])	[3]	[2]:A, [3]:C	ACEF	ACEFPT		AEFPT	F	ACEFP
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h3 (2h9)	HNRPH3	3189	2H9	Bestandteil von hnRNPs, beteiligt am Spleißen der prä-mRNA (EG)	[74]		AEF	C		A		ACEFP
KIAA0101	KIAA0101	9768		?	[18]	[2]:A, [15]:AF	E	ACEFPT	E	AFPT		ACEPT
kinesin family member 23	KIF23	9493	MKLP1, KNSL5	Motorprotein der Kinesinfamilie, wichtig für Mikrotubulidynamik, interagiert mit PRC1 (EG, [203])	[21]	[2]:A	ACE	ACEFPT	E	AEFP		ACEP
kinesin-like 7	KNSL7	56992	HKLP2	Motorprotein der Kinesinfamilie, interagiert mit Ki67 [204]	[21]		ACEF	ACEFPT		AEFPT		ACEPT
karyopherin alpha 2 (rag cohort 1, importin alpha 1)	KPNA2	3838		beteiligt am Import von RNAs und Proteinen in den Nukleus, vermittelt u. a. Import von CHEK2, interagiert mit Proteinen des NPC ( <i>nuclear pore complex</i> ) (EG, [205])	[21]		AEF	ACEFPT		AEFP		AC
lamin b receptor	LBR	3930		Bestandteil der inneren Kernmembran, interagiert mit Chromatin, Rezeptor für Lamin B, wird während Mitose durch CDC2 phosphoryliert [206, 207]	[18]	[2]:A	ACE	ACEFPT		ACFP	F	ACEFP
hypothetical protein mac30	MAC30	27346		Funktion?, induziert durch BRCA1 [208]	[17]		E	CEF		AEFPT		ACEFP
mad2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	MAD2L1	4085	MAD2	beteiligt am Spindelcheckpoint, überwacht Anheftung von Chromosomen an mitotische Spindelfasern, inhibiert APC/CDC20-Komplex, Tumorsuppressor (EG, [181, 211])	[18]	[2]:A, [15]:AF	AE	ACEFPT		AEFPT		ACP
mcm2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin	MCM2	4171		Bestandteil des pre-RC, reguliert dessen Helikase-Aktivität, ATR-Substrat (EG, [179, 188, 212])	[18]	[2]:A, [15]:AF	ACE	ACEFPT	E	AEFPT	ACE	ACEPT
mcm7 minichromosome maintenance deficient 7	MCM7	4176		Bestandteil des pre-RC, interagiert mit CDK4, RB1 und Checkpointproteinen (EG, [179, 186, 188, 212])	[18, 21, 74]	[2]:A	ACEF	ACEFPT		ACEFPT	AE	ACEFPT
antigen identified by monoclonal antibody ki-67	MKI67	4288	Ki-67	beteiligt an mitotischer Progression, universeller Marker für proliferierende Zellen, reguliert Chromatinstruktur [204, 213, 214]	[74]	[2]:A, [15]:AF	ACEFT	ACEFPT	E	AEFP		ACEP
muts homolog 6 (e. coli)	MSH6	2956	GTBP	zentrale Rolle in DNA-Reparatur (MMR), bildet mit MSH2 MUTS $\alpha$ -Komplex, Bestandteil des BASC-Komplexes, interagiert mit p53, BLM, RAD51 [173, 215, 216]	[74]		ACEF	ACEFPT		ACEFPT	E	ACEP
nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	NASP	4678		moduliert G1/S-Transition durch Vermittlung der Bindung von Histon H1 an DNA [217]	[21]		AEFT	ACEFPT		AEFPT		ACEP

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↓	A549 72 h↓	HMEC 24 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 24 h↓	MCF-7 72 h↓
nima (never in mitosis gene a)-related kinase 2	NEK2	4751		beteiligt an Spindelbildung und Chromosomen-segregation, wichtig für Zentrosomen-integrität und -trennung, beteiligt am G2-Checkpoint, phosphoryliert KNTC2 [218-220]	[21]	[15]:AF	AE	ACEFPT		AEFPT		ACEP
polo-like kinase (drosophila)	PLK1	5347	PLK	Kinase mit zentraler Rolle in Mitose, reguliert Spindelbildung, vermittelt nukleäre Lokalisation von Cyclin B1 und CDC25C, Abbau von FBXO5, phosphoryliert z. B. KIFC1 [169, 178, 221-223]	[3]		ACEFP	ACEFPT	P	AEFP	FPT	ACEFPT
polyamine-modulated factor 1	PMF1	11243		Transkriptionsfaktor, reguliert gemeinsam mit NRF-2 die Expression von SAT [224]	[21]			ACT				ACEP
<b>polymerase (dna directed), delta 1, catalytic subunit</b>	POLD1	5424	POLD	Untereinheit von DNA-Polymerase $\delta$ , beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, assoziiert mit PCNA [225]	[209]			ACEFPT				ACEPT
protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	9055		beteiligt an Spindelbildung und Zytokinese, interagiert mit RACGAP1, KIF4A, KIF23 und CENPE (EG, [203, 226])	[210]	[15]:AF	ACE	ACEFPT		AEFPT		ACEP
prothymosin, alpha (gene sequence 28)	PTMA	5757	ProT $\alpha$	antiapoptotisch durch Inhibition der Apoptosombildung, beteiligt an Chromosomendekondensation, fördert Zellproliferation, Onkogen? [228-230]	[18]			ACEFPT		AEFPT		ACEFPT
pituitary tumor-transforming 1	PTTG1	9232	<b>securin</b>	inhibiert Chromosomensegregation und dadurch Progression durch Anaphase durch Hemmung von ESPL1, Ubiquitinierungs-substrat von APC/CDC20, wirkt onkogen und angiogen, moduliert p53-Funktion und -Expression (EG, [227, 231])	[21, 227]	[15]:AF	AE	ACEFPT		AFP		ACEP
rac gtpase activating protein 1	RACGAP1	29127	MgcRac-GAP	beteiligt an Spindelbildung und Zytokinese, interagiert mit PRC1; phosphoryliert durch Aurora B, reguliert RHO-A und CDC42 negativ [226, 232, 233]	[74]		AE	ACEFPT		AFP		ACEP
RecQ protein-like 4	RECQL4	9401		DNA-Helikase, Rolle in DNA-Replikation u./o. -Reparatur? [234]	[21]	[15]:AF						ACEP
replication factor c (activator 1) 2, 40kda	RFC2	5982		Bestandteil des RFC, beteiligt an Elongation während DNA-Replikation, Bestandteil des BASC-Komplexes, interagiert mit RAD17, beteiligt an DNA-Reparatur und Returierung des 9-1-1-Komplexes (EG, [173, 235])	[41]			ACEFPT		AFP		ACEP
replication factor c (activator 1) 3, 38kda	RFC3	5983		Bestandteil des RFC, beteiligt an Elongation während DNA-Replikation, Rolle in DNA-Reparatur (EG)	[41]		AE	ACEFPT		AEFPT		ACEP
sin3-associated polypeptide, 30kda	SAP30	8819		Bestandteil des Histondeacetylase-Komplexes zusammen mit HDAC1, HDAC2, SIN3 u.v.a., beteiligt an transkriptioneller Repression, interagiert mit weiteren transkriptionellen Repressoren (YY1, NCOR1) [236-238]	[21]			AT		AFT		ACEFP

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h↓	A549 72 h↓	HMEC 24 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 24 h↓	MCF-7 72 h↓
stearoyl-coa desaturase (delta-9-desaturase)	SCD	6319		beteiligt an Fettsäuresynthese, reguliert Wachstum und Differenzierung [239]	[74]		CEF	ACEFP	P	CP		ACEFPT
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	SLCO4A1	28231	OATP-E	Anionentransporter [240]	[74]							ACEFP
sperm associated antigen 5	SPAG5	10615	hMAP126	reguliert mitotischen Spindelapparat; phosphoryliert durch CDC2 (EG,[241])	[21]		AE	ACEFPT		AEFP		ACEP
serine/threonine kinase 6	STK6	6790	<b>Aurora A, AURKA</b>	reguliert Bildung und Stabilität der Spindelfasern, essenziell für Centrosomenduplikation, beteiligt an Chromosomensegregation, Aktivität wird über Autophosphorylierung reguliert (stimuliert durch TPX2), phosphoryliert CENPA und steuert dadurch korrekte Anheftung der Spindelfasern an Kinetochoren, phosphoryliert p53 und fördert dessen Ubiquitinierung durch MDM2, Onkogen (EG, [246-248])	[3]	[3]:C, [15]:AF, [4]:Z	ACEF	ACEFPT		AEFPT	F	ACEP
stathmin 1/oncoprotein 18	STMN1	3925	OP18	mitotischer Regulator, induziert Depolymerisation von Mikrotubuli (EG)	[244, 245]	[14]:CPT, [242]:A	A	ACEFPT		AFP	A	ACEP
timeless homolog (drosophila)	TIMELESS	8914	TIM1	beteiligt an Chromosomenkohäsion, interagiert mit Cohesin-Komplex [249]	[74]		E	ACEFPT		AFP		ACEP
topoisomerase (dna) ii alpha 170kda	TOP2A	7153		Kontrolle der DNA-Topologie, beseitigt Torsionsstress während DNA-Replikation und Transkription (EG)	[18, 21, 74]	[2]:A, [15]:AF, [38]:T	AE	ACEFPT		AEFPT		ACEP
tpx2, microtubule-associated protein homolog (xenopus laevis)	TPX2	22974		beteiligt an Spindelformation, rekrutiert Aurora A zum Spindelapparat und stimuliert ihre Autophosphorylierung, interagiert mit KPNB1 [246, 250, 251]	[74]	[15]:AF	AE	ACEFPT		AEFP		ACEP
trophinin associated protein (tastin)	TROAP	10024		assoziiert mit Mikrotubuli-Zytoskelett [252]	[21]		AEF	ACEFPT		AEFP		ACEP
thymidylate synthetase	TYMS	7298	TS	wandelt dUMP in dTMP um, kritisch für DNA-Replikation und -Reparatur (EG)	[74]	[2]:A				AFP		ACEP
ubiquitin-conjugating enzyme e2c	UBE2C	11065	UBCH10	Ubiquitin-E2-Enzym, vermittelt Abbau mitotischer Cycline, beteiligt an Zellzyklusprogression (EG, [253])	[74]	[15]:AF	ACE	ACEFPT		AEFP		ACEPT
ubiquitin-conjugating enzyme e2s	UBE2S	27338		Ubiquitin-E2-Enzym (EG)	[21]	[2]:A, [15]:AF	ACE	ACEFPT		AEFP	FP	ACEFP
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase l5	UCHL5	51377	UCH37	katalysiert Deubiquitinierung [254]	[41]		E			P		ACEP
wee1 homolog (s. pombe)	WEE1	7465		beteiligt am G2-Checkpoint, katalysiert inhibitorische Phosphorylierung von CDC2 (EG, [255, 256])	[21]	[243]:C	A	ACEFPT		AFP	A	ACEP

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatika-Behandlung, Seite 1

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
adenylate kinase 1	AK1	203		s. Tab. 6-1			ACEF↑	ACEFPT↑		P↑						C↑
asf1 anti-silencing function 1 homolog b (s. cerevisiae)	ASF1B	55723	CIA-II	Histonchaperon, vermittelt Nukleosomenbildung während Replikation und DNA-Reparatur (NER), Rolle in Chromatinremodeling, interagiert mit CHAF1A/B [260, 261]				ACEFPT↓		AFP↓	AE↓	ACEPT↓				
activator of s phase kinase	ASK	10926	DBF4	stimuliert Kinaseaktivität von CDC7, essenziell für Aktivierung von Replikationsursprüngen und G1/S-Transition [262]	[257, 258]	[4]:Z	ACE↓	ACEFPT↓		ACEFP↓		ACEP↓			P↓	
asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (dro-	ASPM	259266	ASP	beteiligt an Funktion des mitotischen Spindelapparats [263]			ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓	F↓		F↓	F↓
<b>aurora kinase b</b>	<b>AURKB</b>	<b>9212</b>	<b>STK12</b>	reguliert Chromosomenkondensation, -ausrichtung, -segregation und Zytokinese, interagiert mit Survivin und INCENP, phosphoryliert Histon H3 und CENPA, steuert korrekte Anheftung der Spindelfasern an Kinetochoren, vermittelt Lokalisation von Checkpointproteinen (BUBR1, MAD2, CENPE) an Kinetochoren [170, 171, 246, 247, 264]	[51, 242, 257-259]	[2]:A, [242]:A	ACE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓				
brca1 associated ring domain 1	BARD1	580		bildet Komplex mit BRCA1 und CSTF1, Sensor für DNA-Schäden, beteiligt an G1/S-Arrest, Rolle in Apoptose, Rolle in ATM/ATR-vermittelter p53-Phosphorylierung, Tumorsuppressor [265-267]	[257, 258]	[4]:Z	AE↓			AEFPT↓	A↓	ACEFP↓				
bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1b	BAZ1B	9031	WSTF	beteiligt an Chromatinremodeling während DNA-Replikation [268]			E↓					ACEP↓				T↓
baculoviral iap repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	332	<b>survivin</b>	s. Tab. 6-2		[2]:A, [4]:Z	ACE↓	ACEFPT↓	P↓	AEFPT↓		ACEFPT↓				F↓
bloom syndrome	BLM	641		Helikase und ATPase mit Rolle in DNA-Rekombination, Bestandteil des BASC-Komplexes, interagiert mit p53, WRN und FEN1 (EG, [173, 269-271])			A↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEFPT↓				
breast cancer 1, early onset	BRCA1	672		s. Tab. 6-2	[258]	[2]:A, [162]:ACCEPT	AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓		FP↑		PCE↑

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
breast cancer 2, early onset	BRCA2	675	FANCD1	beteiligt an DNA-Reparatur und -Rekombination, reguliert RAD51, moduliert Zellzyklusprogression, interagiert mit FA-Proteinen, Tumorsuppressor (EG, [175, 274, 275])	[258]	[162]:ACEPT						ACEP↓		F↑		
brca1 interacting protein c-terminal helicase 1	BRIP1	83990	BACH1	Helikase, interagiert mit BRCA1, beteiligt an DNA-Reparatur [276]								ACEP↓		F↑		
barren homolog (drosophila)	BRRN1	23397	HCAP-H	beteiligt an Chromosomenkondensation und Schwesterchromatidensegregation, Bestandteil des Condensin-Komplexes (EG, [277])		[2]:A	ACE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEPT↓		CEP↑		
btg family, member 2	BTG2	7832	PC3, TIS21	s. Tab. 6-1		[2]:A, [14]:CPT, [15]:AF	ACEFPT↑	ACEFPT↑			ACEFPT↑	ACEFPT↑				
bub1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1	699		s. Tab. 6-2	[258, 272]	[3]:C	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEFPT↓		AEP↑	AC↓	
bub1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	BUB1B	701	BUBR1	beteiligt an Spindelcheckpoint, hemmt APC durch Interaktion mit CDC20, interagiert mit CENPE [181, 278]	[258]	[2]:A	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEPT↓				
carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	CAD	790		De-novo-Biosynthese von Pyrimidinnukleotiden (EG)								ACEP↓				
calpain 2, (m/II) large subunit	CAPN2	824		Cysteinprotease, beteiligt an Migration, lysiert Zytoskelett- und Adhäsionsproteine, u. a. FAK und Paxillin, interagiert mit ERK, vermittelt Chromosomenausrichtung während Mitose [279-281]		[2]:A		ACEFP↑								
chromobox homolog 5 (hp1 alpha homolog, drosophila)	CBX5	23468	HP1	beteiligt an Assoziation und Segregation von Schwesterkinetochoren, vermittelt Silencing der Genexpression in Heterochromatinregionen [282, 283]	[257, 273]			ACEF↓		AEFPT↓		ACEP↓				C↑
<b>cyclin a2</b>	CCNA2	890		vermittelt im Komplex mit CDK2 G1/S-Transition und S-Phasen-Progression, vermittelt im Komplex mit CDC2 G2/M-Transition (EG, [287])	[257, 258]	[11]:E, [15]:AF, [4]:Z	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	ACEPT↓	ACEP↓				F↓
<b>cyclin b1</b>	CCNB1	891		s. Tab. 6-2	[272]	[7]:A, [15]:AF, [4]:Z	ACEF↓	ACEFPT↓	P↓	AEFP↓		ACEP↓			AF↓	AF↓



Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
cyclin b1 interacting protein 1	CCNB1IP1	57820	HEI10	E3-Ubiquitinligase, ubiquitiniert Cyclin B1 und inhibiert dadurch G2/M-Progression, interagiert mit E2-Enzym UBE2L3 [288]			C↑							AEPT↓		CET↓
<b>cyclin b2</b>	CCNB2	9133		s. Tab. 6-2	[272]	[4]:Z	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓			F↓	F↓
<b>cyclin d1</b> (prad1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	595		s. Tab. 6-1	[258, 286]	[16]:A, [2]:A		ACEFPT↑		AEFPT↑						
<b>cyclin e2</b>	CCNE2	9134		bildet Komplex mit CDK2, vermittelt G1/S-Transition, u. a. durch Phosphorylierung von RB1, beteiligt an prä-mRNA-Spleißen und Zentrosomenduplikation [188, 289]	[258]	[4]:Z				ACEFPT↓	CE↓	ACEP↓		CFP↑		ACP↑
cyclin f	CCNF	899		an Checkpoints und Zellzyklusarrest beteiligt? [290]		[4]:Z		ACEFPT↓		AEFP↓	T↓	ACEP↓			A↓	
cyclin g1	CCNG1	900		s. Tab. 6-1		[14]:CPT	ACFP↑	F↑			CEP↑	ACFP↑				AFP↓
cyclin g2	CCNG2	901		zellzyklusabhängige Expression, Induktion durch DNA-Schädigung (auch p53-unabhängig); vermittelt G1/S-Arrest [284, 291, 292]		[4]:Z, [284]:Z					EP↑	ACEFP↑		T↓	AF↓	AFPT↓
cell division cycle 2, g1 to s and g2 to m	CDC2	983	CDK1, p34Cdc2	s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]	[2]:A, 96:CPT, [11]:E, [15]:AF, [38]:T, [4]:Z	AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	T↓	ACEP↓		E↑		F↓
cdc20 cell division cycle 20 homolog (s. cerevisiae)	CDC20	991	p55Cdc	s. Tab. 6-2	[258, 272]	[2]:A	ACEF↓	ACEFPT↓	P↓	ACEFPT↓	FP↓	ACEFPT↓		F↓	ACEFP↓	
cell division cycle 25a	CDC25A	993		aktiviert CDK1- und CDC2-Cyclin-Komplexe durch Dephosphorylierung, beteiligt an G1/S- und G2/M-Progression; Target des G1/S- und S-Phasen-Checkpoints (EG, [174, 285])	[257, 258, 272]	[285]:AC				AFP↓		ACEP↓		ACEFP↑		ACP↑
cell division cycle 25b	CDC25B	994		s. Tab. 6-2		[4]:Z	CE↓	ACEF↓		AFP↓		A↓				
cell division cycle 25c	CDC25C	995		aktiviert CDC2-Cyclin B-Komplex durch Dephosphorylierung, fördert G2/M-Transition; Angriffspunkt des G2-Checkpoints (EG, [169, 293])	[273]		AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEFP↓			AF↓	F↓
cdc45 cell division cycle 45-like (s. cerevisiae)	CDC45L	8318	CDC45	beteiligt an Initiation der DNA-Replikation, interagiert mit Polymerase $\alpha$ und MCM7 (EG)	[258]						ACET↓	ACEFP↓				F↓

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	2	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
cdc6 cell division cycle 6 homolog (s. cerevisiae)	CDC6	990		s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]		E↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	AE↓	ACEP↓		FP↑		
cdc7 cell division cycle 7 (s. cerevisiae)	CDC7	8317	CDC7L1	phosphoryliert MCMs, essenziell für Aktivierung von Replikationsursprüngen, Zielprotein des S-Phasen-Checkpoints [174, 294]	[258]					AFP↓		ACEP↓				C↑
cell division cycle associated 3	CDCA3	83461	TOME1	beteiligt an G2/M-Transition, notwendig für CDC2-Cyclin B-Aktivierung, vermittelt Abbau von WEE1, wird während G1 durch APC abgebaut [295]			ACEP↓	ACEFPT↓	EP↓	AEFPT↓	E↓	ACEP↓			AF↓	F↓
cell division cycle associated 4	CDCA4	55038		koexprimiert mit Zellzyklusgenen wie CDC2, CDC7, TOP2A, MKI67; Rolle in Zellzyklusprogression? [296]		[13]:A		ACEFPT↓				ACEP↓				
cell division cycle associated 8	CDCA8	55143		koexprimiert mit Zellzyklusgenen wie CDC2, CDC7, TOP2A, MKI67; Rolle in Zellzyklusprogression? [296]			ACE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓			AF↓	F↓
cyclin-dependent kinase 2	CDK2	1017		s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]	[4]:Z		ACFT↓		AFP↓		ACE↓				
cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21, cip1)	CDKN1A	1026	p21, WAF1, CIP1	s. Tab. 6-1		[2]:A, [7, 8]:A	ACEFPT↑	ACEFPT↑		FP↑	ACEFPT↑	ACEFPT↑	FT↑	ACEFPT↑	AC↑	ACEP↑
cyclin-dependent kinase inhibitor 2c (p18, inhibits cdk4)	CDKN2C	1031	p18 <sup>INK4C</sup>	negative Regulation der Komplexe von CDK4 und CDK6 mit D-Cyclinen, inhibiert G1/S-Transition (EG, [51])	[258]		ACEF↓	ACEFPT↓				ACEFP↓		T↓		F↓
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (cdk2-associated dual specificity phosphatase)	CDKN3	1033	CDI, KAP	s. Tab. 6-2			ACE↓	ACEFPT↓	P↓	AEFPT↓		ACEP↓				F↓
dna replication factor	CDT1	81620		Bestandteil des pre-RC, rekrutiert MCM-Komplex; inhibiert durch Interaktion mit Geminin [179]	[258]						AT↓	ACEPT↓				
centromere protein a, 17kda	CENPA	1058		histonartiges Zentromerprotein, vermittelt Anheftung von Kinetochoren an Mikrotubuli; phosphoryliert durch Aurora A (EG, [247])	[257]	[13]:A	ACEFP↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEPT↓			AF↓	F↓
centromere protein e, 312kda	CENPE	1062		Motorprotein, beteiligt an Chromosomensegregation und Spindelelongation, Teil des Spindelcheckpoints, interagiert mit BUB1B, PRC1 (EG, [177, 203, 278])	[257, 258]	[2]:A	ACEFPT↓	ACEFPT↓		AEFP↓	AEFP↓	ACEP↓			ACFP↓	F↓

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 4

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 5

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
centromere protein f, 350/400ka (mitosin)	CENPF	1063		Motorprotein, beteiligt an Chromosomensegregation (EG)		[2]:A, [4]:Z	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓	F↓		A↓	F↓
chromatin assembly factor 1, subunit a (p150)	CHAF1A	10036	CAF-1 subunit p150	Histonchaperon, vermittelt Nukleosomenbildung während der Replikation und DNA-Reparatur, interagiert mit ASF1A/B [260, 261]				ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓		FP↑		
chromosome condensation 1	CHC1	1104	RCC1	Guaninnukleotid-Austauschfaktor für RAN, beteiligt an Spindelbildung, Chromosomensegregation und nukleozytoplasmatischem Transport; phosphoryliert durch CDC2 [297, 298]			E↓	CP↓				ACEFP↓				
chk1 checkpoint homolog (s. pombe)	CHEK1	1111	<b>CHK1</b>	s. Tab. 6-2	[257, 258]		ACEFT↓	ACEFPT↓		AFP↓	ACE↓	ACEFP↓				
chk2 checkpoint homolog (s. pombe)	CHEK2	11200	<b>CHK2</b>	beteiligt am S- und G2/M-Checkpoint, inhibiert CDC25-Proteine, stimuliert DNA-Reparatur, interagiert mit BRCA1; reguliert durch ATM (und ATR) (EG, [174, 190])								ACEP↓		AE↑		
citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	CIT	11113	Citron-K, CRIK	reguliert G2/M-Transition und Zytokinese, Target des RHO-Signalwegs, phosphoryliert leichte Ketten von Myosin [299, 300]			E↓	ACFT↓		AFP↓		AEP↓				F↓
cdc28 protein kinase regulatory subunit 1b	CKS1B	1163	CKS1, CksHs1	Komponente des SCF-Komplexes, Interaktion mit CDK2-Cyclin-Komplexen, Bestandteil der CDC28-Kinase, moduliert Expression von CDC20, wichtig für Mitose, Ubiquitinierungssubstrat von APC/CDH1 [188, 301-303]	[257, 258]	[183]:A	AET↓	ACEFPT↓		AFPT↓		ACEP↓				
cdc28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	1164	CksHs2	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[183]:A, [4]:Z	AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓			AFP↓	
chromosome condensation-related smc-associated protein 1	CNAP1	9918	hCAP-D2	beteiligt an Chromosomenkondensation, Bestandteil des Condensin-Komplexes [305]			ACE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓				
cse1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	1434	CAS	beteiligt am Spindelcheckpoint, Einfluss auf nukleozytoplasmatischen Transport durch Reexport von Importin $\alpha$ , Rolle in Adhäsion und Apoptose [306]				ACEFPT↓		AF↓		ACEP↓				
chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	CSPG6	9126	SMC3	s. Tab. 6-2			AE↓	ACEFPT↓		ACEFT↓		ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 6

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (s. cerevisiae)	DCC1	79075		Bestandteil eines alternativen RFC, gewährleistet Schwesterchromatidkohäsion, interagiert mit PCNA [307]			E↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				ACP↑
deoxycytidine kinase	DCK	1633		s. Tab. 6-2	[258]		E↓			AP↓		ACEP↓				
dna cross-link repair 1b (pso2 homolog, s. cerevisiae)	DCLRE1B	64858	SNM1B	vermutlich beteiligt an Reparatur von Doppelstrangbrüchen [308]								ACEP↓				
damage-specific dna binding protein 2, 48kda	DDB2	1643		s. Tab. 6-1		[39]:C	ACEFP↑	ACEFP↑		A↓	ACEFP↑	CFP↑				
dek oncogene (dna binding)	DEK	7913		beeinflusst nukleosomale DNA-Topologie und verringert Effizienz der DNA-Replikation, transkriptioneller Koaktivator, beteiligt am prä-mRNA-Spleißen [309, 310]			E↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACP↓				
dihydrofolate reductase	DHFR	1719		katalysiert Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat Expression bei G1-Arrest reprimiert [304]	[258, 286, 304]		AE↓	ACEFPT↓	E↓	AFP↓	CE↓	ACEFP↓				F↓
diaphanous homolog 1 (drosophila)	DIAPH1	1729	DIA1	Rolle in Mitose und Zytokinese, interagiert mit PKD2, beteiligt an Reorganisation des Zytoskeletts [311]								ACEP↓		T↑		
discs, large homolog 7 (drosophila)	DLG7	9787	HURP	während Mitose an den Spindelpolen lokalisiert, beteiligt an Adhäsion [312]		[2]:A	ACE↓	ACEFPT↓	EP↓	AEFPT↓		ACEP↓				F↓
dna2 dna replication helicase 2-like (yeast)	DNA2L	1763		DNA-Helikase, beteiligt an DNA-Replikation [313]								ACEP↓				
dna (cytosine-5)-methyltransferase 1	DNMT1	1786	MCMT	vermittelt Methylierung neu replizierter DNA, beteiligt an DNA-Reparatur (MMR), interagiert mit PCNA, Repression der E2F-abhängigen Transkription [314-316]				ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓		AF↑		
dna (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta	DNMT3B	1789		vermittelt Methylierung neu replizierter DNA, beteiligt an Chromosomenkondensation während Mitose (EG, [199])								ACEP↓				C↑
deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	DTYMK	1841	TYMK, CDC8	s. Tab. 6-2				ACEFPT↓		AFP↓		ACEFPT↓				
dual specificity phosphatase 1	DUSP1	1843	MKP1, CL100	s. Tab. 6-1						ACFP↑				T↑	EP↑	
dupp pyrophosphatase	DUT	1854	dUTPase	hydrolysiert dUTP zu dUMP, wichtig für DNA-Replikation [317]	[257, 258]		ACEFPT↓	ACEFPT↓		P↓	E↓	ACEPT↓				

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytop.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
e2f transcription factor 1	E2F1	1869		Transkriptionsfaktor, transaktiviert zahlreiche an DNA-Replikation, -Reparatur, Mitose und Checkpoints beteiligte Zielgene, wird durch Assoziation mit RB1 in Repressor verwandelt [257, 258, 272, 273]	[258]						A↓	ACEP↓		EF↑		
epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	ECT2	1894		beteiligt an Spindelbildung und Zytokinese (EG, [318])			AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
extra spindle poles like 1 (s. cerevisiae)	ESPL1	9700	separase, separin	beteiligt an Spindelbildung und Chromosomensegregation, reguliert CDC14, assoziiert mit Securin, spaltet Cohesin-Untereinheit RAD21 [319, 320]			AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
exonuclease 1	EXO1	9156	HEX1	fungiert als Exo- und Endonuklease und als RNase H, beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, Rolle bei Aktivierung des S-Phasen-Checkpoints, interagiert mit MSH2, WRN (EG, [322-324])		[2]:A	AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓		FP↑		AC↑
fanconi anemia, complementation group a	FANCA	2175	FA, FAA	Bestandteil des FA-Komplexes, beteiligt an DNA-Reparatur, Schutz vor Chromosomenbrüchen [175]								ACEP↓				
fanconi anemia, complementation group e	FANCE	2178	FACE	Bestandteil des FA-Komplexes, beteiligt an DNA-Reparatur, Schutz vor Chromosomenbrüchen [175]						AEFPT↓		ACEFP↓				
Fanconi anemia, complementation group F	FANCF	2188		Bestandteil des FA-Komplexes, fungiert als Adaptorprotein, beteiligt an DNA-Reparatur, Schutz vor Chromosomenbrüchen [175, 325]										ACPT↓		
fanconi anemia, complementation group g	FANCG	2189	FAG, XRCC9	Bestandteil des FA-Komplexes, beteiligt an DNA-Reparatur, Schutz vor Chromosomenbrüchen, Interaktion mit BRCA2 [175, 326]			E↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEPT↓				
f-box protein 5	FBXO5	26271	EMI1	inhibiert APC/CDH1 und APC/CDC20, reguliert Eintritt in S-Phase und Progression durch frühe Mitose; Abbau durch PLK1 reguliert (EG, [222, 321])	[321]		ACEF↓			AEFPT↓	AT↓	ACEP↓				
flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	2237		Exo- und Endonuklease, beteiligt an DNA-Replikation (entfernt RNA-Primer) und an DNA-Reparatur, interagiert mit PCNA, BLM u. a. (EG, [215, 327, 328])	[257, 258]	[2]:A	CE↓	ACEFPT↓		AFPT↓	E↓	ACEP↓		FP↑		
zwilch	FLJ10036	55055		lokalisiert an Kinetochoren, beteiligt an Chromosomensegregation [329]			AE↓	ACEFPT↓		AFP↓	E↓	ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 7

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
forkhead box m1	FOXM1	2305	FKHL16	Transkriptionsfaktor, transaktiviert Cyclin B1 und D1 und weitere für Replikation und Mitose wichtige Targets [330, 331]		[2]:A, [4]:Z	AE↓	ACEFPT↓		AEFP↓	A↓	ACEPT↓				
fus interacting protein (serine-arginine rich 1)	FUSIP1	10772	SRp38	inhibiert prä-mRNA-Spleißen in mitotischen Zellen, interagiert mit FUS (EG, [332])			AE↓	ACEP↓				ACP↓		A↓		
ga binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kda	GABPB2	2553	E4TF1	Transkriptionsfaktor, transaktiviert Aurora A und RB1 (EG, [334, 335])			E↓				CEF↓	ACEFP↓		T↑		
growth arrest and dna-damage-inducible, alpha	GADD45A	1647	GADD45	s. Tab. 6-1		[7]:A, [9, 15]:AF	ACEFPT↑	ACEFPT↑			EP↑	ACPT↑				
<b>geminin</b> , dna replication inhibitor	GMNN	51053		inhibiert CDT1 und hemmt Initiation der DNA-Replikation; Substrat von APC/CDC20 [213, 336]	[333]			ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
g-protein signalling modulator 2 (ags3-like, c. elegans)	GPSM2	29899	LGN	reguliert G-Protein-Signale, moduliert Spindelorganisation [201, 337]			AE↓			AFP↓		ACEFP↓			AF↓	AF↓
chromosome condensation protein g	HCAP-G	64151	CAPG	s. Tab. 6-2			ACE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
high-mobility group box 1	HMGB1	3146	HMG1	fördert DNA-Flexibilität, wichtig für DNA-Reparatur, -Rekombination und Transkription (EG, [200])	[257]	[2]:A	AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
high-mobility group box 2	HMGB2	3148	HMG2	s. Tab. 6-2		[2]:A	AE↓	ACEFPT↓	E↓	ACEFPT↓		ACEP↓				
hyaluronan-mediated motility receptor (rhamm)	HMMR	3161	RHAMM	s. Tab. 6-2	[257]	[2]:A, [3]:C	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	F↓	ACEFP↓	F↓	F↓		
kinesin family member 11	KIF11	3832	<b>Eg5</b>	Motorprotein der Kinesinfamilie, beteiligt an Chromosomenpositionierung, Zentrosomentrennung und Ausbildung des mitotischen Spindelapparats (EG)			ACEF↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEPT↓				
kinesin family member 14	KIF14	9928		Motorprotein der Kinesinfamilie			AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	F↓	ACEP↓				
kinesin family member 18a	KIF18A	81930		Motorprotein der Kinesinfamilie			ACEF↓	ACEFPT↓				ACE↓				
kinesin family member 20a	KIF20A	10112	RAB6KIFL	Motorprotein der Kinesinfamilie [338]		[2]:A	AE↓	ACEFPT↓	P↓	AEFPT↓	F↓	ACEP↓	F↓		ACFP↓	AF↓
kinesin family member 22	KIF22	3835	Kid, KNLSL4	Motorprotein der Kinesinfamilie, beteiligt an Ausrichtung der Chromosomen während der Metaphase, erzeugt <i>polar ejection forces</i> (EG, [339])	[257, 258]	[2]:A	ACE↓	ACEFPT↓		AFPT↓		ACEFPT↓				

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
kinesin family member 23	KIF23	9493	MKLP1, KNSL5	s. Tab. 6-2		[2]:A	ACE↓	ACEFPT↓	E↓	AEFP↓		ACEP↓		P↑		
kinesin family member 2c	KIF2C	11004	MCAK, KNSL6	Motorprotein der Kinesinfamilie, beteiligt an Chromosomenpositionierung und Zentromerteilung; phosphoryliert durch Aurora B (EG)			AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEPT↓				F↓
kinesin family member 4a	KIF4A	24137		Motorprotein der Kinesinfamilie, beteiligt an Chromosomenkondensation und -segregation, Bestandteil des Condensin-Komplexes, interagiert mit PRC1 [203, 340]	[257, 258]		ACE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓				F↓
kinesin family member c1	KIFC1	3833	MKLP2	Motorprotein der Kinesinfamilie, beteiligt an Zytokinese, interagiert mit Aurora B, PLK1 und CDC14; phosphoryliert durch PLK1 [223, 341]	[272]			ACEFPT↓		AFP↓		ACEFPT↓				F↓
kinesin-like 7	KNSL7	56992	HKLP2	s. Tab. 6-2			ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEPT↓				
kinetochore associated 1	KNTC1	9735	ROD	beteiligt an Chromosomensegregation, Rolle im Spindelcheckpoint (EG, [342])		[2]:A	E↓			ACEFP↓		ACEP↓				
kinetochore associated 2	KNTC2	10403	HEC, HEC1	beteiligt an Chromosomenausrichtung und -segregation, Rolle im Spindelcheckpoint, phosphoryliert durch NEK2 [218, 343, 344]	[257, 258]		AE↓			AEFPT↓		ACEP↓				
lamin b receptor	LBR	3930		s. Tab. 6-2		[2]:A	ACE↓	ACEFPT↓		ACFP↓	F↓	ACEFP↓				
ligase i, dna, atp-dependent	LIG1	3978		DNA-Ligase, beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, interagiert mit PCNA und Polymerase β (EG, [345])	[258]					P↓		ACEP↓				F↓
lamin b1	LMNB1	4001		Bestandteil der nukleären Lamina, interagiert mit Thymopoietin, Rolle in DNA-Replikation [346, 347]			E↓	ACEFPT↓	EP↓	ACEFPT↓	E↓	ACEFPT↓				EF↓
lamin b2	LMNB2	84823		Bestandteil der nukleären Lamina, Rolle in DNA-Replikation [348]		[2]:A		ACEPT↓		AFP↓		ACEFPT↓				E↓
mad2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	MAD2L1	4085	<b>MAD2</b>	s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]	[2]:A, [15]:AF	AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACP↓				
mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9	5601	JNK2	phosphoryliert JUN und aktiviert dadurch Transkription, Rolle in Spindelbildung und Chromosomensegregation, beteiligt an Apoptose (EG, [349])						C↓		ACFP↓				
mcm2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin	MCM2	4171		s. Tab. 6-2	[258]	[2]:A, [15]:AF	ACE↓	ACEFPT↓	E↓	AEFPT↓	ACE↓	ACEPT↓				

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
mcm3 minichromosome maintenance deficient 3	MCM3	4172		Bestandteil des pre-RC, ATM-Substrat (EG, [179, 188, 212])	[257, 258]	[2]:A	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	E↓	ACEP↓		FP↑		
mcm4 minichromosome maintenance deficient 4	MCM4	4173		Bestandteil des pre-RC (EG, [179, 188])	[258]	[15]:AF	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFP↓	AE↓	ACEPT↓		ACFP↑		
mcm5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46	MCM5	4174		Bestandteil des pre-RC, interagiert mit Transkriptionsfaktor STAT1 (EG, [179, 188, 353])	[257, 258, 351]		ACEFP↓	ACEFPT↓	P↓	ACEFPT↓	ACET↓	ACEFPT↓			C↓	ACEP↓
mcm6 minichromosome maintenance deficient 6 (mis5 homolog, s. pombe)	MCM6	4175		Bestandteil des pre-RC [179, 186, 188]	[257, 258, 351]		ACEFP↓	ACEFPT↓	P↓	ACEFPT↓	ACE↓	ACEP↓				AP↓
mcm7 minichromosome maintenance deficient 7	MCM7	4176		s. Tab. 6-2	[258]	[2]:A	ACEF↓	ACEFPT↓		ACEFPT↓	AE↓	ACEFPT↓				
mcm10 minichromosome maintenance deficient 10	MCM10	55388		beteiligt an Initiation der DNA-Replikation, interagiert mit Polymerase $\alpha$ und MCM2-7 [352]	[273, 350]		AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	AET↓	ACEP↓		ACEFPT↑		
mediator of dna damage checkpoint 1	MDC1	9656	NFBD1	beteiligt an S- und G2-Checkpoints, phosphoryliert durch ATM/CHEK2, beteiligt an DNA-Reparatur (NHEJ), interagiert mit PRKDC [354-356]						A↓		ACEP↓				F↑
maternal embryonic leucine zipper kinase	MELK	9833	pEg3	reguliert G2/M-Transition, phosphoryliert CDC25B, beteiligt an prä-mRNA-Spleißen [182, 357]			AE↓	ACEFPT↓		ACEFPT↓		ACEP↓				
antigen identified by monoclonal antibody ki-67	MKI67	4288	Ki-67	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[2]:A, [15]:AF	ACEFT↓	ACEFPT↓	E↓	AEFP↓		ACEP↓				F↓
m-phase phosphoprotein 1	MPHOSPH1	9585	KRMP1, MPP1	kinesinähnliches Motorprotein, phosphoryliert durch CDC2-Cyclin B, interagiert mit PIN1, beteiligt an Zytokinese [358, 359]				ACEFPT↓		AEFP↓		A↓			F↓	
m-phase phosphoprotein 9	MPHOSPH9	10198	MPP9	phosphoryliert durch CDC2-Cyclin B, Funktion während Mitose [360]				ACEFPT↓				ACEP↓		EF↓	F↓	
muts homolog 2, colon cancer, non-polyposis type 1 (e. coli)	MSH2	4436		zentrale Rolle in DNA-Reparatur (MMR), bildet mit MSH6 MUTS $\alpha$ -Komplex, Bestandteil des BASC-Komplexes, interagiert mit p53,	[257, 258, 272]	[3]:C	E↓	ACEPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
muts homolog 6 (e. coli)	MSH6	2956	GTBP	s. Tab. 6-2			ACEF↓	ACEFPT↓		ACEFPT↓	E↓	ACEP↓				



Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 11

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	4605	B-Myb	Transkriptionsfaktor, beteiligt an G1/S- und G2/M-Transition; transaktiviert CDC2, Cyclin D1, vermittelt Freisetzung von CDK2-Cyclin-Komplexen aus Bindung mit p57Kip2 oder p107 (EG, [361])	[258, 286]		E↓	ACEFPT↓				ACEFPT↓		F↑		ACP↑
nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	NASP	4678		s. Tab. 6-2	[273]		AEFT↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
n-myc downstream regulated gene 1	NDRG1	10397	RIT42	beteiligt am Spindelcheckpoint, vermittelt p53-abhängige Apoptose, fördert jedoch auch Metastasierung [362-364]										T↑	CFP↓	ACFP↓
nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	NEIL3	55247	FLJ10858	beteiligt an DNA-Reparatur (BER) [365]			ACE↓	ACEFPT↓				ACEP↓				F↓
nima (never in mitosis gene a)-related kinase 2	NEK2	4751		s. Tab. 6-2	[257]	[15]:AF	AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓		T↓		F↓
nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NPM1	4869		nukleoläres Phosphoprotein, beteiligt an Ribosomenbiogenese, Chaperonfunktion, wichtig für Zentrosomenduplikation, Phosphorylierungssubstrat von CDK2/Cyclin E; fungiert als Aktivator oder Repressor von p53, interagiert mit MDM2 und hemmt p53-MDM2-Wechselwirkung; ARF fördert Polyubiquitinierung und Abbau von NPM1; interagiert mit RB, moduliert Zellzyklusprogression, vermittelt Import von GADD45A in den Nukleus, wichtig für GADD45A-abhängigen G2/M-Arrest [94, 366-370]			E↓	ACEPT↓								
nucleoporin 62kda	NUP62	23636		Bestandteil des NPC, beteiligt am Import in den Zellkern, assoziiert mit Importin $\alpha$ und $\beta$ , Teil des NUP107-160-Komplexes, während Mitose an Kinetochoren lokalisiert, spielt Rolle bei Zusammenlagerung der NPC-Komponenten auf Chromatin nach der Mitose (EG, [371])		[13]:A		AEF↓		F↓		ACEP↓				
nucleoporin 107kda	NUP107	57122		Bestandteil des NPC, Teil des NUP107-160-Komplexes, beteiligt am Transport in den und aus dem Zellkern, während Mitose an Kinetochoren lokalisiert, spielt Rolle bei Zusammenlagerung der NPC-Komponenten auf Chromatin nach der Mitose [371, 372]			E↓	ACEFPT↓		AP↓		ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 12

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
nucleoporin 160kda	NUP160	23279		Bestandteil des NPC, Teil des NUP107-160-Komplexes, beteiligt am Transport in den und aus dem Zellkern (u. a. am mRNA-Export), während Mitose an Kinetochoren lokalisiert, spielt Rolle bei Zusammenlagerung der NPC-Komponenten auf Chromatin nach der Mitose [371, 372]								ACEP↓				T↑
nucleolar and spindle associated protein 1	NUSAP1	51203	ANKT	spindelassoziertes Protein	[273]		ACE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				F↓
ornithine decarboxylase 1	ODC1	4953		katalysiert Umwandlung von Ornithin in Putrescin, generiert Polyamine für mitotischen Spindelapparat und Chromatinkondensation [373]								ACEP↓		E↓		F↑
origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)	ORC1L	4998	ORC1	Bestandteil des ORC im pre-RC, rekrutiert MCM-Komplex (EG, [179])	[257, 258]		AE↓	ACEFPT↓				ACEPT↓				
origin recognition complex, subunit 6 homolog-like (yeast)	ORC6L	23594	ORC6	Bestandteil des ORC im pre-RC, rekrutiert MCM-Komplex; Rolle in Mitose bei Chromosomenreplikation, -segregation und Zytokinese (EG, [179])			AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
poly (adp-ribose) polymerase family, member 2	PARP2	10038	ADPRTL2	vermittelt Poly(ADP)-Ribosylierung nukleärer Proteine, beteiligt an DNA-Reparatur [374]			AE↓	ACEFPT↓		AEF↓		ACEP↓				
pax transcription activation domain interacting protein 1 like	PAXIP1L	22976	PTIP	mögliche Rolle in DNA-Reparatur, essenziell für Progression durch Mitose [375]			E↓	ACEFPT↓				ACEP↓				
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	5111		assoziiert mit CDK2-Cyclin-Komplexen, Kofaktor von Polymerase δ und ε, erhöht Prozessivität der Leitstrang-Synthese bei DNA-Replikation, beteiligt an DNA-Reparatur (EG, [301, 376])	[257, 258]					AF↓		ACEP↓			F↓	
pericentrin 1	PCNT1	79902		beteiligt an Verankerung von Mikrotubuli an Spindelpolen, wichtig für Chromosomenseparation und Zytokinese [377, 378]		[2]:A	AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEFPT↓				
programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4	27250		reguliert Transkription und Translation, proapoptotisch und antiproliferativ, beteiligt an G1/S-Arrest durch Induktion von p21, Tumorsuppressor, Expression wird durch Zytokine moduliert (EG, [379, 380])			AC↑	AC↑					T↑	TP↓	F↓	AFPT↓

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
period homolog 2 (drosophila)	PER2	8864		Regulator des zirkadianen Rhythmus, beeinflusst Transkription, u. a. von Zellzyklusgenen (Cyclin A u. D), MDM2, GADD45A und MYC; Tumorsuppressor, beteiligt an DNA-Damage-Response [381]			CPT↑							ACEFPT↓		
phosphoribosyl-formylglycinamide synthase (fgar amidotransferase)	PFAS	5198		synthetisiert Inosinmonophosphat im Rahmen der Purinbiosynthese, wichtig für DNA-Replikation und Transkription (EG)				ACEFPT↓				ACEP↓				
dna replication complex gins protein psf2	PSF2	51659		beteiligt an DNA-Replikation, Teil des GINS-(Go, Ichi, Nii, and San-) Komplexes [382]			ACEF↓	ACEFPT↓	P↓	AEFP↓	ACET↓	ACEP↓		P↑		
phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	PIK3R3	8503		Untereinheit von PI3K, Komplex mit RB vermittelt G0/G1-Arrest; PI3K ist an zahlreichen Signalwegen beteiligt, aktiviert AKT1 und AKT2, wichtig für p21-Induktion nach p53-Aktivierung [383, 384]				A↑			ACEPT↑	ACEFPT↑		E↑		
membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	PKMYT1	9088	MYT1	beteiligt am G2-Checkpoint, katalysiert inhibitorische Phosphorylierung von CDC2 (EG, [255])				ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓		F↑		
polo-like kinase (drosophila)	PLK1	5347	PLK	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[2]:A, [15]:AF, [4]:Z, [13]:A	ACEFP↓	ACEFPT↓	P↓	AEFP↓	FPT↓	ACEFPT↓		F↓	A-CEFP↓	F↓
polo-like kinase 2 (drosophila)	PLK2	10769	SNK	s. Tab. 6-1		[2]:A, [3]:C	C↑	ACEFPT↑		P↑		ACEFPT↑		T↑		
polo-like kinase 4 (drosophila)	PLK4	10733	SAK	Kinase mit Rolle in Mitose [386]						ACEFPT↓	E↓	ACEFP↓				
polymerase (dna directed), alpha	POLA	5422		Bestandteil des DNA-Polymerase- $\alpha$ /Primase-Komplexes, beteiligt an Initiation der DNA-Replikation und Elongation [387]	[257, 258, 272]		ACE↓	ACEFPT↓	EP↓	AFP↓	E↓	ACEP↓				CE↓
polymerase (dna directed), alpha (70kd)	POLA2	23649		Bestandteil des DNA-Polymerase- $\alpha$ /Primase-Komplexes, beteiligt an Initiation der DNA-Replikation und Elongation [387]	[257, 258]			ACEFPT↓		AFPT↓	AE↓	ACEP↓		ACEFP↑		
polymerase (dna directed), delta 1, catalytic subunit 125kda	POLD1	5424	POLD	s. Tab. 6-2	[257, 258]					ACEFPT↓		ACEPT↓				
polymerase (dna directed), delta 3, accessory subunit	POLD3	10714	POLD p66/p68	Untereinheit von DNA-Polymerase $\delta$ , beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, assoziiert mit PCNA [388]			E↓	ACEFPT↓		AFP↓	AET↓	ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 14

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
polymerase (dna-directed), epsilon	POLE	5426	POLE1	Untereinheit von DNA-Polymerase $\epsilon$ , beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, assoziiert mit PCNA [376]								ACEP↓				
polymerase (dna-directed), epsilon 2 (p59 subunit)	POLE2	5427		Untereinheit von DNA-Polymerase $\epsilon$ , beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, assoziiert mit PCNA [376]	[385]		AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	E↓	ACEP↓				
polymerase (dna-directed), epsilon 3 (p17 subunit)	POLE3	54107		Untereinheit von DNA-Polymerase $\epsilon$ , beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, assoziiert mit PCNA, sequenzspezifische Bindung an DNA via <i>histone-fold</i> -Domäne [376, 389]				ACP↓		A↓		ACEP↓				
polymerase (dna-directed) sigma	POLS	11044	TRF4	beteiligt am Abschluss der DNA-Replikation und an Schwesterchromatidkohäsion während Mitose [391]			A↓	A↓				ACEP↓				
protein phosphatase 1d magnesium-dependent, delta isoform	PPM1D	8493	WIP1	s. Tab. 6-1		[2]:A, [3, 39]:C	ACEFP↑	ACEFPT↑			P↑					
protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	9055		s. Tab. 6-2	[257, 258]	[15]:AF	ACE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
primase, polypeptide 1, 49kda	PRIM1	5557		Bestandteil des DNA-Polymerase- $\alpha$ /Primase-Komplexes, Initiation der DNA-Replikation, Elongation, Synthese von Okazaki-Fragmenten (EG, [387])	[390]		AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	E↓	ACEP↓				AP↑
protein kinase, dna-activated, catalytic polypeptide	PRKDC	5591	<b>DNA-PKcs</b>	Untereinheit von DNA-PK, beteiligt an DNA-Reparatur (NHEJ), interagiert mit MDC1, vermittelt posttranslationale Modifikation von p53, Rolle in transkriptioneller Regulation [52, 392, 393]	[257, 258]		E↓	ACET↓				ACEP↓				
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	PRPS2	5634	PRS II	Untereinheit der PPRibP-Synthetase, diese reguliert Purin- und Pyrimidinnukleotidbiosynthese [394]					FPT↓			ACEP↓				
pituitary tumor-transforming 1	PTTG1	9232	<b>securin</b>	s. Tab. 6-2	[257, 272]	[15]:AF	AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
rac gtpase activating protein 1	RACGAP1	29127	MgcRac-GAP	s. Tab. 6-2			AE↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
rad1 homolog (s. pombe)	RAD1	5810		Checkpoint-Protein, beteiligt an Zellzyklusarrest während S-Phase und an DNA-Reparatur, interagiert mit RAD9A/B und HUS1 (9-1-1 Komplex), Exonuclease (EG, [174, 395, 396])						ACEFPT↓	A↓	ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 15

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
RAD17 homolog (S. pombe)	RAD17	5884	RAD24	Checkpoint-Protein, Sensor für DNA-Schäden, beteiligt an Zellzyklusarrest während S-/G2-Phase, essenziell für DNA-Reparatur, aktiviert durch ATR-vermittelte Phosphorylierung, interagiert mit RFC-Proteinen, wird durch RPA rekrutiert und aktiviert, rekrutiert 9-1-1-Komplex zu geschädigter DNA, beteiligt an DNA-Replikation, interagiert mit Polymerase ε (EG, [235, 397-399])										ACFP↓		
rad21 homolog (s. pombe)	RAD21	5885	SCC1	beteiligt an Schwesterchromatidkohäsion während Mitose, Bestandteil des Cohesin-Komplexes, Spaltung durch ESPL1, Rolle in DNA-Reparatur (EG, [319, 400])			AE↓	ACEFP↓				ACEP↓				
rad51 homolog (reca homolog, e. coli) (s. cerevisiae)	RAD51	5888		Rolle in DNA-Reparatur und homologer Rekombination, interagiert mit BRCA1/2, RPA, RAD52 u.v.a. (EG, [392])	[257, 258, 272, 273]	[2]:A	E↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
rad51 associated protein 1	RAD51AP1	10635	PIR131	interagiert mit RAD51, vermutlich Rolle in DNA-Reparatur und -Rekombination [401]			E↓	ACEFPT↓		AFP↓	E↓	ACEP↓				
rad54 homolog b (s. cerevisiae)	RAD54B	25788		beteiligt an DNA-Rekombination und -Reparatur (EG, [392])			AE↓	ACEPT↓		AEFP↓	A↓	ACEP↓		F↑		
ran binding protein 1	RANBP1	5902		reguliert Funktionen von RAN im Zellzyklus, u. a. in DNA-Replikation [402]			AE↓	ACEFPT↓		A↓		ACEP↓				
retinoblastoma binding protein 8	RBBP8	5932	CTIP	interagiert mit BRCA1, CTBP, RB1, Rolle in DNA-Reparatur, Checkpoints und transkriptioneller Regulation (EG)								ACEP↓				
RecQ protein-like 4	RECQL4	9401		s. Tab. 6-2		[15]:AF						ACEP↓				
replication factor c (activator 1) 2, 40kda	RFC2	5982		s. Tab. 6-2	[257, 258]			ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
replication factor c (activator 1) 3, 38kda	RFC3	5983		s. Tab. 6-2	[257, 258]		AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓		CP↑		
replication factor c (activator 1) 4, 37kDa	RFC4	5984		Bestandteil des RFC, beteiligt an Elongation während DNA-Replikation, Bestandteil des BASC-Komplexes, interagiert mit RAD17, beteiligt an DNA-Reparatur und Rekrutierung des 9-1-1-Komplexes (EG, [235])	[257, 258]		AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
replication factor c (activator 1) 5, 36.5kda	RFC5	5985		Bestandteil des RFC, beteiligt an Elongation während DNA-Replikation, interagiert mit RAD17, beteiligt an DNA-Reparatur und Rekrutierung des 9-1-1-Komplexes, interagiert mit PCNA (EG, [235, 399])		[2]:A	AE↓	ACEFPT↓		ACEFPT↓		ACEP↓				
ribonuclease h2, large subunit	RNASEH2A	10535	RNase HI	degradiert RNA-DNA-Hybride, Rolle in DNA-Replikation und -Reparatur, interagiert mit FEN1 bei Entfernung der RNA-Primer [404]				ACEFPT↓		AFP↓		ACEPT↓				
Rho family GTPase 3	RND3	390	ARHE, RHOE	reguliert Organisation des Zytoskeletts, hemmt Ausbildung von Actin-Stressfasern, inhibiert integrinvermittelte fokale Adhäsion, antagonistisch zu RHO-A, inhibiert Proliferation und Eintritt in S-Phase, inhibiert RAS- und RAF-vermittelte Transformation [403, 405, 406]		[403]:P		ACEFPT↑		AFP↑		F↑				
replication protein a2, 32kda	RPA2	6118		Bestandteil des RPA ( <i>replication complex A</i> ), beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, Rolle in verschiedenen Checkpoints [174, 327, 407, 408]	[258]		E↓	P↓				ACEP↓				
replication protein a3, 14kda	RPA3	6119		beteiligt an DNA-Replikation, assoziiert mit ssDNA, essenziell für Initiation von Checkpoints, rekrutiert ATR-TREX1-Komplex zu DNA-Läsionen und stimuliert CHEK1-Aktivierung, beteiligt an DNA-Reparatur [392, 409-412]	[257, 258, 272, 273]	[2]:A		ACEFPT↓		AFPT↓		ACP↓				
ribonucleotide reductase m1 polypeptide	RRM1	6240		Biosynthese von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Replikation (EG, [413])	[257, 258]	[2]:A		ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
ribonucleotide reductase m2 polypeptide	RRM2	6241		Biosynthese von Desoxyribonukleotiden für die DNA-Replikation und -Reparatur, interagiert mit p53 (EG, [413])	[258]	[15]:AF	AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	ACET↓	ACEP↓		F↑		
RUN and TBC1 domain containing 3	RUTBC3	27352	MAP	potenzielles Homolog des Checkpointproteins BUB2, interagiert mit Tumorsuppressor NF2 (merlin) und unterstützt dessen antiproliferative Effekte [414]								P↑		ACFT↓		F↓
set translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	6418	TAF-1β, I2PP2A	kooperiert mit p21 bei Inhibition von CDC2-Cyclin B-Komplexen, hemmt G2/M-Transition [415]			E↓	AP↓				ACEP↓				CE↓
splicing factor 3b, subunit 3, 130kda	SF3B3	23450		Bestandteil des Spleißfaktors SF3B, beteiligt an Chromatin-Remodeling, Transkription, prä-mRNA-Spleißen und DNA-Reparatur (EG)			E↓					ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 17

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
stratifin	SFN	2810	14-3-3σ	s. Tab. 6-2		[9, 15]:AF, [39]:C, [126]:T	CEF↑	ACEPT↑				ACE↓			C↑	F↓
splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	SFPQ	6421	PSF	beteiligt an prä-mRNA-Spleißen, Rolle in DNA-Replikation und Transkription, interagiert mit PTBP1 [416]	[257]	[3]:C	E↓	P↓		P↓		ACEP↓				F↑CP↓
Sac3 homology domain 1 (S. cerevisiae)	SHD1	29901	SAC3	beteiligt an Zentrosomenduplikation, Rolle im Spindelcheckpoint [340]								ACEP↓				P↑
serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	SHMT1	6470		generiert C1-Donor für Thymin- und Purinsynthese, wichtig für DNA-Replikation und Transkription (EG)			E↓					ACEP↓				
tal1 (scl) interrupting locus	SIL	6491		vermutlich Rolle in Mitose, koexprimiert mit Kinetochorproteinen [417]			AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	E↓	ACEP↓				
s-phase kinase-associated protein 2 (p45)	SKP2	6502	p45	Bestandteil des SCF, Interaktion mit CDK2-Cyclin-Komplexen, beteiligt an Ubiquitinierung von p27Kip1, Ubiquitinierungssubstrat von APC/CDH1 [188, 301, 302, 418]			E↓	ACEPT↓		ACEPT↓	E↓	ACEFPT↓				F↓
stem-loop (histone) binding protein	SLBP	7884	HBP	beteiligt an Histon-Expression und S-Phasen-Progression [419]			AEF↓	ACFPT↓		A↓		ACEP↓				
sld5 homolog	SLD5	84296		beteiligt an DNA-Replikation, Teil des GINS-Komplexes, gemeinsam mit PSF2 [382]			F↑	ACEFPT↓								
smc2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1 (yeast)	SMC2L1	10592	hCAP-E	beteiligt an Chromosomenkondensation und Schwesterchromatidensegregation, Bestandteil des Condensin-Komplexes [420]	[257, 258, 272]		ACE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	E↓	ACEP↓				
smc4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	SMC4L1	10051	hCAP-C	beteiligt an Chromosomenkondensation und Schwesterchromatidensegregation, Bestandteil des Condensin-Komplexes [420]	[257, 258, 272]	[2]:A	ACE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEFP↓	C↓			AC↓
sperm associated antigen 5	SPAG5	10615	hMAP126	s. Tab. 6-2			AE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓			A↓	
kinetochore protein spc25	SPBC25	57405	Spc25	beteiligt an Chromosomenausrichtung und -segregation, Rolle im Spindelcheckpoint [343]			ACEF↓	ACEFPT↓		AFPT↓	AE↓	ACEP↓				F↓
stromal antigen 1	STAG1	10274	SA1	interagiert mit Komponenten des Cohesin-Komplexes, u. a. CSPG6, RAD21 [421]			CF↓		EP↓	C↓	F↓	ACEP↓		AE↓	C↓	CE↓
serine/threonine kinase 6	STK6	6790	Aurora A, AURKA	s. Tab. 6-2		[3]:C, [15]:AF, [4]:Z	ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓	F↓	ACEP↓	F↓		ACF↓	F↓
stathmin 1/oncoprotein 18	STMN1	3925	OP18	s. Tab. 6-2	[242]	[14]:CPT, [242]:A	A↓	ACEFPT↓		AFP↓	A↓	ACEP↓				

Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikahandlung. Seite 18

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	TACC3	10460		Bestandteil des mitotischen Spindelapparats, lokalisiert an Zentrosomen [422]			AE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEPT↓		ACEP↑		
tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	TDP1	55775		beteiligt an Reparatur von blockierten TOPO-I-DNA-Komplexen und DNA-Doppelstrangbrüchen (EG, [423])				ACEPT↓				ACFP↓				
transcription factor a, mitochondrial	TFAM	7019	mtTFA	beteiligt an mitochondrialer DNA-Replikation und Transkription, interagiert mit p53, erkennt alkylierte DNA, beteiligt an Apoptose (EG, [424])		[4]:Z		A↓				ACEP↓				
transcription factor dp-1	TFDP1	7027	DP1	Heterodimer mit E2F-Familienmitgliedern fungiert als Transkriptionsfaktor, vermittelt zellzyklusabhängige Expression der E2F-Targetgene [425]	[258]	[4]:Z, [255]:A	E↓					ACEP↓				
timeless homolog (drosophila)	TIMELESS	8914	TIM1	s. Tab. 6-2			E↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
thymidine kinase 1, soluble	TK1	7083		phosphoryliert Thymidine zu dTMP, essenziell für Zellzyklusprogression [427]	[257, 258]	[2]:A		ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				
topoisomerase (dna) ii alpha 170kda	TOP2A	7153		s. Tab. 6-2	[257, 258]	[2]:A, [15]:AF, [38]:T	AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
topoisomerase (dna) ii binding protein 1	TOPBP1	11073		reguliert gemeinsam mit MCM10 das Laden von CDC45L auf Chromatin, beteiligt an Regulation des G2-Checkpoints, transkriptioneller Repressor von E2F1 und MIZ1 [350, 428, 429]	[350]		E↓	ACEFPT↓		AP↓		ACEP↓				
t-lak cell-originated protein kinase	TOPK	55872		mögliche Rolle in Spindelformation und Zytokinese [430]			AE↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				
tpx2, microtubule-associated protein homolog (xenopus laevis)	TPX2	22974		s. Tab. 6-2	[273]	[15]:AF	AE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓				
three prime repair exonuclease 2	TREX2	11219		3'-Exonuklease, beteiligt an DNA-Replikation und -Reparatur, assoziiert mit DNA-Polymerase δ (EG, [431])				ACEFPT↓				ACEP↓		T↑		
trophinin associated protein (tastin)	TROAP	10024		s. Tab. 6-2			AEF↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEP↓				
TTK protein kinase	TTK	7272	MPS1, MPS1L1, PYT	beteiligt an Zentrosomenduplikation und Spindelcheckpoint, phosphoryliert CHEK2 [432, 433]	[257, 258, 273]		ACEF↓	ACEFPT↓		AEFPT↓		ACEP↓				



Tab. 6-3: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 19

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
beta 5-tubulin	TUBB	203068	OK/SW-cl	Bestandteil von Mikrotubuli		[14]:CPT	E↓	ACEFP↓				ACP↓				
tubulin, gamma 1	TUBG1	7283		Bestandteil von Mikrotubuli, am Zentrosom lokalisiert [434]								ACEP↓				
thioredoxin interacting protein	TXNIP	10628	VDUP1	transkriptioneller (Ko-)Repressor, Tumorsuppressor, induziert G0/G1-Arrest, Antagonist von Thioredoxin; Expression wird durch Vitamin D3 und Stressfaktoren reguliert [435, 436]		[14]:CPT, [4]:Z, [426]:F					ACEF↑			CFPT↓		F↑
thymidylate synthetase	TYMS	7298	TS	s. Tab. 6-2	[258, 272, 273]	[2]:A				AFP↓		ACEP↓				
ubiquitin-conjugating enzyme e2c	UBE2C	11065	<b>UBCH10</b>	s. Tab. 6-2	[273]	[15]:AF	ACE↓	ACEFPT↓		AEFP↓		ACEPT↓				
uridine-cytidine kinase 2	UCK2	7371	UK	wandelt UMP in UDP um, wichtig für DNA-Replikation und Transkription (EG)			E↓	CE↓			AEP↓	ACEFP↓		T↑		
uracil-dna glycosylase	UNG	7374		beteiligt an DNA-Reparatur (BER), Excision von Uracil aus DNA (EG)	[257, 258]		ACE↓	ACEFPT↓		A↓	E↓	ACEP↓				
wee1 homolog (s. pombe)	WEE1	7465		s. Tab. 6-2		[243]:C	A↓	ACEFPT↓		AFP↓	A↓	ACEP↓				
xeroderma pigmentosum, complementation group c	XPC	7508	XPCC	s. Tab. 6-1		[15]:AF, [142]:UV	ACEFP↑	ACEFP↑				P↑				T↓
zw10 interactor	ZWINT	11130		Kinetochoorprotein, beteiligt am Spindelcheckpoint [437]		[2]:A, [15]:AF	E↓	ACEFPT↓		AFP↓		ACEP↓				

Tab. 6-4: Deregulation von RNA-Prozessierungs-Genen nach Zytostatikabehandlung. Seite 1

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 72 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 72 h↓	HT-29 72 h↓	MDA-MB-231 72 h↓
cyclin e2	CCNE2	9134		bildet Komplex mit CDK2, vermittelt G1/S-Transition, u. a. durch Phosphorylierung von RB1, beteiligt an prä-mRNA-Spleißen und Zentrosomen-duplikation [188, 289]	[4]:Z		ACEFPT	ACEP		E
dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 39	DDX39	10212	URH49	RNA-Helikase, beteiligt an prä-mRNA-Spleißen und mRNA-Export [438]		ACEFP		ACEP		
dek oncogene (dna binding)	DEK	7913		beeinflusst nukleosomale DNA-Topologie und verringert Effizienz der DNA-Replikation, transkriptioneller Koaktivator, beteiligt am prä-mRNA-Spleißen [309, 310]		ACEFPT	AEFPT	ACP		
deah (asp-glu-ala-his) box polypeptide 9	DHX9	1660	<b>RNA helicase A (RHA)</b> , NDHII	RNA-Helikase, beteiligt an Transkription als Teil des RNA-Polymerase II-Holoenzym, mRNA-Export aus dem Nukleus, transkriptioneller Koaktivator von NFκB und CREBBP, interagiert mit BRCA1, ILF3 u. a. (EG, [439-441])			AE	ACEP		
dyskeratosis congenita 1, dyskerin	DKC1	1736		Bestandteil von snoRNPs, beteiligt an rRNA-Biogenese und -Pseudouridylierung, Teil des Telomerasekomplexes (EG, [442])		AEPT		AEP		ACEP
exosome component 2	EXOSC2	23404	RRP4	Bestandteil des Exosoms, beteiligt an Transkription, mRNA-Export und Abbau von AU-reichen mRNAs, tRNAs u. a. [443-445]		ACEFP	AF	ACEP		ACE
exosome component 8	EXOSC8	11340	OIP2	Bestandteil des Exosoms, beteiligt an Transkription, mRNA-Export und Abbau von AU-reichen mRNAs, tRNAs u. a. [443-445]		ACEFPT	AFP	ACEP		
exosome component 9	EXOSC9	5393	PM/Sci-75, PMSCL1	Bestandteil des Exosoms, beteiligt an Transkription, mRNA-Export und Abbau von AU-reichen mRNAs, tRNAs u. a. [443-445]	[13]:A	ACEPT	AFPT	ACEP		CE
<b>fibrillarin</b>	FBL	2091		Bestandteil von snoRNPs, beteiligt an rRNA-Prozessierung, interagiert mit SMN-Komplex (EG, [446])		ACEFP	AP	A		CE
ftsj homolog 2 (e. coli)	FTSJ2	29960		nukleoläre RNA-Methyltransferase, beteiligt an rRNA-Prozessierung und -Modifikation (EG)				ACEP		
fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	FUS	2521	TLS	RNA-bindend, Bestandteil von nukleären Ribonukleoproteinkomplexen, reguliert Transkription, interagiert mit RELA, beteiligt an Spleißosombildung, interagiert mit PTBP1, SFRS2, SFRS4, SRRM1 [447, 448]	[2]:A	ACEFP	AP	ACEFP		
gem (nuclear organelle) associated protein 4	GEMIN4	50628		Bestandteil des SMN-Komplex, beteiligt an Bildung und Transport von snRNPs, auch in Bildung von snoRNPs, hnRNPs, miRNPs involviert [449, 450]		ACEFT		ACEFPT		
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein d (aurich element rna binding protein 1, 37kda)	HNRPD	3184	AUF1	hnRNP, assoziiert mit hnRNAs, bindet an AU-reiche Elemente in Zytokin- und Protoonkogen-mRNAs und vermittelt deren Abbau (z. B. mRNA von BCL2, p21, MYC, FOS, GM-CSF), interagiert mit HSC70- und HSP70-Proteinen, pro-apoptotisch, aber auch tumorigen (EG, [451-454])		ACEPT	ACEPT	ACEP		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 72 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 72 h↓	HT-29 72 h↓	MDA-MB-231 72 h↓
karyopherin alpha 2 (rag cohort 1, importin alpha 1)	KPNA2	3838		beteiligt am Import von RNAs und Proteinen in den Nukleus, vermittelt u. a. Import von CHEK2, interagiert mit Proteinen des NPC (EG, [205])		ACEFPT	AEFP	AC		CE
lsm2 homolog, u6 small nuclear rna associated (s. cerevisiae)	LSM2	57819		beteiligt an Bildung von U6-snRNP und anderen snRNPs [455]		E	A	ACEPT		A
LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	LSM6	11157		beteiligt an mRNA-Prozessierung, interagiert mit SMN-Komplex, möglicherweise Chaperonfunktion bei Zusammenlagerung von RNPs [449, 456]		ACPT		P		ACEP
mago-nashi homolog, proliferation-associated (drosophila)	MAGOH	4116	MAGO	Bestandteil des EJC, beteiligt an nukleärem Export gespleißter mRNAs, fördert mRNA-Assoziation mit Polysomen, Rolle im <i>Nonsense-mediated decay</i> von mRNAs [457, 458]		ACEPT	A	ACEP		E
muscleblind-like (drosophila)	MBNL1	4154		reguliert alternatives prä-mRNA-Spleißen [459]				ACEP		
maternal embryonic leucine zipper kinase	MELK	9833	pEg3	reguliert G2/M-Transition, phosphoryliert CDC25B, beteiligt an prä-mRNA-Spleißen [182, 357]		ACEFPT	ACEFPT	ACEP		
nucleolar protein 5a (56kda with kke/d repeat)	NOL5A	10528	Nop56	beteiligt an prä-rRNA-Prozessierung und Bildung der 60S-Ribosomenuntereinheit, interagiert mit TCOF1 [460]		AEFP		ACEP		
nucleoporin 155kda	NUP155	9631		Bestandteil des NPC, beteiligt Transport von Molekülen in den und aus dem Zellkern, interagiert mit GLE1L und spielt Rolle beim mRNA-Export (EG, [461])		ACPT	A	ACEP		
nucleoporin 160kda	NUP160	23279		Bestandteil des NPC, Teil des NUP107-160-Komplexes, beteiligt am Transport in den und aus dem Zellkern, u. a. am mRNA-Export, während Mitose an Kinetochoren lokalisiert und spielt Rolle bei Zusammenlagerung der NPC-Komponenten auf Chromatin nach der Mitose [371, 372]				ACEP		
nuclear transport factor 2-like export factor 2	NXT2	55916		assoziiert mit dem NPC, beteiligt an mRNA-Export [462]		AP		ACEFP		
peptidyl prolyl isomerase h (cyclophilin h)	PPIH	10465		Bestandteil des Spleißosoms mit Chaperonfunktion, vermittelt Interaktion zwischen Komponenten des Spleißosoms, liegt im Komplex mit PRPF3 und PRPF4 vor (EG, [463])		ACEFPT		ACEP		
prp3 pre-mrna processing factor 3 homolog (yeast)	PRPF3	9129	PRP3	Spleißosom-Komponente, assoziiert mit U4- und U6-snRNPs, interagiert mit PRPF4 und PPIH [463, 464]				ACEP		
prp4 pre-mrna processing factor 4 homolog (yeast)	PRPF4	9128	PRP4	Spleißosom-Komponente, assoziiert mit U4-, U5- und U6-snRNPs, interagiert mit PRPF3 und PPIH, beteiligt an Regulation der Transkription via Chromatin-Remodeling, interagiert mit NCOR1-Histondeacetylase [463-465]		ACE		ACEP		

Name	Symbol	GenelD	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 72 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 72 h↓	HT-29 72 h↓	MDA-MB-231 72 h↓
pc4 and sfrs1 interacting protein 1	PSIP1	11168	LEDGF	transkriptioneller Aktivator und Koaktivator, antiapoptotisch, schützt Zellen vor stressinduziertem Zelltod, aktiviert u. a. Expression von Hitzeschockproteinen, beeinflusst prä-mRNA-Spleißen durch Interaktion mit SFRS1 [466-469]		ACEFPT	ACEFPT	ACEFP		
polypyrimidine tract binding protein 1	PTBP1	5725	PTB	bindet an Polypyrimidinregionen der Introns von prä-mRNAs, inhibiert Spleißen, fördert Bindung von U2 snRNPs an prä-mRNAs, beteiligt an Translation bestimmter mRNAs mit IRES-Sequenzen, interagiert mit FUS (EG, [447, 470, 471])		ACEP	AC	ACEFPT		
rna binding motif protein 10	RBM10	8241		RNA-bindendes Protein mit Homologie zu snRNP- und hnRNP-Proteinen (EG)				ACEFP		
scaffold attachment factor b	SAFB	6294	HET	beteiligt an Chromatinorganisation, Regulation der Transkription und prä-mRNA-Spleißen [472]				ACEFP		
splicing factor 3b, subunit 3, 130kda	SF3B3	23450		Bestandteil des Spleißfaktors SF3B, beteiligt an Chromatin-Remodeling, Transkription, prä-mRNA-Spleißen und DNA-Reparatur (EG)				ACEP		
splicing factor proline/ glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	SFPQ	6421	PSF	beteiligt an prä-mRNA-Spleißen, Rolle in DNA-Replikation und Transkription, interagiert mit PTBP1 [416]	[3]:C	P	P	ACEP		
splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	SFRS1	6426	ASF2, SF2	prä-mRNA-Spleißfaktor, wirkt aktivierend oder reprimierend auf Spleißprozess, regulatorische Interaktion mit TOP1 [473, 474]		AP		ACEP		
splicing factor, arginine/serine-rich 2	SFRS2	6427	SC35	prä-mRNA-Spleißfaktor, beteiligt an Bildung des Spleißosoms, interagiert mit FUS, kolokalisiert mit SAFB [447, 476]		ACEP		ACEP		
splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3	6428	SRp20	prä-mRNA-Spleißfaktor, beteiligt an Erkennung terminaler Exons für Polyadenylierung [477]	[3]:C	ACFPT	P	ACP		AC
splicing factor, arginine/serine-rich 4	SFRS4	6429	SRP75	prä-mRNA-Spleißfaktor, beteiligt an Bildung des Spleißosoms, interagiert mit FUS [447]				ACEP		AF
splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kda	SFRS7	6432	9G8	prä-mRNA-Spleißfaktor, beteiligt am Export gespleißter mRNAs [478]		ACEFP		ACEP		E
splicing factor, arginine/serine-rich 10 (transformer 2 homolog, drosophila)	SFRS10	6434	TRA2-β	prä-mRNA-Spleißfaktor, aktiviert das Spleißen sequenzspezifisch [475]		ACEFPT		ACEFP		ACEP
survival of motor neuron protein interacting protein 1	SIP1	8487	<b>GEMIN2</b>	Bestandteil des SMN-Komplex, beteiligt an Bildung und Transport von snRNPs, snoRNPs, hnRNPs, miRNPs [449, 450]			A	ACEP		
skb1 homolog (s. pombe)	SKB1	10419	PRMT5	interagiert mit SMN-Komplex, beteiligt an Bildung von snRNPs, beeinflusst Transkription, reprimiert Cyclin E-Expression, interagiert mit Chromatin-Remodeling-Komplexen [479, 480]		AE		ACEP		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 72 h↓	HMEC 72 h↓	MCF-7 72 h↓	HT-29 72 h↓	MDA-MB-231 72 h↓
small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	SNRPA	6626		Bestandteil des U1-snRNPs, beteiligt an prä-mRNA-Spleißen, U1-snRNP bindet an 5'-Spleißstellen von prä-mRNA [481, 482]		ACEP		ACE		
small nuclear ribonucleoprotein polypeptides b and b1	SNRPB	6628	Sm protein B/B'	Sm-Protein, Bestandteil von snRNPs (EG)		ACCEPT		ACEP		
small nuclear ribonucleoprotein d1 polypeptide 16kda	SNRPD1	6632	Sm protein D1	Sm-Protein, Bestandteil von snRNPs, strukturelle Funktion bei snRNP-Zusammenlagerung oder Interaktionen zwischen verschiedenen snRNPs (EG)		ACP		ACEP		
synaptotagmin binding, cytoplasmic rna interacting protein	SYNCRIP	10492	gry-RBP, HNRNP-Q, NSAP1	beteiligt an mRNA-Prozessierung und -Stabilisierung, interagiert mit SMN [483]		ACEP		ACEP		
tho complex 1	THOC1	9984	HPR1	Bestandteil des TREX-Komplexes, beteiligt an Transkription und mRNA-Export [484, 485]			C	ACEP		
upf3 regulator of nonsense transcripts homolog b (yeast)	UPF3B	65109		beteiligt am Export von mRNAs aus dem Nukleus, Rolle in NMD ( <i>nonsense-mediated decay</i> ), assoziiert mit RBM8A u. a. Proteinen nahe Exon-Exon-Grenzen (EG, [486])				ACFP		
ww domain binding protein 11	WBP11	51729	NPWBP	beteiligt am prä-mRNA-Spleißen [487]		AEP	AF	ACEP		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
adrenomedullin	ADM	133	AM	mitogen, angiogen, antiapoptotisch, reguliert die Komplementkaskade negativ, dadurch immunsuppressiv; induziert durch proinflammatorische Zytokine (u. a. IFN $\gamma$ ) [492-494]	[488]:T, [489]:A							ACE $\uparrow$		ACE $\uparrow$
apolipoprotein I, 1	APOL1	8542	APO-L	beteiligt an Lipid- und Cholesteroltransport; induziert durch TNF $\alpha$ (EG, [495])								ACEP $\uparrow$		
b-cell cl/lymphoma 3	BCL3	602		Protoonkogen, transkriptioneller Kofaktor für NF $\kappa$ B und AP-1; Expression wird durch TNF $\alpha$ (vermittelt durch NF $\kappa$ B), IL4 und IL9 induziert (EG, [496-499])	[3]:C					ACEFP $\uparrow$				
b-factor, properdin	BF	629	complement factor B	beteiligt an alternativer Komplementkaskade; induziert durch IFNs (EG, [500])								ACEP $\uparrow$		
bone morphogenetic protein 2	BMP2	650		Zytokin der TGF $\beta$ -Familie, kann proliferationshemmend und proapoptotisch, aber auch proliferations- und invasionfördernd wirken [501, 502]				EPT $\uparrow$				ACEFPT $\downarrow$		
complement component 1, s subcomponent	C1S	716		Komponente des Komplementsystems, beteiligt an Immunantwort [502]		F $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$							
complement component 3	C3	718		Komponente des Komplementsystems, beteiligt an Immunantwort; induziert u. a. durch IFN $\gamma$ , IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ (EG, 503, 504)		ACEF $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$	AF $\uparrow$						
complement component 4 binding protein, beta	C4BPB	725		inhibiert Komplementkaskade und schützt apoptotische Zellen vor komplementvermittelter Lyse; induziert während inflammatorischer Antwort, z. B. durch Interleukine [505, 506]								ACEFPT $\uparrow$		ACP $\uparrow$
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	837		spaltet und aktiviert Procaspase-1 und sein eigenes Vorläuferprotein Procaspase-4, Teil der apoptotischen Caspasekaskade; induzierbar durch IFNs, UPR (EG, [507, 508])										ACEP $\uparrow$
caveolin 1, caveolae protein, 22kda	CAV1	857		Bestandteil der Caveolae, bildet Heterooligomer mit CAV2, beteiligt an Adhäsion, fungiert als Adaptorprotein zwischen $\alpha$ -Integrinen und FYN, interagiert mit RAC1 und CDC42, potenzieller Tumorsuppressor oder potenzielles Onkogen, pro- oder antiinvasiv, beteiligt an Induktion von Seneszenz; induziert durch IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ (EG, [509-514])	[9]:AF, [490]:T, [491]:AET		ACEFT $\uparrow$			P $\uparrow$		ACEFPT $\uparrow$		
cas-br-m (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	CBLB	868		Onkogen, Ubiquitinligase, inhibiert Rezeptortyrosinkinase-abhängige Signalwege durch Ubiquitinierung von z. B. EGFR und SRC-Familienmitgliedern, antiapoptotisch, beeinflusst Immunantwort [517-519]								ACEP $\downarrow$		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
chemokine (c-c motif) ligand 5	CCL5	6352	RANTES	Chemokin, fungiert als Chemoattraktor für verschiedene Immunzellen; induziert durch IRF3, IRF7, IFN $\beta$ , IL1, TNF $\alpha$ (EG, 515, 520, 521))	[515]:P							ACEP $\uparrow$		
cd47 antigen (rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	CD47	961	IAP	beteiligt an Adhäsion an die ECM und Reorganisation des Zytoskeletts, vermittelt Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, Rezeptor für Thrombospondin, proapoptotisch, moduliert Immunantwort (EG, [522, 523])	[39]:C							ACEP $\uparrow$		
cd59 antigen p18-20	CD59	966	protectin	s. Tab. 6-1	[38]:T		ACEPT $\uparrow$	AT $\uparrow$		ACP $\uparrow$		T $\uparrow$		
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	10370	MRG1	transkriptioneller Regulator, interagiert mit Transkriptionsfaktoren p300/CBP; induziert durch Hypoxie und durch verschiedene Zytokine, z. B. IFN $\gamma$ , IL9 und TGF $\beta$ ; repräsentiert HIF1-abhängige Expression [524, 525]	[3]:C			ACEPT $\uparrow$						C $\uparrow$
chloride intracellular channel 4	CLIC4	25932		intrazellulärer Chloridkanal, beteiligt an Stressantwort, proapoptotisch, reguliert Organisation des Zytoskeletts; induziert durch p53 und TNF $\alpha$ [526-528]	[2]:A		F $\uparrow$			C $\downarrow$		AEFPT $\downarrow$		F $\downarrow$
colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	CSF2	1437	GM-CSF	Zytokin, aktiviert Immunantwort, kontrolliert Produktion, Wachstum und Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen; induziert u. a. durch IL1 $\beta$ und TNF $\alpha$ (EG, [529])										ACEPT $\uparrow$
colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	CSF2RA	1438	GM-CSFR	Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors, vermittelt GM-CSF-abhängige Stimulierung von Immunzellen, aktiviert IKK- $\beta$ und vermittelt dadurch Inhibition von I $\kappa$ B und Aktivierung von NF $\kappa$ B, beteiligt an Wachstum und Überleben (EG, [530])										ACEPT $\uparrow$ , F $\downarrow$
cathepsin B	CTSB	1508		Cysteinproteinase, prozessiert APP, beteiligt an TNF $\alpha$ -vermittelter Apoptose, vermittelt Arachidonsäureausschüttung und wirkt antiinflammatorisch, degradiert ECM-Komponenten, beteiligt an Invasion; induziert durch TNF $\alpha$ via NF $\kappa$ B (EG, 531-533))	[4]:Z, [516]:A		P $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$						
cathepsin s	CTSS	1520		Cysteinproteinase, prozessiert antigene Proteine für die Präsentation in MHC-II-Molekülen, degradiert ECM, Rolle in Invasion; induziert durch IFN $\gamma$ (EG, [533, 536])			C $\uparrow$					AE $\uparrow$		ACEP $\uparrow$
chemokine (c-x3-c motif) ligand 1	CX3CL1	6376	fractalkine	Chemokin, beteiligt an Chemotaxis, Adhäsion und Migration; induziert durch FN $\gamma$ , IL4, TNF $\alpha$ [537-539]								ACEP $\uparrow$		

Tab. 6-5: Deregulation von Immunantwortgenen nach Zytostatikabehandlung, Seite 2

Name	Symbol	GeneID	Synonym	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
chemokine (c-x-c motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	CXCL1	2919	GRO-1, MGSA	Chemokin, beteiligt an Immunantwort, Tumorigenese und Angiogenese; induziert durch Stress und Zytokine, z. B. TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ ; aktiviert NF $\kappa$ B- und MAPK-Signalkaskaden [540, 541]	[4]:Z		ACEPT $\uparrow$	ACPT $\uparrow$						ACET $\uparrow$
chemokine (c-x-c motif) ligand 10	CXCL10	3627	IFI10, IP-10	Chemokin, fungiert als Chemoattraktor für verschiedene Immunzellen, Rolle in Adhäsion, antiangiogene Wirkung; induziert durch IFN $\gamma$ (EG, [535, 542])	[534, 535]:T							ACEPT $\uparrow$		
chemokine (c-x-c motif) ligand 11	CXCL11	6373	$\beta$ -R1, SCYB11, P-9	Chemokin, beteiligt an Chemotaxis; induziert durch IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ [543]								ACEP $\uparrow$		
dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 58	DDX58	23586	RIG-I	RNA-Helikase, vermittelt dsRNA-induzierte Signale auf NF $\kappa$ B und IRF3, beteiligt an antiviraler Abwehr, vermittelt Induktion von ISGs (u. a. G1P2); induziert durch IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ [544-546]								ACEPT $\uparrow$		E $\uparrow$
epstein-barr virus induced gene 3	EBI3	10148		Heterodimer mit IL30 ergibt IL27, dieses reguliert Immunantwort, induziert Zytokinproduktion (z. B. IFN $\gamma$ ); induziert durch FN $\beta$ [547, 548]										ACEP $\uparrow$
eukaryotic translation initiation factor 4e binding protein 1	EIF4EBP1	1978	4E-BP1	reprimiert Initiation der Cap-abhängigen Translation, proapoptotisch; wird durch IFN-vermittelte Phosphorylierung inaktiviert, wodurch Translation IFN-induzierter Transkripte möglich wird; Expression wird durch ERK und p38 gehemmt [549-551]			AEFP $\downarrow$	AP $\downarrow$		AC $\downarrow$		ACEFPT $\downarrow$		F $\downarrow$
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	FAS	355	CD95, Apo-1, TNFRSF6	s. Tab. 6-1	[9]:AF, [67]:ACFP, [39]:C, [68]:P	ACEFPT $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$	P $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$		ACEFP $\uparrow$	C $\uparrow$	CE $\uparrow$
fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein ncp94)	FER	2241		reguliert Zell-Zell-Adhäsion über Phosphorylierung von Integrinen, vermittelt Signale von Wachstumsfaktorrezeptoren zum Zytoskelett; wird reprimiert durch FN $\gamma$ (in der Folge G1-Arrest); stimuliert Proliferation (EG, [552, 553])										ACEP $\downarrow$
ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	2495		Eisenspeicherprotein, beteiligt an Regulation der Zellproliferation, beteiligt an antioxidativer Schutzreaktion, antiapoptotisch; induziert durch TNF $\alpha$ und TGF $\beta$ , vermittelt durch NF $\kappa$ B), [556, 557]	[2]:A		ACEP $\uparrow$	A-CEFP $\uparrow$						
interferon, alpha-inducible protein (clone ifi-15k)	G1P2	9636	ISG15, IFI15	s. Tab. 6-1		E $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$	ACPT $\uparrow$		PT $\uparrow$	F $\uparrow$	AP $\uparrow$		ACEP $\uparrow$
interferon, alpha-inducible protein (clone ifi-6-16)	G1P3	2537	IFI6-16, 6-16	Funktion?; induziert durch IFNs, IRF1 (EG, [558])				T $\uparrow$		T $\uparrow$		ACEPT $\uparrow$		ACEP $\uparrow$



Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
hect domain and RLD 5	HERC5	51191	CEB1	E3-Ubiquitinligase, reguliert Aktivität von CDKs; induziert durch TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ [559, 560]								ACEP $\uparrow$		
major histocompatibility complex, class i, b	HLA-B	3106		MHC-I-Protein, stimuliert Immunzellen im Rahmen der Antigenpräsentation; induziert durch IFNs, TNF $\alpha$ (EG, [561, 562])								ACEP $\uparrow$		CE $\uparrow$
major histocompatibility complex, class i, c	HLA-C	3107		MHC-I-Protein, stimuliert Immunzellen im Rahmen der Antigenpräsentation; induziert durch IFNs, TNF $\alpha$ (EG, [561, 562])		C $\uparrow$						ACEP $\uparrow$		CE $\uparrow$
major histocompatibility complex, class ii, dr beta 3	HLA-DRB3	3125		MHC-II-Protein, stimuliert Immunzellen durch Antigenpräsentation (EG)					E $\uparrow$	ACEP $\uparrow$				CE $\uparrow$
heme oxygenase (decycling) 1	HMOX1	3162	HO-1	s. Tab. 6-1	[9]: AF, [72]: T		FT $\uparrow$	ACEP $\uparrow$	T $\uparrow$			T $\uparrow$		
xiap associated factor-1	HSXIAPAF1	54739	XAF1	antagonisiert die antiapoptotischen Eigenschaften von BIRC4, induziert durch IFNs, beteiligt an IFN-vermittelter Apoptose [563, 564]								ACEP $\uparrow$		
intercellular adhesion molecule 1 (cd54), human rhinovirus receptor	ICAM1	3383	CD54	Zelladhäsionsmolekül (CAM), Ligand für Integrine (u. a. LFA-1), beteiligt an Metastasierung, kann Immunabwehr gegen Tumorzellen aktivieren, Tumorsuppressor; induziert durch Zytokine, u. a. IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ (vermittelt durch NF $\kappa$ B) [555, 565-569]	[554]:Z, [555]:CFP							AE $\uparrow$		ACEP $\uparrow$ , F $\downarrow$
interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	3429		induziert durch IFNs, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 [570]								ACEP $\uparrow$		ACEP $\uparrow$
interferon, gamma-inducible protein 30	IFI30	10437		lysosomale Thio-reduktase, beteiligt an MHC-II-vermittelter Antigenpräsentation; induziert durch IFN $\gamma$ (EG)	[15]:AF	CF $\uparrow$	C $\uparrow$					ACEP $\uparrow$	C $\uparrow$	ACEP $\uparrow$
interferon-induced protein 44	IFI44	10561		induziert durch IFNs								ACEP $\uparrow$		ACEP $\uparrow$
interferon-induced protein 44-like	IFI44L	10964		induziert durch IFNs								ACEP $\uparrow$		
interferon induced with helicase C domain 1	IFIH1	64135	MDA-5	RNA-Helikase, mögliche proapoptische Rolle während terminaler Differenzierung; induziert durch IFN $\beta$ (EG, [571])								ACEP $\uparrow$		
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	3434	IFI56	induziert durch IFNs und dsRNA, koreguliert mit IFIT2 [572]	[2]:A			T $\uparrow$		T $\uparrow$	CFP $\uparrow$	ACEP $\uparrow$		CE $\uparrow$ , F $\downarrow$
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	IFIT2	3433	IFI54, ISG-54K	induziert durch IFNs und dsRNA, koreguliert mit IFIT1 [572]							F $\uparrow$	ACEP $\uparrow$		ACEP $\uparrow$
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	IFIT3	3437	IFIT4	induziert durch IFN $\alpha$ und IFN $\beta$ [573]								ACEP $\uparrow$		CE $\uparrow$

Name	Symbol	GeneID	Synonym	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	IFIT5	24138	RI58	induziert durch IFNs und Retinsäure [574]							F↑	ACEP↑		ACET↓
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	8519	IFI17, 9-27, LEU13	vermittelt antiproliferative Signale, beteiligt an homotypischer Adhäsion, Rolle in IFN-vermittelter Resistenz gegen Röntgenstrahlen; induziert durch IFNs [92, 575, 576]				T↑, F↓		AE↓		ACEPT↑		CE↑, F↓
interferon induced transmembrane protein 2 (1-8d)	IFITM2	10581	1-8D	vermittelt antiproliferative Signale, beteiligt an homotypischer Adhäsion; induziert durch IFNs [92, 576]			AE↓					ACEP↑		
interferon induced transmembrane protein 3 (1-8d)	IFITM3	10410	1-8U	vermittelt antiproliferative Signale, beteiligt an homotypischer Adhäsion; induziert durch IFNs [92, 576]								ACEPT↑		
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKBKB	3551	IKKβ, IKK2	ördert Aktivierung von NFκB durch Phosphorylierung von IκB-Proteinen (→ Ubiquitinierung), Verstärker der NFκB-abhängigen Transkription, aktiviert durch Zytokine, u. a. TNFα und IL1 [81, 577, 578]		F↑	AEFP↑							F↓
interleukin 11	IL11	3589		Zytokin, Rolle in Immunantwort, reguliert Entwicklung von Plasmazellen, anti-inflammatorische Wirkung (EG, [584])		ACEP↓	ACP↓							
interleukin 15	IL15	3600		Zytokin, reguliert Aktivierung und Proliferation verschiedener Immunzellen, aktiviert JAK-STAT-Signalweg, vermittelt Expression des antiapoptotischen BCL-2; induziert durch IFNγ, IL1β, TNFα (EG, [585])		C↓						AEPT↑		
interleukin 1, alpha	IL1A	3552		proinflammatorisches Zytokin, moduliert Immunantwort, Sekretion nach Zellschädigung, proapoptotisch, Induktion durch FAS-Aktivierung (EG, [586])	[579]:T, [15]:AF			ACEFP↑						PCE↑
interleukin 1, beta	IL1B	3553		proinflammatorisches Zytokin, steigert Expression von anderen Zytokinen (z. B. CSF2, IL2, IL6, IL8), Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM) und vielfältigen anderen zytokinresponsiven Genen; Rolle in Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese und Invasion, stimuliert Immunantwort, fördert NFκB-Aktivität, Sekretion nach Zellschädigung [529, 587-589]	[579]:T			A-CEFP↑						ACEP↑
interleukin 1 receptor antagonist	IL1RN	3557	IL1RA	Gegenspieler von IL1α und IL1β, moduliert Immunantwort; induziert durch IL4, L10, IFNγ (EG, [590])				ACP↓			F↑	ACET↑		
interleukin 7 receptor	IL7R	3575		Untereinheit des IL7-Rezeptors, heterodimerisiert mit IL2R-gamma, aktiviert PI3K- und JAK/STAT-Signalkaskade, ördert Proliferation und Überleben von Immun- und Tumorzellen (EG, [591])									C↑	ACEPT↑

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
interleukin 8	IL8	3576		Zytokin mit zentraler Rolle in inflammatorischen Prozessen, Chemoattraktor, angiogen, induziert durch Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Familie (EG, [580, 592])	[580, 581]:A, [582]:E, [579, 583]:T	CEFP↑	ACEPT↑	PT↑			F↑	ACEFPT↑		AFP↓
interferon regulatory factor 7	IRF7	3665		Transkriptionsfaktor, vermittelt Expression von IFNs, CCL5 und IFN-responsiven Genen (ISGs); wichtige Rolle in antiviraler Immunantwort; wird selbst induziert durch IFN $\gamma$ und BRCA1 [520, 593]	[520]:E							ACEP↑		F↑
insulin receptor substrate 2	IRS2	8660		Adaptorprotein an Rezeptortyrosinkinasen, vermittelt Effekte von Insulin, IGF1, IL4 und anderen Zytokinen (EG)				AFPT↑				CEFP↓		
interferon stimulated gene 20kda	ISG20	3669		antiproliferative und antivirale Effekte; induziert durch IFNs und dsRNA (vermittelt durch NF $\kappa$ B und IRF1) [595]								ACEPT↑		ACE↑
keratin 17	KRT17	3872	CK17	gehört zur Keratinfamilie; induziert durch FN $\gamma$ (EG, [596])								ACEPT↑		
leucine aminopeptidase 3	LAP3	51056		beteiligt an Erzeugung peptidischer Antigene für MHC-I-Moleküle, induziert durch IFNs [597, 598]								ACEPT↑		
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	LGALS3	3958		Chemoattraktor für verschiedene Immunzellen, fördert Tumorwachstum, -invasion und Angiogenese, induziert Cyclin D1-Expression, beteiligt an Adhäsion, interagiert mit Wnt-Signalweg, antiapoptisch [599-602]	[11]:E, [594]:Z	C↑	ACEFPT↑			ACEFPT↑				
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	LGALS3BP	3959	90K, M2BP, MAC2-BP	bindet an LGALS3, interagiert mit ECM- und Adhäsionsproteinen, moduliert Zell-Zell- und Zell-ECM-Adhäsion, mögliche Rolle in Metastasierung, stimuliert Immunantwort durch Aktivierung von Killerzellen und Induktion der Expression von MHC-I-Antigenen, moduliert Apoptose; induziert durch IFN $\gamma$ , IGF1 u. a. (EG, [603-605])	[2]:A	ACEF↑	ACEPT↑							F↓
met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	MET	4233	HGFR	Protoonkogen, transformierende und proinvasive Effekte, antiapoptotisch durch inhibierende Bindung an FAS und durch Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs; transkriptionell reguliert durch verschiedene Zytokine [606-608]								AFPT↑		F↑
myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	MX1	4599	MxA	fördert Zelltod nach apoptotischen Stimuli und Virusinfektion; induziert durch IFNs und BRCA1 (EG, [593, 609])	[13]:A			T↑				ACEPT↑		GET↑
myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	MX2	4600	MxB	keine antivirale Aktivität; induziert durch IFNs (EG)								ACEPT↑		

Name	Symbol	GeneID	Synonym	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
myeloid differentiation primary response gene (88)	MYD88	4615		Adaptorprotein an Toll-like-Rezeptoren, vermittelt Aktivierung von NFκB via Komplexbildung mit IRF7, IRAK und TRAF6; führt zur Expression von IFNα, IFNβ, IL8 und weiteren Zytokinen; selbst induziert durch IFNγ [610, 611]				P↑						ACEP↑
nuclear factor of activated t-cells 5, tonicity-responsive	NFAT5	10725	TonEBP, OREBP	Transkriptionsfaktor, vermittelt Expression von an Immunantwort und Differenzierung beteiligten Proteinen, z. B. Zytokinen, TNFα, HSP70 (EG, [612-614])			F↑					AEFPT↑		
neuropilin 1	NRP1	8829		Korezeptor für VEGF und Semaphorine, moduliert Angiogenese, beteiligt an Tumprogression, Invasion und Metastasierung, überexprimiert in Tumoren; Expression reguliert durch TNFα, ERK, c38 u. a. [615-618]		CE↓	C↓			ACEFP↑		T↑	C↓	F↑, AC↓
2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kda	OAS1	4938		katalysiert Bildung von 2',5'-Adenosinoligomeren, aktiviert RNase L, beteiligt an antiviraler Abwehr; aktiviert durch dsRNA, induziert durch IFNs (EG, [619, 620])	[534]:T			T↑					ACEPT↑	
2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kda	OAS2	4939		katalysiert Bildung von 2',5'-Adenosinoligomeren, aktiviert RNase L, beteiligt an antiviraler Abwehr; aktiviert durch dsRNA, induziert durch IFNs (EG, [621])									ACEPT↑	C↑
2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kda	OAS3	4940		katalysiert Bildung von 2',5'-Adenosinoligomeren, aktiviert RNase L, beteiligt an antiviraler Abwehr; aktiviert durch dsRNA, induziert durch IFNs (EG, [621])				AFP↓					ACEPT↑	C↑
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL	8638	TRIP14	ähnlich zu OAS-Enzymen, katalysiert vermutlich Bildung von 2',5'-Adenosinoligomeren, interagiert mit Schilddrüsenhormonrezeptoren; induziert durch IFNs [622]							F↑		ACEPT↑	ACET↑
programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4	27250		s. Tab. 6-3		AC↑	AC↑				T↑	TP↓	F↓	AFPT↓
plasminogen activator, tissue	PLAT	5327	tPA	Serinproteinase, aktiviert Plasminogen zu Plasmin, beteiligt an Migration und Geweberemodelling; induziert durch Zytokine, Glucokortikoide, Retinsäure (EG, [623, 624])	[4]:Z	F↑		C↑					ACEFPT↑	

Name	Symbol	GeneID	Synonymie	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
plasminogen activator, urokinase	PLAU	5328	<b>uPA</b>	Serinproteinase, Vorläufer pro-uPA wird durch Plasmin aktiviert; aktiviert Plasminogen zu Plasmin (→ Degradation der ECM), degradiert selbst FN1; beteiligt an Migration und Metastasierung, aktiviert MMP9 (→ Aktivierung von IL8), aktiviert pro-HGF zu HGF, spaltet seinen Inhibitor PAI1 (SERPINE1); induziert durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, u. a. IL1β, IFNγ, TNFα, EGF, TGFβ1 und IGF1 (vermittelt über PI3K- und MAPK-Signalweg und durch NFκB) [EG, [625-629]]	[2, 581]:A, [4]:Z	F↑	PT↑					AEFT↑	C↓	ACP↓
plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	5329	<b>uPAR</b>	uPA-Rezeptor, beteiligt an uPA-Effekten (Plasminaktivierung, Migration, Metastasierung), beeinflusst Adhäsion und Motilität durch Interaktion mit Integrinen, Vitronectin (VTN) u. a., moduliert intrazelluläre Signalkaskaden (u. a. MEK-ERK- und JAK-STAT-Signalwege), induziert durch IFNs (EG, [629, 631-633])			T↑	PT↑				ACET↑		FP↑
phospholipid scramblase 1	PLSCR1	5359		beteiligt an Regulation der Proliferation und terminaler Differenzierung, proapoptisch, verstärkt die antivirale IFN-Antwort, induziert durch IFNs und Wachstumsfaktoren [634, 635]				AFP↓		ACEP↓		ACEP↑		
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15a	PPP1R15A	23645	<b>GADD34</b>	regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase PP1; induziert durch verschiedene Stressoren (Hypoxie, UPR, DNA-Schädigung, ..., vermittelt durch ATF4); induziert durch TNFα und andere apoptotische Stimuli; dephosphoryliert eIF2α und hebt Translationsarrest unter Stressbedingungen auf, beteiligt an Wachstumsarrest in G1 und G2 und an Apoptose; inhibiert durch BAG1 und 3CL2 (EG, [508, 636, 637])	[630]:IR	CP↑	FT↑	AEFP↑					F↑	F↑
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional protease 7)	PSMB8	5696	LMP7	Untereinheit des Immunproteasoms, beteiligt an Prozessierung von Proteinen für die MHC-I-Präsentation; induziert durch IFNγ und TNFα [638-640]			ACEP↑	A↓				AE↑		ACEP↑
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)	PSMB9	5698	LMP2	Proteasomuntereinheit, beteiligt an Antigenprozessierung für MHC-I-Moleküle; induziert durch IFNγ und TNFα (EG, [147, 641])				AEFP↓				ACEPT↑		CE↑

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin g/h synthase and cyclooxygenase)	PTGS2	5743	COX2	nduzierbare COX-Form, fungiert als Dioxygenase und Peroxidase bei Prostaglandinsynthese; induzierbar durch inflammatorische und mitogene Stimuli (z. B. TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , HGF, HER2, FN1); antiapoptotisch, vermittelt Resistenz gegen Anoikis, stabilisiert Survivin, nduziert HER2-Expression, Rolle in Angiogenese und Invasion (EG, [642-347])	[534]:T, [11]:E	CF $\uparrow$		AEFPT $\uparrow$				F $\downarrow$		
v-rel reticulo-endotheliosis viral oncogene homolog b, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in b-cells 3 (avian)	RELB	5971		Bestandteil des NF $\kappa$ B-Komplexes, beteiligt an transkriptioneller Regulation, beeinflusst inflammatorische Prozesse, Immunantwort, Proliferation und Apoptose nach Aktivierung durch Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1; induziert durch IFN $\alpha$ , vermittelt durch NF $\kappa$ B selbst [81, 649]			PT $\uparrow$					AEPT $\uparrow$		F $\uparrow$
radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	91543	cig5, viperin	antivirale Wirkung; induziert durch IFNs und Virusinfektion [650]								ACEPT $\uparrow$		
s100 calcium binding protein a8 (calgranulin a)	S100A8	6279		calcium- und zinkbindendes Zytokin, Chemoattraktor für verschiedene Immunzellen; induziert durch IFN $\gamma$ , IL10 und TNF $\alpha$ (EG, [651, 652])				P $\downarrow$		ACEFPT $\uparrow$				
serum amyloid a1	SAA1	6288		Akute-Phase-Protein; induziert durch TNF $\alpha$ , IL6 u. a. [653]	[648]:P			ACEFT $\uparrow$						ACEPT $\uparrow$
sam domain and hd domain 1	SAMHD1	25939	DCIP	induziert durch IFNs [654]								ACEPT $\uparrow$		F $\downarrow$
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	5055	PAI-2	inhibiert Plasminogenaktivatoren (tPA, uPA), unterdrückt Invasion; induziert durch TNF $\alpha$ , inhibiert TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose [655, 656]				EFPT $\uparrow$						
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade e (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	SERPINE2	5270	protease nexin 1	inhibiert Plasminogenaktivatoren (uPA, tPA), beteiligt an Invasion, moduliert Zusammensetzung der ECM, antiapoptotisch, induziert durch IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ und EGF [628, 657, 658]		ACEFP $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$					AEFT $\uparrow$		AE $\uparrow$
suppressor of cytokine signalling 2	SOCS2	8835	SSI2	STAT-induzierter STAT-Inhibitor (SSI); zytokininduzierbar (u. a. durch GM-CSF, L10, IFN $\gamma$ ); reguliert zytokinabhängige Signalwege in Form einer Feedbackschleife negativ, insbesondere Inhibition des JAK/STAT-Signalwegs; antiproliferativ, Tumorsuppressor (EG, [659, 660])						ACEP $\uparrow$				ACEPT $\downarrow$

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	6648	MnSOD	schützt Zellen gegen oxidativen Stress, antiapoptisch, induziert durch Zytokine (u. a. TNF $\alpha$ ), vermittelt durch NF $\kappa$ B und Nucleophosmin, Tumorsuppressor?, edoch auch proliferationsfördernd [661, 362, 664-667]	[661]:E, [662]:A		EPT $\uparrow$	A $\downarrow$				AET $\uparrow$		ACEFPT $\uparrow$
nuclear antigen sp100	SP100	6672		transkriptioneller Koaktivator/ Korepressor für ETS1, hemmt Invasion von Tumorzellen; induziert durch IFNs und Retinsäure [668-670]		E $\uparrow$	C $\uparrow$					ACEPT $\uparrow$		
sp110 nuclear body protein	SP110	3431	IFI41, IFI75	transkriptioneller Koaktivator; induziert durch IFNs (EG, [671])		C $\uparrow$				E $\uparrow$		ACEPT $\uparrow$		
signal transducer and activator of transcription 1, 91kda	STAT1	6772	ISGF3	Transkriptionsfaktor, reguliert Expression zahlreicher Proteine mit Funktionen in Zellzyklus, Apoptose, Immunantwort etc.; beteiligt an Antwort auf DNA-Schädigung, zentrale Rolle in IFN $\gamma$ -Antwort gemeinsam mit BRCA1, Koaktivator für $\gamma$ 53-abhängige Transkription, Tumorsuppressor?; induziert durch IFNs, IL6, EGF, PDGF u. a., aktiviert durch JAKs (EG, [672-674])	[663]:Z	A $\uparrow$				AT $\uparrow$		ACEPT $\uparrow$ , F $\downarrow$		E $\uparrow$
signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT3	6774	APRF	Transkriptionsfaktor, vermittelt proliferationsfördernde Signale; aktiviert durch verschiedene Zytokine, u. a. IFNs, EGF, IL5, IL6; Adaptormolekül an IFN $\alpha$ -Rezeptor, interagiert mit PI3K-Untereinheit p85; in verschiedenen Tumoren überexprimiert und beteiligt an onkogener Transformation und Apoptoseresistenz, antiinflammatorisch (EG, [675-677])		ACEFP $\uparrow$	AEFP $\uparrow$	P $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$	ACEP $\uparrow$				
signal transducer and activator of transcription 4	STAT4	6775		Transkriptionsfaktor, vermittelt zytokinabhängige Transkription, reguliert IFN-Expression und Differenzierung von T-Helferzellen; induziert durch IL12 und IFNs (EG, [678, 679])		ACEF $\uparrow$	EP $\uparrow$						CP $\uparrow$	ACEPT $\uparrow$
transporter 1, atp-binding cassette, sub-family b (mdr/tap)	TAP1	6890	ABCB2	s. Tab. 6-1	[140]:AC	ACEFP $\uparrow$	CFT $\uparrow$					AE $\uparrow$		CE $\uparrow$
toll-like receptor 4	TLR4	7099		vermittelt angeborene Immunantwort gegen Pathogene, induziert Zytokinexpression (z. B. IL8) durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs, aktiviert Neutrophile; induziert durch IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ (EG, [680, 681])				ACPT $\uparrow$						
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	7128	A20	induziert durch proinflammatorische Zytokine, u. a. TNF $\alpha$ , IL1, TRAIL (vermittelt durch NF $\kappa$ B); inhibiert TNF $\alpha$ - und IL1-abhängige Aktivierung von NF $\kappa$ B, antiapoptisch (EG, [682, 683])		CP $\uparrow$	EPT $\uparrow$	AEFPT $\uparrow$				ET $\uparrow$	ACF $\uparrow$	ACEFPT $\uparrow$

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	8795	DR5, KILLER, TRAIL-R2	s. Tab. 6-1	[9]:AF, [11]:E	ACEFP↑	ACEFPT↑		P↑	ACEFP↑				
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	8743	TRAIL, APO2L	Ligand von <i>death receptors</i> und Decoy-rezeptoren, proapoptotisch, kooperiert mit HSXIAPAF1 bei Vermittlung IFN-abhängiger Apoptose; induziert durch FN $\alpha$ und IFN $\beta$ (vermittelt durch FOXO3A oder NF $\kappa$ B); Expressions negativ reguliert durch PI3K/AKT-Signalweg (EG, [155, 564, 684-686])				AP↓				ACEP↑		CE↑, F↓
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	TNFSF9	8744	4-1BBL	Zytokin, beteiligt an Antigenpräsentation, Rolle in T-Zell-Tumorzell-Interaktion (EG)	[11]:E	AP↑	ACEFPT↑							
tumor rejection antigen (gp96) 1	TRA1	7184	GRP94	Hitzeschockprotein, induziert durch Stressoren, z. B. Hypoxie (vermittelt durch HIF1 $\alpha$ ) und während UPR, fungiert als Chaperon im ER, u. a. für MHC-I-Peptide, stimuliert Zytokinproduktion (z. B. TNF $\alpha$ , IL12), induziert in Brusttumormodellen, kann Immunantwort gegen Tumoren aktivieren [508, 687-690]	[648]:P		F↓						F↓	AFPT↓
tnf receptor-associated factor 1	TRAF1	7185		Adaptorprotein an Rezeptoren der TNFR-Familie, bildet Heterodimer mit TRAF2, vermittelt TNF $\alpha$ -abhängige Aktivierung von JNK und NF $\kappa$ B und Apoptose, kann durch Interaktion mit AP-Proteinen c-IAP1 und c-IAP2 auch antiapoptotische Signale übertragen (EG, [691, 692])	[11]:E									ACEFP↑
tnf receptor-associated factor 4	TRAF4	9618	CART1	s. Tab. 6-1	[141]:AE	C↑	ACEFPT↑							
tripartite motif-containing 22	TRIM22	10346	STAF50	antiproliferative Wirkung; induziert durch IFNs und p53 (EG, [693])			ACEP↑					ACEPT↑		
thyroid hormone receptor interactor 6	TRIP6	7205		transkriptioneller Koaktivator von NF $\kappa$ B und AP-1, interagiert mit RIPK2 und TRAF1 in zytokinabhängigen Signalwegen (z. B. nach TNF $\alpha$ - oder IL1-Stimulation) [694, 695]		ACEFP↑	CFP↑							
delta sleep inducing peptide, immunoreactor	TSC22D3	1831	GILZ, DSI-PI	reguliert Transkription, antiapoptotisch durch Inhibition der Expression von FAS und FASL, verhindert Bindung von AP-1 an seine Targetpromotoren, reprimiert Expression von IL2 und IL2R, negative Regulation von MAPK-Signalwegen durch Bindung an RAF1; induziert durch IL10, immunsuppressiv und antiinflammatorisch (EG, [698-700])			F↑	AFP↓	F↑	ACEFPT↑		AEFPT↓		ACEP↓

Tab. 6-5: Deregulation von Immunantwortgenen nach Zytostatikabehandlung. Seite 11



Name	Symbol	GeneID	Synonym	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 24 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
ubiquitin-conjugating enzyme e2l 6	UBE2L6	9246	UBCH8, UBC8	Ubiquitin-E2-Enzym, konjugiert G1P2 nach IFN-Stimulation mit zellulären Proteinen, beteiligt an Antigenpräsentation?; induziert durch IFNs [90, 701]			AP↑					ACEPT↑		C↑
ul16 binding protein 2	ULBP2	80328		MHC-I-ähnliches Protein, stimuliert Natürliche Killerzellen durch Bindung an Rezeptor KLRK1, aktiviert JAK-STAT-, MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege, induziert IFN $\gamma$ -Produktion; induziert durch Infektion und Transformation [702, 703]								ACEF↑		CE↑
uridine phosphorylase 1	UPP1	7378	UP, UPase	katalysiert reversible Umwandlung von Uridylat in Uridin; induziert durch IL1 $\alpha$ , FN $\gamma$ , TNF $\alpha$ [704, 705]								T↑		
ubiquitin specific protease 18	USP18	11274	UBP43	entfernt Ubiquitin- und G1P2-Gruppen von zellulären Proteinen, Gegenspieler von UBE2L6, moduliert IFN-Antwort; induziert durch IFNs (vermittelt durch JAK-STAT-Signalweg) und RNase L [91, 706]								ACEP↑		
vascular endothelial growth factor	VEGF	7422		Wachstumsfaktor mit angiogener Wirkung; induziert durch Stressoren wie Hypoxie (vermittelt durch HIF1 $\alpha$ ) und während UPR (vermittelt durch ATF4), Expression wird reprimiert durch IFN $\alpha$ und BRCA1, Sekretion wird gesteigert durch HYOU1 [508, 707-709]	[696]:T, [697]:AEP							ACEFPTd	C↓	ACEP↓
x-box binding protein 1	XBP1	7494		Transkriptionsfaktor, Rolle in Differenzierung und Immunantwort, beteiligt an JPR, transaktiviert MHC-II-Gene, ER-Chaperone und an Proteinfaltung beteiligte Enzyme (z. B. DNAJB9); induziert durch IL4 und CD40-Aktivierung, aktiviert durch endonukleolytische Spaltung seiner mRNA durch IRE1 $\alpha/\beta$ ; in Tumoren überexprimiert (EG, [508, 710-712])	[2]:A↑, [13]:A↓		F↓			AEPT↑		AFPT↓		
tyrosyl-trna synthetase	YARS	8565	TYRRS	tRNA-Synthetase, beteiligt an Translation; unter apoptotischen Bedingungen Spaltung in Fragmente mit zytokinartigen Eigenschaften, N-terminales Fragment wirkt IL8-artig, C-terminales Fragment EMAP II-artig und dadurch antiangiogen (EG, [713, 714])								AEPT↓		AEP↓
zinc finger cch type, antiviral 1	ZC3HAV1	56829		beteiligt an antiviraler Immunabwehr (EG)								ACEP↑		

Name	Symbol	GeneID	Synonym	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)	ADAM19	8728		Metalloproteinase, beteiligt an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion und Migration, vermittelt Abspaltung des extrazellulären Teils von NRG1 (Neuregulin-1) ( <i>ectodomain shedding</i> ) (EG, [715])					ACEFPT↑					
a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	9510	METH1	Metalloproteinase, degradiert Proteoglykane der ECM, unterdrückt jedoch Tumorigenese und Metastasierung, antiangiogen durch Inhibition VEGF-abhängiger Signale, an inflammatorischen Prozessen beteiligt (EG, [716, 717])				P↑	ACEFPT↑					F↑
a kinase (prka) anchor protein (gravin) 12	AKAP12	9590	gravin, AKAP25	assoziiert mit PKA, PKC und Proteinphosphatasen, fungiert als Gerüstprotein, interagiert mit Zytoskelettproteinen, beteiligt an Adhäsion, Mitogenese, Entzündungsreaktionen; Tumorsuppressor (EG, [718, 719])		CE↓	AC↓		FT↑			ACEFPT↑		P↑
activated leukocyte cell adhesion molecule	ALCAM	214	CD166	Zelladhäsionsmolekül (CAM), vermittelt Adhäsion, interagiert mit CD6, moduliert Invasion von Tumorzellen [720, 721]			AE↓				ACEP↑			AC↓
calpain 2, (m/II) large subunit	CAPN2	824		s. Tab. 6-3	[2]:A		ACEFP↑							
caveolin 1, caveolae protein, 22kda	CAV1	857		s. Tab. 6-5	[9]:AF, [490]:T, [491]:AET		ACEFT↑				P↑	ACEFPT↑		
caveolin 2	CAV2	858		Bestandteil der Caveolae, bildet Heterooligomer mit CAV1, koexprimiert mit CAV1, beteiligt an Adhäsion, Tumorsuppressor?, beteiligt an Induktion von Seneszenz (EG, [512])	[2]:A, [491]:AET		ACEFPT↑					CEFP↑		
cd24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	CD24	934		Ligand von P-Selektin auf Tumorzellen, Adhäsionsmolekül, überexprimiert in Tumoren, mögliche Rolle in Invasion und Metastasierung; induziert durch Hypoxie [722-724]	[2]:A						ACEFP↑			ACEP↑
cd47 antigen (rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	CD47	961	IAP	s. Tab. 6-5	[39]:C							ACEP↑		
cadherin 4, type 1, r-cadherin (retinal)	CDH4	1002		Zelladhäsionsmolekül (CAM), interagiert mit Cateninen und stellt Verbindung zum Zytoskelett her, Rolle in Motilität, Invasion und Metastasierung, Tumorsuppressor? [725, 726]		CEFP↓	C↓	EP↓					CEFP↓	ACEFP↓

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
claudin 1	CLDN1	9076		Zellverbindungs-molekül (CJM), Bestandteil von <i>Tight Junctions</i> ; induziert durch Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, erhöhte oder erniedrigte Expression in Tumoren; proapoptisch [EG, [727, 728]]					ACEFPT $\uparrow$					
cse1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	1434	CAS	s. Tab. 6-3			ACEFPT $\downarrow$		AF $\downarrow$		ACEP $\downarrow$			
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	1462	PG/M	s. Tab. 6-1			F $\uparrow$		ACEFP $\uparrow$					AP $\uparrow$
connective tissue growth factor	CTGF	1490	IGFBP8	Wachstumsfaktor, moduliert integrin-abhängige Adhäsion, vermittelt Reorganisation des Zytoskeletts, fördert Expression von FN1, stimuliert oder inhibiert Proliferation, Migration und Metastasierung, beeinflusst ERK-, AKT- und Wnt-Signalwege; induziert durch mitogene Faktoren, z. B. TGF $\beta$ [56-60]		F $\uparrow$	AEFPT $\uparrow$		ACEFPT $\uparrow$				C $\downarrow$	ACE $\downarrow$
chemokine (c-x3-c motif) ligand 1	CX3CL1	6376	fractalkine	s. Tab. 6-5								ACEP $\uparrow$		
chemokine (c-x-c motif) ligand 10	CXCL10	3627	IF11, IP-1	s. Tab. 6-5	[534, 535]:T							ACEPT $\uparrow$		
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	3491		stimuliert Adhäsion und Migration, interagiert mit Integrinen, antiapoptisch durch Induktion von BIRC4, fördert Angiogenese, pro- oder antiproliferativ, Koaktivator im Wnt-Signalweg, vermittelt Zytostatikaresistenz; induziert durch Wachstumsfaktoren [729-733]	[2]:A	F $\uparrow$	FT $\uparrow$		ACFPT $\uparrow$			AEPT $\uparrow$		C $\downarrow$
dickkopf homolog 3 (xenopus laevis)	DKK3	27122	REIC	interagiert mit Wnt-Proteinen, Tumorsuppressor, inhibiert Proliferation und Invasion, fördert Zell-Zell-Adhäsion [734, 735]		ACEF $\uparrow$	ACEF $\uparrow$							
discs, large homolog 7 (drosophila)	DLG7	9787	HURP	s. Tab. 6-3	[2]:A	ACE $\downarrow$	ACEFPT $\downarrow$	EP $\downarrow$	AEFPT $\downarrow$		ACEP $\downarrow$			F $\downarrow$
down syndrome critical region gene 1	DSCR1	1827	MCIP1	stressinduziert und wirkt stressprotektiv, inhibiert calcineurinabhängige Signalwege, Target von VEGF, interagiert mit Integrinen und vermittelt Adhäsion und Migration (EG, [736])							ACEP $\uparrow$			ACEFPT $\downarrow$
extracellular matrix protein 1	ECM1	1893		Substratadhäsionsmolekül (SAM), Bestandteil der ECM, beteiligt an Proliferation, Angiogenese, Differenzierung und Metastasierung, Target des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, überexprimiert in malignen Tumoren [738, 739]										ACEP $\uparrow$

Tab. 6-6: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach Zytostatikabehandlung. Seite 3

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
epithelial membrane protein 2	EMP2	2013		moduliert Adhäsion, fördert Membranlokalisierung bestimmter Integrine, reguliert Bildung und Transport von <i>Lipid Rafts</i> und <i>Caveolae</i> , Tumorsuppressor? [740, 741]		AE↓	ACEFPT↓		AEFP↓					
fat tumor suppressor homolog 1 (drosophila)	FAT	2195		Zelladhäsionsmolekül (CAM), beteiligt an Zell-Zell-Kommunikation, Mitglied der Cadherinfamilie, Tumorsuppressor? (EG)			F↑		F↑		ACEFP↑			
fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein ncp94)	FER	2241		s. Tab. 6-5										ACEP↓
fibroblast growth factor 1 (acidic)	FGF1	2246	FGFA, ECGF	mitogener Wachstumsfaktor, aktiviert zahlreiche Signalkaskaden (u. a. PI3K/AKT, RAS/MAPK, SRC), angiogen, bindet an Heparansulfatproteoglykane (Speicherform von TGFs), induziert Expression von MMPs, induziert Expression von E-Cadherin und β-Catenin und fördert deren Assoziation mit dem Zytoskelett, stimuliert Adhäsion und reduziert Invasivität, beteiligt an Stressantwort (EG, [709, 742-746])									C↑	ACEP↑
fibronectin 1	FN1	2335		Substratadhäsionsmolekül (SAM), Bestandteil der Zellmembran und der ECM, interagiert mit Zelladhäsionsmolekülen (z. B. Integrinen), beteiligt an Migration und Metastasierung (EG, [747])			ACEFT↑		ACEFPT↑			AEFPT↑		F↓
growth differentiation factor 15	GDF15	9518	PLAB, MIC-1	s. Tab. 6-1	[2, 69]:A↑, [3, 737]:C↑, [15]:AF↑	A-CEFPPT↑	ACEFPT↑	CP↑	ACEP↑	A-CEFPPT↑	ACEFPT↑	T↑		ACFP↓
intercellular adhesion molecule 1 (cd54), human rhinovirus receptor	ICAM1	3383	CD54	s. Tab. 6-5	[554]:Z, [555]:CFP							AE↑		ACEPT↑, F↓
intercellular adhesion molecule 2	ICAM2	3384		Zelladhäsionsmolekül (CAM), interagiert mit dem Integrin LFA-1, beteiligt an Immunantwort, aktiviert den PI3K/AKT-Signalweg, antiapoptisch (EG, [748])									C↑	ACEFP↑
interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	8519	IFI17, 9-27, LEU13	s. Tab. 6-5					T↑, F↓		AE↓	ACEPT↑		CE↑, F↓
interferon induced transmembrane protein 2 (1-8d)	IFITM2	10581	1-8D	s. Tab. 6-5			AE↓					ACEP↑		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
interferon induced transmembrane protein 3 (1-8d)	IFITM3	10410	1-8U	s. Tab. 6-5								ACEPT↑		
insulin-like growth factor binding protein 1	IGFBP1	3484		Kontrolle und Abschwächung der IGF-vermittelten Wachstumssignale, interagiert mit Integrinen, moduliert Adhäsion und Migration [749, 750]										CEFP↑
interleukin 1, beta	IL1B	3553		s. Tab. 6-5	[579]:T				ACEFP↑					ACEP↑
integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2c	ILKAP	80895		Serin-Threonin-Kinase, reguliert ILK-Aktivität und hemmt ILK-vermittelte Phosphorylierung von GSK3β (Wnt-Signalweg), moduliert Adhäsion, inhibiert <i>anchorage-independent growth</i> , Tumorsuppressor (EG,							ACEP↓			
integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	ITGA3	3675	VLA-3A	s. Tab. 6-1			EFPT↑						C↓	AC↓
I1 cell adhesion molecule	L1CAM	3897		s. Tab. 6-1					ACEFP↑		FP↑			AF↓
laminin, gamma 2	LAMC2	3918		Bestandteil der Basalmembran, beteiligt an Tumorprogression und -migration, Rolle in Adhäsion; induziert durch Wnt-Signalweg (EG, [752, 753])	[4]:Z	F↑	CEFP↑		T↑			T↑		ACEFP↑
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	LGALS3	3958		s. Tab. 6-5	[11]:E, [594]:Z	C↑	ACEFP↑				ACEFP↑			
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	LGALS3BP	3959	9K, M2BP, MAC2-BP	s. Tab. 6-5	[2]:A	ACEF↑	ACEPT↑							F↓
lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	LGALS8	3964		interagiert mit Integrinen, moduliert Adhäsion und Migration, beteiligt an Reorganisation des Zytoskeletts (EG, [754, 755])					F↓			AEPT↑		C↑
leupaxin	LPXN	9404		zytoskelettales Adaptorprotein, homolog zu Paxillin, interagiert mit fokaler Kinase PYK2 (PTK2B) (EG, [756])					ACEPT↑					ACEP↑
melanoma cell adhesion molecule	MCAM	4162	MUC18	Zelladhäsionsmolekül (CAM), beteiligt an Tumorprogression, Invasion und Metastasierung (EG, [757, 758])					F↓			F↑	C↑	ACEP↑
ninjurin 1	NINJ1	4814		s. Tab. 6-1	[3]:C, [15]:AF	ACEFP↑	ACEFP↑							
neuronal cell adhesion molecule	NRCAM	4897		Zelladhäsionsmolekül (CAM), fördert Transformation, Proliferation und Motilität; aktiviert durch Wnt/β-Catenin-Signalweg [759]			F↑		F↑		ACEFP↑			

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
pleckstrin homology-like domain, family a, member 1	PHLDA1	22822	TDAG51	pro- oder antiapoptisch, inhibiert Adhäsion; induziert durch IGF1 (EG, [760])			F↓		FP↑		ACEPT↑	AF↓	ACE↓	F↑, ACEPT↓
plakophilin 4	PKP4	8502	p71	Zellverbindungs-molekül (CJM), beteiligt an Adhäsion; reguliert Desmosomen-Zusammenlagerung, interzelluläre <i>Junctions</i> und Cadherin-Funktion (EG, [761, 762])									CE↓	ACEP↓
plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	5329	UPAR	s. Tab. 6-5			T↑		PT↑			ACET↑		FP↑
protein kinase c, alpha	PRKCA	5578		aktiviert durch Calcium und DAG, phosphoryliert zahlreiche Targets, reguliert u. a. Proliferation, Adhäsion, Transformation, Checkpoints, Apoptose (EG, [763-765])		C↓						ACE↓	C↓	ACEF↓
parathyroid hormone-like hormone	PTHLH	5744	PTHrP	Parathormon-ähnliche Funktion, antiapoptotisch (vermittelt durch PKA), induziert Integrinexpression und fördert Adhäsion an ECM, stimuliert Invasion und Metastasierung (EG, [766, 767])					ACEFT↑					
protein tyrosine phosphatase, receptor type, f	PTPRF	5792	LAR	Tyrosinphosphatase, reguliert Zell-Zell-Adhäsion und beeinflusst den Wnt/β-Catenin-Signalweg, inhibiert Insulinrezeptor-Signalkaskade (EG, [768])								ACEP↓		A↓
ras homolog gene family, member d	RHOD	29984	ARHD	involviert in Reorganisation des Actinzytoskeletts, reguliert Transportvorgänge und Endosomenmotilität, aktiviert DIAPH2 und SRC (EG, [769])		F↑	CEFP↑							ACEP↑
Rho family GTPase 3	RND3	390	ARHE, RHOE	s. Tab. 6-3	[403]:P		ACEFPT↑		AFP↑		F↑			
syndecan 1	SDC1	6382		beteiligt an Zellproliferation, Zell-Matrix-Adhäsion und Tumordinvasion, Überexpression in Tumoren, vermittelt Aktivierung von Integrinen (EG, [770-772])		F↑	F↑			CEF↑	CEFP↑			
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade e (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	SERPINE1	5054	PAI-1	s. Tab. 6-1		AF↑	ACEFPT↑		F↑			AE↑, Fd	CE↓	AC↓
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade e (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	SERPINE2	5270	protease nexin 1	s. Tab. 6-5		ACEFP↑	ACEFPT↑					AEFT↑		AE↑

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	A549 24 h	A549 72 h	HMEC 24 h	HMEC 72 h	MCF-7 24 h	MCF-7 72 h	HT-29 72 h	MDA-MB-231 24 h	MDA-MB-231 72 h
SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	SHC1	6464		Adaptormolekül an Rezeptor- und zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, bildet Komplex mit GRB2, Vermittlerfunktion in zahlreichen Signaltransduktionswegen, u. a. bei RAS-Aktivierung; Isoform p66 wird durch oxidativen Stress aktiviert und wirkt proapoptotisch, moduliert Adhäsion durch Interaktion mit FAK und mit Integrinen [773, 774]		ACF↑	ACEFP↑							
solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	SLC3A2	6520	4F2hc, CD98hc	Aminosäuretransporter, bildet Heterodimer mit SLC7A5, SLC7A11 u. a., vermittelt Cystinimport und Glutamatexport und reguliert intrazellulären Glutathionspiegel, beteiligt an Zytostatikaresistenz, Rolle in Integrin-abhängiger Adhäsion und Migration, antiapoptotisch [775, 776]				P↓				AEFP↓		
smoothelin	SMTN	6525		s. Tab. 6-1		CEFP↑	CP↑				P↑			
synovial sarcoma, x breakpoint 2 interacting protein	SSX2IP	117178	ADIP	beteiligt an Ausbildung des Actinzytoskeletts und Nectin- und Cadherin-vermittelter Adhäsion [777, 778]		E↓	FT↓		AFPT↓	A↓	ACEFP↓			
tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	7980		inhibiert Plasmin- und Trypsin-vermittelte Aktivierung von MMPs, reguliert ECM-Remodeling, hemmt Invasion, Metastasierung und Angiogenese, induziert durch IFNs und RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg [779-781]			AET↑		ACP↓					ACEPT↑
thrombomodulin	THBD	7056		Zelladhäsionsmolekül (CAM), bindet Thrombin und wirkt antikoagulatorisch (EG, [782])			ACEFPT↑		AFPT↑					FT↓
transforming growth factor, alpha	TGFA	7039		s. Tab. 6-1	[2]:A	F↑	ACEFPT↑		T↑					P↑
thrombospondin 1	THBS1	7057	TSP-1	s. Tab. 6-1	[9]:AF		F↑		ACFPT↑					E↑
vitronectin (serum spreading factor, somatomedin B, complement S-protein)	VTN	7448	VN	Substratadhäsionsmolekül (SAM), Bestandteil der ECM, interagiert mit Integrinen, insbes. mit Integrin $\alpha V/\beta 3$ (ITGAV/ITGB3), interagiert mit uPAR und SERPINE1, fördert Adhäsion und Metastasierung [136, 332]			ACEP↑							

**Tab. 6-7: Repression von Genen der Unfolded Protein Response nach Zytostatikabehandlung.**

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Zytost.-Literatur	MDA-MB-231 24 h↓	MDA-MB-231 72 h↓
activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element b67)	ATF4	468	CREB-2	Transkriptionsfaktor, reguliert Expression von Genen mit cAMP-Response-Element (cAMP-RE), beteiligt an UPR und an Hypoxie-Antwort, transaktiviert u. a. ASNS, DDIT3, HERPUD1, HSPA5, SLC7A11 (EG, [636, 783, 784])			ACEP
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	837		s. Tab. 6-5			
dnaj (hsp40) homolog, subfamily b, member 9	DNAJB9	4189	MDG1, ERDJ4	Kochaperon, Rolle in Stressantwort, stabilisiert im Rahmen der UPR Bindung von HSPA5 (BiP) an ungefaltete Proteine, antiapoptotisch [785, 786]			AFPT
homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HERPUD1	9709	MIF1, HERP	ER-Protein; induziert während UPR, transaktiviert durch ATF4; interagiert mit Proteasom und stimuliert Proteindegradation [508, 784, 787]		F	ACEFPT
heat shock 70kda protein 5 (glucose-regulated protein, 78kda)	HSPA5	3309	GRP78, BiP	Hitzeschockprotein, Chaperonfunktion, beteiligt an UPR; induziert durch Hypoxie und andere Stressoren (vermittelt durch ATF4); inhibiert UPR-Kinasen ATF6, IRE1 $\alpha/\beta$ und PERK durch Bindung an luminal Domänen und dissoziiert bei ER-Stress, interagiert mit HYOU1, antiapoptotisch [508, 783, 788-790]	[648]: P	F	ACFPT
hypoxia up-regulated 1	HYOU1	10525	ORP150	Hitzeschockprotein, Chaperonfunktion im ER; induziert durch Hypoxie und andere Stressoren; beteiligt an UPR, antiapoptotisch, interagiert mit HSPA5, steigert VEGF-Sekretion; Expression korreliert mit Tumorinvasivität (EG, [508, 790, 791])			ACFPT
protein disulfide isomerase-associated 4	PDIA4	9601	ERP70, ERP72	beteiligt am Schließen von Disulfidbrücken während Proteinfaltung und -zusammenlagerung im ER, Chaperonfunktion, beteiligt an UPR [792-794]	[648]: P		AFPT
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15a	PPP1R15A	23645	<b>GADD34</b>	s. Tab. 6-5	[630]: IR		
stromal cell-derived factor 2-like 1	SDF2L1	23753		ER-Protein mit Chaperonfunktion, induziert während UPR [793, 795]			AEFP
stanniocalcin 2	STC2	8614		stressinduziert und wirkt stressprotektiv, beteiligt an UPR, antiproliferativ [796, 797]			
tumor rejection antigen (gp96) 1	TRA1	7184	GRP94	s. Tab. 6-5	[648]: P	F	AFPT
vascular endothelial growth factor	VEGF	7422		s. Tab. 6-5	[696]: T, [697]: AEFP	C	ACEP
x-box binding protein 1	XBP1	7494		s. Tab. 6-5	[13]: A		



Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7↑	Mdm2-RNAi HCT-116↑	Mdm2- Inhibitor MCF-7↑	Mdm2- Inhibitor HCT-116↑
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	59		s. Tab. 6-1	[17, 18]	M5 M6 M8	M6	R270	
aldehyde dehydrogenase 4 family, member a1	ALDH4A1	8659	ALDH4	Aldehyddehydrogenase, entgiftet reaktive Sauerstoffspezies (ROS), vermittelt Schutz gegen oxidative Schäden [798]	[112, 798]	M6 M8			
btg family, member 2	BTG2	7832	PC3, TIS21	s. Tab. 6-1	[3, 17, 21, 23, 24]	M5	M5 M6	R270	R270
cyclin d1 (prad1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	595		s. Tab. 6-1	[16, 27]	M5	M5		
cyclin g1	CCNG1	900		s. Tab. 6-1	[23, 27]	M5 M6 M8		R270	
cd59 antigen p18-20	CD59	966	protectin	s. Tab. 6-1	[40]	M8		R270	
cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21, cip1)	CDKN1A	1026	p21, WAF1, CIP1	s. Tab. 6-1	[3, 9, 17, 18, 21]	M5 M6 M8	M5 M6 M8	R270	R270
carboxylesterase 2 (intestine, liver)	CES2	8824		s. Tab. 6-1	[17]				R270
chloride intracellular channel 4	CLIC4	25932		s. Tab. 6-5	[528]				
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	1462	PG/M	s. Tab. 6-1	[17]				
cytoplasmic fmr1 interacting protein 2	CYFIP2	26999	PIR121	s. Tab. 6-1	[21, 42]	M5 M8	M6 M8	R270	R270
DNA-damage-inducible transcript 4	DDIT4	54541	RTP801, REDD1	s. Tab. 6-1	[44]		M5 M8		R270
dickkopf homolog 1 (xenopus laevis)	DKK1	22943		Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, proapoptisch [799, 800]	[799]	M5			
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	FAS	355	CD95, Apo-1, TNFRSF6	s. Tab. 6-1	[3, 17, 18, 21]	M5 M6 M8	M5 M6 M8		R270
ferredoxin reductase	FDXR	2232		s. Tab. 6-1	[17, 21, 23, 73-75]		M5 M6 M8		R270
glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kda)	GAD1	2571		katalysiert Umwandlung von Glutaminsäure in GABA, beteiligt an Stressantwort, wird während Differenzierung induziert (EG, [801, 802])	[17]	M5 M8			
growth arrest and dna-damage-inducible, alpha	GADD45A	1647	GADD45	s. Tab. 6-1	[17, 18, 21, 23, 74]	M5 M6 M8			
growth differentiation factor 15	GDF15	9518	PLAB, MIC-1	s. Tab. 6-1	[3, 17, 18, 21]	M5 M6 M8	M5 M6 M8		
gelsolin (amyloidosis, finnish type)	GSN	2934		s. Tab. 6-1	[17, 79]	M5 M6		R270	
immediate early response 5	IER5	51278		s. Tab. 6-1	[21]	M5 M8			
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	3487		Kontrolle und Abschwächung der IGF-vermittelten Wachstumssignale [750]	[41, 143]	M6			
insulin-like growth factor binding protein 6	IGFBP6	3489		wirkt antiproliferativ, indem es an IGFs bindet und ihre mitogenen Signale abschwächt [750, 804]	[17]		M5		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7↑	Mdm2-RNAi HCT-116↑	Mdm2- Inhibitor MCF-7↑	Mdm2- Inhibitor HCT-116↑
mdm2, transformed 3t3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	MDM2	4193	HDM2	Antagonist von p53, vgl. Haupttext	[109, 244]			R270	
polo-like kinase 2 (drosophila)	PLK2	10769	SNK	s. Tab. 6-1	[21, 74, 111]	M5 M6	M5 M8		
prostaglandin e synthase	PTGES	9536	mPGES	Prostaglandin E-Synthase, durch proinflammatorische Zytokine induzierbar, u. a. IL1 $\beta$ (EG, [805])	[18, 27]	M6			
ribosomal protein s27-like	RPS27L	51065		?	[21]	M5 M6 M8	M5 M8	R270	R270
spermidine/spermine n1-acetyltransferase	SAT	6303	SSAT	s. Tab. 6-1	[41]	M5 M8			
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 5	SERPINB5	5268	maspin	Proteaseinhibitor, unterdrückt Invasion und Metastasierung, Tumorsuppressor, antiangiogen [806]	[23, 112, 803]				R270
sestrin 1	SESN1	27244	PA26	s. Tab. 6-1	[12, 21, 137]	M5 M8	M5 M6 M8	R270	
stratifin	SFN	2810	14-3-3 $\sigma$	s. Tab. 6-1	[18, 21, 27]		M5		
thrombospondin 1	THBS1	7057	TSP-1	s. Tab. 6-1	[9, 18, 27, 41, 112, 143]	M5			
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	8795	DR5, KILLER, TRAIL-R2	s. Tab. 6-1	[18, 23]		M8		R270
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	TNFRSF6B	8771	DCR3	Decoyrezeptor für FASL, LIGHT und TL1A, unterdrückt deren physiologische, proapoptotische Effekte (EG, [807])	[41]		M5 M6		R270
tp53 activated protein 1	TP53AP1	11257	TP53TG1	s. Tab. 6-1	[144]	M5 M6			
tumor protein p53 inducible protein 3	TP53I3	9540	PIG3	s. Tab. 6-1	[3, 18, 21, 23, 24, 74]		M5 M6 M8	R270	R270
tyrosinase-related protein 1	TYRP1	7306	TRP-1	s. Tab. 6-1	[145]	M5 M6 M8		R270	
p53 target zinc finger protein	WIG1	64393	PAG608	s. Tab. 6-1	[146]	M5 M6 M8	M8	R270	R270

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7↓	Mdm2-RNAi HCT-116↓	Mdm2- Inhibitor MCF-7↓	Mdm2- Inhibitor HCT-116↓
acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member e	ANP32E	81611		?	[21]	M5 M6 M8		R270	
adp-ribosylation factor-like 4a	ARL4A	10124		gehört zur ARF-GTPase-Familie (EG)	[17]4			R270	
baculoviral iap repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	332	<b>survivin</b>	s. Tab. 6-2	[21, 163, 164]	M5 M6 M8	M8	R270	R270
bcl2/adenovirus e1b 19kda interacting protein 3	BNIP3	664	NIP3	proapoptotisches BCL2-Familienmitglied, induziert durch Hypoxie (EG, [808])	[21]	M5 M6 M8			
breast cancer 1, early onset	BRCA1	672		s. Tab. 6-2	[163, 165]	M8	M8	R270	
bub1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1	699		s. Tab. 6-2	[3]	M5 M6 M8	M8	R270	R270
<b>cyclin b1</b>	CCNB1	891		s. Tab. 6-2	[3, 21]	M6 M8	M8	R270	R270
cyclin b2	CCNB2	9133		s. Tab. 6-2	[21]	M6 M8	M8	R270	R270
cell division cycle 2, g1 to s and g2 to m	CDC2	983	CDK1, p34Cdc2	s. Tab. 6-2	[74, 166]	M8		R270	R270
cdc20 cell division cycle 20 homolog (s. cerevisiae)	CDC20	991	p55Cdc	s. Tab. 6-2	[21]	M5 M6 M8	M8	R270	R270
cell division cycle 25b	CDC25B	994		s. Tab. 6-2	[74]	M8	M8	R270	
cdc6 cell division cycle 6 homolog (s. cerevisiae)	CDC6	990		s. Tab. 6-2	[17]	M8	M8	R270	R270
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (cdk2-associated dual specificity phosphatase)	CDKN3	1033	CDI, KAP	s. Tab. 6-2	[21]	M8	M8	R270	R270
chk1 checkpoint homolog (s. pombe)	CHEK1	1111	CHK1	s. Tab. 6-2	[21]	M8		R270	
cdc28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	1164	CksHs2	s. Tab. 6-2	[41, 74]	M8		R270	
chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	CSPG6	9126	SMC3	s. Tab. 6-2	[74]	M6 M8			
deoxycytidine kinase	DCK	1633		s. Tab. 6-2	[21, 41]	M8	M8	R270	
dnaj (hsp40) homolog, subfamily c, member 9	DNAJC9	23234		s. Tab. 6-2	[41]	M8	M8	R270	
deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	DTYMK	1841	TYMK, CDC8	s. Tab. 6-2	[21]	M8	M8	R270	
enhancer of zeste homolog 2 (drosophila)	EZH2	2146		s. Tab. 6-2	[185]	M8		R270	R270
fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	2171		s. Tab. 6-2	[74]	M8		R270	
fatty acid desaturase 1	FADS1	3992	D5D	s. Tab. 6-2	[41]	M5 M6 M8	M8	R270	

Tab. 6-9: Repression von p53-Targets nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 1

Tab. 6-9: Repression von p53-Targets nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung.

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7↓	Mdm2-RNAi HCT-116↓	Mdm2- Inhibitor MCF-7↓	Mdm2- Inhibitor HCT-116↓
h2a histone family, member x	H2AFX	3014		s. Tab. 6-2	[21]	M8	M8	R270	R270
chromosome condensation protein g	HCAP-G	64151	CAPG	s. Tab. 6-2	[21]	M5 M6 M8	M5 M6 M8	R270	R270
high-mobility group box 2	HMGB2	3148	HMG2	s. Tab. 6-2	[18]	M8		R270	
hyaluronan-mediated motility receptor (rhamm)	HMMR	3161	RHAMM	s. Tab. 6-2	[3]	M5 M6 M8	M5 M8	R270	R270
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h3 (2h9)	HNRPH3	3189	2H9	s. Tab. 6-2	[74]	M8		R270	
heat shock 70kda protein 1a	HSPA1A	3303	HSP70-1, HSP72	Hitzeschockprotein, Chaperonfunktion, beteiligt an Stressantwort, schützt Zelle vor Apoptose, hemmt Aktivierung der proapoptotischen Kinasen MAP3K5 und MAPK8, moduliert mRNA-Degradierung durch hemmende Interaktion mit HNRPD (EG, [809, 810])	[3]		M6 M8		
insulin receptor substrate 1	IRS1	3667		Adaptorprotein an Insulinrezeptor und IGF1R, führt u. a. zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, vermittelt pleiotrope Effekte (Apoptose, Differenzierung, Transformation), interagiert mit ESR1 und moduliert Transkription; Expression induziert durch Adhäsion und ESR1; häufig überexprimiert in Tumoren [811-813]	[3]			R270	
KIAA0101	KIAA0101	9768		?	[18]	M8		R270	
kinesin family member 23	KIF23	9493	MKLP1, KNSL5	s. Tab. 6-2	[21]	M8	M8	R270	R270
kinesin-like 7	KNSL7	56992	HKLP2	s. Tab. 6-2	[21]	M6 M8		R270	
karyopherin alpha 2 (rag cohort 1, importin alpha 1)	KPNA2	3838		s. Tab. 6-2	[21]	M8		R270	
lamin b receptor	LBR	3930		s. Tab. 6-2	[18]		M8	R270	
hypothetical protein mac30	MAC30	27346		s. Tab. 6-2	[17]	M5 M6 M8		R270	
mad2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	MAD2L1	4085	MAD2	s. Tab. 6-2	[18]	M8		R270	
mcm2 minichromosome maintenance deficient 2,	MCM2	4171		s. Tab. 6-2	[18]	M6 M8	M8	R270	R270
mcm7 minichromosome maintenance deficient 7	MCM7	4176		s. Tab. 6-2	[18, 21, 74]	M6 M8	M8	R270	R270
antigen identified by monoclonal antibody ki-67	MKI67	4288	Ki-67	s. Tab. 6-2	[74]	M6 M8	M8	R270	R270
muts homolog 6 (e. coli)	MSH6	2956	GTBP	s. Tab. 6-2	[74]	M8	M8		R270
nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	NASP	4678		s. Tab. 6-2	[21]	M6 M8		R270	R270

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7↓	Mdm2-RNAi HCT-116↓	Mdm2- Inhibitor MCF-7↓	Mdm2- Inhibitor HCT-116↓
nima (never in mitosis gene a)- related kinase 2	NEK2	4751		s. Tab. 6-2	[21]	M6 M8		R270	R270
neurogranin (protein kinase c substrate, rc3)	NRGN	4900	RC3	bindet an Calmodulin, proapoptotisch [814]	[74]				R270
polo-like kinase (drosophila)	PLK1	5347	PLK	s. Tab. 6-2	[3]	M5 M6 M8	M8	R270	R270
<b>polymerase (dna directed), delta 1, catalytic subunit 125kda</b>	POLD1	5424	POLD	s. Tab. 6-2	[209]	M8		R270	
protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	9055		s. Tab. 6-2	[210]	M6 M8	M8	R270	R270
pituitary tumor-transforming 1	PTTG1	9232	<b>securin</b>	s. Tab. 6-2	[21, 227]	M6 M8	M8	R270	
rac gtpase activating protein 1	RACGAP1	29127	MgcRacGAP	s. Tab. 6-2	[74]	M8		R270	
RecQ protein-like 4	RECQL4	9401		s. Tab. 6-2	[21]	M8		R270	R270
replication factor c (activator 1) 2, 40kda	RFC2	5982		s. Tab. 6-2	[41]	M8			R270
stearoyl-coa desaturase (delta- 9-desaturase)	SCD	6319		s. Tab. 6-2	[74]		M6 M8		R270
solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	SLCO4A1	28231	OATP-E	s. Tab. 6-2	[74]	M5 M6 M8			
son dna binding protein	SON	6651		antiapoptotisch?, an prä-mRNA-Spleißen betei- ligt? (EG)	[74]	M6			
sperm associated antigen 5	SPAG5	10615	hMAP126	s. Tab. 6-2	[21]	M8		R270	
serine/threonine kinase 6	STK6	6790	<b>Aurora A, AURKA</b>	s. Tab. 6-2	[3]	M5 M6 M8	M8	R270	R270
stathmin 1/oncoprotein 18	STMN1	3925	OP18	s. Tab. 6-2	[244, 245]	M8		R270	R270
stomatin	STOM	2040		Membranprotein, reguliert Funktion von Ionenka- nälen und Transportern; induziert durch IL6 [815, 816]	[41]		M5		
srb7 suppressor of rna poly- merase b homolog (yeast)	SURB7	9412		reguliert Transkription, reprimiert RNA-Polyme- rase-II-abhängige Transkription als Teil des NAT- ( <i>negative regulator of activated transcription</i> -) Komplexes [817]	[74]	M5	M5		
timeless homolog (drosophila)	TIMELESS	8914	TIM1	s. Tab. 6-2	[74]	M8	M8	R270	
topoisomerase (dna) ii alpha 170kda	TOP2A	7153		s. Tab. 6-2	[18, 21, 74]	M6 M8	M8	R270	R270
tpx2, microtubule-associated protein homolog (xenopus laevis)	TPX2	22974		s. Tab. 6-2	[74]	M6 M8	M8	R270	
trophinin associated protein (tastin)	TROAP	10024		s. Tab. 6-2	[21]	M8	M8	R270	R270

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7↓	Mdm2-RNAi HCT-116↓	Mdm2- Inhibitor MCF-7↓	Mdm2- Inhibitor HCT-116↓
thymidylate synthetase	TYMS	7298	TS	s. Tab. 6-2	[74]	M8		R270	
ubiquitin-conjugating enzyme e2c	UBE2C	11065	UBCH10	s. Tab. 6-2	[74]	M8		R270	
ubiquitin-conjugating enzyme e2s	UBE2S	27338		s. Tab. 6-2	[21]	M8		R270	
ubiquitin-conjugating enzyme e2 variant 2	UBE2V2	7336	MMS2	Ubiquitin-E2-Enzym, beteiligt an DNA-Reparatur durch Ubiquitinierung von PCNA, signalisiert durch Proteinmodifikation mitotischen Stress [818, 819]	[74]		M5		
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase l5	UCHL5	51377	UCH37	s. Tab. 6-2	[41]	M6 M8		R270	
wee1 homolog (s. pombe)	WEE1	7465		s. Tab. 6-2	[21]	M5 M8	M5		

**Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und –Inhibitorbehandlung.** Seite 1

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2-Inhibitor MCF-7	Mdm2-Inhibitor HCT-116
asf1 anti-silencing function 1 homolog b (s. cerevisiae)	ASF1B	55723	CIA-II	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
activator of s phase kinase	ASK	10926	DBF4	s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓		R270↓	
asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (drosophila)	ASPM	259266	ASP	s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
<b>aurora kinase b</b>	AURKB	9212	STK12	s. Tab. 6-3	[242, 257-259]		M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	
arca1 associated ring domain 1	BARD1	580		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓		R270↓	
capuloviral iap repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	332	<b>survivin</b>	s. Tab. 6-2	[820]	[21, 163, 164]	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
breast cancer 1, early onset	BRCA1	672		s. Tab. 6-2	[258]	[163], [165]	M8↓	M8↓	R270↓	
brca1 interacting protein c-terminal helicase 1	BRIP1	83990	BACH1	s. Tab. 6-3					R270↓	
barren homolog (drosophila)	BRRN1	23397	<b>HCAP-H</b>	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
btg family, member 2	BTG2	7832	PC3, TIS21	s. Tab. 6-1		[3, 17, 21, 23, 24]	M5↑	M5 M6↑	R270↑	R270↑
bub1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1	699		s. Tab. 6-2	[258, 272]	[3]	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
bub1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	BUB1B	701	BUBR1	s. Tab. 6-3	[258]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
chromobox homolog 5 (hp1 alpha homolog, drosophila)	CBX5	23468	HP1	s. Tab. 6-3	[257, 273]		M8↓		R270↓	
cyclin a2	CCNA2	890		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
cyclin b1	CCNB1	891		s. Tab. 6-2	[272]	[3, 21]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
cyclin b2	CCNB2	9133		s. Tab. 6-2	[272]	[21]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
cyclin d1 (prad1: parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	595		s. Tab. 6-1	[258, 821]	[16, 27]	M5↑	M5↑		
cyclin e2	CCNE2	9134		s. Tab. 6-3	[258]					R270↓
cyclin f	CCNF	899		s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
<b>cyclin g1</b>	CCNG1	900		s. Tab. 6-1		[23, 27]	M5 M6 M8↑		R270↑	
cyclin g2	CCNG2	901		s. Tab. 6-3		[27]	M5 M8↑			
cell division cycle 2, g1 to s and g2 to m	CDC2	983	CDK1, p34Cdc2	s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]	[74, 166]	M8↓		R270↓	R270↓
cdc20 cell division cycle 20 homolog (s. cerevisiae)	CDC20	991	p55Cdc	s. Tab. 6-2	[258, 272]	[21]	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
cell division cycle 25a	CDC25A	993		s. Tab. 6-3	[257, 258, 272]		M6 M8↓	M8↓		R270↓
cell division cycle 25b	CDC25B	994		s. Tab. 6-2		[74]	M8↓	M8↓	R270↓	
cell division cycle 25c	CDC25C	995		s. Tab. 6-3	[273]		M8↓		R270↓	R270↓
cdc45 cell division cycle 45- like (s. cerevisiae)	CDC45L	8318	CDC45	s. Tab. 6-3	[258]		M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	
cdc6 cell division cycle 6 homolog (s. cerevisiae)	CDC6	990		s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]	[17]	M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
cell division cycle associ- ated 3	CDCA3	83461	TOME1	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
cell division cycle associated 4	CDCA4	55038		s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
cell division cycle associated 8	CDCA8	55143		s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	R270↓
cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (p21, cip1)	CDKN1A	1026	p21, WAF1, CIP1	s. Tab. 6-1		[3, 9, 17, 18, 21]	M5 M6 M8↑	M5 M6 M8↑	R270↑	R270↑
cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (cdk2-associated dual specificity phos- phatase)	CDKN3	1033	CDI, KAP	s. Tab. 6-2		[21]	M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
dna replication factor	CDT1	81620		s. Tab. 6-3	[258]		M5 M6 M8↓	M5 M6 M8↓	R270↓	R270↓
centromere protein a, 17kda	CENPA	1058		s. Tab. 6-3	[257]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	
centromere protein e, 312kda	CENPE	1062		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M6 M8↓		R270↓	R270↓
centromere protein f, 350/400ka (mitosin)	CENPF	1063		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	
centromere protein j	CENPJ	55835	CPAP	zentrosomales Protein, destabilisiert Mi- krotubuli und hemmt Proliferation [821]			M8↓		R270↓	
chromatin assembly factor 1, subunit a (p150)	CHAF1A	10036	CAF-1 subunit p150	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
chromosome condensa- tion 1	CHC1	1104	RCC1	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
chk1 checkpoint homolog (s. pombe)	CHEK1	1111	CHK1	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[21]	M8↓		R270↓	
chk2 checkpoint homolog (s. pombe)	CHEK2	11200	CHK2	s. Tab. 6-3		[385]	M8↓		R270↓	
citron (rho-interacting, seine/threonine kinase 21)	CIT	11113	Citron-K, CRIK	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
cdc28 protein kinase regulatory subunit 1b	CKS1B	1163	CKS1, CksHs1	s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓		R270↓	

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 2



Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
cdc28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	1164	CksHs2	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[41, 74]	M8↓		R270↓	
chromosome condensation-related smc-associated protein 1	CNAP1	9918	<b>HCAP-D2</b>	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	
cse1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	1434	CAS	s. Tab. 6-3		[21]	M8↓	M8↓	R270↓	
casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	CSNK2A1	1457	CK2A1	reguliert G1/S-Transition durch Einfluss auf CDKN1C-Abbau, beteiligt an DNA-Reparatur, phosphoryliert XRCC1 (BER), phosphoryliert IκB und β-Catenin; wird durch Interaktion mit p53 gehemmt, phosphoryliert p53; pro- oder antiapoptotisch [822-827]			M5 M8↓	M5↓		
chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	CSPG6	9126	SMC3	s. Tab. 6-2		[74]	M6 M8↓			
defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (s. cerevisiae)	DCC1	79075		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
deoxycytidine kinase	DCK	1633		s. Tab. 6-2	[258]	[21, 41]	M8↓	M8↓	R270↓	
dek oncogene (dna binding)	DEK	7913		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	
dihydrofolate reductase	DHFR	1719		s. Tab. 6-3	[258, 286, 304]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
discs, large homolog 7 (drosophila)	DLG7	9787	HURP	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
dna2 dna replication helicase 2-like (yeast)	DNA2L	1763		s. Tab. 6-3					R270↓	
deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	DTYMK	1841	TYMK, CDC8	s. Tab. 6-2		[21]	M8↓	M8↓	R270↓	
dupp pyrophosphatase	DUT	1854	dUTPase	s. Tab. 6-3	[257, 258]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	
e2f transcription factor 1	E2F1	1869		s. Tab. 6-3	[258]		M8d			R270↓
epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	ECT2	1894		s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	
extra spindle poles like 1 (s. cerevisiae)	ESPL1	9700	separase, separin	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
exonuclease 1	EXO1	9156	HEX1	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	
fanconi anemia, complementation group a	FANCA	2175	FA, FAA	s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓		R270↓	
f-box protein 5	FBXO5	26271	EMI1	s. Tab. 6-3	[321]		M8↓		R270↓	R270↓
flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	2237		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 3

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
zwilch	FLJ10036	55055		s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	
forkhead box m1	FOXM1	2305	FKHL16	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
ga binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kda	GABPB2	2553	E4TF1	s. Tab. 6-3			M6 M8↓			
growth arrest and dna- damage-inducible, alpha	GADD45A	1647	GADD45	s. Tab. 6-1		[17, 18, 21, 23, 74]	M5 M6 M8↑			
geminin, dna replication inhibitor	GMNN	51053		s. Tab. 6-3	[333]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
g-protein signalling modulator 2 (ags3-like, c. elegans)	GPSM2	29899	LGN	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M5 M6 M8↓	R270↓	R270↓
chromosome condensation protein g	HCAP-G	64151	CAPG	s. Tab. 6-2		[21]	M5 M6 M8↓	M5 M6 M8↓	R270↓	R270↓
helicase, lymphoid-specific	HELLS	3070	SMARCA6	DNA-Helikase, vermutlich an DNA-Re- plikation u./o. Chromatinremodeling be- teiligt (EG, [828])			M8↓		R270↓	
high-mobility group box 2	HMGB2	3148	HMG2	s. Tab. 6-2		[18]	M8↓		R270↓	
hyaluronan-mediated motil- ity receptor (rhamm)	HMMR	3161	RHAMM	s. Tab. 6-2	[257]	[3]	M5 M6 M8↓	M5 M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member 11	KIF11	3832	<b>Eg5</b>	s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member 14	KIF14	9928		s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	
kinesin family member 18a	KIF18A	81930		s. Tab. 6-3					R270↓	
kinesin family member 20a	KIF20A	10112	RAB6KIFL	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member 22	KIF22	3835	Kid, KNSL4	s. Tab. 6-3	[257, 258]		M6 M8↓	M6 M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member 23	KIF23	9493	MKLP1, KNSL5	s. Tab. 6-2		[21]	M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member 2c	KIF2C	11004	MCAK, KNSL6	s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member 4a	KIF4A	24137		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
kinesin family member c1	KIFC1	3833	<b>MKLP2</b>	s. Tab. 6-3	[272]		M5 M6 M8↓	M5 M6↓	R270↓	R270↓
kinesin-like 7	KNSL7	56992	HKLP2	s. Tab. 6-2		[21]	M6 M8↓		R270↓	
kinetochore associated 1	KNTC1	9735	ROD	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
kinetochore associated 2	KNTC2	10403	HEC, HEC1	s. Tab. 6-3	[257, 258]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 4

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
karyopherin (importin) beta 1	KPNB1	3837	importin $\beta$ 1	beteiligt an Spindelpolorganisation, assoziiert mit TPX2, Transport von RNAs und Proteinen zwischen Nukleus und Zytoplasma, Rolle bei Bildung des NPC [250, 829]			M6 M8↓			
lamin b receptor	LBR	3930		s. Tab. 6-2		[18]		M8↓	R270↓	
lamin b1	LMNB1	4001		s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓		R270↓	R270↓
mad2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	MAD2L1	4085	<b>MAD2</b>	s. Tab. 6-2	[257, 258, 272]	[18]	M8↓		R270↓	
mcm2 minichromosome maintenance deficient 2, mitotin	MCM2	4171		s. Tab. 6-2	[258]	[18]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
mcm3 minichromosome maintenance deficient 3	MCM3	4172		s. Tab. 6-3	[257, 258]	[21, 74]	M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
mcm4 minichromosome maintenance deficient 4	MCM4	4173		s. Tab. 6-3	[258]		M6 M8↓	M6 M8↓	R270↓	R270↓
mcm5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46	MCM5	4174		s. Tab. 6-3	[257, 258, 351]		M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
mcm6 minichromosome maintenance deficient 6 (mis5 homolog, s. pombe)	MCM6	4175		s. Tab. 6-3	[257, 258, 351]	[21]	M8↓		R270↓	
mcm7 minichromosome maintenance deficient 7	MCM7	4176		s. Tab. 6-2	[258]	[18, 21, 74]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
mcm10 minichromosome maintenance deficient 10	MCM10	55388		s. Tab. 6-3	[273, 350]		M8↓		R270↓	R270↓
mediator of dna damage checkpoint 1	MDC1	9656	NFBD1	s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↓			
maternal embryonic leucine zipper kinase	MELK	9833	pEg3	s. Tab. 6-3			M8↓	M6 M8↓	R270↓	R270↓
antigen identified by monoclonal antibody ki-67	MKI67	4288	Ki-67	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[74]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
m-phase phosphoprotein 1	MPHOSPH1	9585	KRMP1, MPP1	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	R270↓
m-phase phosphoprotein 9	MPHOSPH9	10198	MPP9	s. Tab. 6-3			M8↓			R270↓
muts homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (e. coli)	MSH2	4436		s. Tab. 6-3	[257, 258, 272]		M6↓			R270↓
muts homolog 6 (e. coli)	MSH6	2956	GTBP	s. Tab. 6-2		[74]	M8↓	M8↓		R270↓
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	MYBL2	4605	B-Myb	s. Tab. 6-3	[258, 286]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 5

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2-Inhibitor MCF-7	Mdm2-Inhibitor HCT-116
nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	NASP	4678		s. Tab. 6-2	[273]	[21]	M6 M8↓		R270↓	R270↓
nude nuclear distribution gene e homolog 1 (a. nidulans)	NDE1	54820	NUDE1	lokalisiert an Zentrosomen und mitotischen Spindeln, vermittelt die Polwärtsbewegung von Dynein, reguliert Spindelcheckpoint; phosphoryliert durch CDC2, MAPK1 und MAPK3 [830]					R270↓	
n-myc downstream regulated gene 1	NDRG1	10397	RIT42	s. Tab. 6-3		[9]↑	M5 M6 M8↓		R270↑	
nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	NEIL3	55247	FLJ10858	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
nima (never in mitosis gene a)-related kinase 2	NEK2	4751		s. Tab. 6-2	[257]	[21]	M6 M8↓		R270↓	R270↓
nucleoporin 107kda	NUP107	57122		s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
nucleoporin 62kda	NUP62	23636		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
nucleolar and spindle associated protein 1	NUSAP1	51203	ANKT	s. Tab. 6-3	[273]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)	ORC1L	4998	ORC1	s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
origin recognition complex, subunit 6 homolog-like (yeast)	ORC6L	23594	ORC6	s. Tab. 6-3			M6 M8↓		R270↓	
poly (adp-ribose) polymerase family, member 2	PARP2	10038	ADPRTL2	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	R270↓
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	5111		s. Tab. 6-3	[257, 258]	[17]	M8↓		R270↓	
pericentrin 1	PCNT1	79902		s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4	27250		s. Tab. 6-3			M8↑	M5 M8↑		R270↑
dna replication complex gins protein psf2	PSF2	51659		s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55, gamma)	PIK3R3	8503		s. Tab. 6-3			M5 M6 M8↑		R270↑	
membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	PKMYT1	9088	MYT1	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	R270↓
polo-like kinase (drosophila)	PLK1	5347	PLK	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[3]	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
polo-like kinase 2 (drosophila)	PLK2	10769	SNK	s. Tab. 6-1		[21, 74, 111]	M5 M6↑	M5 M8↑		
polo-like kinase 4 (drosophila)	PLK4	10733	SAK	s. Tab. 6-3			M5 M8↓	M6 M8↓	R270↓	

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 6

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2-Inhibitor MCF-7	Mdm2-Inhibitor HCT-116
polymerase (dna-directed), alpha (70kd)	POLA2	23649		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
polymerase (dna-directed), delta 1, catalytic subunit 125kda	POLD1	5424	POLD	s. Tab. 6-2	[257, 258]	[209]	M8↓		R270↓	
polymerase (dna-directed), delta 3, accessory subunit	POLD3	10714	POLD p66/p68	s. Tab. 6-3					R270↓	
polymerase (dna-directed), epsilon	POLE	5426	POLE1	s. Tab. 6-3			M8↓			R270↓
polymerase (dna-directed), epsilon 2 (p59 subunit)	POLE2	5427		s. Tab. 6-3	[385]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	9055		s. Tab. 6-2	[257, 258]	[210]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
primase, polypeptide 1, 49kda	PRIM1	5557		s. Tab. 6-3	[390]	[18]	M8↓	M5 M8↓	R270↓	R270↓
primase, polypeptide 2a, 58kda	PRIM2A	5558		Bestandteil des DNA-Polymerase- $\alpha$ /Primase-Komplexes, beteiligt an Initiation der DNA-Replikation und Elongation durch Synthese von Okazaki-Fragmenten (EG, [387])	[257, 258]					R270↓
pituitary tumor-transforming 1	PTTG1	9232	<b>securin</b>	s. Tab. 6-2	[257, 272]	[21, 227]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	
rac gtpase activating protein 1	RACGAP1	29127	MgcRacGAP	s. Tab. 6-2		[74]	M8↓		R270↓	
rad21 homolog (s. pombe)	RAD21	5885	SCC1	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
rad51 homolog (reca homolog, e. coli) (s. cerevisiae)	RAD51	5888		s. Tab. 6-3	[257, 258, 272, 273]		M8↓			R270↓
rad51 associated protein 1	RAD51AP1	10635	PIR131	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	R270↓
rad54 homolog b (s. cerevisiae)	RAD54B	25788		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
rad54-like (s. cerevisiae)	RAD54L	8438	RAD54	beteiligt an DNA-Rekombination und -Reparatur, interagiert mit RAD51, besitzt ATPase-Eigenschaft, beteiligt am DNA-Supercoiling und an DNA-Strangtrennung (EG, [831])	[257, 258, 272]				R270↓	R270↓
rna binding motif, single stranded interacting protein 1	RBMS1	5937	MSSP	bindet an einzelsträngige DNA und RNA, stimuliert DNA-Replikation und aktiviert Polymerase $\alpha$ , reguliert Transkription, proapoptisch, beteiligt an MYC-abhängiger Transformation (EG, [832])				M5↓		

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
RecQ protein-like 4	RECQL4	9401		s. Tab. 6-2		[21]	M8↓		R270↓	R270↓
replication factor c (activator 1) 2, 40kda	RFC2	5982		s. Tab. 6-2	[257, 258]	[41]	M8↓			R270↓
replication factor c (activator 1) 3, 38kda	RFC3	5983		s. Tab. 6-2	[257, 258]	[41]	M8↓		R270↓	R270↓
replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	RFC4	5984		s. Tab. 6-3	[257, 258]	[21]	M6 M8↓	M8↓		
replication factor c (activator 1) 5, 36.5kda	RFC5	5985		s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	
ribonuclease h2, large subunit	RNASEH2A	10535	RNase HI	s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	
replication protein a3, 14kda	RPA3	6119		s. Tab. 6-3	[257, 258, 272, 273]		M8↓		R270↓	R270↓
ribonucleotide reductase m1 polypeptide	RRM1	6240		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
ribonucleotide reductase m2 polypeptide	RRM2	6241		s. Tab. 6-3	[258]		M8↓		R270↓	R270↓
stratifin	SFN	2810	<b>14-3-3σ</b>	s. Tab. 6-2		[18, 21, 27]			M5↑	
tal1 (scl) interrupting locus	SIL	6491		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
s-phase kinase-associated protein 2 (p45)	SKP2	6502	p45	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
sld5 homolog	SLD5	84296		s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
smc2 structural mainte- nance of chromosomes 2- like 1 (yeast)	SMC2L1	10592	<b>HCAP-E</b>	s. Tab. 6-3	[257, 258, 272]		M5 M6 M8↓		R270↓	
smc4 structural mainte- nance of chromosomes 4- like 1 (yeast)	SMC4L1	10051	<b>HCAP-C</b>	s. Tab. 6-3	[257, 258, 272]		M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
sperm associated antigen 5	SPAG5	10615	hMAP126	s. Tab. 6-2		[21]	M8↓		R270↓	
kinetochore protein spc25	Spc25	57405		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	
stromal antigen 1	STAG1	10274	SA1	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
serine/threonine kinase 6	STK6	6790	<b>Aurora A, AURKA</b>	s. Tab. 6-2		[3]	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
stathmin 1/oncoprotein 18	STMN1	3925	OP18	s. Tab. 6-2	[242]	[244, 245]	M8↓		R270↓	R270↓
transforming, acidic coiled- coil containing protein 3	TACC3	10460		s. Tab. 6-3			M6 M8↓	M8↓	R270↓	
timeless homolog (drosophila)	TIMELESS	8914	TIM1	s. Tab. 6-2		[74]	M8↓	M8↓	R270↓	
thymidine kinase 1, soluble	TK1	7083		s. Tab. 6-3	[257, 258]		M8↓		R270↓	R270↓

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 8

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	E2F-Regul.	p53-Regul.	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
topoisomerase (dna ii alpha 170kda	TOP2A	7153		s. Tab. 6-2	[257, 258]	[18, 21, 74]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
t-lak cell-originated protein kinase	TOPK	55872		s. Tab. 6-3			M6 M8↓		R270↓	
tpx2, microtubule- associated protein homolog (xenopus laevis)	TPX2	22974		s. Tab. 6-2	[273]	[74]	M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
three prime repair exonuclease 2	TREX2	11219		s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
trophinin associated protein (tastin)	TROAP	10024		s. Tab. 6-2		[21]	M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
TTK protein kinase	TTK	7272	MPS1, MPS1L1, PYT	s. Tab. 6-3	[257, 258, 273]		M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
beta 5-tubulin	TUBB	203068	OK/SW-cl	s. Tab. 6-3			M8↓		R270↓	
tubulin, beta, 2	TUBB2	10383		Bestandteil von Mikrotubuli					R270↓	
thioredoxin interacting protein	TXNIP	10628	VDUP1	s. Tab. 6-3			M5 M6↑			
thymidylate synthetase	TYMS	7298	TS	s. Tab. 6-2	[258, 272, 273]	[74]	M8↓		R270↓	
ubiquitin-conjugating enzyme e2c	UBE2C	11065	UBCH10	s. Tab. 6-2	[273]	[74]	M8↓		R270↓	
ubiquitin-conjugating enzyme e2 variant 2	UBE2V2	7336	MMS2	s. Tab. 6-9		[74]		M5↓		
wee1 homolog (s. pombe)	WEE1	7465		s. Tab. 6-2		[21]	M5 M8↓	M5↓		
zw10 interactor	ZWINT	11130		s. Tab. 6-3			M8↓	M8↓	R270↓	

Tab. 6-10: Deregulation von Zellzyklus- und DNA-Damage-Response-Genen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 9

Tab. 6-11: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach MDM2-Silencing und -Inhibitor-behandlung. Seite 1

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2-Inhibitor MCF-7	Mdm2-Inhibitor HCT-116
activated leukocyte cell adhesion molecule	ALCAM	214	CD166	s. Tab. 6-6	M5 M6 M8↑			
adp-ribosylation factor 6	ARF6	382		beteiligt an Adhäsion, vermittelt erhöhte Migration und Invasion, aktiviert den MEK/ERK-Signalweg [833, 834]		M6↓		
cse1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	1434	CAS	s. Tab. 6-3	M8↓	M8↓	R270↓	
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	1462	PG/M	s. Tab. 6-1		M8↓		
cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	1466	CRP2	beteiligt an Wachstumsregulation, Differenzierung und Reorganisation des Zytoskeletts (EG, [835])	M5 M6 M8↓			
chemokine (c-x-c motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	CXCL12	6387	SDF1	Chemokin, fungiert als Chemoattraktor für verschiedene Immunzellen; beteiligt an Invasion, Adhäsion, Angiogenese [836, 837]	M5 M6↑			
discs, large homolog 7 (drosophila)	DLG7	9787	HURP	s. Tab. 6-3	M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
growth differentiation factor 15	GDF15	9518	PLAB, MIC-1	s. Tab. 6-1	M5 M6 M8↑	M5 M6 M8↑		
interferon induced transmembrane protein 1 (9-)	IFITM1	8519	IFI17, 9-27, LEU13	s. Tab. 6-5	M8↑		R270↓	
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	LGALS3	3958	MAC-2	s. Tab. 6-5	M5 M6 M8↑			
mucin 1, transmembrane	MUC1	4582		Onkogen, moduliert Adhäsion, fungiert als Koaktivator im Wnt-Signalweg, inhibiert Apoptose nach DNA-Schädigung, dadurch beteiligt an Zytostatikaresistenz; induziert durch FN $\gamma$ , TNF $\alpha$ [838-841]			R270↑	
brain-protocadherin (brain-heart)	PCDH7	5099		Zelladhäsionsmolekül (CAM), beteiligt an Zell-Zell-Erkennung (EG)		M5↓		
protocadherin 9	PCDH9	5101		Zelladhäsionsmolekül (CAM) [842]	M5↑			
pleckstrin homology-like domain, family a, member 1	PHLDA1	22822	TDAG51	s. Tab. 6-6	M5 M6 M8↑			
ras-related c3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small gtp binding protein rac3)	RAC3	5881		beteiligt an integrinvermittelter Adhäsion und Reorganisation des Zytoskeletts, vermittelt Transformation und Migration von Tumorzellen ( <i>membrane ruffling</i> ) [843, 844]		M6↓		
retinoic acid induced 14	RAI14	26064	NORPEG, ankyrin	Rolle in Differenzierung?, an Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt [845, 846]	M8↓	M5↓		
rap2a, member of ras oncogene family	RAP2A	5911		fördert Integrinaktivierung und Adhäsion, beteiligt an Migration, interagiert mit MAP4K4 und aktiviert JNK-Signalweg [847, 848]		M5↓		
synovial sarcoma, x breakpoint 2 interacting protein	SSX2IP	117178	ADIP	s. Tab. 6-6	M6↓	M5 M6 M8↓		
trefoil factor 3 (intestinal)	TFF3	7033	ITF	fördert Invasion, moduliert E-Cadherin-vermittelte Adhäsion, antiapoptotisch, induziert durch Zytokine, u. a. IL4, IL13 [849-851]	M5 M6↑		R270↑	



Tab. 6-11: Deregulation von Adhäsionsmolekülen nach MDM2-Silencing und -Inhibitorbehandlung. Seite 2

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
thrombospondin 1	THBS1	7057	TSP-1	s. Tab. 6-1	M5↑			
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	7534	<b>14-3-3ζ</b>	Rolle in Adhäsion, moduliert Integrin-Signale, beeinflusst Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch Ras, antiapoptotisch, interagiert mit β-Catenin [852-855]	M5 M6↑			

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
4-aminobutyrate aminotransferase	ABAT	18		katalysiert Abbau von GABA zu Succinsemialdehyd (EG)	M5 M6 M8↑		R270↑	
atp-binding cassette, sub-family a (abc1), member 12	ABCA12	26154		Transportprotein der ABC-Familie (EG)	M5 M6 M8↑		R270↑	
apolipoprotein b mrna editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3b	APOBEC3B	9582		Cytidineaminase, RNA-editierendes Enzym?, Rolle in Wachstumsregulation? (EG)	M5 M6 M8↓		R270↓	R270↓
chromosome 10 open reading frame 116	C10orf116	10974	AMP2	?	M5 M6 M8↑	M8↓	R270↑	
chromosome 1 open reading frame 34	C1orf34	22996	DEME-6	?	M5 M6↑		R270↑	
chromosome 9 open reading frame 87	C9orf87	55151		?	M5 M6 M8↓		R270↓	
carbonic anhydrase xii	CA12	771		katalysiert reversible Hydratisierung von CO <sub>2</sub> , in vielen Tumoren überexprimiert, möglicherweise beteiligt an Aufrechterhaltung des Tumormikromilieus und dadurch an Tumprogression und -invasion; induziert durch Hypoxie (EG,	M5 M6 M8↑			
chloride intracellular channel 3	CLIC3	9022		stimuliert Aktivität von Chloridionenkanal, assoziiert mit ERK, Rolle in Wachstumskontrolle? (EG)	M5 M6↑	M5↑		
carnitine o-octanoyltransferase	CROT	54677	COT	katalysiert Transfer von Fettsäureresten zwischen Coenzym A und Carnitin [857]	M5 M6↑			
cysteine sulfinic acid decarboxylase	CSAD	51380		beteiligt an Taurinsynthese [858]	M5 M6↑		R270↑	
cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	1466	CRP2	beteiligt an Wachstumsregulation, Differenzierung und Reorganisation des Zytoskeletts (EG, [835])	M5 M6 M8↓			
cytochrome p450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	CYP1A1	1543		metabolisches Enzym der CYP1-Familie, wird induziert durch polyzyklische Aromaten (EG)	M5 M6 M8↑			
dep domain containing 1	DEPDC1	55635		?	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	
dep domain containing 6	DEPDC6	64798		?	M5 M6↑			
dehydrogenase/reductase (sdr family) member 2	DHRS2	10202	HEP27	Dehydrogenase, wird bei Natriumbutyrat-vermitteltem Wachstumsarrest induziert [859]	M5 M6↑	M5↑		R270↓
dnaj (hsp40) homolog, sub-family b, member 9	DNAJB9	4189	MDG1, ERDJ4	s. Tab. 6-7	M5 M6↑			
hypothetical protein flj20364	FLJ20364	54908		?	M5 M6 M8↓	M5 M8↓	R270↓	R270↓
flj23311 protein	FLJ23311	79733		?	M5 M6 M8↓		R270↓	R270↓
galanin	GAL	51083		Neuropeptid, wirkt proliferationsfördernd, aktiviert p42MAPK [860]	M5 M6 M8↓		R270↓	
g-2 and s-phase expressed 1	GTSE1	51512	B99	bindet p53 und schleust es aus dem Nukleus aus, inhibiert p53-abhängige Apoptose, kann nur während S und G2 durch p53 induziert werden (EG, [861, 862])	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
major histocompatibility complex, class ii, dr beta 3	HLA-DRB3	3125		MHC-II-Protein, stimuliert Immunzellen durch Antigenpräsentation (EG)	M5 M6 M8↑			

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2-Inhibitor MCF-7	Mdm2-Inhibitor HCT-116
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein d (au-rich element rna binding protein 1, 37kda)	HNRPD	3184	AUF1	hnRNP, assoziiert mit hnRNAs, bindet an AU-reiche Elemente in Zytokin- und Protoonkogen-mRNAs und vermittelt deren Abbau (z. B. mRNA von BCL2, p21, MYC, FOS, GM-CSF), interagiert mit HSC70- und HSP70-Proteinen; proapoptotisch, aber auch tumorigen (EG, [451-454])	M5 M6 M8↓			
paraneoplastic antigen	HUMPPA	30850		?	M8↓			
insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	3488		Kontrolle IGF-vermittelter Wachstumssignale, vermittelt je nach Zelltyp proliferationsfördernde oder -hemmende Wirkung; Expression wird reguliert durch IGF1, TGFβ, MYB, MYBL2, AKT u. a. [750, 863-865]	M5 M6↑		R270↑	
jumonji, at rich interactive domain 1b (rbp2-like)	JARID1B	10765	PLU-1, RBBP2H1A	vermutlich transkriptioneller Korepressor, interagiert mit FOXG1B und PAX9 und mit Pocketproteinen der RB-Familie, Expression wird durch ERBB2 reguliert [866, 867]	M5 M6 M8↑	M8↑		R270↑
kiaa0286 protein	KIAA0286	23306		?	M5 M6 M8↓	M5 M6 M8↓	R270↓	
kiaa0882 protein	KIAA0882	23158		?	M5 M6 M8↑			
maba1	KIAA1324	57535		überexprimiert in metastasierenden Tumorzelllinien, Rolle in Tumorprogression und -invasion? [868]	M5 M6↑		R270↑	
hypothetical protein loc54103	LOC54103	54103		?	M5 M6 M8↑		R270↑	
lipin 1	LPIN1	23175		Rolle im Fettstoffwechsel (EG)	M5 M6↓	M8↓		
latexin	LXN	56925		Inhibitor von Carboxypeptidase A [869]	M5 M6 M8↑			
unknown mgc21654 product	MGC21654	93594		?	M5 M6 M8↓		R270↓	
nuclear prelamin a recognition factor	NARF	26502		assoziiert mit prenyliertem Prälamina A, Funktion? (EG)	M5 M6 M8↓			
nuclear receptor subfamily 2, group f, member 1	NR2F1	7025	EAR3, COUP-TF1	nukleärer <i>Orphan</i> -Hormonrezeptor, reguliert Transkription, vorwiegend als transkriptioneller Repressor; hemmt AP-1-abhängige Transkription, induziert MDM2-Expression; induziert durch Retinsäure [108, 870, 871]	M5 M6 M8↓			
opsin 3 (encephalopsin, pagnopsin)	OPN3	23596		G-Protein-gekoppelter Rezeptor, beteiligt an Photorezeption [872]	M5 M6↑			
pdz and lim domain 7 (enigma)	PDLIM7	9260		assoziiert mit Zytoskelettkomponenten, beteiligt an mitogener Signalübertragung (EG, [873, 874])	M5 M6↓			
phosphatidylserine decarboxylase	PISD	23761		beteiligt an Synthese von Phosphatidylethanolamin [875]	M5 M6 M8↑	M8↑	R270↑	
peripheral myelin protein 22	PMP22	5376		Bestandteil von Myelin; wird bei G0-Arrest induziert, in fortgeschrittenen Tumoren überexprimiert [876-878]	M5 M6 M8↑	M8↓		
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	PNRC1	10957	B4-2	Koaktivator oder -repressor nukleärer Rezeptoren, beeinflusst Wachstumskontrolle [879]	M5 M6 M8↑	M8↑	R270↑	
pc4 and sfrs1 interacting protein 1	PSIP1	11168	LEDGF	transkriptioneller Aktivator und Koaktivator, antiapoptotisch, schützt Zellen vor stressinduziertem Zelltod, aktiviert u. a. Expression von Hitzeschockproteinen, beeinflusst prä-mRNA-Spleißen durch Interaktion mit SFRS1 [466-469]	M5 M6 M8↓	M6 M8↓	R270↓	

Name	Symbol	GeneID	Synonyme	Funktion	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
ret proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, hirschsprung disease)	RET	5979		Rezeptortyrosinkinase, Protoonkogen (aktiviert durch Chromosomenrearrangements), beteiligt an Stressantwort, vermittelt Expression von HSP70-Familienmitgliedern, Rolle in Proliferation, Differenzierung und Migration (EG, [880])	M5 M6↑		R270↑	
retinoid x receptor, alpha	RXRA	6256		nukleärer Retinoid-Rezeptor, fungiert als Transkriptionsfaktor, Expression korreliert mit Wachstum; Agonisten induzieren Wachstumsarrest und Apoptose (EG, [881, 882])	M5 M6↓			
sarcoma amplified sequence	SAS	6302		Mitglied der Tetraspanin-Familie, vermutlich an Wachstumsprozessen beteiligt; in Tumoren häufig mit MDM2 koamplifiziert (EG, [883])	M5 M6 M8↑			
sideroflexin 3	SFXN3	81855		?	M5 M6 M8↓			
sid1 transmembrane family, member 2	SIDT2	51092		?	M5 M6 M8↑	M8↑		
tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	TIMP3	7078	SFD	inhibiert MMPs, wirkt proapoptotisch über FADD-abhängigen Mechanismus, inhibiert VEGF-vermittelte Angiogenese [884, 885]	M5 M6 M8↑		R270↑	
transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	TMEM8	58986		?	M5 M6 M8↑			
transmembrane protease, serine 4	TMPRSS4	56649	MT-SP2	Serinproteinase, Rolle in Invasion und Metastasierung? (EG, [886])	M5 M6↓			
thyroid hormone receptor interactor 13	TRIP13	9319	16E1BP	interagiert mit Schilddrüsenhormonrezeptor, dadurch beteiligt an transkriptioneller Regulation [887]	M5 M6 M8↓	M8↓	R270↓	R270↓
delta sleep inducing peptide, immunoreactor	TSC22D3	1831	GILZ, DSIPI	reguliert Transkription, antiapoptotisch durch Inhibition der Expression von FAS und FASL, verhindert Bindung von AP-1 an seine Targetpromotoren, reprimiert Expression von IL2 und IL2R, negative Regulation von MAPK-Signalwegen durch Bindung an RAF1; induziert durch IL10; immunsuppressiv und antiinflammatorisch (EG, [698-700])	M5 M6 M8↑			
ubiquitin-like 3	UBL3	5412		ubiquitinartig, Funktion? [888]	M5 M6 M8↓			
zinc finger protein 226	ZNF226	7769		?	M5 M6 M8↑			

Tab. 6-13: Weitere nach MDM2-Silencing in HCT-116-Zellen deregulierte Gene.

Name	Symbol	GenelD	Synonyme	Funktion	Mdm2-RNAi MCF-7	Mdm2-RNAi HCT-116	Mdm2- Inhibitor MCF-7	Mdm2- Inhibitor HCT-116
apolipoprotein b mrna editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3c	APOBEC3C	27350		Cytidineaminase, fungiert als RNA-editierendes Enzym in antiviraler Immunabwehr, bewirkt DNA-Mutationen (EG, [889])		M5 M6↑		R270↑
i-mfa domain-containing protein	HIC	29969		reguliert Transkription, interagiert mit Transkriptionselongationsfaktor-Komplex P-TEFb [890]		M5 M6 M8↓		
kiaa0286 protein	KIAA0286	23306		?	M5 M6 M8↓	M5 M6 M8↓	R270↓	
neuregulin 1	NRG1	3084		existiert in zahlreichen Isoformen (Heregulin, <i>glial growth factors</i> , SMDF ( <i>sensory and motor neuron-derived factor</i> )), diese sind Liganden an ERBB-Rezeptoren, regulieren Wachstum und Differenzierung (EG, [874])		M5 M6 M8↑		
zinc finger, bed domain containing 2	ZBED2	79413		?		M5 M6 M8↑		

### 6.3 Literaturverzeichnis Kapitel 6

1. Janus, F., et al., *The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity*. Cell Mol Life Sci, 1999. 55(1): p. 12-27.
2. Chang, B.D., et al., *Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(1): p. 389-94.
3. Daoud, S.S., et al., *Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study*. Cancer Res, 2003. 63(11): p. 2782-93.
4. Li, Y., et al., *Gene expression profiling revealed novel mechanism of action of Taxotere and Furtulon in prostate cancer cells*. BMC Cancer, 2005. 5(1): p. 7.
5. Shtil, A.A., et al., *Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells*. Oncogene, 1999. 18(2): p. 377-84.
6. Fan, F., et al., *ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth*. Oncogene, 2002. 21(49): p. 7488-96.
7. Dan, S. and T. Yamori, *Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 280(3): p. 861-7.
8. Bellarosa, D., et al., *Apoptotic events in a human ovarian cancer cell line exposed to anthracyclines*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 296(2): p. 276-83.
9. Yu, J., et al., *Identification and classification of p53-regulated genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(25): p. 14517-22.
10. Peters, G.J., et al., *Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed*. Eur J Cancer, 2000. 36(7): p. 916-24.
11. Tao, W., et al., *Profiling of differentially expressed apoptosis-related genes by cDNA arrays in human cord blood CD34+ cells treated with etoposide*. Exp Hematol, 2003. 31(3): p. 251-60.
12. Kaeser, M.D., S. Pebernard, and R.D. Iggo, *Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells*. J Biol Chem, 2004. 279(9): p. 7598-605 Epub 2003 Dec 9.
13. Middelburg, R., et al., *Induction of p53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis Messenger RNA by Chemotherapeutic Treatment of Locally Advanced Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2005. 11(5): p. 1863-9.
14. Brachat, A., et al., *A microarray-based, integrated approach to identify novel regulators of cancer drug response and apoptosis*. Oncogene, 2002. 21(54): p. 8361-71.
15. Troester, M.A., et al., *Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer*. Cancer Res, 2004. 64(12): p. 4218-26.
16. Vikhanskaya, F., et al., *Changes in cyclins and cyclin-dependent kinases induced by DNA damaging agents in a human ovarian cancer cell line expressing mutated or wild-type P53*. Exp Cell Res, 1996. 227(2): p. 380-5.
17. Kannan, K., et al., *DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53*. Oncogene, 2001. 20(18): p. 2225-34.
18. Zhao, R., et al., *Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays*. Genes Dev, 2000. 14(8): p. 981-93.
19. Collavin, L., et al., *wt p53 dependent expression of a membrane-associated isoform of adenylate kinase*. Oncogene, 1999. 18(43): p. 5879-88.
20. Zheng, X. and X. Chen, *Aquaporin 3, a glycerol and water transporter, is regulated by p73 of the p53 family*. FEBS Lett, 2001. 489(1): p. 4-7.
21. Kho, P.S., et al., *p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. 279(20): p. 21183-92 Epub 2004 Mar 11.
22. Hai, T., et al., *ATF3 and stress responses*. Gene Expr, 1999. 7(4-6): p. 321-35.
23. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 594-604.
24. Maxwell, S.A. and G.E. Davis, *Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(24): p. 13009-14.
25. Yu, J., et al., *PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(4): p. 1931-6 Epub 2003 Feb 6.
26. Nakano, K. and K.H. Vousden, *PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53*. Mol Cell, 2001. 7(3): p. 683-94.
27. Amundson, S.A., et al., *Physiological function as regulation of large transcriptional programs: the cellular response to genotoxic stress*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001. 129(4): p. 703-10.
28. Okamoto-Inoue, M., et al., *The induction of smooth muscle alpha actin in a transformed rat cell line suppresses malignant properties in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 1999. 142(2): p. 173-8.
29. Yoon, J.C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation*. Mol Cell Biol, 2000. 20(14): p. 5343-9.
30. Le Jan, S., et al., *Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma*. Am J Pathol, 2003. 162(5): p. 1521-8.
31. Sugiyama, Y., et al., *Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1522(2): p. 82-8.
32. Chipuk, J.E., et al., *Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis*. Science, 2004. 303(5660): p. 1010-4.
33. Cartron, P.F., et al., *The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA*. Mol Cell, 2004. 16(5): p. 807-18.
34. Buccellato, L.J., et al., *Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells*. J Biol Chem, 2004. 279(8): p. 6753-60 Epub 2003 Nov 18.

35. Tirone, F., *The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair?* J Cell Physiol, 2001. 187(2): p. 155-65.
36. Albanese, C., et al., *IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf.* Mol Biol Cell, 2003. 14(2): p. 585-99.
37. Pratt, M.A. and M.Y. Niu, *Bcl-2 controls caspase activation following a p53-dependent cyclin D1-induced death signal.* J Biol Chem, 2003. 278(16): p. 14219-29 Epub 2002 Dec 11.
38. Bani, M.R., et al., *Gene expression correlating with response to paclitaxel in ovarian carcinoma xenografts.* Mol Cancer Ther, 2004. 3(2): p. 111-21.
39. Zhou, Y., et al., *Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects.* Cancer Res, 2002. 62(6): p. 1688-95.
40. Gazouli, M., et al., *The complement inhibitor CD59 and the lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3, CD58) genes possess functional binding sites for the p53 tumor suppressor protein.* Anticancer Res, 2002. 22(6C): p. 4237-41.
41. O'Farrell, T.J., et al., *Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression.* Cancer Res, 2004. 64(22): p. 8199-207.
42. Saller, E., et al., *Increased apoptosis induction by 121F mutant p53.* Embo J, 1999. 18(16): p. 4424-37.
43. Tan, T. and G. Chu, *p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice.* Mol Cell Biol, 2002. 22(10): p. 3247-54.
44. Ellisen, L.W., et al., *REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species.* Mol Cell, 2002. 10(5): p. 995-1005.
45. Li, M., et al., *The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation.* J Biol Chem, 2003. 278(42): p. 41059-68 Epub 2003 Jul 29.
46. Ohtsuka, T., et al., *The negative role of cyclin G in ATM-dependent p53 activation.* Oncogene, 2004. 23(31): p. 5405-8.
47. Zhao, L., et al., *Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways.* Mol Cancer Res, 2003. 1(3): p. 195-206.
48. Kimura, S.H. and H. Nojima, *Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein.* Genes Cells, 2002. 7(8): p. 869-80.
49. Kimura, S.H., et al., *Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery.* Oncogene, 2001. 20(25): p. 3290-300.
50. Madjd, Z., et al., *Loss of CD59 expression in breast tumours correlates with poor survival.* J Pathol, 2003. 200(5): p. 633-9.
51. Shah, M.A. and G.K. Schwartz, *Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy.* Clin Cancer Res, 2001. 7(8): p. 2168-81.
52. Lakin, N.D. and S.P. Jackson, *Regulation of p53 in response to DNA damage.* Oncogene, 1999. 18(53): p. 7644-55.
53. Kramer, D.L., et al., *Polyamine depletion in human melanoma cells leads to G1 arrest associated with induction of p21WAF1/CIP1/SDI1, changes in the expression of p21-regulated genes, and a senescence-like phenotype.* Cancer Res, 2001. 61(21): p. 7754-62.
54. Wu, Y., et al., *beta 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican.* J Biol Chem, 2002. 277(14): p. 12294-301 Epub 2002 Jan 22.
55. Touab, M., et al., *Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development.* Am J Pathol, 2002. 160(2): p. 549-57.
56. Chang, C.C., et al., *Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis.* J Natl Cancer Inst, 2004. 96(5): p. 364-75.
57. Utsugi, M., et al., *C-Jun-NH2-terminal kinase mediates expression of connective tissue growth factor induced by transforming growth factor-beta1 in human lung fibroblasts.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. 28(6): p. 754-61.
58. Moritani, N.H., et al., *Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line.* Cancer Lett, 2003. 192(2): p. 205-14.
59. Crean, J.K., et al., *The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells.* J Biol Chem, 2002. 277(46): p. 44187-94 Epub 2002 Sep 5.
60. Mercurio, S., et al., *Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex.* Development, 2004. 131(9): p. 2137-47.
61. Shoshani, T., et al., *Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis.* Mol Cell Biol, 2002. 22(7): p. 2283-93.
62. Schwarzer, R., et al., *REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase.* Oncogene, 2005. 24(7): p. 1138-49.
63. Brondello, J.M., J. Pouyssegur, and F.R. McKenzie, *Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation.* Science, 1999. 286(5449): p. 2514-7.
64. Mizuno, R., et al., *Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells.* J Urol, 2004. 172(2): p. 723-7.
65. Wang, H.Y., Z. Cheng, and C.C. Malbon, *Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer.* Cancer Lett, 2003. 191(2): p. 229-37.
66. Hardy, K., et al., *Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts.* Mol Biol Cell, 2005. 16(2): p. 943-53 Epub 2004 Dec 1.
67. Micheau, O., et al., *Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity.* J Natl Cancer Inst, 1997. 89(11): p. 783-9.
68. Muller, M., et al., *p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs.* J Exp Med, 1998. 188(11): p. 2033-45.

69. Yang, H., et al., *Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation*. Mol Cancer Ther, 2003. 2(10): p. 1023-9.
70. Wang, Y., et al., *Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology*. FEBS Lett, 1999. 445(2-3): p. 269-73.
71. Maxwell, P.J., et al., *Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling*. Cancer Res, 2003. 63(15): p. 4602-6.
72. Choi, B.M., et al., *Induction of heme oxygenase-1 is involved in anti-proliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 321(1): p. 132-7.
73. Liu, G. and X. Chen, *The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis*. Oncogene, 2002. 21(47): p. 7195-204.
74. Mirza, A., et al., *Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression*. Oncogene, 2003. 22(23): p. 3645-54.
75. Hwang, P.M., et al., *Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells*. Nat Med, 2001. 7(10): p. 1111-7.
76. Scholl, F.A., et al., *DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis*. J Cell Biol, 2000. 151(3): p. 495-506.
77. Stilo, R., et al., *TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF-kappaB activation*. FEBS Lett, 2002. 521(1-3): p. 165-9.
78. Hummer, B.T., X.L. Li, and B.A. Hassel, *Role for p53 in gene induction by double-stranded RNA*. J Virol, 2001. 75(16): p. 7774-7.
79. Kannan, K., et al., *DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1*. Oncogene, 2001. 20(26): p. 3449-55.
80. Fujita, M., et al., *Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas*. Cancer Res, 2001. 61(21): p. 7722-6.
81. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(10): p. 725-34.
82. Porta, C., et al., *Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively*. Oncogene, 2005. 24(4): p. 605-15.
83. Luttmann, W., et al., *Differential regulation of CD95 (Fas/APO-1) expression in human blood eosinophils*. Eur J Immunol, 1998. 28(7): p. 2057-65.
84. Augstein, P., et al., *Fas ligand down-regulates cytokine-induced Fas receptor expression on insulinoma (NIT-1), but not islet cells, from autoimmune nonobese diabetic mice*. Endocrinology, 2004. 145(6): p. 2747-52 Epub 2004 Mar 19.
85. Starace, D., et al., *Characterization of signaling pathways leading to Fas expression induced by TNF-alpha: pivotal role of NF-kappaB*. Faseb J, 2005. 19(3): p. 473-5 Epub 2004 Dec 15.
86. Morlon, A. and P. Sassone-Corsi, *The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 3977-82 Epub 2003 Mar 18.
87. Philippar, U., et al., *The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF*. Mol Cell, 2004. 16(6): p. 867-80.
88. Yan, J., et al., *BRCA1 interacts with FHL2 and enhances FHL2 transactivation function*. FEBS Lett, 2003. 553(1-2): p. 183-9.
89. Labalette, C., et al., *Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2004. 24(24): p. 10689-702.
90. Kim, K.I., et al., *Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation*. Mol Cell Biol, 2004. 24(21): p. 9592-600.
91. Kim, K.I. and D.E. Zhang, *ISG15, not just another ubiquitin-like protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 307(3): p. 431-4.
92. Martensen, P.M. and J. Justesen, *Small ISGs coming forward*. J Interferon Cytokine Res, 2004. 24(1): p. 1-19.
93. Hirose, T., et al., *p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y*. Oncogene, 2003. 22(49): p. 7762-73.
94. Gao, H., et al., *B23 regulates Gadd45a nuclear translocation and contributes to Gadd45a-induced cell cycle G2-M arrest*. J Biol Chem, 2005. 10: p. 10.
95. Kearsey, J.M., et al., *Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1*. Oncogene, 1995. 11(9): p. 1675-83.
96. Liu, T., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2003. 63(16): p. 5034-40.
97. Albertoni, M., et al., *Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1*. Oncogene, 2002. 21(27): p. 4212-9.
98. Gouaze, V., et al., *Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2002. 277(45): p. 42867-74 Epub 2002 Sep 6.
99. Ahn, J.S., et al., *Gelsolin for senescence-associated resistance to apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 1010: p. 493-5.
100. Azuma, T., et al., *Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression*. J Biol Chem, 2000. 275(6): p. 3761-6.
101. Lee, T.S. and L.Y. Chau, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. Nat Med, 2002. 8(3): p. 240-6.
102. Liu, Z.M., et al., *Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells*. Oncogene, 2004. 23(2): p. 503-13.
103. Ghattas, M.H., et al., *Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. 34(12): p. 1619-28.



104. Lin, Y., W. Ma, and S. Benchimol, *Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis*. Nat Genet, 2000. 26(1): p. 122-7.
105. Brugger, D., et al., *Induction of drug resistance and protein kinase C genes in A2780 ovarian cancer cells after incubation with antineoplastic agents at sublethal concentrations*. Anticancer Res, 2002. 22(6C): p. 4229-32.
106. Ohtsuka, T., et al., *ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway*. Nat Cell Biol, 2004. 6(2): p. 121-8 Epub 2004 Jan 18.
107. Tinel, A. and J. Tschopp, *The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress*. Science, 2004. 304(5672): p. 843-6 Epub 2004 Apr 8.
108. Qi, J.S., et al., *Regulation of the mdm2 oncogene by thyroid hormone receptor*. Mol Cell Biol, 1999. 19(1): p. 864-72.
109. Chene, P., *Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(2): p. 102-9.
110. Ihrie, R.A. and L.D. Attardi, *Perp-etrating p53-dependent apoptosis*. Cell Cycle, 2004. 3(3): p. 267-9 Epub 2004 Mar 1.
111. Burns, T.F., et al., *Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells*. Mol Cell Biol, 2003. 23(16): p. 5556-71.
112. Nakamura, Y., *Isolation of p53-target genes and their functional analysis*. Cancer Sci, 2004. 95(1): p. 7-11.
113. Fukushima, Y., et al., *Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells*. Int J Cancer, 1998. 76(1): p. 63-72.
114. Ding, S.J., et al., *From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis*. Mol Cell Proteomics, 2004. 3(1): p. 73-81 Epub 2003 Oct 30.
115. Wikman, H., et al., *Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array*. Oncogene, 2002. 21(37): p. 5804-13.
116. Fogel, M., et al., *L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma*. Cancer Lett, 2003. 189(2): p. 237-47.
117. Silletti, S., et al., *Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion*. J Biol Chem, 2004. 279(28): p. 28880-8 Epub 2004 May 5.
118. Kolli, S., et al., *The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling*. J Biol Chem, 2004. 279(28): p. 29374-85 Epub 2004 May 7.
119. Araki, T. and J. Milbrandt, *Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth*. Neuron, 1996. 17(2): p. 353-61.
120. Warnke, S., et al., *Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells*. Curr Biol, 2004. 14(13): p. 1200-7.
121. Seo, Y.W., et al., *The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death*. J Biol Chem, 2003. 278(48): p. 48292-9 Epub 2003 Sep 18.
122. Kim, J.Y., et al., *BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha*. J Exp Med, 2004. 199(1): p. 113-24 Epub 2003 Dec 29.
123. Hershko, T. and D. Ginsberg, *Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis*. J Biol Chem, 2004. 279(10): p. 8627-34 Epub 2003 Dec 18.
124. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. 288(5468): p. 1053-8.
125. Li, J., et al., *AMPK-beta1 subunit is a p53-independent stress responsive protein that inhibits tumor cell growth upon forced expression*. Carcinogenesis, 2003. 24(5): p. 827-34.
126. Chen, J.G., et al., *Gene expression and mitotic exit induced by microtubule-stabilizing drugs*. Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7891-9.
127. Lu, X., et al., *The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair*. Mol Cell, 2004. 15(4): p. 621-34.
128. Bulavin, D.V., et al., *Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity*. Nat Genet, 2002. 31(2): p. 210-5 Epub 2002 May 20.
129. Stehlik, C., et al., *The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor kappaB activation pathways*. J Exp Med, 2002. 196(12): p. 1605-15.
130. Yokoyama, T., et al., *Methylation of ASC/TMS1, a proapoptotic gene responsible for activating procaspase-1, in human colorectal cancer*. Cancer Lett, 2003. 202(1): p. 101-8.
131. Masumoto, J., et al., *ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells*. J Biol Chem, 1999. 274(48): p. 33835-8.
132. Tomitori, H., et al., *Functional characterization of the human spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase gene promoter*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1579(2-3): p. 180-4.
133. Chopra, S. and H.M. Wallace, *Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species*. Biochem Pharmacol, 1998. 55(7): p. 1119-23.
134. Durand, M.K., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and tumour growth, invasion, and metastasis*. Thromb Haemost, 2004. 91(3): p. 438-49.
135. Chang, H., et al., *Cell adhesion induces the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation in anchorage dependent cells*. Cell Commun Adhes, 2002. 9(5-6): p. 239-47.
136. Hertig, A. and E. Rondeau, *Plasminogen activator inhibitor type 1: the two faces of the same coin*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004. 13(1): p. 39-44.
137. Velasco-Miguel, S., et al., *PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes*. Oncogene, 1999. 18(1): p. 127-37.
138. Yang, H.Y., et al., *14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth*. Mol Cell Biol, 2003. 23(20): p. 7096-107.

139. Chan, T.A., et al., *14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage*. Nature, 1999. 401(6753): p. 616-20.
140. Zhu, K., et al., *p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides*. Oncogene, 1999. 18(54): p. 7740-7.
141. Sax, J.K. and W.S. El-Deiry, *Identification and characterization of the cytoplasmic protein TRAF4 as a p53-regulated proapoptotic gene*. J Biol Chem, 2003. 278(38): p. 36435-44 Epub 2003 Jun 4.
142. Adimoolam, S. and J.M. Ford, *p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(20): p. 12985-90 Epub 2002 Sep 19.
143. Wang, L., et al., *Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches*. J Biol Chem, 2001. 276(47): p. 43604-10.
144. Takei, Y., et al., *Isolation of a novel TP53 target gene from a colon cancer cell line carrying a highly regulated wild-type TP53 expression system*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. 23(1): p. 1-9.
145. Nylander, K., et al., *Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response*. J Pathol, 2000. 190(1): p. 39-46.
146. Mendez-Vidal, C., et al., *The p53-induced mouse zinc finger protein wig-1 binds double-stranded RNA with high affinity*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(9): p. 1991-6.
147. Marques, L., et al., *STAT1 regulates lipopolysaccharide- and TNF-alpha-dependent expression of transporter associated with antigen processing 1 and low molecular mass polypeptide 2 genes in macrophages by distinct mechanisms*. J Immunol, 2004. 173(2): p. 1103-10.
148. Begley, G.S., et al., *Cytoplasmic domains of the transporter associated with antigen processing and P-glycoprotein interact with subunits of the proteasome*. Mol Immunol, 2005. 42(1): p. 137-41.
149. Brucet, M., et al., *Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1*. Genes Immun, 2004. 5(1): p. 26-35.
150. Sawhney, R.S., et al., *Autocrine transforming growth factor alpha regulates cell adhesion by multiple signaling via specific phosphorylation sites of p70S6 kinase in colon cancer cells*. J Biol Chem, 2004. 279(45): p. 47379-90 Epub 2004 Aug 10.
151. Rosen, K., et al., *Transforming growth factor-alpha prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2001. 276(40): p. 37273-9 Epub 2001 Aug 3.
152. Kanda, D., et al., *Transforming growth factor alpha protects against Fas-mediated liver apoptosis in mice*. FEBS Lett, 2002. 519(1-3): p. 11-5.
153. Hahm, K.B., et al., *Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein*. Nat Genet, 1999. 23(2): p. 222-7.
154. Teicher, B.A., *Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta*. Cancer Metastasis Rev, 2001. 20(1-2): p. 133-43.
155. Wajant, H., *TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship*. Vitam Horm, 2004. 67: p. 101-32.
156. Wu, G.S., K. Kim, and W.S. el-Deiry, *KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death*. Adv Exp Med Biol, 2000. 465: p. 143-51.
157. Fleckenstein, D.S., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase*. Leuk Res, 2003. 27(8): p. 687-94.
158. Glauner, H., et al., *Intracellular localization and transcriptional regulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 4 (TRAF4)*. Eur J Biochem, 2002. 269(19): p. 4819-29.
159. Wang, Q.E., et al., *UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2*. Carcinogenesis, 2004. 25(6): p. 1033-43 Epub 2004 Jan 23.
160. Wang, G., et al., *The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(7): p. 2231-40 Print 2004.
161. El-Deiry, W.S., *Transactivation of repair genes by BRCA1*. Cancer Biol Ther, 2002. 1(5): p. 490-1.
162. Andres, J.L., et al., *Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents*. Oncogene, 1998. 16(17): p. 2229-41.
163. Liu, T.G., et al., *Silencing of hdm2 oncogene by siRNA inhibits p53-dependent human breast cancer*. Cancer Gene Ther, 2004. 17: p. 17.
164. Mirza, A., et al., *Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway*. Oncogene, 2002. 21(17): p. 2613-22.
165. Arizti, P., et al., *Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression*. Mol Cell Biol, 2000. 20(20): p. 7450-9.
166. Yun, J., et al., *p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor*. J Biol Chem, 1999. 274(42): p. 29677-82.
167. Shern, J.F., et al., *Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2003. 278(42): p. 40829-36 Epub 2003 Aug 11.
168. Burd, C.G., T.I. Strohlic, and S.R. Gangi Setty, *Arf-like GTPases: not so Arf-like after all*. Trends Cell Biol, 2004. 14(12): p. 687-94.
169. Okada, H. and T.W. Mak, *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(8): p. 592-603.
170. Honda, R., R. Komer, and E.A. Nigg, *Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis*. Mol Biol Cell, 2003. 14(8): p. 3325-41 Epub 2003 May 29.
171. Chen, J., et al., *Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells*. J Biol Chem, 2003. 278(1): p. 486-90 Epub 2002 Nov 04.
172. Wang, Z., S. Fukuda, and L.M. Pelus, *Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family*. Oncogene, 2004. 23(49): p. 8146-53.

173. Futaki, M. and J.M. Liu, *Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex*. Trends Mol Med, 2001. 7(12): p. 560-5.
174. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. 432(7015): p. 316-23.
175. D'Andrea, A.D. and M. Grompe, *The Fanconi anaemia/BRCA pathway*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(1): p. 23-34.
176. Zhong, Q., et al., *Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response*. Science, 1999. 285(5428): p. 747-50.
177. Brunet, S. and I. Vernos, *Chromosome motors on the move. From motion to spindle checkpoint activity*. EMBO Rep, 2001. 2(8): p. 669-73.
178. Toyoshima-Morimoto, F., et al., *Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase*. Nature, 2001. 410(6825): p. 215-20.
179. Diffley, J.F., *Regulation of early events in chromosome replication*. Curr Biol, 2004. 14(18): p. R778-86.
180. Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner, *Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1*. Mol Cell, 1998. 2(2): p. 163-71.
181. Fang, G., *Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex*. Mol Biol Cell, 2002. 13(3): p. 755-66.
182. Davezac, N., et al., *Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation*. Oncogene, 2002. 21(50): p. 7630-41.
183. Kudoh, K., et al., *Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray*. Cancer Res, 2000. 60(15): p. 4161-6.
184. Xie, R.L., et al., *The tumor suppressor interferon regulatory factor 1 interferes with SP1 activation to repress the human CDK2 promoter*. J Biol Chem, 2003. 278(29): p. 26589-96 Epub 2003 May 5.
185. Tang, X., et al., *Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene*. Oncogene, 2004. 23(34): p. 5759-69.
186. Bailis, J.M. and S.L. Forsburg, *MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair*. Curr Opin Genet Dev, 2004. 14(1): p. 17-21.
187. Clay-Farrace, L., et al., *Human replication protein Cdc6 prevents mitosis through a checkpoint mechanism that implicates Chk1*. Embo J, 2003. 22(3): p. 704-12.
188. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. Nature, 2004. 432(7015): p. 298-306.
189. Elias, B., A. Laine, and Z. Ronai, *Phosphorylation of MdmX by CDK2/Cdc2(p34) is required for nuclear export of Mdm2*. Oncogene, 2005. 14: p. 14.
190. Godelock, D.M., et al., *Regulatory interactions between the checkpoint kinase Chk1 and the proteins of the DNA-dependent protein kinase complex*. J Biol Chem, 2003. 278(32): p. 29940-7 Epub 2003 May 19.
191. Egan, E.A. and M.J. Solomon, *Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases*. Mol Cell Biol, 1998. 18(7): p. 3659-67.
192. Ghiselli, G., et al., *The cohesin SMC3 is a target for beta-catenin/TCF4 transactivation pathway*. J Biol Chem, 2003. 278(22): p. 20259-67 Epub 2003 Mar 21.
193. Silins, G., S. Grimmond, and N. Hayward, *Characterisation of a new human and murine member of the DnaJ family of proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 243(1): p. 273-6.
194. Huang, S.H., et al., *Human dTMP kinase: gene expression and enzymatic activity coinciding with cell cycle progression and cell growth*. DNA Cell Biol, 1994. 13(5): p. 461-71.
195. Tonini, T., et al., *Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A*. Oncogene, 2004. 23(28): p. 4930-7.
196. Bracken, A.P., et al., *EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer*. Embo J, 2003. 22(20): p. 5323-35.
197. Ichikawa, Y., et al., *Monitoring the expression profiles of doxorubicin-resistant K562 human leukemia cells by serial analysis of gene expression*. Int J Hematol, 2004. 79(3): p. 276-82.
198. U, M., et al., *Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor*. Leukemia, 2004. 18(11): p. 1850-6.
199. Geiman, T.M., et al., *Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(9): p. 2716-29 Print 2004.
200. Stros, M., et al., *HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter*. J Biol Chem, 2002. 277(9): p. 7157-64 Epub 2001 Dec 17.
201. Du, Q., et al., *LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation*. Curr Biol, 2002. 12(22): p. 1928-33.
202. Wang, C., et al., *The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression*. Clin Cancer Res, 1998. 4(3): p. 567-76.
203. Kurasawa, Y., et al., *Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation*. Embo J, 2004. 23(16): p. 3237-48 Epub 2004 Aug 05.
204. Sueishi, M., M. Takagi, and Y. Yoneda, *The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2*. J Biol Chem, 2000. 275(37): p. 28888-92.
205. Zannini, L., et al., *Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import*. J Biol Chem, 2003. 278(43): p. 42346-51 Epub 2003 Aug 09.
206. Nikolakaki, E., et al., *Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34(cdc2)*. J Biol Chem, 1997. 272(10): p. 6208-13.
207. Foisner, R., *Cell cycle dynamics of the nuclear envelope*. ScientificWorldJournal, 2003. 3: p. 1-20.
208. Atalay, A., et al., *Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 299(5): p. 839-46.

209. Li, B. and M.Y. Lee, *Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1*. J Biol Chem, 2001. 276(32): p. 29729-39 Epub 2001 May 25.
210. Li, C., M. Lin, and J. Liu, *Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis*. Oncogene, 2004. 23(58): p. 9336-47.
211. Michel, L., et al., *Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13): p. 4459-64 Epub 2004 Mar 15.
212. Cortez, D., G. Glick, and S.J. Elledge, *Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(27): p. 10078-83 Epub 2004 Jun 21.
213. Wohlschlegel, J.A., et al., *Expression of geminin as a marker of cell proliferation in normal tissues and malignancies*. Am J Pathol, 2002. 161(1): p. 267-73.
214. Scholzen, T., et al., *The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure*. J Pathol, 2002. 196(2): p. 135-44.
215. Kolodner, R.D. and G.T. Marsischky, *Eukaryotic DNA mismatch repair*. Curr Opin Genet Dev, 1999. 9(1): p. 89-96.
216. Yang, Q., et al., *The mismatch DNA repair heterodimer, hMSH2/6, regulates BLM helicase*. Oncogene, 2004. 23(21): p. 3749-56.
217. Alekseev, O.M., et al., *Overexpression of the Linker histone-binding protein tNASP affects progression through the cell cycle*. J Biol Chem, 2003. 278(10): p. 8846-52 Epub 2002 Dec 30.
218. Chen, Y., et al., *Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation*. J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 49408-16 Epub 2002 Oct 16.
219. Hayward, D.G., et al., *The centrosomal kinase Nek2 displays elevated levels of protein expression in human breast cancer*. Cancer Res, 2004. 64(20): p. 7370-6.
220. Fletcher, L., et al., *Inhibition of centrosome separation after DNA damage: a role for Nek2*. Radiat Res, 2004. 162(2): p. 128-35.
221. Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, and E. Nishida, *Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase*. EMBO Rep, 2002. 3(4): p. 341-8 Epub 2002 Mar 15.
222. Hansen, D.V., et al., *Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1*. Mol Biol Cell, 2004. 15(12): p. 5623-34 Epub 2004 Oct 06.
223. Neef, R., et al., *Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis*. J Cell Biol, 2003. 162(5): p. 863-75 Epub 2003 Aug 25.
224. Wang, Y., et al., *Polyamine-modulated factor 1 binds to the human homologue of the 7a subunit of the Arabidopsis COP9 signalosome: implications in gene expression*. Biochem J, 2002. 366(Pt 1): p. 79-86.
225. Syvaoja, J. and S. Linn, *Characterization of a large form of DNA polymerase delta from HeLa cells that is insensitive to proliferating cell nuclear antigen*. J Biol Chem, 1989. 264(5): p. 2489-97.
226. Ban, R., et al., *Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase*. J Biol Chem, 2004. 279(16): p. 16394-402 Epub 2004 Jan 26.
227. Zhou, Y., et al., *DNA damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53*. J Biol Chem, 2003. 278(1): p. 462-70 Epub 2002 Oct 25.
228. Jiang, X., et al., *Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway*. Science, 2003. 299(5604): p. 223-6.
229. Boan, F., et al., *Prothymosin alpha, a mammalian c-myc-regulated acidic nuclear protein, provokes the decondensation of human chromosomes in vitro*. Cytogenet Cell Genet, 2001. 93(3-4): p. 171-4.
230. Orre, R.S., et al., *Prothymosin alpha functions as a cellular oncoprotein by inducing transformation of rodent fibroblasts in vitro*. J Biol Chem, 2001. 276(3): p. 1794-9 Epub 2000 Oct 17.
231. Hamid, T. and S.S. Kakar, *PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function*. Mol Cancer, 2004. 3(1): p. 18.
232. Mishima, M., et al., *Cell cycle regulation of central spindle assembly*. Nature, 2004. 430(7002): p. 908-13 Epub 2004 Jul 28.
233. Maddox, A.S. and K. Oegema, *Closing the GAP: a role for a RhoA GAP in cytokinesis*. Mol Cell, 2003. 11(4): p. 846-8.
234. Yin, J., et al., *RECQL4, mutated in the Rothmund-Thomson and RAPADILINO syndromes, interacts with ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway*. Hum Mol Genet, 2004. 13(20): p. 2421-30 Epub 2004 Aug 18.
235. Zou, L., D. Liu, and S.J. Elledge, *Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 13827-32 Epub 2003 Nov 6.
236. Huang, N.E., et al., *Modulation of YY1 activity by SAP30*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 306(1): p. 267-75.
237. Laherty, C.D., et al., *SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors*. Mol Cell, 1998. 2(1): p. 33-42.
238. Zhang, Y., et al., *SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex*. Mol Cell, 1998. 1(7): p. 1021-31.
239. Li, J., et al., *Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues*. Int J Cancer, 1994. 57(3): p. 348-52.
240. Tamai, I., et al., *Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 273(1): p. 251-60.
241. Chang, M.S., et al., *Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 287(1): p. 116-21.
242. Polager, S. and D. Ginsberg, *E2F mediates sustained G2 arrest and down-regulation of Stathmin and AIM-1 expression in response to genotoxic stress*. J Biol Chem, 2003. 278(3): p. 1443-9 Epub 2002 Nov 21.

243. Ullmannova, V. and C. Haskovec, *Gene expression during camptothecin-induced apoptosis in human myeloid leukemia cell line ML-2*. Neoplasma, 2004. 51(3): p. 175-80.
244. Cadwell, C. and G.P. Zambetti, *The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth*. Gene, 2001. 277(1-2): p. 15-30.
245. Johnsen, J.I., et al., *p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest*. Int J Cancer, 2000. 88(5): p. 685-91.
246. Andrews, P.D., et al., *Mitotic mechanics: the auroras come into view*. Curr Opin Cell Biol, 2003. 15(6): p. 672-83.
247. Kunitoku, N., et al., *CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function*. Dev Cell, 2003. 5(6): p. 853-64.
248. Katayama, H., et al., *Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53*. Nat Genet, 2004. 36(1): p. 55-62 Epub 2003 Dec 14.
249. Chan, R.C., et al., *Chromosome cohesion is regulated by a clock gene paralogue TIM-1*. Nature, 2003. 423(6943): p. 1002-9.
250. Ciciarello, M., et al., *Importin beta is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 26): p. 6511-22 Epub 2004 Nov 30.
251. Kufer, T.A., et al., *Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle*. J Cell Biol, 2002. 158(4): p. 617-23 Epub 2002 Aug 12.
252. Nadano, D., et al., *Human tustin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton*. Biochem J, 2002. 364(Pt 3): p. 669-77.
253. Bastians, H., et al., *Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins*. Mol Biol Cell, 1999. 10(11): p. 3927-41.
254. Stone, M., et al., *Uch2/Uch37 is the major deubiquitinating enzyme associated with the 26S proteasome in fission yeast*. J Mol Biol, 2004. 344(3): p. 697-706.
255. Wang, Y., S.J. Decker, and J. Sebolt-Leopold, *Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt1 by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis*. Cancer Biol Ther, 2004. 3(3): p. 305-13 Epub 2004 Mar 10.
256. Leach, S.D., et al., *Negative regulation of Wee1 expression and Cdc2 phosphorylation during p53-mediated growth arrest and apoptosis*. Cancer Res, 1998. 58(15): p. 3231-6.
257. Ren, B., et al., *E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints*. Genes Dev, 2002. 16(2): p. 245-56.
258. Bracken, A.P., et al., *E2F target genes: unraveling the biology*. Trends Biochem Sci, 2004. 29(8): p. 409-17.
259. Kimura, M., et al., *Cell cycle-dependent regulation of the human aurora B promoter*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 316(3): p. 930-6.
260. Mello, J.A., et al., *Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway*. EMBO Rep, 2002. 3(4): p. 329-34 Epub 2002 Mar 15.
261. Daganzo, S.M., et al., *Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1*. Curr Biol, 2003. 13(24): p. 2148-58.
262. Kumagai, H., et al., *A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1999. 19(7): p. 5083-95.
263. Bond, J., et al., *ASPM is a major determinant of cerebral cortical size*. Nat Genet, 2002. 32(2): p. 316-20.
264. Ditchfield, C., et al., *Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores*. J Cell Biol, 2003. 161(2): p. 267-80.
265. Fabbro, M., et al., *BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage*. J Biol Chem, 2004. 279(30): p. 31251-8 Epub 2004 May 24.
266. Kleiman, F.E. and J.L. Manley, *Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50*. Science, 1999. 285(5433): p. 1576-9.
267. Irminger-Finger, I., et al., *Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis*. Mol Cell, 2001. 8(6): p. 1255-66.
268. Poot, R.A., et al., *The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci*. Nat Cell Biol, 2004. 6(12): p. 1236-44 Epub 2004 Nov 14.
269. Sharma, S., et al., *Stimulation of flap endonuclease-1 by the Bloom's syndrome protein*. J Biol Chem, 2004. 279(11): p. 9847-56 Epub 2003 Dec 19.
270. Yang, Q., et al., *The processing of Holliday junctions by BLM and WRN helicases is regulated by p53*. J Biol Chem, 2002. 277(35): p. 31980-7 Epub 2002 Jun 21.
271. von Kobbe, C., et al., *Colocalization, physical, and functional interaction between Werner and Bloom syndrome proteins*. J Biol Chem, 2002. 277(24): p. 22035-44 Epub 2002 Mar 27.
272. Stevaux, O. and N.J. Dyson, *A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function*. Curr Opin Cell Biol, 2002. 14(6): p. 684-91.
273. Weinmann, A.S., et al., *Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis*. Genes Dev, 2002. 16(2): p. 235-44.
274. Davies, A.A., et al., *Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein*. Mol Cell, 2001. 7(2): p. 273-82.
275. Howlett, N.G., et al., *Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia*. Science, 2002. 297(5581): p. 606-9 Epub 2002 Jun 13.
276. Yu, X., et al., *The BRCT domain is a phospho-protein binding domain*. Science, 2003. 302(5645): p. 639-42.
277. Cabello, O.A., et al., *Cell cycle-dependent expression and nucleolar localization of hCAP-H*. Mol Biol Cell, 2001. 12(11): p. 3527-37.
278. Mao, Y., A. Abrieu, and D.W. Cleveland, *Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1*. Cell, 2003. 114(1): p. 87-98.

279. Honda, S., et al., *Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis*. J Biol Chem, 2004. 279(11): p. 10615-23 Epub 2003 Dec 19.
280. Franco, S., B. Perrin, and A. Huttenlocher, *Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion*. Exp Cell Res, 2004. 299(1): p. 179-87.
281. Carragher, N.O., et al., *A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src*. Curr Biol, 2003. 13(16): p. 1442-50.
282. Sugimoto, K., H. Tasaka, and M. Dotsu, *Molecular behavior in living mitotic cells of human centromere heterochromatin protein HPLalpha ectopically expressed as a fusion to red fluorescent protein*. Cell Struct Funct, 2001. 26(6): p. 705-18.
283. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. 410(6824): p. 120-4.
284. Bates, S., S. Rowan, and K.H. Vousden, *Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes*. Oncogene, 1996. 13(5): p. 1103-9.
285. Xiao, Z., et al., *Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents*. J Biol Chem, 2003. 278(24): p. 21767-73 Epub 2003 Apr 3.
286. Patel, J.H., et al., *Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(7): p. 562-8.
287. Badie, C., et al., *p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line*. Br J Cancer, 2000. 82(3): p. 642-50.
288. Toby, G.G., et al., *A novel RING finger protein, human enhancer of invasion 10, alters mitotic progression through regulation of cyclin B levels*. Mol Cell Biol, 2003. 23(6): p. 2109-22.
289. Moroy, T. and C. Geisen, *Cyclin E*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(8): p. 1424-39.
290. Fung, T.K., et al., *Cyclin F is degraded during G2-M by mechanisms fundamentally different from other cyclins*. J Biol Chem, 2002. 277(38): p. 35140-9 Epub 2002 Jul 16.
291. Horne, M.C., et al., *Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression*. J Biol Chem, 1996. 271(11): p. 6050-61.
292. Bennin, D.A., et al., *Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest*. J Biol Chem, 2002. 277(30): p. 27449-67 Epub 2002 Apr 15.
293. Li, L. and L. Zou, *Sensing, signaling, and responding to DNA damage: Organization of the checkpoint pathways in mammalian cells*. J Cell Biochem, 2004. 2: p. 2.
294. Sato, N., K. Arai, and H. Masai, *Human and Xenopus cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: in vitro phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7*. Embo J, 1997. 16(14): p. 4340-51.
295. Ayad, N.G., et al., *Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC*. Cell, 2003. 113(1): p. 101-13.
296. Walker, M.G., *Drug target discovery by gene expression analysis: cell cycle genes*. Curr Cancer Drug Targets, 2001. 1(1): p. 73-83.
297. Li, H.Y. and Y. Zheng, *Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells*. Genes Dev, 2004. 18(5): p. 512-27 Epub 2004 Mar 10.
298. Carazo-Salas, R.E., et al., *Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation*. Nature, 1999. 400(6740): p. 178-81.
299. Liu, H., et al., *Citron kinase is a cell cycle-dependent, nuclear protein required for G2/M transition of hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. 278(4): p. 2541-8 Epub 2002 Oct 30.
300. Yamashiro, S., et al., *Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II*. Mol Biol Cell, 2003. 14(5): p. 1745-56 Epub 2003 Feb 06.
301. Mongay, L., et al., *Association of the cell cycle regulatory proteins p45(SKP2) and CksHs1. Functional effect on CDK2 complex formation and kinase activity*. J Biol Chem, 2001. 276(27): p. 25030-6 Epub 2001 May 10.
302. Bashir, T., et al., *Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase*. Nature, 2004. 428(6979): p. 190-3.
303. Morris, M.C., et al., *Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast*. Nature, 2003. 423(6943): p. 1009-13.
304. Wells, J.M., et al., *Accumulation of E2F-4.DP-1 DNA binding complexes correlates with induction of dhfr gene expression during the G1 to S phase transition*. J Biol Chem, 1997. 272(7): p. 4483-92.
305. Ball, A.R., Jr., et al., *Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7*. Mol Cell Biol, 2002. 22(16): p. 5769-81.
306. Behrens, P., U. Brinkmann, and A. Wellmann, *CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis*. Apoptosis, 2003. 8(1): p. 39-44.
307. Bermudez, V.P., et al., *The alternative Ctf18-Dcc1-Ctf8-replication factor C complex required for sister chromatid cohesion loads proliferating cell nuclear antigen onto DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(18): p. 10237-42 Epub 2003 Aug 20.
308. Demuth, I., M. Digweed, and P. Concannon, *Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation*. Oncogene, 2004. 23(53): p. 8611-8.
309. Campillos, M., et al., *Transcriptional activation by AP-2alpha is modulated by the oncogene DEK*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(5): p. 1571-5.
310. Alexiadis, V., et al., *The protein encoded by the proto-oncogene DEK changes the topology of chromatin and reduces the efficiency of DNA replication in a chromatin-specific manner*. Genes Dev, 2000. 14(11): p. 1308-12.
311. Rundle, D.R., G. Gorbsky, and L. Tsiokas, *PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: role of mDia1 IN PKD2 localization to mitotic spindles*. J Biol Chem, 2004. 279(28): p. 29728-39 Epub 2004 Apr 28.
312. Tsou, A.P., et al., *Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2003. 22(2): p. 298-307.

313. Eki, T., et al., *Assignment of the closest human homologue (DNA2L:KIAA0083) of the yeast Dna2 helicase gene to chromosome band 10q21.3-q22.1*. Genomics, 1996. 37(3): p. 408-10.
314. Chuang, L.S., et al., *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1*. Science, 1997. 277(5334): p. 1996-2000.
315. Robertson, K.D., et al., *DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters*. Nat Genet, 2000. 25(3): p. 338-42.
316. Guo, G., W. Wang, and A. Bradley, *Mismatch repair genes identified using genetic screens in Blm-deficient embryonic stem cells*. Nature, 2004. 429(6994): p. 891-5.
317. McIntosh, E.M., et al., *Human dUTP pyrophosphatase: cDNA sequence and potential biological importance of the enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(17): p. 8020-4.
318. Tatsumoto, T., et al., *Potential roles of the nucleotide exchange factor ECT2 and Cdc42 GTPase in spindle assembly in Xenopus egg cell-free extracts*. J Cell Biochem, 2003. 90(5): p. 892-900.
319. Hauf, S., I.C. Waizenegger, and J.M. Peters, *Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells*. Science, 2001. 293(5533): p. 1320-3.
320. Pereira, G. and E. Schiebel, *Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14*. Science, 2003. 302(5653): p. 2120-4 Epub 2003 Nov 6.
321. Hsu, J.Y., et al., *E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1)*. Nat Cell Biol, 2002. 4(5): p. 358-66.
322. Nakada, D., Y. Hirano, and K. Sugimoto, *Requirement of the Mre11 complex and exonuclease 1 for activation of the Mec1 signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2004. 24(22): p. 10016-25.
323. Genschel, J., L.R. Bazemore, and P. Modrich, *Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair*. J Biol Chem, 2002. 277(15): p. 13302-11 Epub 2002 Jan 24.
324. Sharma, S., et al., *The exonucleolytic and endonucleolytic cleavage activities of human exonuclease 1 are stimulated by an interaction with the carboxyl-terminal region of the Werner syndrome protein*. J Biol Chem, 2003. 278(26): p. 23487-96 Epub 2003 Apr 18.
325. Leveille, F., et al., *The Fanconi anemia gene product FANCF is a flexible adaptor protein*. J Biol Chem, 2004. 279(38): p. 39421-30 Epub 2004 Jul 15.
326. Hussain, S., et al., *Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCG with BRCA2/FANCD1*. Hum Mol Genet, 2003. 12(19): p. 2503-10 Epub 2003 Aug 5.
327. Krokan, H.E., et al., *Base excision repair of DNA in mammalian cells*. FEBS Lett, 2000. 476(1-2): p. 73-7.
328. Hosfield, D.J., et al., *Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity*. Cell, 1998. 95(1): p. 135-46.
329. Williams, B.C., et al., *Zwilch, a new component of the ZW10/ROD complex required for kinetochore functions*. Mol Biol Cell, 2003. 14(4): p. 1379-91.
330. Wang, X., et al., *Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11468-73.
331. Wang, X., et al., *The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(26): p. 16881-6 Epub 2002 Dec 13.
332. Shin, C., Y. Feng, and J.L. Manley, *Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock*. Nature, 2004. 427(6974): p. 553-8.
333. Markey, M., H. Siddiqui, and E.S. Knudsen, *Geminin is targeted for repression by the retinoblastoma tumor suppressor pathway through intragenic E2F sites*. J Biol Chem, 2004. 279(28): p. 29255-62 Epub 2004 Apr 14.
334. Tanaka, M., et al., *Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1*. J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 10719-26 Epub 2002 Jan 14.
335. Sowa, Y., et al., *Retinoblastoma binding factor 1 site in the core promoter region of the human RB gene is activated by hGABP/E4TF1*. Cancer Res, 1997. 57(15): p. 3145-8.
336. McGarry, T.J. and M.W. Kirschner, *Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis*. Cell, 1998. 93(6): p. 1043-53.
337. Kaushik, R., et al., *Subcellular localization of LGN during mitosis: evidence for its cortical localization in mitotic cell culture systems and its requirement for normal cell cycle progression*. Mol Biol Cell, 2003. 14(8): p. 3144-55 Epub 2003 May 03.
338. Lai, F., et al., *cDNA cloning, expression pattern, genomic structure and chromosomal location of RAB6KIFL, a human kinesin-like gene*. Gene, 2000. 248(1-2): p. 117-25.
339. Shiroguchi, K., et al., *The second microtubule-binding site of monomeric kid enhances the microtubule affinity*. J Biol Chem, 2003. 278(25): p. 22460-5 Epub 2003 Apr 12.
340. Khuda, S.E., et al., *The Sac3 homologue shd1 is involved in mitotic progression in mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. 279(44): p. 46182-90 Epub 2004 Aug 18.
341. Gruneberg, U., et al., *Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2*. J Cell Biol, 2004. 166(2): p. 167-72.
342. Chan, G.K., et al., *Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores*. Nat Cell Biol, 2000. 2(12): p. 944-7.
343. Deluca, J.G., et al., *Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites*. Mol Biol Cell, 2005. 16(2): p. 519-31 Epub 2004 Nov 17.
344. Martin-Lluesma, S., V.M. Stucke, and E.A. Nigg, *Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2*. Science, 2002. 297(5590): p. 2267-70.
345. Tomkinson, A.E., et al., *Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2001. 68: p. 151-64.



346. Harris, C.A., et al., *Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2*. Genomics, 1995. 28(2): p. 198-205.
347. Vergnes, L., et al., *Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(28): p. 10428-33 Epub 2004 Jul 1.
348. Biamonti, G., et al., *The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase*. Mol Cell Biol, 1992. 12(8): p. 3499-506.
349. MacCorkle, R.A. and T.H. Tan, *Inhibition of JNK2 disrupts anaphase and produces aneuploidy in mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. 279(38): p. 40112-21 Epub 2004 Jul 15.
350. Yoshida, K. and I. Inoue, *Expression of MCM10 and TopBP1 is regulated by cell proliferation and UV irradiation via the E2F transcription factor*. Oncogene, 2004. 23(37): p. 6250-60.
351. Ohtani, K., et al., *Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F*. Oncogene, 1999. 18(14): p. 2299-309.
352. Ricke, R.M. and A.K. Bielinsky, *Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase-alpha*. Mol Cell, 2004. 16(2): p. 173-85.
353. DaFonseca, C.J., F. Shu, and J.J. Zhang, *Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(6): p. 3034-9 Epub 2001 Mar 06.
354. Goldberg, M., et al., *MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint*. Nature, 2003. 421(6926): p. 952-6.
355. Lou, Z., et al., *MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways*. Nature, 2003. 421(6926): p. 957-61.
356. Lou, Z., et al., *MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage*. J Biol Chem, 2004. 279(45): p. 46359-62 Epub 2004 Sep 17.
357. Vulsteke, V., et al., *Inhibition of spliceosome assembly by the cell cycle-regulated protein kinase MELK and involvement of splicing factor NIPP1*. J Biol Chem, 2004. 279(10): p. 8642-7 Epub 2003 Dec 29.
358. Abaza, A., et al., *M phase phosphoprotein 1 is a human plus-end-directed kinesin-related protein required for cytokinesis*. J Biol Chem, 2003. 278(30): p. 27844-52 Epub 2003 May 11.
359. Kamimoto, T., et al., *Identification of a novel kinesin-related protein, KRMP1, as a target for mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1*. J Biol Chem, 2001. 276(40): p. 37520-8.
360. Matsumoto-Taniura, N., et al., *Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning*. Mol Biol Cell, 1996. 7(9): p. 1455-69.
361. Joaquin, M. and R.J. Watson, *The cell cycle-regulated B-Myb transcription factor overcomes cyclin-dependent kinase inhibitory activity of p57(KIP2) by interacting with its cyclin-binding domain*. J Biol Chem, 2003. 278(45): p. 44255-64 Epub 2003 Aug 28.
362. Kim, K.T., et al., *Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent mitotic spindle checkpoint*. J Biol Chem, 2004. 279(37): p. 38597-602 Epub 2004 Jul 09.
363. Stein, S., et al., *NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis*. J Biol Chem, 2004. 279(47): p. 48930-40 Epub 2004 Sep 17.
364. Wang, Z., et al., *Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm*. World J Gastroenterol, 2004. 10(4): p. 550-4.
365. Bandaru, V., et al., *A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to Escherichia coli endonuclease VIII*. DNA Repair (Amst), 2002. 1(7): p. 517-29.
366. Okuda, M., et al., *Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication*. Cell, 2000. 103(1): p. 127-40.
367. Colombo, E., et al., *Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53*. Nat Cell Biol, 2002. 4(7): p. 529-33.
368. Itahana, K., et al., *Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation*. Mol Cell, 2003. 12(5): p. 1151-64.
369. Maignel, D.A., et al., *Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation*. Mol Cell Biol, 2004. 24(9): p. 3703-11.
370. Kurki, S., et al., *Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation*. Cancer Cell, 2004. 5(5): p. 465-75.
371. Loiodice, I., et al., *The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis*. Mol Biol Cell, 2004. 15(7): p. 3333-44 Epub 2004 May 14.
372. Walther, T.C., et al., *The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly*. Cell, 2003. 113(2): p. 195-206.
373. Pyronnet, S., L. Pradayrol, and N. Sonenberg, *A cell cycle-dependent internal ribosome entry site*. Mol Cell, 2000. 5(4): p. 607-16.
374. Huber, A., et al., *PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development*. DNA Repair (Amst), 2004. 3(8-9): p. 1103-8.
375. Cho, E.A., M.J. Prindle, and G.R. Dressler, *BRCT domain-containing protein PTIP is essential for progression through mitosis*. Mol Cell Biol, 2003. 23(5): p. 1666-73.
376. Fuss, J. and S. Linn, *Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase*. J Biol Chem, 2002. 277(10): p. 8658-66 Epub 2001 Dec 10.
377. Zimmerman, W.C., et al., *Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry*. Mol Biol Cell, 2004. 15(8): p. 3642-57 Epub 2004 May 14.
378. Chen, D., et al., *Centrosomal anchoring of protein kinase C betaII by pericentrin controls microtubule organization, spindle function, and cytokinesis*. J Biol Chem, 2004. 279(6): p. 4829-39.



379. Goke, R., et al., *Programmed cell death protein 4 (PDCD4) acts as a tumor suppressor in neuroendocrine tumor cells*. Ann N Y Acad Sci, 2004. 1014: p. 220-1.
380. Goke, R., et al., *Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1)*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 287(6): p. C1541-6 Epub 2004 Aug 18.
381. Fu, L., et al., *The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo*. Cell, 2002. 111(1): p. 41-50.
382. Walter, B.E. and J.J. Henry, *Embryonic expression of pre-initiation DNA replication factors in Xenopus laevis*. Gene Expr Patterns, 2004. 5(1): p. 81-9.
383. Mitsuuchi, Y., et al., *The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel*. Cancer Res, 2000. 60(19): p. 5390-4.
384. Xia, X., et al., *The N-terminal 24 amino acids of the p53 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest*. Mol Cell Biol, 2003. 23(5): p. 1717-25.
385. Huang, D., et al., *E2F mediates induction of the Sp1-controlled promoter of the human DNA polymerase epsilon B-subunit gene POLE2*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(13): p. 2810-21.
386. Swallow, C.J., et al., *Sak/Plk4 and mitotic fidelity*. Oncogene, 2005. 24(2): p. 306-12.
387. Schub, O., et al., *Multiple phosphorylation sites of DNA polymerase alpha-primase cooperate to regulate the initiation of DNA replication in vitro*. J Biol Chem, 2001. 276(41): p. 38076-83 Epub 2001 Aug 13.
388. Ducoux, M., et al., *Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1)-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase delta*. J Biol Chem, 2001. 276(52): p. 49258-66 Epub 2001 Oct 10.
389. Li, Y., Z.F. Pursell, and S. Linn, *Identification and cloning of two histone fold motif-containing subunits of HeLa DNA polymerase epsilon*. J Biol Chem, 2000. 275(30): p. 23247-52.
390. Nishikawa, N., et al., *E2F regulates growth-dependent transcription of genes encoding both catalytic and regulatory subunits of mouse primase*. Genes Cells, 2001. 6(1): p. 57-70.
391. Wang, Z., et al., *Pol kappa: A DNA polymerase required for sister chromatid cohesion*. Science, 2000. 289(5480): p. 774-9.
392. van Gent, D.C., J.H. Hoeijmakers, and R. Kanaar, *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. Nat Rev Genet, 2001. 2(3): p. 196-206.
393. DeFazio, L.G., et al., *Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase*. Embo J, 2002. 21(12): p. 3192-200.
394. Becker, M.A., et al., *Cloning of cDNAs for human phosphoribosylpyrophosphate synthetases 1 and 2 and X chromosome localization of PRPS1 and PRPS2 genes*. Genomics, 1990. 8(3): p. 555-61.
395. Wang, W., et al., *The human Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex stimulates flap endonuclease 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(48): p. 16762-7 Epub 2004 Nov 19.
396. Bartek, J., C. Lukas, and J. Lukas, *Checking on DNA damage in S phase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(10): p. 792-804.
397. Bao, S., et al., *ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses*. Nature, 2001. 411(6840): p. 969-74.
398. Post, S.M., A.E. Tomkinson, and E.Y. Lee, *The human checkpoint Rad protein Rad17 is chromatin-associated throughout the cell cycle, localizes to DNA replication sites, and interacts with DNA polymerase epsilon*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(19): p. 5568-75.
399. Dahm, K. and U. Hubscher, *Colocalization of human Rad17 and PCNA in late S phase of the cell cycle upon replication block*. Oncogene, 2002. 21(50): p. 7710-9.
400. Pati, D., N. Zhang, and S.E. Plon, *Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of Rad21*. Mol Cell Biol, 2002. 22(23): p. 8267-77.
401. Kovalenko, O.V., et al., *A novel nucleic acid-binding protein that interacts with human rad51 recombinase*. Nucleic Acids Res, 1997. 25(24): p. 4946-53.
402. Battistoni, A., et al., *Deregulated expression of the RanBP1 gene alters cell cycle progression in murine fibroblasts*. J Cell Sci, 1997. 110(Pt 19): p. 2345-57.
403. Villalonga, P., et al., *RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation*. Mol Cell Biol, 2004. 24(18): p. 7829-40.
404. Bae, S.H., et al., *RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes*. Nature, 2001. 412(6845): p. 456-61.
405. Wennerberg, K., et al., *Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP*. Curr Biol, 2003. 13(13): p. 1106-15.
406. Nobes, C.D., et al., *A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion*. J Cell Biol, 1998. 141(1): p. 187-97.
407. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1999. 13(7): p. 768-85.
408. Wang, H., et al., *Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxia telangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase*. Cancer Res, 2001. 61(23): p. 8554-63.
409. Dodson, G.E., Y. Shi, and R.S. Tibbetts, *DNA replication defects, spontaneous DNA damage, and ATM-dependent checkpoint activation in replication protein A-deficient cells*. J Biol Chem, 2004. 279(32): p. 34010-4 Epub 2004 Jun 14.
410. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. 300(5625): p. 1542-8.
411. Friedberg, E.C., *How nucleotide excision repair protects against cancer*. Nature Rev Cancer, 2001. 1(1): p. 22-33.
412. Irving, J.A. and A.G. Hall, *Mismatch repair defects as a cause of resistance to cytotoxic drugs*. Expert Rev Anticancer Ther, 2001. 1(1): p. 149-58.

413. Xue, L., et al., *Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits*. *Cancer Res*, 2003. 63(5): p. 980-6.
414. Lee, I.K., et al., *MAP, a protein interacting with a tumor suppressor, merlin, through the run domain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 325(3): p. 774-83.
415. Canela, N., et al., *The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity*. *J Biol Chem*, 2003. 278(2): p. 1158-64 Epub 2002 Oct 28.
416. Shav-Tal, Y. and D. Zipori, *PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins*. *FEBS Lett*, 2002. 531(2): p. 109-14.
417. Erez, A., et al., *Sil overexpression in lung cancer characterizes tumors with increased mitotic activity*. *Oncogene*, 2004. 23(31): p. 5371-7.
418. Carrano, A.C., et al., *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27*. *Nat Cell Biol*, 1999. 1(4): p. 193-9.
419. Zhao, X., S. McKillop-Smith, and B. Muller, *The human histone gene expression regulator HBP/SLBP is required for histone and DNA synthesis, cell cycle progression and cell proliferation in mitotic cells*. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 25): p. 6043-51 Epub 2004 Nov 16.
420. Schmiesing, J.A., et al., *A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of Xenopus XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(18): p. 6996-7006.
421. Sumara, I., et al., *Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase*. *J Cell Biol*, 2000. 151(4): p. 749-62.
422. Piekorz, R.P., et al., *The centrosomal protein TACC3 is essential for hematopoietic stem cell function and genetically interfaces with p53-regulated apoptosis*. *Embo J*, 2002. 21(4): p. 653-64.
423. Inamdar, K.V., et al., *Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1*. *J Biol Chem*, 2002. 277(30): p. 27162-8 Epub 2002 May 21.
424. Yoshida, Y., et al., *P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA*. *Cancer Res*, 2003. 63(13): p. 3729-34.
425. Yasui, K., et al., *Association of over-expressed TFDP1 with progression of hepatocellular carcinomas*. *J Hum Genet*, 2003. 48(12): p. 609-13 Epub 2003 Nov 15.
426. Takahashi, Y., et al., *Up-regulation of vitamin D3 up-regulated protein 1 gene in response to 5-fluorouracil in colon carcinoma SW620*. *Oncol Rep*, 2002. 9(1): p. 75-9.
427. He, Q., et al., *Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas*. *Int J Oncol*, 2004. 25(4): p. 945-53.
428. Yamane, K., J. Chen, and T.J. Kinsella, *Both DNA topoisomerase II-binding protein 1 and BRCA1 regulate the G2-M cell cycle checkpoint*. *Cancer Res*, 2003. 63(12): p. 3049-53.
429. Herold, S., et al., *Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1*. *Mol Cell*, 2002. 10(3): p. 509-21.
430. Matsumoto, S., et al., *Characterization of a MAPKK-like protein kinase TOPK*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 325(3): p. 997-1004.
431. Shevelev, I.V., K. Ramadan, and U. Hubscher, *The TREX2 3'-->5' exonuclease physically interacts with DNA polymerase delta and increases its accuracy*. *ScientificWorldJournal*, 2002. 2: p. 275-81.
432. Wei, J.H., et al., *TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on Thr68*. *J Biol Chem*, 2004. 23: p. 23.
433. Fisk, H.A., C.P. Mattison, and M. Winey, *Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(25): p. 14875-80.
434. Stearns, T., L. Evans, and M. Kirschner, *Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome*. *Cell*, 1991. 65(5): p. 825-36.
435. Kim, K.Y., et al., *Heat shock factor regulates VDUP1 gene expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(2): p. 369-75.
436. Han, S.H., et al., *VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression*. *Oncogene*, 2003. 22(26): p. 4035-46.
437. Wang, H., et al., *Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling*. *J Biol Chem*, 2004. 279(52): p. 54590-8 Epub 2004 Oct 13.
438. Pryor, A., et al., *Growth-regulated expression and G0-specific turnover of the mRNA that encodes URH49, a mammalian DExH/D box protein that is highly related to the mRNA export protein UAP56*. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(6): p. 1857-65 Print 2004.
439. Tetsuka, T., et al., *RNA helicase A interacts with nuclear factor kappaB p65 and functions as a transcriptional coactivator*. *Eur J Biochem*, 2004. 271(18): p. 3741-51.
440. Reichman, T.W., et al., *Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the NF90 family of double-stranded RNA-binding proteins*. *J Mol Biol*, 2003. 332(1): p. 85-98.
441. Aratani, S., et al., *Dual roles of RNA helicase A in CREB-dependent transcription*. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(14): p. 4460-9.
442. Marrone, A. and I. Dokal, *Dyskeratosis congenita: molecular insights into telomerase function, ageing and cancer*. *Expert Rev Mol Med*, 2004. 6(26): p. 1-23.
443. Mukherjee, D., et al., *The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements*. *Embo J*, 2002. 21(1-2): p. 165-74.
444. Jiang, T. and S. Altman, *A protein subunit of human RNase P, Rpp14, and its interacting partner, OIP2, have 3'-->5' exonuclease activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(8): p. 5295-300 Epub 2002 Apr 02.
445. Reed, R., *Coupling transcription, splicing and mRNA export*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(3): p. 326-31.

446. Pellizzoni, L., et al., *The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1*. *Curr Biol*, 2001. 11(14): p. 1079-88.
447. Meissner, M., et al., *Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins*. *Exp Cell Res*, 2003. 283(2): p. 184-95.
448. Uranishi, H., et al., *Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator*. *J Biol Chem*, 2001. 276(16): p. 13395-401 Epub 2001 Jan 24.
449. Yong, J., L. Wan, and G. Dreyfuss, *Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes?* *Trends Cell Biol*, 2004. 14(5): p. 226-32.
450. Patterson, R.J., W. Wang, and J.L. Wang, *Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus*. *Glycoconj J*, 2004. 19(7-9): p. 499-506.
451. Gouble, A., et al., *A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPd overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice*. *Cancer Res*, 2002. 62(5): p. 1489-95.
452. Laroia, G., et al., *Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway*. *Science*, 1999. 284(5413): p. 499-502.
453. Lapucci, A., et al., *AUF1 Is a bcl-2 A + U-rich element-binding protein involved in bcl-2 mRNA destabilization during apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. 277(18): p. 16139-46 Epub 2002 Feb 20.
454. Shchors, K., et al., *Cell death inhibiting RNA (CDIR) derived from a 3'-untranslated region binds AUF1 and heat shock protein 27*. *J Biol Chem*, 2002. 277(49): p. 47061-72 Epub 2002 Sep 27.
455. Salgado-Garrido, J., et al., *Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin*. *Embo J*, 1999. 18(12): p. 3451-62.
456. Verdone, L., et al., *Lsm proteins promote regeneration of pre-mRNA splicing activity*. *Curr Biol*, 2004. 14(16): p. 1487-91.
457. Le Hir, H., et al., *The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization*. *EMBO Rep*, 2001. 2(12): p. 1119-24 Epub 2001 Nov 21.
458. Nott, A., H. Le Hir, and M.J. Moore, *Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex*. *Genes Dev*, 2004. 18(2): p. 210-22.
459. Ho, T.H., et al., *Muscleblind proteins regulate alternative splicing*. *Embo J*, 2004. 23(15): p. 3103-12 Epub 2004 Jul 15.
460. Hayano, T., et al., *Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome*. *J Biol Chem*, 2003. 278(36): p. 34309-19 Epub 2003 May 30.
461. Rayala, H.J., et al., *The mRNA export factor human Gle1 interacts with the nuclear pore complex protein Nup155*. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3(2): p. 145-55 Epub 2003 Nov 25.
462. Herold, A., et al., *TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(23): p. 8996-9008.
463. Horowitz, D.S., R. Kobayashi, and A.R. Krainer, *A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs*. *Rna*, 1997. 3(12): p. 1374-87.
464. Wang, A., et al., *Identification and characterization of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome*. *Hum Mol Genet*, 1997. 6(12): p. 2117-26.
465. Dellaire, G., et al., *Mammalian PRP4 kinase copurifies and interacts with components of both the U5 snRNP and the N-CoR deacetylase complexes*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(14): p. 5141-56.
466. Wu, X., et al., *Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders*. *Cell Death Differ*, 2002. 9(9): p. 915-25.
467. Shinohara, T., D.P. Singh, and N. Fatma, *LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes*. *Prog Retin Eye Res*, 2002. 21(3): p. 341-58.
468. Ge, H., Y. Si, and R.G. Roeder, *Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation*. *Embo J*, 1998. 17(22): p. 6723-9.
469. Singh, D.P., et al., *Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 267(1): p. 373-81.
470. McCutcheon, I.E., et al., *Expression of the splicing regulator polypyrimidine tract-binding protein in normal and neoplastic brain*. *Neuro-oncol*, 2004. 6(1): p. 9-14.
471. Back, S.H., S. Shin, and S.K. Jang, *Polypyrimidine tract-binding proteins are cleaved by caspase-3 during apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. 277(30): p. 27200-9 Epub 2002 May 09.
472. Oesterreich, S., *Scaffold attachment factors SAFB1 and SAFB2: Innocent bystanders or critical players in breast tumorigenesis?* *J Cell Biochem*, 2003. 90(4): p. 653-61.
473. Andersen, F.F., et al., *The RNA splicing factor ASF/SF2 inhibits human topoisomerase I mediated DNA relaxation*. *J Mol Biol*, 2002. 322(4): p. 677-86.
474. Dauksaite, V. and G. Akusjarvi, *Human splicing factor ASF/SF2 encodes for a repressor domain required for its inhibitory activity on pre-mRNA splicing*. *J Biol Chem*, 2002. 277(15): p. 12579-86 Epub 2002 Jan 18.
475. Tacke, R., et al., *Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing*. *Cell*, 1998. 93(1): p. 139-48.
476. Nayler, O., et al., *SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements*. *Nucleic Acids Res*, 1998. 26(15): p. 3542-9.
477. Lou, H., et al., *Regulation of alternative polyadenylation by U1 snRNPs and SRp20*. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(9): p. 4977-85.
478. Huang, Y. and J.A. Steitz, *Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA*. *Mol Cell*, 2001. 7(4): p. 899-905.
479. Meister, G. and U. Fischer, *Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs*. *Embo J*, 2002. 21(21): p. 5853-63.
480. Pal, S., et al., *mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad*. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(21): p. 7475-87.

481. Malca, H., N. Shomron, and G. Ast, *The U1 snRNP base pairs with the 5' splice site within a penta-snRNP complex*. Mol Cell Biol, 2003. 23(10): p. 3442-55.
482. Nelissen, R.L., et al., *Structure, chromosomal localization and evolutionary conservation of the gene encoding human U1 snRNP-specific A protein*. Gene, 1991. 102(2): p. 189-96.
483. Rossoll, W., et al., *Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?* Hum Mol Genet, 2002. 11(1): p. 93-105.
484. Rondon, A.G., et al., *Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation*. J Biol Chem, 2003. 278(40): p. 39037-43 Epub 2003 Jul 18.
485. Strasser, K., et al., *TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export*. Nature, 2002. 417(6886): p. 304-8.
486. Kim, V.N., N. Kataoka, and G. Dreyfuss, *Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex*. Science, 2001. 293(5536): p. 1832-6.
487. Komuro, A., M. Saeki, and S. Kato, *Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine*. J Biol Chem, 1999. 274(51): p. 36513-9.
488. Zaks-Zilberman, M., et al., *Induction of adrenomedullin mRNA and protein by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine macrophages*. Infect Immun, 1998. 66(10): p. 4669-75.
489. Tokudome, T., et al., *Adrenomedullin inhibits doxorubicin-induced cultured rat cardiac myocyte apoptosis via a cAMP-dependent mechanism*. Endocrinology, 2002. 143(9): p. 3515-21.
490. Roussel, E., M.M. Belanger, and J. Couet, *G2/M blockade by paclitaxel induces caveolin-1 expression in A549 lung cancer cells: caveolin-1 as a marker of cytotoxicity*. Anticancer Drugs, 2004. 15(10): p. 961-7.
491. Belanger, M.M., E. Roussel, and J. Couet, *Up-regulation of caveolin expression by cytotoxic agents in drug-sensitive cancer cells*. Anticancer Drugs, 2003. 14(4): p. 281-7.
492. Cuttitta, F., et al., *Adrenomedullin functions as an important tumor survival factor in human carcinogenesis*. Microsc Res Tech, 2002. 57(2): p. 110-9.
493. Oehler, M.K., et al., *Tissue and plasma expression of the angiogenic peptide adrenomedullin in breast cancer*. Br J Cancer, 2003. 89(10): p. 1927-33.
494. Tomoda, Y., et al., *Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells*. Peptides, 2001. 22(11): p. 1783-94.
495. Monajemi, H., et al., *The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue*. Genomics, 2002. 79(4): p. 539-46.
496. Rocha, S., et al., *p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1*. Mol Cell Biol, 2003. 23(13): p. 4713-27.
497. Richard, M., et al., *Interleukin-9 regulates NF-kappaB activity through BCL3 gene induction*. Blood, 1999. 93(12): p. 4318-27.
498. Na, S.Y., et al., *Bcl3, an IkappaB protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation*. J Biol Chem, 1999. 274(40): p. 28491-6.
499. Murakami, T., et al., *The gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor alpha using DNA microarray analysis*. J Atheroscler Thromb, 2000. 7(1): p. 39-44.
500. Taylor, M.W., et al., *Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro*. J Interferon Cytokine Res, 2004. 24(2): p. 107-18.
501. Hardwick, J.C., et al., *Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon*. Gastroenterology, 2004. 126(1): p. 111-21.
502. Langenfeld, E.M., et al., *The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells*. Carcinogenesis, 2003. 24(9): p. 1445-54 Epub 2003 Jun 19.
503. Andrews, E., et al., *Comparative effects of cytokines and cytokine combinations on complement component C3 secretion by HepG2 cells*. Cytokine, 2003. 23(6): p. 164-9.
504. Andoh, A., et al., *Transforming growth factor-beta1 acts as a potent inhibitor of complement C3 biosynthesis in human pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2000. 20(2): p. 138-45.
505. Blom, A.M., B.O. Villoutreix, and B. Dahlback, *Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2004. 52(2): p. 83-95.
506. Phillips, D.J., et al., *TNF-alpha suppresses IL-1 alpha and IL-6 upregulation of C4b-binding protein in HepG-2 hepatoma cells*. Thromb Res, 1996. 81(3): p. 307-14.
507. Chawla-Sarkar, M., et al., *Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. Apoptosis, 2003. 8(3): p. 237-49.
508. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?* Nat Rev Cancer, 2004. 4(12): p. 966-77.
509. Volonte, D., et al., *Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts*. Mol Biol Cell, 2002. 13(7): p. 2502-17.
510. Lee, S.W., et al., *Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells*. Oncogene, 1998. 16(11): p. 1391-7.
511. Deregowski, V., et al., *Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2002. 64(5-6): p. 873-81.
512. Cho, K.A., et al., *Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status*. J Biol Chem, 2004. 279(40): p. 42270-8 Epub 2004 Jul 19.
513. Lee, H., et al., *Src-induced phosphorylation of caveolin-2 on tyrosine 19. Phospho-caveolin-2 (Tyr(P)19) is localized near focal adhesions, remains associated with lipid rafts/caveolae, but no longer forms a high molecular mass hetero-oligomer with caveolin-1*. J Biol Chem, 2002. 277(37): p. 34556-67 Epub 2002 Jun 28.

514. Sunaga, N., et al., *Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 2004. 64(12): p. 4277-85.
515. Ramesh, G. and W.B. Reeves, *TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity*. *J Clin Invest*, 2002. 110(6): p. 835-42.
516. Bien, S., et al., *Nuclear factor-kappaB mediates up-regulation of cathepsin B by doxorubicin in tumor cells*. *Mol Pharmacol*, 2004. 65(5): p. 1092-102.
517. Ettenberg, S.A., et al., *cbl-b inhibits EGF-receptor-induced apoptosis by enhancing ubiquitination and degradation of activated receptors*. *Mol Cell Biol Res Commun*, 1999. 2(2): p. 111-8.
518. Rao, N., I. Dodge, and H. Band, *The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system*. *J Leukoc Biol*, 2002. 71(5): p. 753-63.
519. Liu, Y.C., *Ubiquitin ligases and the immune response*. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 81-127.
520. Lu, R., P.A. Moore, and P.M. Pitha, *Stimulation of IRF-7 gene expression by tumor necrosis factor alpha: requirement for NFkappa B transcription factor and gene accessibility*. *J Biol Chem*, 2002. 277(19): p. 16592-8 Epub 2002 Feb 27.
521. Kim, M.O., et al., *Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta*. *J Neurochem*, 2004. 90(2): p. 297-308.
522. Mateo, V., et al., *Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization*. *Blood*, 2002. 100(8): p. 2882-90.
523. Howard, C.J., et al., *Co-stimulation and modulation of the ensuing immune response*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2002. 87(3-4): p. 123-30.
524. Yokota, H., M.B. Goldring, and H.B. Sun, *CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear*. *J Biol Chem*, 2003. 278(47): p. 47275-80 Epub 2003 Sep 5.
525. Freedman, S.J., et al., *Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by CITED2*. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(7): p. 504-12.
526. Suh, K.S., et al., *The organellar chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in response to cellular stress and accelerates apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. 279(6): p. 4632-41 Epub 2003 Nov 10.
527. Berryman, M.A. and J.R. Goldenring, *CLIC4 is enriched at cell-cell junctions and colocalizes with AKAP350 at the centrosome and midbody of cultured mammalian cells*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2003. 56(3): p. 159-72.
528. Fernandez-Salas, E., et al., *mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(11): p. 3610-20.
529. Fitzgerald, S.M., et al., *GM-CSF induction in human lung fibroblasts by IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage contact*. *J Interferon Cytokine Res*, 2003. 23(2): p. 57-65.
530. Ebner, K., et al., *GMCSF activates NF-kappaB via direct interaction of the GMCSF receptor with IkappaB kinase beta*. *Blood*, 2003. 102(1): p. 192-9 Epub 2003 Mar 13.
531. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): p. 39499-506 Epub 2002 Aug 15.
532. Guicciardi, M.E., et al., *Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c*. *J Clin Invest*, 2000. 106(9): p. 1127-37.
533. Fernandez, P.L., et al., *Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma*. *Int J Cancer*, 2001. 95(1): p. 51-5.
534. Moos, P.J. and F.A. Fitzpatrick, *Taxane-mediated gene induction is independent of microtubule stabilization: induction of transcription regulators and enzymes that modulate inflammation and apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(7): p. 3896-901.
535. Zaks-Zilberman, M., T.Z. Zaks, and S.N. Vogel, *Induction of proinflammatory and chemokine genes by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine and human breast cancer cell lines*. *Cytokine*, 2001. 15(3): p. 156-65.
536. Schwarz, G., et al., *Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma*. *J Invest Dermatol*, 2002. 119(1): p. 44-9.
537. Yamashita, K., et al., *Effect of hypoxia on the expression of fractalkine in human endothelial cells*. *Tohoku J Exp Med*, 2003. 200(4): p. 187-94.
538. Yoshikawa, M., et al., *TNF-alpha and IL-4 regulate expression of fractalkine (CX3CL1) as a membrane-anchored proadhesive protein and soluble chemotactic peptide on human fibroblasts*. *FEBS Lett*, 2004. 561(1-3): p. 105-10.
539. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. *Cell*, 1997. 91(4): p. 521-30.
540. Wang, D. and A. Richmond, *Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway*. *J Biol Chem*, 2001. 276(5): p. 3650-9 Epub 2000 Nov 2.
541. Warhurst, A.C., S.J. Hopkins, and G. Warhurst, *Interferon gamma induces differential upregulation of alpha and beta chemokine secretion in colonic epithelial cell lines*. *Gut*, 1998. 42(2): p. 208-13.
542. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. *J Exp Med*, 1995. 182(1): p. 155-62.
543. Rani, M.R., et al., *Requirement of phosphoinositide 3-kinase and Akt for interferon-beta-mediated induction of the beta-R1 (SCYB11) gene*. *J Biol Chem*, 2002. 277(41): p. 38456-61 Epub 2002 Aug 06.
544. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. 5(7): p. 730-7 Epub 2004 Jun 20.
545. Cui, X.F., et al., *Retinoic acid-inducible gene-1 is induced by interferon-gamma and regulates the expression of interferon-gamma stimulated gene 15 in MCF-7 cells*. *Biochem Cell Biol*, 2004. 82(3): p. 401-5.
546. Sakaki, H., et al., *Retinoic acid-inducible gene-1 is induced by interleukin-1beta in cultured human gingival fibroblasts*. *Oral Microbiol Immunol*, 2005. 20(1): p. 47-50.

547. Pflanz, S., et al., *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells*. *Immunity*, 2002. 16(6): p. 779-90.
548. van Seventer, J.M., T. Nagai, and G.A. van Seventer, *Interferon-beta differentially regulates expression of the IL-12 family members p35, p40, p19 and EBI3 in activated human dendritic cells*. *J Neuroimmunol*, 2002. 133(1-2): p. 60-71.
549. Li, S., et al., *Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites on translational repressor 4E-BP1 governs its proapoptotic potency*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(8): p. 2853-61.
550. Rolli-Derkinderen, M., et al., *ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1*. *J Biol Chem*, 2003. 278(21): p. 18859-67 Epub 2003 Mar 4.
551. Lekmine, F., et al., *Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons*. *J Biol Chem*, 2003. 278(30): p. 27772-80 Epub 2003 May 20.
552. Xu, G., et al., *Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer*. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 15): p. 3207-19.
553. Orlovsky, K., et al., *Gamma interferon down-regulates Fer and induces its association with inactive Stat3 in colon carcinoma cells*. *Oncogene*, 2002. 21(32): p. 4997-5001.
554. Grunberg, E., K. Eckert, and H.R. Maurer, *Docetaxel treatment of HT-29 colon carcinoma cells reinforces the adhesion and immunocytotoxicity of peripheral blood lymphocytes in vitro*. *Int J Oncol*, 1998. 12(4): p. 957-63.
555. Bergmann-Leitner, E.S. and S.I. Abrams, *Treatment of human colon carcinoma cell lines with anti-neoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 2001. 50(9): p. 445-55.
556. Lo, J. and R.A. Hurta, *Transforming growth factor beta1 selectively regulates ferritin gene expression in malignant H-ras-transformed fibrosarcoma cell lines*. *Biochem Cell Biol*, 2000. 78(4): p. 527-35.
557. Pham, C.G., et al., *Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species*. *Cell*, 2004. 119(4): p. 529-42.
558. Henderson, Y.C., M. Chou, and A.B. Deisseroth, *Interferon regulatory factor 1 induces the expression of the interferon-stimulated genes*. *Br J Haematol*, 1997. 96(3): p. 566-75.
559. Kroismayr, R., et al., *HERC5, a HECT E3 ubiquitin ligase tightly regulated in LPS activated endothelial cells*. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 20): p. 4749-56 Epub 2004 Aug 25.
560. Mitsui, K., et al., *A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 266(1): p. 115-22.
561. Johnson, D.R. and J.S. Pober, *HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons*. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(2): p. 1322-32.
562. Johnson, D.R., *Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression*. *J Immunol*, 2003. 170(4): p. 1894-902.
563. Liston, P., et al., *Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity*. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(2): p. 128-33.
564. Leaman, D.W., et al., *Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. 277(32): p. 28504-11 Epub 2002 May 23.
565. Gorgoulis, V.G., et al., *p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner*. *Embo J*, 2003. 22(7): p. 1567-78.
566. Maeda, K., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2002. 9(3): p. 511-4.
567. Subauste, M.C., D.C. Choi, and D. Proud, *Transient exposure of human bronchial epithelial cells to cytokines leads to persistent increased expression of ICAM-1*. *Inflammation*, 2001. 25(6): p. 373-80.
568. Finzel, A.H., et al., *ICAM-1 supports adhesion of human small-cell lung carcinoma to endothelial cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2004. 21(3): p. 185-9.
569. Roche, Y., et al., *Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway*. *Thromb Haemost*, 2003. 89(6): p. 1089-97.
570. Suomela, S., et al., *Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) is upregulated in psoriatic skin and certain epithelial cancers*. *J Invest Dermatol*, 2004. 122(3): p. 717-21.
571. Kang, D.C., et al., *Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene*. *Oncogene*, 2004. 23(9): p. 1789-800.
572. Wathélet, M.G., et al., *The IFI-56K and IFI-54K interferon-inducible human genes belong to the same gene family*. *FEBS Lett*, 1988. 231(1): p. 164-71.
573. de Veer, M.J., et al., *IFI60/ISG60/IFIT4, a new member of the human IFI54/IFIT2 family of interferon-stimulated genes*. *Genomics*, 1998. 54(2): p. 267-77.
574. Niikura, T., R. Hirata, and S.C. Weil, *A novel interferon-inducible gene expressed during myeloid differentiation*. *Blood Cells Mol Dis*, 1997. 23(3): p. 337-49.
575. Kita, K., et al., *Involvement of LEU13 in interferon-induced refractoriness of human RSa cells to cell killing by X rays*. *Radiat Res*, 2003. 160(3): p. 302-8.
576. Brem, R., et al., *Inhibition of proliferation by 1-8U in interferon-alpha-responsive and non-responsive cell lines*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(6): p. 1235-48.
577. Huang, Y., et al., *Nuclear factor-kappaB/IkappaB signaling pathway may contribute to the mediation of paclitaxel-induced apoptosis in solid tumor cells*. *Cancer Res*, 2000. 60(16): p. 4426-32.
578. Yamamoto, Y. and R.B. Gaynor, *IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway*. *Trends Biochem Sci*, 2004. 29(2): p. 72-9.
579. Lee, L.F., et al., *Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK)*. *J Biol Chem*, 1998. 273(43): p. 28253-60.

580. Shibakura, M., et al., *Induction of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by doxorubicin in human small cell lung carcinoma cells*. *Int J Cancer*, 2003. 103(3): p. 380-6.
581. Niiya, M., et al., *Induction of TNF-alpha, uPA, IL-8 and MCP-1 by doxorubicin in human lung carcinoma cells*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003. 52(5): p. 391-8 Epub 2003 Aug 08.
582. Muhl, H., et al., *Expression and release of chemokines associated with apoptotic cell death in human promonocytic U937 cells and peripheral blood mononuclear cells*. *Eur J Immunol*, 1999. 29(10): p. 3225-35.
583. Lee, L.F., et al., *Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter*. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(9): p. 5097-105.
584. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. *Chest*, 2000. 117(4): p. 1162-72.
585. Stoeck, M., W. Kromer, and V. Gekeler, *Induction of IL-15 mRNA and protein in A549 cells by pro-inflammatory cytokines*. *Immunobiology*, 1998. 199(1): p. 14-22.
586. Schaub, F.J., et al., *Fas and Fas-associated death domain protein regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression by human smooth muscle cells through caspase- and calpain-dependent release of interleukin-1alpha*. *Circ Res*, 2003. 93(6): p. 515-22 Epub 2003 Aug 28.
587. White, C.M., et al., *Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 1998. 46(2): p. 104-12.
588. Baek, S.H., et al., *Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein*. *Cell*, 2002. 110(1): p. 55-67.
589. Yamanaka, N., et al., *Interleukin 1beta enhances invasive ability of gastric carcinoma through nuclear factor-kappaB activation*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(5): p. 1853-9.
590. Kline, J.N., et al., *Regulation of interleukin-1 receptor antagonist by Th1 and Th2 cytokines*. *Am J Physiol*, 1995. 269(1 Pt 1): p. L92-8.
591. Al-Rawi, M.A., R.E. Mansel, and W.G. Jiang, *Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 receptor (IL-7R) signalling complex in human solid tumours*. *Histol Histopathol*, 2003. 18(3): p. 911-23.
592. Verhagen, A.M., et al., *TNF and CD95 promote IL-8 gene transactivation via independent elements in colon carcinoma cells*. *Cytokine*, 2001. 15(2): p. 108-12.
593. Andrews, H.N., et al., *BRCA1 regulates the interferon gamma-mediated apoptotic response*. *J Biol Chem*, 2002. 277(29): p. 26225-32 Epub 2002 May 13.
594. Domic, J., G. Lauc, and M. Fogel, *Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB*. *Cell Physiol Biochem*, 2000. 10(3): p. 149-58.
595. Espert, L., et al., *The exonuclease ISG20 is directly induced by synthetic dsRNA via NF-kappaB and IRF1 activation*. *Oncogene*, 2004. 23(26): p. 4636-40.
596. Bonnekoh, B., et al., *Up-regulation of keratin 17 expression in human HaCaT keratinocytes by interferon-gamma*. *J Invest Dermatol*, 1995. 104(1): p. 58-61.
597. Craven, R.A., et al., *Identification of proteins regulated by interferon-alpha in resistant and sensitive malignant melanoma cell lines*. *Proteomics*, 2004. 4(12): p. 3998-4009.
598. Hattori, A. and M. Tsujimoto, *Processing of antigenic peptides by aminopeptidases*. *Biol Pharm Bull*, 2004. 27(6): p. 777-80.
599. Califice, S., et al., *Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3*. *Oncogene*, 2004. 23(45): p. 7527-36.
600. Lin, H.M., et al., *Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells*. *Oncogene*, 2002. 21(52): p. 8001-10.
601. Califice, S., V. Castronovo, and F. Van Den Brule, *Galectin-3 and cancer (Review)*. *Int J Oncol*, 2004. 25(4): p. 983-92.
602. Shimura, T., et al., *Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin*. *Cancer Res*, 2004. 64(18): p. 6363-7.
603. Marchetti, A., et al., *Expression of 90K (Mac-2 BP) correlates with distant metastasis and predicts survival in stage I non-small cell lung cancer patients*. *Cancer Res*, 2002. 62(9): p. 2535-9.
604. Grassadonia, A., et al., *The 90K protein increases major histocompatibility complex class I expression and is regulated by hormones, gamma-interferon, and double-strand polynucleotides*. *Endocrinology*, 2004. 145(10): p. 4728-36 Epub 2004 Jul 1.
605. Grassadonia, A., et al., *90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis*. *Glycoconj J*, 2004. 19(7-9): p. 551-6.
606. Wang, X., et al., *A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met*. *Mol Cell*, 2002. 9(2): p. 411-21.
607. Bowers, D.C., et al., *Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathways*. *Cancer Res*, 2000. 60(15): p. 4277-83.
608. Zhang, X. and Y. Liu, *Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 284(6): p. F1216-25 Epub 2003 Feb 04.
609. Mibayashi, M., K. Nakad, and K. Nagata, *Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection*. *Microbiol Immunol*, 2002. 46(1): p. 29-36.
610. Honda, K., et al., *Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(43): p. 15416-21 Epub 2004 Oct 18.
611. Tamai, R., et al., *Human gingival CD14(+) fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression*. *Infect Immun*, 2002. 70(3): p. 1272-8.
612. Na, K.Y., et al., *Silencing of TonEBP/NFAT5 transcriptional activator by RNA interference*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(2): p. 283-8.



613. Horsley, V. and G.K. Pavlath, *NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation*. J Cell Biol, 2002. 156(5): p. 771-4 Epub 2002 Mar 04.
614. Lopez-Rodriguez, C., et al., *Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress*. Immunity, 2001. 15(1): p. 47-58.
615. Takahashi, T., et al., *Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors*. Cell, 1999. 99(1): p. 59-69.
616. Klagsbrun, M., S. Takashima, and R. Mamluk, *The role of neuropilin in vascular and tumor biology*. Adv Exp Med Biol, 2002. 515: p. 33-48.
617. Parikh, A.A., et al., *Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis*. Am J Pathol, 2004. 164(6): p. 2139-51.
618. Stephenson, J.M., et al., *Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer*. Int J Cancer, 2002. 101(5): p. 409-14.
619. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. Nat Cell Biol, 2003. 5(9): p. 834-9 Epub 2003 Aug 24.
620. Sledz, C.A. and B.R. Williams, *RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt 6): p. 952-6.
621. Hovanessian, A.G., et al., *Identification of 69-kd and 100-kd forms of 2-5A synthetase in interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies*. Embo J, 1987. 6(5): p. 1273-80.
622. Hartmann, R., et al., *p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family*. Nucleic Acids Res, 1998. 26(18): p. 4121-8.
623. Spence, M.J., et al., *Oncostatin M induces tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in Calu-1 lung carcinoma cells*. Cytokine, 2002. 18(1): p. 26-34.
624. Merchiers, P., et al., *Involvement of Sp1 in basal and retinoic acid induced transcription of the human tissue-type plasminogen activator gene*. FEBS Lett, 1999. 456(1): p. 149-54.
625. Chan, C.F., et al., *Evaluation of nuclear factor-kappaB, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. 10(12 Pt 1): p. 4140-9.
626. Kobayashi, H., et al., *Genetic down-regulation of phosphoinositide 3-kinase by bikunin correlates with suppression of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells*. J Biol Chem, 2004. 279(8): p. 6371-9 Epub 2003 Nov 03.
627. Dunn, S.E., et al., *Up-regulation of urokinase-type plasminogen activator by insulin-like growth factor-I depends upon phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase kinase*. Cancer Res, 2001. 61(4): p. 1367-74.
628. Kasza, A., et al., *Epidermal growth factor and pro-inflammatory cytokines regulate the expression of plasminogen activation system in U373-MG astrocytoma cells*. Cytokine, 2001. 16(5): p. 187-90.
629. Rao, J.S., *Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(7): p. 489-501.
630. Hollander, M.C., et al., *Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors*. Int J Cancer, 2001. 96(1): p. 22-31.
631. Wu, S., G.A. Murrell, and Y. Wang, *Interferon-alpha (Intron A) upregulates urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression*. Cancer Immunol Immunother, 2002. 51(5): p. 248-54 Epub 2002 Apr 09.
632. Kjoller, L., *The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility*. Biol Chem, 2002. 383(1): p. 5-19.
633. Hensen, A., et al., *Comparative evaluation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression in primary breast carcinomas and on metastatic tumor cells*. Int J Cancer, 2003. 107(6): p. 903-9.
634. Dong, B., et al., *Phospholipid scramblase 1 potentiates the antiviral activity of interferon*. J Virol, 2004. 78(17): p. 8983-93.
635. Zhao, K.W., et al., *Protein kinase Cdelta mediates retinoic acid and phorbol myristate acetate-induced phospholipid scramblase 1 gene expression: its role in leukemic cell differentiation*. Blood, 2004. 104(12): p. 3731-8 Epub 2004 Aug 12.
636. Blais, J.D., et al., *Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress*. Mol Cell Biol, 2004. 24(17): p. 7469-82.
637. Hung, W.J., et al., *Human BAG-1 proteins bind to the cellular stress response protein GADD34 and interfere with GADD34 functions*. Mol Cell Biol, 2003. 23(10): p. 3477-86.
638. Cabrera, C.M., et al., *Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are disorganized in colorectal tumors with total loss of major histocompatibility complex class I expression and LMP7 downregulation*. Tissue Antigens, 2004. 63(5): p. 446-52.
639. Matsui, M., et al., *Downregulation of the proteasome subunits, transporter, and antigen presentation in hepatocellular carcinoma, and their restoration by interferon-gamma*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. 17(8): p. 897-907.
640. Hallermalm, K., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface*. Blood, 2001. 98(4): p. 1108-15.
641. Miyagi, T., et al., *Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. 18(1): p. 32-40.
642. Sinicrope, F.A. and S. Gill, *Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2004. 23(1-2): p. 63-75.
643. Han, S., et al., *Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression*. Int J Cancer, 2004. 111(3): p. 322-31.
644. Tong, X., L. Yin, and C. Giardina, *Butyrate suppresses Cox-2 activation in colon cancer cells through HDAC inhibition*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 317(2): p. 463-71.
645. Zeng, Q., L.K. McCauley, and C.Y. Wang, *Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein 1-dependent cyclooxygenase-2. Implication in head and neck squamous cell carcinoma progression*. J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 50137-42 Epub 2002 Oct 18.
646. Benoit, V., et al., *Regulation of HER-2 oncogene expression by cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2*. Oncogene, 2004. 23(8): p. 1631-5.



647. Liu, W., et al., *Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways*. *Cancer Res*, 2003. 63(13): p. 3632-6.
648. Burczynski, M.E., et al., *Toxicogenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells*. *Toxicol Sci*, 2000. 58(2): p. 399-415.
649. Tracey, L., et al., *Transcriptional response of T cells to IFN-alpha: changes induced in IFN-alpha-sensitive and resistant cutaneous T cell lymphoma*. *J Interferon Cytokine Res*, 2004. 24(3): p. 185-95.
650. Chin, K.C. and P. Cresswell, *Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 15125-30.
651. Xu, K. and C.L. Geczy, *IFN-gamma and TNF regulate macrophage expression of the chemotactic S100 protein S100A8*. *J Immunol*, 2000. 164(9): p. 4916-23.
652. Xu, K., T. Yen, and C.L. Geczy, *IL-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8*. *J Immunol*, 2001. 166(10): p. 6358-66.
653. Thorn, C.F., Z.Y. Lu, and A.S. Whitehead, *Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines*. *Scand J Immunol*, 2004. 59(2): p. 152-8.
654. Li, N., W. Zhang, and X. Cao, *Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells*. *Immunol Lett*, 2000. 74(3): p. 221-4.
655. Manzano, R.G., et al., *CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential*. *Oncogene*, 2002. 21(28): p. 4435-47.
656. Dear, A.E., et al., *Molecular mechanisms governing tumor-necrosis-factor-mediated regulation of plasminogen-activator inhibitor type-2 gene expression*. *Eur J Biochem*, 1996. 241(1): p. 93-100.
657. Buchholz, M., et al., *SERPINE2 (protease nexin 1) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo*. *Cancer Res*, 2003. 63(16): p. 4945-51.
658. Rossignol, P., et al., *Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells*. *J Biol Chem*, 2004. 279(11): p. 10346-56 Epub 2003 Dec 29.
659. Sutherland, K.D., et al., *Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas*. *Oncogene*, 2004. 23(46): p. 7726-33.
660. Larsen, L. and C. Ropke, *Suppressors of cytokine signalling: SOCS*. *Apmis*, 2002. 110(12): p. 833-44.
661. Mantymaa, P., et al., *Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide*. *Br J Haematol*, 2000. 108(3): p. 574-81.
662. Suresh, A., et al., *Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment*. *Br J Haematol*, 2003. 120(3): p. 457-63.
663. Karpf, A.R., et al., *Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(24): p. 14007-12.
664. Dhar, S.K., et al., *Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene*. *J Biol Chem*, 2004. 279(27): p. 28209-19 Epub 2004 Apr 15.
665. Weydert, C., et al., *Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase*. *Mol Cancer Ther*, 2003. 2(4): p. 361-9.
666. Delhalle, S., et al., *NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2002. 21(24): p. 3917-24.
667. Tsanou, E., et al., *Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma*. *Histol Histopathol*, 2004. 19(3): p. 807-13.
668. Wasyluk, C., et al., *Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(8): p. 2687-702.
669. Pelicano, L., et al., *Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: evidence for multiple mechanisms of action*. *Oncogene*, 1997. 15(19): p. 2349-59.
670. Yordy, J.S., et al., *SP100 expression modulates ETS1 transcriptional activity and inhibits cell invasion*. *Oncogene*, 2004. 23(39): p. 6654-65.
671. Nicewonger, J., et al., *Epstein-Barr virus (EBV) SM protein induces and recruits cellular Sp110b to stabilize mRNAs and enhance EBV lytic gene expression*. *J Virol*, 2004. 78(17): p. 9412-22.
672. Wong, L.H., et al., *Isolation and characterization of a human STAT1 gene regulatory element. Inducibility by interferon (IFN) types I and II and role of IFN regulatory factor-1*. *J Biol Chem*, 2002. 277(22): p. 19408-17 Epub 2002 Mar 21.
673. Ouchi, T., et al., *Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(10): p. 5208-13.
674. Townsend, P.A., et al., *STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. 279(7): p. 5811-20 Epub 2003 Nov 05.
675. Burke, W.M., et al., *Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells*. *Oncogene*, 2001. 20(55): p. 7925-34.
676. Pfeffer, L.M., et al., *STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor*. *Science*, 1997. 276(5317): p. 1418-20.
677. Wang, T., et al., *Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells*. *Nat Med*, 2004. 10(1): p. 48-54 Epub 2003 Dec 21.
678. Nguyen, K.B., et al., *Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection*. *Science*, 2002. 297(5589): p. 2063-6.
679. Lund, R.J., et al., *Early target genes of IL-12 and STAT4 signaling in th cells*. *J Immunol*, 2004. 172(11): p. 6775-82.
680. Ryan, K.A., et al., *Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression*. *Infect Immun*, 2004. 72(4): p. 2123-30.

681. Abreu, M.T., et al., *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. 277(23): p. 20431-7 Epub 2002 Mar 28.
682. Heyninck, K. and R. Beyaert, *The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-kappaB activation at the level of TRAF6*. FEBS Lett, 1999. 442(2-3): p. 147-50.
683. Kumar-Sinha, C., et al., *Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. 277(1): p. 575-85 Epub 2001 Oct 24.
684. Wang, Q., et al., *Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells*. J Biol Chem, 2002. 277(39): p. 36602-10 Epub 2002 Jul 24.
685. Modur, V., et al., *FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer*. J Biol Chem, 2002. 277(49): p. 47928-37 Epub 2002 Sep 25.
686. Wurzer, W.J., et al., *NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation*. J Biol Chem, 2004. 279(30): p. 30931-7 Epub 2004 May 12.
687. Gazit, G., J. Lu, and A.S. Lee, *De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines*. Breast Cancer Res Treat, 1999. 54(2): p. 135-46.
688. Paris, S., et al., *Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia*. FEBS Lett, 2005. 579(1): p. 105-14.
689. Rivoltini, L., et al., *Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells*. J Immunol, 2003. 171(7): p. 3467-74.
690. Schild, H. and H.G. Rammensee, *gp96--the immune system's Swiss army knife*. Nat Immunol, 2000. 1(2): p. 100-1.
691. Wang, X., et al., *Regulation of phorbol ester-mediated TRAF1 induction in human colon cancer cells through a PKC/RAF/ERK/NF-kappaB-dependent pathway*. Oncogene, 2004. 23(10): p. 1885-95.
692. Pryhuber, G.S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced lung cell expression of antiapoptotic genes TRAF1 and cIAP2*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. 22(2): p. 150-6.
693. Obad, S., et al., *Staf50 is a novel p53 target gene conferring reduced clonogenic growth of leukemic U-937 cells*. Oncogene, 2004. 23(23): p. 4050-9.
694. Kassel, O., et al., *A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-kappaB-regulated promoters*. Genes Dev, 2004. 18(20): p. 2518-28.
695. Li, L., et al., *TRIP6 is a RIP2-associated common signaling component of multiple NF-kappaB activation pathways*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 3): p. 555-63 Epub 2005 Jan 18.
696. Hata, K., et al., *Evaluation of the antiangiogenic effect of Taxol in a human epithelial ovarian carcinoma cell line*. Cancer Chemother Pharmacol, 2004. 53(1): p. 68-74 Epub 2003 Oct 21.
697. Lennernas, B., et al., *Chemotherapy and antiangiogenesis--drug-specific, dose-related effects*. Acta Oncol, 2003. 42(4): p. 294-303.
698. Mittelstadt, P.R. and J.D. Ashwell, *Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ*. J Biol Chem, 2001. 276(31): p. 29603-10 Epub 2001 Jun 07.
699. Ayroldi, E., et al., *Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1*. Mol Cell Biol, 2002. 22(22): p. 7929-41.
700. Asselin-Labat, M.L., et al., *GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis*. Blood, 2004. 104(1): p. 215-23 Epub 2004 Mar 18.
701. Nyman, T.A., et al., *Proteome analysis reveals ubiquitin-conjugating enzymes to be a new family of interferon-alpha-regulated genes*. Eur J Biochem, 2000. 267(13): p. 4011-9.
702. Sutherland, C.L., et al., *UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells*. J Immunol, 2002. 168(2): p. 671-9.
703. Eleme, K., et al., *Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D*. J Exp Med, 2004. 199(7): p. 1005-10 Epub 2004 Mar 29.
704. Miyashita, H., et al., *Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma*. Cancer, 2002. 94(11): p. 2959-66.
705. Watanabe, S. and T. Uchida, *Cloning and expression of human uridine phosphorylase*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. 216(1): p. 265-72.
706. Li, X.L., et al., *RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response*. J Biol Chem, 2000. 275(12): p. 8880-8.
707. Rosewicz, S., et al., *Interferon-alpha: regulatory effects on cell cycle and angiogenesis*. Neuroendocrinology, 2004. 80(Suppl 1): p. 85-93.
708. Kawai, H., et al., *Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells*. Oncogene, 2002. 21(50): p. 7730-9.
709. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition*. Trends Pharmacol Sci, 2001. 22(4): p. 201-7.
710. Iwakoshi, N.N., A.H. Lee, and L.H. Glimcher, *The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response*. Immunol Rev, 2003. 194: p. 29-38.
711. Fujimoto, T., et al., *Upregulation and overexpression of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) gene in primary breast cancers*. Breast Cancer, 2003. 10(4): p. 301-6.
712. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. 23(21): p. 7448-59.
713. Ewalt, K.L. and P. Schimmel, *Activation of angiogenic signaling pathways by two human tRNA synthetases*. Biochemistry, 2002. 41(45): p. 13344-9.

714. Wakasugi, K. and P. Schimmel, *Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase*. Science, 1999. 284(5411): p. 147-51.
715. Wakatsuki, S., T. Kurisaki, and A. Sehara-Fujisawa, *Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19*. J Neurochem, 2004. 89(1): p. 119-23.
716. Kuno, K., et al., *The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 319(4): p. 1327-33.
717. Iruela-Arispe, M.L., D. Carpizo, and A. Luque, *ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 995: p. 183-90.
718. Tao, J., H.Y. Wang, and C.C. Malbon, *Protein kinase A regulates AKAP250 (gravin) scaffold binding to the beta2-adrenergic receptor*. Embo J, 2003. 22(24): p. 6419-29.
719. Gelman, I.H., *The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development*. Front Biosci, 2002. 7: p. d1782-97.
720. van Kempen, L.C., et al., *Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis*. J Invest Dermatol, 2004. 122(5): p. 1293-301.
721. Bowen, M.A., et al., *Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand*. J Exp Med, 1995. 181(6): p. 2213-20.
722. Kristiansen, G., et al., *CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients*. Br J Cancer, 2003. 88(2): p. 231-6.
723. Senner, V., et al., *CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. 58(8): p. 795-802.
724. Scheurer, S.B., et al., *Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study*. Proteomics, 2004. 4(6): p. 1737-60.
725. Johnson, E., et al., *R-cadherin influences cell motility via Rho family GTPases*. J Biol Chem, 2004. 279(30): p. 31041-9 Epub 2004 May 13.
726. Miotto, E., et al., *Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer*. Cancer Res, 2004. 64(22): p. 8156-9.
727. Miwa, N., et al., *Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers*. Oncol Res, 2000. 12(11-12): p. 469-76.
728. Hoevel, T., et al., *Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids*. Int J Cancer, 2004. 108(3): p. 374-83.
729. Tong, X., et al., *Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway*. Oncogene, 2004. 23(28): p. 4847-55.
730. Lin, M.T., et al., *Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation*. J Biol Chem, 2004. 279(23): p. 24015-23 Epub 2004 Mar 24.
731. Tsai, M.S., et al., *Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression*. Oncogene, 2002. 21(53): p. 8178-85.
732. Grzeszkiewicz, T.M., et al., *CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through Integrin alpha vbeta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha vbeta 3, independent of its carboxyl-terminal domain*. J Biol Chem, 2001. 276(24): p. 21943-50.
733. Tong, X., et al., *Cyr61, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non-small cell lung cancer*. J Biol Chem, 2001. 276(50): p. 47709-14.
734. Tsuji, T., et al., *A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 268(1): p. 20-4.
735. Hoang, B.H., et al., *Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway*. Cancer Res, 2004. 64(8): p. 2734-9.
736. Ermak, G., et al., *DSCR1(Adapt78) modulates expression of SOD1*. Faseb J, 2004. 18(1): p. 62-9.
737. Hara, E., et al., *Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts*. J Biol Chem, 1994. 269(3): p. 2139-45.
738. Wang, L., et al., *Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors*. Cancer Lett, 2003. 200(1): p. 57-67.
739. Kenny, P.A., T. Enver, and A. Ashworth, *Receptor and secreted targets of Wnt-1/beta-catenin signalling in mouse mammary epithelial cells*. BMC Cancer, 2005. 5(1): p. 3.
740. Wadehra, M., et al., *The tetraspan protein epithelial membrane protein-2 interacts with beta1 integrins and regulates adhesion*. J Biol Chem, 2002. 277(43): p. 41094-100 Epub 2002 Aug 19.
741. Wadehra, M., L. Goodglick, and J. Braun, *The tetraspan protein EMP2 modulates the surface expression of caveolins and glycosylphosphatidyl inositol-linked proteins*. Mol Biol Cell, 2004. 15(5): p. 2073-83 Epub 2004 Feb 20.
742. Udayakumar, T.S., R.B. Nagle, and G.T. Bowden, *Fibroblast growth factor-1 transcriptionally induces membrane type-1 matrix metalloproteinase expression in prostate carcinoma cell line*. Prostate, 2004. 58(1): p. 66-75.
743. Udayakumar, T.S., et al., *Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and STAT3*. Neoplasia, 2002. 4(1): p. 60-7.
744. El-Hariry, I., M. Pignatelli, and N.R. Lemoine, *FGF-1 and FGF-2 regulate the expression of E-cadherin and catenins in pancreatic adenocarcinoma*. Int J Cancer, 2001. 94(5): p. 652-61.
745. El-Hariry, I., M. Pignatelli, and N.R. Lemoine, *FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines*. Br J Cancer, 2001. 84(12): p. 1656-63.
746. Bagala, C., et al., *The alternative translation of synaptotagmin 1 mediates the non-classical release of FGF1*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 310(4): p. 1041-7.
747. von Wichert, G., et al., *RPTP-alpha acts as a transducer of mechanical force on alphav/beta3-integrin-cytoskeleton linkages*. J Cell Biol, 2003. 161(1): p. 143-53 Epub 2003 Apr 07.
748. Perez, O.D., et al., *Activation of the PKB/AKT pathway by ICAM-2*. Immunity, 2002. 16(1): p. 51-65.

749. Firth, S.M. and R.C. Baxter, *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins*. *Endocr Rev*, 2002. 23(6): p. 824-54.
750. Holly, J., *Physiology of the IGF system*. Novartis Found Symp, 2004. 262: p. 19-26; discussion 26-35, 265-8.
751. Kumar, A.S., et al., *ILKAP regulates ILK signaling and inhibits anchorage-independent growth*. *Oncogene*, 2004. 23(19): p. 3454-61.
752. Aishima, S., et al., *Aberrant expression of laminin gamma 2 chain and its prognostic significance in intrahepatic cholangiocarcinoma according to growth morphology*. *Mod Pathol*, 2004. 17(8): p. 938-45.
753. Hlubek, F., et al., *Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas*. *Int J Cancer*, 2004. 108(2): p. 321-6.
754. Levy, Y., et al., *Sustained induction of ERK, protein kinase B, and p70 S6 kinase regulates cell spreading and formation of F-actin microspikes upon ligation of integrins by galectin-8, a mammalian lectin*. *J Biol Chem*, 2003. 278(16): p. 14533-42 Epub 2003 Feb 04.
755. Zick, Y., et al., *Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth*. *Glycoconj J*, 2004. 19(7-9): p. 517-26.
756. Gupta, A., et al., *Leupaxin is a critical adaptor protein in the adhesion zone of the osteoclast*. *J Bone Miner Res*, 2003. 18(4): p. 669-85.
757. Wu, G.J., et al., *Isolation and characterization of the major form of human MUC18 cDNA gene and correlation of MUC18 over-expression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression*. *Gene*, 2001. 279(1): p. 17-31.
758. Kristiansen, G., et al., *Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer*. *Anal Cell Pathol*, 2003. 25(2): p. 77-81.
759. Conacci-Sorrell, M.E., et al., *Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2002. 16(16): p. 2058-72.
760. Hossain, G.S., et al., *TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia*. *J Biol Chem*, 2003. 278(32): p. 30317-27 Epub 2003 May 08.
761. Setzer, S.V., et al., *Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration*. *J Invest Dermatol*, 2004. 123(3): p. 426-33.
762. Hatzfeld, M., K.J. Green, and H. Sauter, *Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains*. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 7): p. 1219-33.
763. Wang, X.Y., E. Repasky, and H.T. Liu, *Antisense inhibition of protein kinase C $\alpha$  reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells*. *Exp Cell Res*, 1999. 250(1): p. 253-63.
764. Orlandi, L., et al., *Ribozyme-mediated inhibition of PKC $\alpha$  sensitizes androgen-independent human prostate cancer cells to cisplatin-induced apoptosis*. *Prostate*, 2003. 54(2): p. 133-43.
765. Tanaka, Y., et al., *Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway*. *J Biol Chem*, 2003. 278(36): p. 33753-62 Epub 2003 Jun 24.
766. Hastings, R.H., et al., *Parathyroid hormone-related protein regulates apoptosis in lung cancer cells through protein kinase A*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 287(6): p. C1616-22 Epub 2004 Jul 28.
767. Shen, X. and M. Falzon, *PTH-related protein modulates PC-3 prostate cancer cell adhesion and integrin subunit profile*. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. 199(1-2): p. 165-77.
768. Mooney, R.A. and C.M. LeVea, *The leukocyte common antigen-related protein LAR: candidate PTP for inhibitory targeting*. *Curr Top Med Chem*, 2003. 3(7): p. 809-19.
769. Gasman, S., Y. Kalaidzidis, and M. Zerial, *RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase*. *Nat Cell Biol*, 2003. 5(3): p. 195-204.
770. Burbach, B.J., Y. Ji, and A.C. Rapraeger, *Syndecan-1 ectodomain regulates matrix-dependent signaling in human breast carcinoma cells*. *Exp Cell Res*, 2004. 300(1): p. 234-47.
771. Beauvais, D.M., B.J. Burbach, and A.C. Rapraeger, *The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells*. *J Cell Biol*, 2004. 167(1): p. 171-81.
772. Leivonen, M., et al., *Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer*. *Oncology*, 2004. 67(1): p. 11-8.
773. Pellegrini, M., S. Pacini, and C.T. Baldari, *p66SHC: the apoptotic side of Shc proteins*. *Apoptosis*, 2005. 10(1): p. 13-8.
774. Mauro, L., et al., *SHC-alpha5beta1 integrin interactions regulate breast cancer cell adhesion and motility*. *Exp Cell Res*, 1999. 252(2): p. 439-48.
775. Okuno, S., et al., *Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines*. *Br J Cancer*, 2003. 88(6): p. 951-6.
776. Mastroberardino, L., et al., *Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family*. *Nature*, 1998. 395(6699): p. 288-91.
777. Asada, M., et al., *Afadin- and alpha-actinin-binding protein ADIP directly binds beta-COP, a subunit of the coatamer complex*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 321(2): p. 350-4.
778. Asada, M., et al., *ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions*. *J Biol Chem*, 2003. 278(6): p. 4103-11 Epub 2002 Nov 21.
779. Chand, H.S., et al., *The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice*. *Blood*, 2004. 103(3): p. 1069-77 Epub 2003 Oct 2.
780. Konduri, S.D., et al., *Physiological and chemical inducers of tissue factor pathway inhibitor-2 in human glioma cells*. *Int J Oncol*, 2003. 22(6): p. 1277-83.
781. Kast, C., M. Wang, and M. Whiteway, *The ERK/MAPK pathway regulates the activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 promoter*. *J Biol Chem*, 2003. 278(9): p. 6787-94 Epub 2002 Nov 24.
782. Huang, H.C., et al., *Thrombomodulin-mediated cell adhesion: involvement of its lectin-like domain*. *J Biol Chem*, 2003. 278(47): p. 46750-9 Epub 2003 Sep 1.

783. Luo, S., et al., *Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements*. J Biol Chem, 2003. 278(39): p. 37375-85 Epub 2003 Jul 18.
784. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways*. J Biol Chem, 2004. 279(14): p. 13792-9 Epub 2004 Jan 23.
785. Kurisu, J., et al., *MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress*. Genes Cells, 2003. 8(2): p. 189-202.
786. Prols, F., et al., *Upregulation of the cochaperone Mdg1 in endothelial cells is induced by stress and during in vitro angiogenesis*. Exp Cell Res, 2001. 269(1): p. 42-53.
787. van Laar, T., A.J. van der Eb, and C. Terleth, *Mif1: a missing link between the unfolded protein response pathway and ER-associated protein degradation?* Curr Protein Pept Sci, 2001. 2(2): p. 169-90.
788. Reddy, R.K., et al., *Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation*. J Biol Chem, 2003. 278(23): p. 20915-24 Epub 2003 Mar 28.
789. Shen, J., et al., *Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response*. Mol Cell Biol, 2005. 25(3): p. 921-32.
790. Steel, G.J., et al., *Coordinated activation of Hsp70 chaperones*. Science, 2004. 303(5654): p. 98-101.
791. Miyagi, T., et al., *Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells*. Int J Urol, 2002. 9(10): p. 577-85.
792. Jessop, C.E., et al., *Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt 5): p. 655-8.
793. Meunier, L., et al., *A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins*. Mol Biol Cell, 2002. 13(12): p. 4456-69.
794. Vattemi, G., et al., *Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle*. Am J Pathol, 2004. 164(1): p. 1-7.
795. Fukuda, S., et al., *Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 280(1): p. 407-14.
796. Ito, D., et al., *Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties*. Mol Cell Biol, 2004. 24(21): p. 9456-69.
797. Gagliardi, A.D., et al., *Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. 288(1): p. E92-105 Epub 2004 Sep 14.
798. Yoon, K.A., Y. Nakamura, and H. Arakawa, *Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses*. J Hum Genet, 2004. 49(3): p. 134-40 Epub 2004 Feb 25.
799. Wang, J., J. Shou, and X. Chen, *Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53*. Oncogene, 2000. 19(14): p. 1843-8.
800. Shou, J., et al., *Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA*. Oncogene, 2002. 21(6): p. 878-89.
801. Bain, G., et al., *Expression of the genes coding for glutamic acid decarboxylase in pluripotent cell lines*. Brain Res Mol Brain Res, 1993. 17(1-2): p. 23-30.
802. Moon, M.S., et al., *GAD 67KD antisense in colon cancer cells inhibits cell growth and sensitizes to butyrate and pH reduction and H2O2 and gamma-radiation*. Arch Biochem Biophys, 2004. 430(2): p. 229-36.
803. Zou, Z., et al., *p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin*. J Biol Chem, 2000. 275(9): p. 6051-4.
804. Sueoka, N., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-6 inhibits the growth of human bronchial epithelial cells and increases in abundance with all-trans-retinoic acid treatment*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. 23(3): p. 297-303.
805. Catley, M.C., et al., *IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE2 release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase*. FEBS Lett, 2003. 547(1-3): p. 75-9.
806. Maass, N., et al., *Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2002. 3(4): p. 281-7.
807. Hsu, M.J., et al., *Enhanced adhesion of monocytes via reverse signaling triggered by decoy receptor 3*. Exp Cell Res, 2004. 292(2): p. 241-51.
808. Kothari, S., et al., *BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF*. Oncogene, 2003. 22(30): p. 4734-44.
809. Park, H.S., et al., *Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1*. Mol Cell Biol, 2002. 22(22): p. 7721-30.
810. Gabai, V.L., et al., *Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 2002. 22(10): p. 3415-24.
811. Morelli, C., et al., *Estrogen receptor-alpha regulates the degradation of insulin receptor substrates 1 and 2 in breast cancer cells*. Oncogene, 2003. 22(26): p. 4007-16.
812. Chang, Q., et al., *Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications*. Cancer Res, 2002. 62(21): p. 6035-8.
813. Lebrun, P., et al., *Cell adhesion and focal adhesion kinase regulate insulin receptor substrate-1 expression*. J Biol Chem, 2000. 275(49): p. 38371-7.
814. Devireddy, L.R. and M.R. Green, *Transcriptional program of apoptosis induction following interleukin 2 deprivation: identification of RC3, a calcium/calmodulin binding protein, as a novel proapoptotic factor*. Mol Cell Biol, 2003. 23(13): p. 4532-41.

815. Price, M.P., et al., *Stomatin modulates gating of acid-sensing ion channels*. J Biol Chem, 2004. 279(51): p. 53886-91 Epub 2004 Oct 07.
816. Snyers, L. and J. Content, *Induction of metallothionein and stomatin by interleukin-6 and glucocorticoids in a human amniotic cell line*. Eur J Biochem, 1994. 223(2): p. 411-8.
817. Sun, X., et al., *NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription*. Mol Cell, 1998. 2(2): p. 213-22.
818. Bothos, J., et al., *The Chfr mitotic checkpoint protein functions with Ubc13-Mms2 to form Lys63-linked polyubiquitin chains*. Oncogene, 2003. 22(46): p. 7101-7.
819. Hoege, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. 419(6903): p. 135-41.
820. Jiang, Y., et al., *Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins*. J Biol Chem, 2004. 279(39): p. 40511-20 Epub 2004 Jul 22.
821. Hung, L.Y., et al., *Identification of a novel microtubule-destabilizing motif in CPAP that binds to tubulin heterodimers and inhibits microtubule assembly*. Mol Biol Cell, 2004. 15(6): p. 2697-706 Epub 2004 Mar 26.
822. Hilgard, P., et al., *Proapoptotic function of protein kinase CK2alpha is mediated by a JNK signaling cascade*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 287(1): p. G192-201 Epub 2004 Feb 12.
823. Kim, Y.S., et al., *Phosphorylation of threonine 10 on CKBBP1/SAG/ROC2/Rbx2 by protein kinase CKII promotes the degradation of IkappaBalpha and p27Kip1*. J Biol Chem, 2003. 278(31): p. 28462-9 Epub 2003 May 13.
824. Landesman-Bollag, E., et al., *Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland*. Mol Cell Biochem, 2001. 227(1-2): p. 153-65.
825. Litchfield, D.W., *Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death*. Biochem J, 2003. 369(Pt 1): p. 1-15.
826. Loizou, J.I., et al., *The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks*. Cell, 2004. 117(1): p. 17-28.
827. Keller, D.M., et al., *A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1*. Mol Cell, 2001. 7(2): p. 283-92.
828. Yano, M., et al., *Tumor-specific exon creation of the HELLS/SMARCA6 gene in non-small cell lung cancer*. Int J Cancer, 2004. 112(1): p. 8-13.
829. Mosammaparast, N. and L.F. Pemberton, *Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators*. Trends Cell Biol, 2004. 14(10): p. 547-56.
830. Yan, X., et al., *Human Nudel and NudE as regulators of cytoplasmic dynein in poleward protein transport along the mitotic spindle*. Mol Cell Biol, 2003. 23(4): p. 1239-50.
831. Sigurdsson, S., et al., *Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54*. J Biol Chem, 2002. 277(45): p. 42790-4 Epub 2002 Aug 29.
832. Niki, T., et al., *MSSP, a protein binding to an origin of replication in the c-myc gene, interacts with a catalytic subunit of DNA polymerase alpha and stimulates its polymerase activity*. FEBS Lett, 2000. 475(3): p. 209-12.
833. Tague, S.E., V. Muralidharan, and C. D'Souza-Schorey, *ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(26): p. 9671-6 Epub 2004 Jun 21.
834. Palacios, F., et al., *An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration*. Embo J, 2001. 20(17): p. 4973-86.
835. Grubinger, M. and M. Gimona, *CRP2 is an autonomous actin-binding protein*. FEBS Lett, 2004. 557(1-3): p. 88-92.
836. Heidemann, J., et al., *Mucosal angiogenesis regulation by CXCR4 and its ligand CXCL12 expressed by human intestinal microvascular endothelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. 286(6): p. G1059-68 Epub 2004 Feb 05.
837. Lapteva, N., et al., *CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo*. Cancer Gene Ther, 2005. 12(1): p. 84-9.
838. Huang, L., et al., *MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation*. Cancer Biol Ther, 2003. 2(6): p. 702-6.
839. Ren, J., et al., *Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents*. Cancer Cell, 2004. 5(2): p. 163-75.
840. Li, Y., et al., *Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene*. Oncogene, 2003. 22(38): p. 6107-10.
841. Lagow, E.L. and D.D. Carson, *Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. J Cell Biochem, 2002. 86(4): p. 759-72.
842. Strehl, S., et al., *Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14*. Genomics, 1998. 53(1): p. 81-9.
843. Haataja, L., et al., *The small GTPase Rac3 interacts with the integrin-binding protein CIB and promotes integrin alpha(IIb)beta(3)-mediated adhesion and spreading*. J Biol Chem, 2002. 277(10): p. 8321-8 Epub 2001 Dec 27.
844. Joyce, P.L. and A.D. Cox, *Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling*. Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7959-67.
845. Peng, Y.F., et al., *Ankycorbin: a novel actin cytoskeleton-associated protein*. Genes Cells, 2000. 5(12): p. 1001-8.
846. Kutty, R.K., et al., *Molecular characterization and developmental expression of NORPEG, a novel gene induced by retinoic acid*. J Biol Chem, 2001. 276(4): p. 2831-40 Epub 2000 Oct 19.
847. Machida, N., et al., *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase*. J Biol Chem, 2004. 279(16): p. 15711-4 Epub 2004 Feb 13.
848. McLeod, S.J., et al., *The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes*. J Biol Chem, 2004. 279(13): p. 12009-19 Epub 2003 Dec 29.

849. Yamachika, T., et al., *Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma*. Clin Cancer Res, 2002. 8(5): p. 1092-9.
850. Blanchard, C., et al., *IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis*. J Immunol, 2004. 172(6): p. 3775-83.
851. Meyer zum Buschenfelde, D., et al., *Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex*. Peptides, 2004. 25(5): p. 873-83.
852. Subramanian, R.R., et al., *Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins*. Exp Cell Res, 2004. 294(2): p. 581-91.
853. Wilker, E. and M.B. Yaffe, *14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease*. J Mol Cell Cardiol, 2004. 37(3): p. 633-42.
854. Zhu, P., et al., *The interaction between ADAM 22 and 14-3-3zeta: regulation of cell adhesion and spreading*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 301(4): p. 991-9.
855. Tian, Q., et al., *Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(43): p. 15370-5 Epub 2004 Oct 18.
856. Ivanov, S., et al., *Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer*. Am J Pathol, 2001. 158(3): p. 905-19.
857. van der Leij, F.R., et al., *Genomics of the human carnitine acyltransferase genes*. Mol Genet Metab, 2000. 71(1-2): p. 139-53.
858. Schuller-Levis, G.B. and E. Park, *Taurine: new implications for an old amino acid*. FEMS Microbiol Lett, 2003. 226(2): p. 195-202.
859. Pellegrini, S., et al., *A human short-chain dehydrogenase/reductase gene: structure, chromosomal localization, tissue expression and subcellular localization of its product*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1574(3): p. 215-22.
860. Seufferlein, T. and E. Rozengurt, *Galanin, neurotensin, and phorbol esters rapidly stimulate activation of mitogen-activated protein kinase in small cell lung cancer cells*. Cancer Res, 1996. 56(24): p. 5758-64.
861. Monte, M., et al., *hGTSE-1 expression stimulates cytoplasmic localization of p53*. J Biol Chem, 2004. 279(12): p. 11744-52 Epub 2004 Jan 5.
862. Collavin, L., et al., *Cell-cycle regulation of the p53-inducible gene B99*. FEBS Lett, 2000. 481(1): p. 57-62.
863. Schneider, M.R., et al., *IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own*. J Endocrinol, 2002. 172(3): p. 423-40.
864. Rouse, S., et al., *Transforming growth factor-beta inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-5 synthesis in skeletal muscle cells involves a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway*. J Biol Chem, 2001. 276(50): p. 46961-7 Epub 2001 Oct 11.
865. Tanno, B., et al., *Expression of insulin-like growth factor-binding protein 5 in neuroblastoma cells is regulated at the transcriptional level by c-Myb and B-Myb via direct and indirect mechanisms*. J Biol Chem, 2002. 277(26): p. 23172-80 Epub 2002 Apr 24.
866. Tan, K., et al., *Human PLU-1 Has transcriptional repression properties and interacts with the developmental transcription factors BF-1 and PAX9*. J Biol Chem, 2003. 278(23): p. 20507-13 Epub 2003 Mar 25.
867. Lu, P.J., et al., *A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer*. J Biol Chem, 1999. 274(22): p. 15633-45.
868. Bauer, M., G. Aust, and U. Schumacher, *Different transcriptional expression of KIAA1324 and its splicing variants in human carcinoma cell lines with different metastatic capacity*. Oncol Rep, 2004. 11(3): p. 677-80.
869. Liu, Q., et al., *Cloning, tissue expression pattern and genomic organization of latexin, a human homologue of rat carboxypeptidase A inhibitor*. Mol Biol Rep, 2000. 27(4): p. 241-6.
870. Lin, F., et al., *Regulation of retinoic acid-induced inhibition of AP-1 activity by orphan receptor chicken ovalbumin up-stream promoter-transcription factor*. J Biol Chem, 2002. 277(24): p. 21414-22 Epub 2002 Apr 04.
871. Qiu, Y., et al., *Isolation, characterization, and chromosomal localization of mouse and human COUP-TF I and II genes*. Genomics, 1995. 29(1): p. 240-6.
872. Blackshaw, S. and S.H. Snyder, *Encephalopsin: a novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain*. J Neurosci, 1999. 19(10): p. 3681-90.
873. Durick, K., G.N. Gill, and S.S. Taylor, *Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2*. Mol Cell Biol, 1998. 18(4): p. 2298-308.
874. Guerra-Vladusic, F.K., et al., *Signaling molecules implicated in heregulin induction of growth arrest and apoptosis*. Oncol Rep, 2001. 8(6): p. 1203-14.
875. Voelker, D.R., *Phosphatidylserine decarboxylase*. Biochim Biophys Acta, 1997. 1348(1-2): p. 236-44.
876. van Dartel, M. and T.J. Hulsebos, *Amplification and overexpression of genes in 17p11.2 ~ p12 in osteosarcoma*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. 153(1): p. 77-80.
877. Karlsson, C., et al., *Elevated level of gas3 gene expression is correlated with G0 growth arrest in human fibroblasts*. Cell Biol Int, 1999. 23(5): p. 351-8.
878. Evtimova, V., R. Zeillinger, and U.H. Weidle, *Identification of genes associated with the invasive status of human mammary carcinoma cell lines by transcriptional profiling*. Tumour Biol, 2003. 24(4): p. 189-98.
879. Zhou, D., et al., *A novel crosstalk mechanism between nuclear receptor-mediated and growth factor/Ras-mediated pathways through PNRG-Grb2 interaction*. Oncogene, 2004. 23(31): p. 5394-404.
880. Myers, S.M. and L.M. Mulligan, *The RET receptor is linked to stress response pathways*. Cancer Res, 2004. 64(13): p. 4453-63.
881. Wu, Y., et al., *RXRalpha mRNA expression is associated with cell proliferation and cell cycle regulation in Hep3B cell*. Exp Mol Pathol, 2004. 76(1): p. 24-8.

882. Zhao, Y., et al., *Casein kinase 1alpha interacts with retinoid X receptor and interferes with agonist-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. 279(29): p. 30844-9.
883. Ragazzini, P., et al., *Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma*. Histol Histopathol, 2004. 19(2): p. 401-11.
884. Bond, M., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway*. J Biol Chem, 2002. 277(16): p. 13787-95 Epub 2002 Feb 4.
885. Qi, J.H., et al., *A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2*. Nat Med, 2003. 9(4): p. 407-15 Epub 2003 Mar 24.
886. Wallrapp, C., et al., *A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2000. 60(10): p. 2602-6.
887. Lee, J.W., et al., *Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor*. Mol Endocrinol, 1995. 9(2): p. 243-54.
888. Chadwick, B.P., et al., *Cloning, mapping and expression of UBL3, a novel ubiquitin-like gene*. Gene, 1999. 233(1-2): p. 189-95.
889. Harris, R.S., S.K. Petersen-Mahrt, and M.S. Neuberger, *RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators*. Mol Cell, 2002. 10(5): p. 1247-53.
890. Young, T.M., et al., *The human I-mfa domain-containing protein, HIC, interacts with cyclin T1 and modulates P-TEFb-dependent transcription*. Mol Cell Biol, 2003. 23(18): p. 6373-84.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Dr. Helmut Burtscher, in dessen Arbeitsgruppe und unter dessen Anleitung ich meine Dissertation angefertigt habe. Vielen Dank für die gute Betreuung, die vielen Ideen und konstruktiven Ratschläge und den lockeren und offenen Umgang.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg-Burkhard Kreße für die intensive Durchsicht meiner Dissertation und die vielen hilfreichen Anregungen bedanken.

Meinen Laborkollegen Ute Bär, Claudia Vetter, Anja Wiese, Klara Palme und Dr. Vincent Beuger danke ich für die jederzeit herzliche Atmosphäre, den fachlichen Rat und die emotionale Unterstützung. Besonders hervorheben möchte ich die Hilfe von Ute Bär beim Erlernen der Affymetrix-Methodik und der Auswertung der großen Datenflut und die Unterstützung, die ich von Claudia Vetter beim Erlernen der Zellkulturtechniken bekommen habe.

Vielen Dank auch allen anderen Kollegen von Etage 300 für die fachlichen Tipps, die netten Pausenraumgespräche und – gerade in den letzten Monaten – die vielen aufmunternden Worte.

Bei Simone Schlecht möchte ich mich für die Mithilfe bei der Datenauswertung bedanken, die sie im Rahmen eines Bioinformatik-Praxissemesters geleistet hat.

Für die gute und konstruktive Zusammenarbeit danke ich den IT-Spezialisten Dr. Thomas Heinemeyer und Dr. Stefan Klostermann.

Meinen Eltern gilt mein ganz besonderer Dank für die seelische und finanzielle Unterstützung. Ich bin sehr froh, dass ihr immer für mich da seid.

Meiner Schwester Andrea danke ich ganz herzlich für die überaus sorgfältige und mühevollen Durchsicht dieser Arbeit.

Bei Guido Dennert möchte ich mich für den lange Jahre währenden Rückhalt und die wunderschöne gemeinsame Zeit bedanken.

Alexander, vielen Dank für Deine Liebe, Dein großes Verständnis dafür, dass ich in den letzten Monaten so wenig Zeit für Dich hatte, und den Trost, den Du mir jederzeit zu geben bereit warst, wenn meine nervliche Anspannung überhand nahm.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Marion Hirt  
Adresse: Kolumbusstr. 2, 81543 München  
Geburtsdatum: 27. Juni 1976  
Geburtsort: Fürstenfeldbruck  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulischer Werdegang:

1982-1986 Grundschule Türkenfeld  
1986-1995 Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien

### Ausbildung und Pflichtpraktika:

11/1995 bis 04/2000 Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
05/2000 bis 11/2000 Pharmazeutisches Praktikum am Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, USA  
12/2000 bis 05/2001 Pharmazeutisches Praktikum in der Spitzweck-Apotheke, Garching bei München  
09/2001 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
11/2001 Approbation zur Apothekerin  
06/2001-04/2005 Doktorarbeit in der Division Pharma der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, in der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Burtscher  
Fachvertreter:  
Prof. Dr. Martin Biel, Pharmakologie für Naturwissenschaften, Ludwig-Maximilians-Universität München

### Berufstätigkeit:

seit 05/2005 Laborleitung bei der Firma IMG Laboratories, Martinsried

### Publikation:

Silencing of Human Choline Kinase Expression: Quantification Using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit and the LightCycler System *Biochemica* 2004, 2, 19-21