

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

Identifizierung und Regulation Nelfinavir-induzierter Peptidhormone

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefanie Hones

aus Lindau i.B.

2013

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Vogeser
Prof. Dr. Harald Steiner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ansgar Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2013

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Peptidhormone ADM2 und Inhibin β E.....	2
1.1.1	Adrenomedullin 2 (ADM2)	2
1.1.2	Inhibine.....	4
1.2	Das Endoplasmatische Retikulum	5
1.3	ER Stress.....	6
1.4	Transkriptionsfaktoren der ER Stress Antwort.....	7
1.4.1	ATF4.....	7
1.4.2	ATF3.....	8
1.4.3	CHOP.....	9
1.4.4	XBP1.....	9
1.5	ER Stress Induktoren.....	10
1.5.1	Nelfinavir	10
1.5.2	Andere Stressinduktoren	10
2	Zielsetzung der Arbeit	11
3	Materialien und Methoden.....	12
3.1	Materialien	12
3.1.1	Geräte und Instrumente.....	12
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	12
3.1.3	Reagenzien	13
3.1.3.1	Zellkultur	13
3.1.3.2	Reverse Transkriptase PCR.....	14
3.1.3.3	Real-time-PCR	15
3.1.3.4	Immunfluoreszenz	15
3.1.3.5	Plasmid-Klonierung	15
3.2	Methoden	16
3.2.1	Zellkultur.....	16
3.2.2	RNA-Extraktion	16
3.2.3	Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion	17
3.2.3.1	Umschreibung RNA in cDNA	17
3.2.3.2	Polymerasekettenreaktion	17

3.2.4	Gelelektrophorese.....	20
3.2.5	Real-time-PCR.....	21
3.2.6	Microarray.....	24
3.2.7	Immunfluoreszenz.....	24
3.2.8	Plasmidklonierung und Transfektion	26
3.2.8.1	PCR Klonierung.....	26
3.2.8.2	Transfektion	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Microarray Analyse Nelfinavir regulierter Gene	29
4.2	PCR Analysen zur Validierung des Microarrays.....	33
4.2.1	ADM2 Hochregulation in Jurkat-Zellen	33
4.2.2	ADM2 Hochregulation in epithelialen Tumoren	35
4.3	Zeitabhängige PCR Analysen der ER Stress Reaktion	36
4.3.1	MCF7-Zellen nach Nelfinavirbehandlung.....	36
4.3.2	MCF7-Zellen nach Behandlung anderer ER Stress Induktoren	38
4.3.2.1	Tunicamyzin	38
4.3.2.2	Thapsigargin	39
4.3.2.3	Quercetin	40
4.4	Inhibin β E Hochregulation im Vergleich mit anderen Inhibinen.....	41
4.5	Real-time-PCR Analysen	42
4.5.1	XBP1 Splicing nach Quercetin- und Tunicamyzinbehandlung.....	43
4.5.2	XBP1 Splicing nach Nelfinavir-, Quercetin- und Bortezomibbehandlung	45
4.6	Nachweis der ADM2 Hochregulation auf Proteinebene	46
4.6.1	Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen nach Nelfinavirbehandlung	46
4.6.2	Immunfluoreszenz nach Behandlung mit anderen ER Stress Induktoren	47
4.7	PCR Klonierung von ER Stress regulierenden Transkriptionsfaktoren	48
4.7.1	ATF4 Klonierung: Nachweis in der Immunfluoreszenz	49
4.7.2	ADM2: ein Zielgen von ATF4	50
5	Diskussion	52
5.1	Die Rolle von ADM2 bei der Neoangiogenese	52
5.2	Die Induktion von ADM2 durch ER Stress	53
5.3	ADM2 ist ein Zielgen von ATF4.....	56

5.4	ADM2 Expression in Tumoren	57
5.5	Andere ER Stress Marker	58
6	Zusammenfassung	60
7	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
8	Literaturverzeichnis	VIII
9	Anhang	XVII
9.1	Danksagung	XVII

1 Einleitung

Die Tumorprogression ist mit einer Vielzahl genetischer und phänotypischer Veränderungen der Tumorzellen verbunden. Tumorzellen sind dabei bereits therapieunabhängig verschiedenen Stressbedingungen wie Hypoxie oder Nährstoffmangel ausgesetzt. Kommt es im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von Tumorzellen zu einer Störung der Homöostase, wird eine genetisch festgelegte ER Stress Reaktion ausgelöst. Sowohl Hypoxie als auch Nährstoffmangel und Veränderungen des Redoxzustandes, der Ionenkonzentrationen oder virale Infektionen können Ursache dieser Reaktion sein.

Die ER Stress Reaktion bewirkt einen vorübergehenden Zellzyklusarrest, einen vorläufigen Stopp der Proteinbiosynthese und die Hochregulation von diversen Mitgliedern der Hitzeschockprotein-Familie zur Bewältigung der ER Stress Situation. Persistierender ER Stress führt jedoch zur Apoptose der Tumorzellen. Dieser Apoptoseweg unterscheidet sich von den klassischen Zelltodmechanismen. Deswegen werden ER Stress induzierende Substanzen als mögliche Medikamente für die Behandlung von ansonsten chemoresistenten Tumoren untersucht. Eines dieser Medikamente ist der HIV-Proteaseinhibitor Nelfinavir.

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass es in Mammakarzinomzellen nach Auslösung der sogenannten ER Stress Reaktion durch Nelfinavir zu einer selektiven und ausgeprägten Expression des Peptidhormons Inhibin βE kommt.

Neue Erkenntnisse aus der vorliegenden Doktorarbeit sind, dass auch das Peptidhormon Adrenomedullin 2 (ADM2) eine durch ER Stress induzierte Hochregulation erfährt. Physiologisch wirkt Adrenomedullin 2 blutdrucksenkend, es ist aber auch dafür bekannt, die Neoangiogenese zu fördern. Es könnte somit von Bedeutung für die Tumorprogression sein, da die Fähigkeit von Tumorzellen zur Neoangiogenese einen entscheidenden Überlebensvorteil darstellt. Durch Nährstoffmangel in Tumorzellen ausgelöster ER Stress kann, sofern er noch tolerierbar ist und nicht zum Zelltod führt, somit über ADM2 Regulation zu einem Voranschreiten von Tumoren führen.

ADM2 wird in humaner Plazenta exprimiert und seine Immunreaktivität ist während der Schwangerschaft in Trophoblasten und Endothelzellen nachweisbar. Es fördert die Invasion und Migration von Trophoblasten im ersten Trimester der Schwangerschaft. Inwieweit ADM2 hierdurch einen Einfluss auf die Physiologie der Schwangerschaft hat, bleibt zu untersuchen (Chauhan et al. 2009). Außerdem wurde ADM2 als ein neuer, hochaktiver Neoangiogenesefaktor beschrieben. Neoangiogenese ist sowohl bei der Plazentabildung als auch beim Tumorwachstum von Bedeutung. ADM2 kann die Neoangiogenese fördern, indem es über den CRLR/RAMP-Rezeptorkomplex den PI3K-Akt-eNOS und ERK Signalweg aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von Endothelzellen führt. Zudem kommt es durch Stimulation von eNOS und NO zu einer Hochregulation von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), was ebenfalls zu einer Aktivierung von Endothelzellen führt (Smith et al. 2009, siehe Abbildung 2).

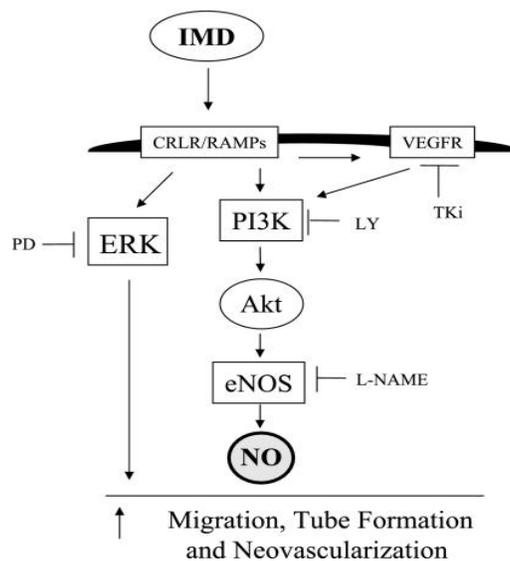


Abbildung 2: Smith et al. 2009

[CRLR (calcitonin receptor-like receptor); RAMP (receptor activity-modifying protein); PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase); Akt (protein kinase B); eNOS (endothelial nitric oxide [NO] synthase); ERK (extracellular signal-regulated kinase)]

1.1.2 Inhibine

Inhibine gehören zur TGF (*transforming growth factor*) beta Superfamilie. Sie werden als Prepro-peptide gebildet und nach der Prozessierung im ER und Golgi sekretiert. Inhibine werden in Sertoli-Zellen des Hodens und Granulosazellen des Ovars gebildet und sind wichtige Regulationshormone für die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH (Muttukrishna et al. 2004; Suresh et al. 2011). Es sind fünf verschiedene Untereinheiten bekannt: Inhibin alpha (Inh α), Inhibin beta A (Inh β A), Inhibin beta B (Inh β B), Inhibin beta C (Inh β C) und Inhibin beta E (Inh β E). Ein Inhibin ist ein Heterodimer, bestehend aus einer alpha-Untereinheit und einer beta-Untereinheit. Inhibine, die als Homodimere aus zwei beta-Untereinheiten bestehen, werden als Aktivine bezeichnet. Als Aktivin A wird so beispielsweise ein Homodimer aus beta A bezeichnet und als Inhibin A ein Heterodimer aus alpha und beta A. Aktivine aktivieren Gonadotropine, während Inhibine die Sekretion von Gonadotropinen hemmen (Butler et al. 2005).

Die Peptide Aktivin A, B und AB sowie die Inhibine β A und β B wirken als Sexualhormone. Andere Funktionen kommen der Untereinheit β E zu. Inhibin β E wurde beim Menschen aufgrund von Sequenzhomologien entdeckt und wird vorwiegend von Leberzellen exprimiert (Hashimoto et al. 2002). Inh β E mRNA wird nach verschiedenen Formen der Leberschädigung hochreguliert (Deli et al. 2008), allerdings in hepatozellulären Karzinomen vermindert exprimiert (Grusch et al. 2006). Eine Expression von Inh β E konnte auch in Mamma-, Ovarial- und Endometriumskarzinomen beobachtet werden. Hier gibt es allerdings große Schwankungen in den verschiedenen Zelllinien und Stadien der Erkrankung. So ist beim fortgeschrittenen Endometriumskarzinom eine verminderte Expression von Inh β E zu sehen (Mylonas et al. 2011). In der Arbeitsgruppe meiner Doktorarbeit konnte kürzlich die Hochregulation von Inh β E durch ER Stress nachgewiesen werden, wie er beispielsweise durch Nelfinavir induziert wird (Brüning et al. 2012).

1.2 Das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) befindet sich im Zytoplasma eukaryotischer Zellen. Es ist ein Membransystem, das in seinem Innern Hohlräume bildet. Die Teile des ER, die auf ihren Membranflächen mit Ribosomen besetzt sind, nennt man raues ER. Ribosomen freie Teile bezeichnet man als glattes ER. Raues und glattes Endoplasmatisches Retikulum unterscheiden sich in ihren Funktionen. Aufgaben des rauhen ER sind die Biosynthese sekretorischer Proteine und die Membranproduktion. Die in den membrangebundenen Ribosomen entstehenden Polypeptidgruppen werden in das Lumen des ER geschleust, dort zurechtgeschnitten und gefaltet. So erhalten sie ihre dreidimensionale Struktur. Um Fehlfaltungen zu verhindern, binden sogenannte Chaperone an die Peptidketten und stabilisieren sie. Kommt es dennoch zu fehlgefalteten Proteinen, werden diese zurück ins Zytosol transportiert und durch Proteasomen abgebaut. Außerdem finden andere posttranslationale Prozesse wie Glykosylierung und Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen im rauhen ER statt. Das glatte ER dient als Kalziumspeicher und ist an der Biosynthese von Phospholipiden, Polyphenolen und Cholesterin beteiligt (Karp 2010).

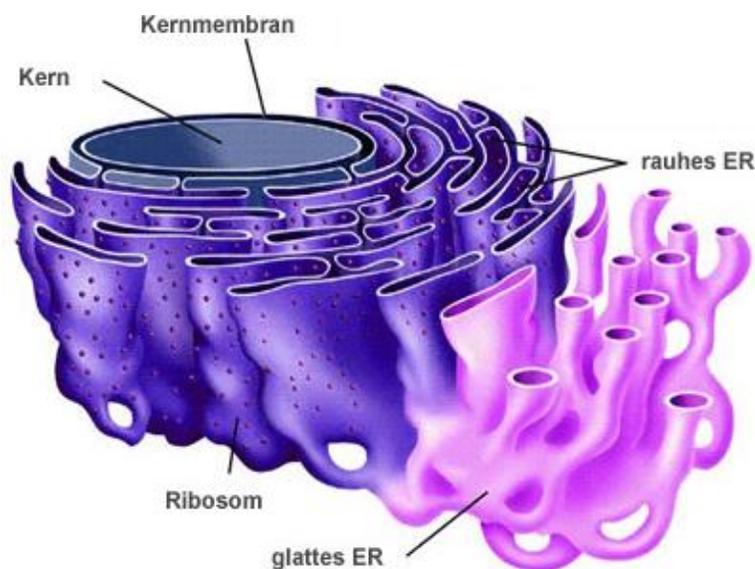


Abbildung 3: Das Endoplasmatische Retikulum (Biokurs: www.biokurs.de/skripten/bs11-53.htm)

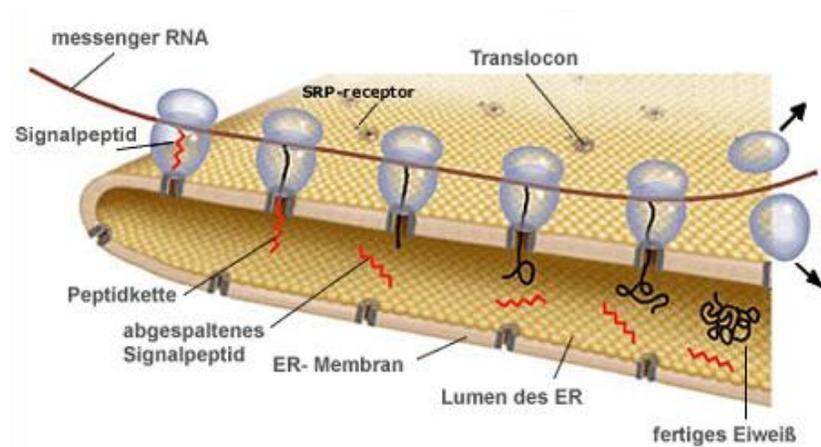


Abbildung 4: Proteinsynthese im rauen ER (Biokurs: www.biokurs.de/skripten/bs11-53.htm)

1.3 ER Stress

Damit das Endoplasmatische Retikulum seine Aufgaben reibungslos erfüllen kann, sind optimale Bedingungen im Lumen des ER nötig. Kommt es zu einer Störung dieser Homöostase, wird eine genetisch festgelegte ER Stress Reaktion ausgelöst. Man bezeichnet sie als die *Unfolded Protein Response* (UPR). Ursachen hierfür können Veränderungen des Redoxzustandes oder der Ionenkonzentration, virale Infektionen oder die Ansammlung inkorrekt prozessierter Proteine sein (Xu et al. 2005). Häufen sich nicht- oder fehlgefaltete Proteine an, kommt es zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Das Chaperon und Hitzeschockprotein Grp78 /BiP (*Glucose-regulated protein 78/Binding Immunoglobulin Protein*) entlässt bei einer Akkumulation solcher Proteine die membrangebundenen ER Proteine PERK (*protein kinase R-like ER kinase*), Ire1 (*inositol-requiring enzyme-1*) und ATF6 (*activating transcription factor 6*) (Schroder and Kaufman 2005). Unter physiologischen Bedingungen liegen diese in inaktivem Zustand vor. PERK, Ire1 und ATF6 aktivieren schließlich weitere Signalwege und Transkriptionsfaktoren, die zum Schutz Zellzyklusarrest, Inhibierung von Proteinneusynthese und Hochregulation von Hitzeschock-ähnlichen Proteinen bewirken (Healy et al. 2009, siehe Abbildung 5).

Ist der ER Stress allerdings zu stark oder persistierend, versagen die anfänglichen Rettungsmaßnahmen. Es kommt zur Apoptose der Zelle. Verschiedene Mechanismen sind bekannt. Diese können mitochondrienabhängig oder -unabhängig sein. So führt ein Weg über

die Aktivierung der Caspase-4 (Hitomi et al. 2004), andere über Kinasen, Ca^{2+} , Bcl-2-Proteine oder Transkriptionsfaktoren (Rosati et al. 2010; Walter and Ron 2011).

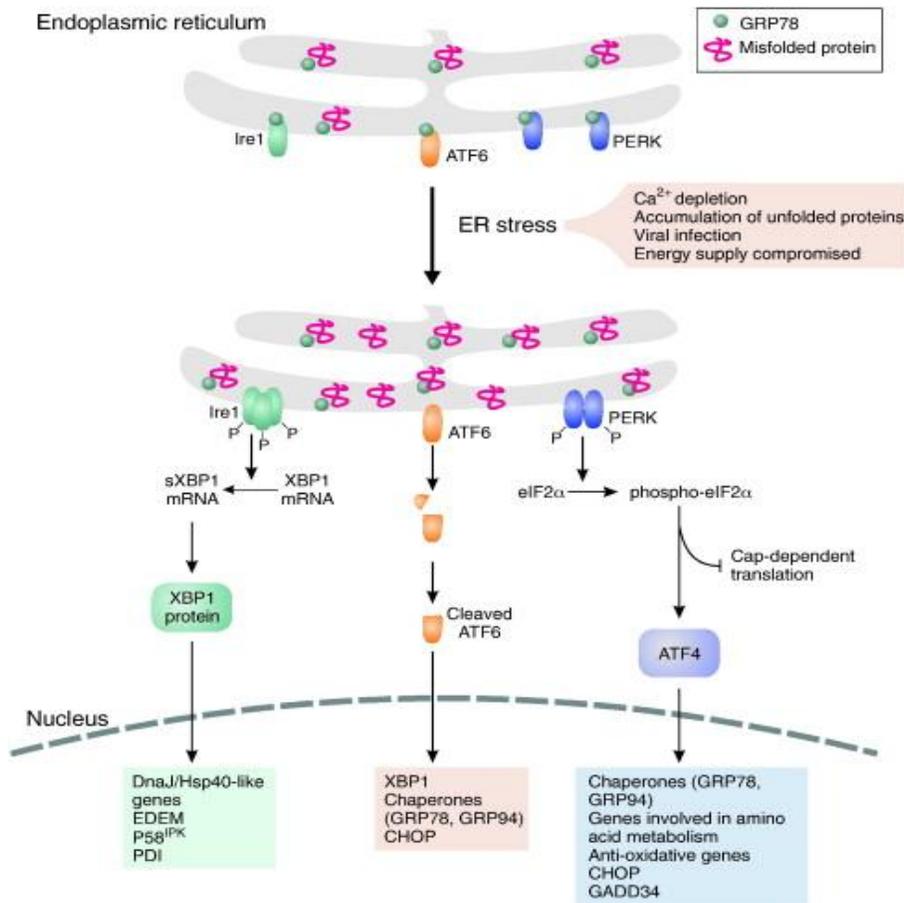


Abbildung 5: Healy et al. 2009

1.4 Transkriptionsfaktoren der ER Stress Antwort

1.4.1 ATF4

ATF4, auch als CREB2 bezeichnet, gehört zur Familie der ATF/CREB Proteine (*activating transcription factor/cAMP response element binding protein*), die eine Leucin Zipper Domäne besitzen. Leucin Zipper (engl.: *basic Leucine Zipper Domain*, bZIP) sind DNA-bindende

Proteindomänen, die der Dimerisierung von Proteinen dienen. ATF4 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression verschiedenster Gene und schützt die Zelle vor Proteinüberlastung und oxidativem Stress (Gachon et al. 2001). Die mRNA von ATF4 ist ubiquitär in humanen Tumorzelllinien zu finden (Karpinski et al. 1992). Kommt es im Endoplasmatischen Retikulum zur ER Stress Reaktion wird über PERK der eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 alpha*) phosphoryliert und inaktiviert. Die Proteintranslation und -akkumulation wird gehemmt (Harding et al. 2000). Die Expression von ATF4 wird in erster Linie auf Translationsniveau reguliert. ATF4 mRNA besitzt auf der 5'-Seite des AUG-Startkodons hemmende offene Leseraster, die die mRNA Translation unter normalen physiologischen Bedingungen inhibieren. Nach der Phosphorylierung von eIF2 α bewirken sie dagegen eine verstärkte Translation und ATF4 wird vermehrt exprimiert (Dey et al. 2010).

1.4.2 ATF3

ATF3 (*activating transcription factor 3*) gehört ebenfalls zur Familie der ATF/CREB Proteine. Es wird durch eine Vielzahl von Stressmechanismen wie Hypoxie, Nährstoffmangel, oxidativem Stress, ER Stress und genotoxischem Stress induziert (Chen et al. 1996). Besteht ER Stress, reiht sich ATF3 in den PERK-eIF2-ATF4-Weg ein. Für eine vermehrte Expression von ATF3 ist eine Aktivierung des verwandten Transkriptionsfaktors ATF4 Voraussetzung (Jiang et al. 2004).

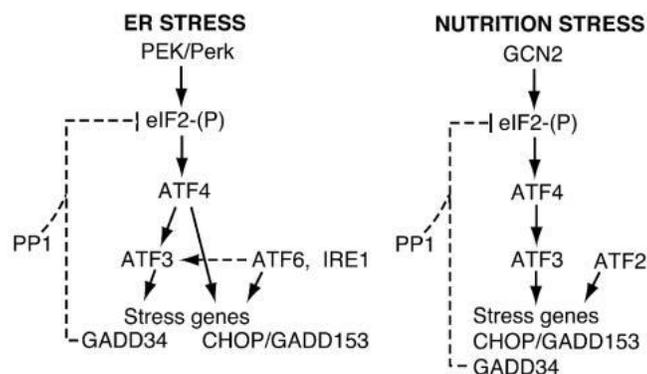


Abbildung 6: Jiang et al. 2004

1.4.3 CHOP

CHOP (*CCAAT-enhancer-binding homologous protein*, auch DDIT3 oder GADD153) ist ein pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor. Die Expression von CHOP wird durch ER Stress induziert. Sein Promotor besitzt Bindungsstellen für alle wichtigen Induktoren der ER Stress Reaktion wie ATF4, ATF6 und XBP1 (Oyadomari and Mori 2004). ATF4, das über PERK/phospho-eIF2 induziert wird, spielt eine dominante Rolle in der Induktion von CHOP. Welcher Mechanismus durch CHOP zur Apoptose führt, wird kontrovers diskutiert. Sowohl die Repression von Bcl-2-Proteinen als auch die Regulation zahlreicher pro-apoptotischer Faktoren wie ERO1, DR5 und BH3-*only*-Proteine kommen als Faktoren in Frage, in der CHOP-vermittelten Apoptose mitzuwirken (Nishitoh 2012).

1.4.4 XBP1

XBP1 (*X-box binding protein 1*) gehört ebenfalls zur Familie der bZIP (*basic-leucine zipper*) Transkriptionsfaktoren. Es reguliert die Expression zahlreicher Proteine, v.a. von Proteinen der UPR (Lee et al. 2003). XBP1 mRNA wird über ATF6 durch ER Stress induziert. Eine andere Reaktion, die auf ER Stress folgt, ist Splicing. Ire1 wird nach Dissoziation von GRP78 homodimerisiert und autophosphoryliert, so dass eine Ribonuklease aktiviert wird. Diese entfernt ein 26 Nukleotide umfassendes Intron aus der mRNA des XBP1. Der darauffolgende Frameshift führt zu einer veränderten, längeren Form von XBP1 Proteins (50 kDa statt 29 kDa). Die neue Form zeigt eine deutlich höhere transkriptionale Aktivität und längere Halbwertszeit. Das Splicing ist somit ein frühes und charakteristisches Kennzeichen für ER Stress (Yoshida et al. 2001). Nach einer PCR Analyse zeigt sich das XBP1 Splicing in der Elektrophorese am Vorhandensein zweier unterschiedlich schnell wandernder Banden, was in dieser Doktorarbeit als molekularer Marker für die ER Stress Induktion diente.

1.5 ER Stress Induktoren

1.5.1 Nelfinavir

Nelfinavir ist ein Proteaseinhibitor, der zur Therapie von HIV-infizierten Patienten eingesetzt wird. Es wird im Rahmen der „*highly active antiretroviral therapy*“ (HAART) in Kombination mit Reverse-Transkriptase-Inhibitoren angewandt. Bei AIDS Patienten, die mit HIV-Proteaseinhibitoren behandelt wurden, konnte ein vermindertes Auftreten sowohl von Kaposi-Sarkomen als auch von bestimmten Typen von Non-Hodgkin-Lymphomen festgestellt werden. Dies führte zu der Annahme, dass Proteaseinhibitoren einen antikarzinogenen Effekt haben (Sgadari et al. 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass Nelfinavir über die Ansammlung fehlgefalteter Proteine zur Auslösung der ER Stress Kaskade führt. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass Nelfinavir, in höheren Konzentrationen als für HIV-Patienten vorgesehen appliziert, in Tumorzellen über ER Stress zur Apoptose führt (Gills et al. 2007; Brüning et al. 2009). Doch der exakte Mechanismus der Apoptose, die durch Nelfinavir ausgelöst wird, ist unklar. Vermutlich gibt es einen Zusammenhang zwischen der Wirkungsweise von Nelfinavir und der Proteolyse neu synthetisierter Proteine im ER (Gupta et al. 2007). Das Zielmolekül, an dem der Proteaseinhibitor ansetzt, ist noch nicht bekannt. Es ist jedoch durch Nelfinavir eine Hochregulierung des pro-apoptischen Proteins CHOP und der Caspase-4 zu beobachten (Pyrko et al. 2007). Um eine ER Stress Reaktion in epithelialen Tumorzellen auszulösen, die eine Apoptose nach sich zieht, sind Konzentrationen von 8-15 µg/ml Nelfinavir nötig. Für die Hemmung der Proteinase bei HIV-Patienten genügt eine geringere Konzentration von ungefähr 2 µg/ml. Derzeit laufen über 20 klinische Studien, in welchen Nelfinavir bei Karzinom- und Leukämiepatienten getestet wird (www.clinicaltrials.org).

1.5.2 Andere Stressinduktoren

Um unter Laborbedingungen ER Stress zu induzieren, stehen mehrere Chemikalien zur Verfügung. Zu den gängigsten gehören Tunicamyzin und Thapsigargin. Tunicamyzin inhibiert die posttranslationale N-terminale Proteinglykosylierung, während Thapsigargin die

endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase blockiert, was zum Abbau der Kalziumspeicher im ER führt (Samali et al. 2010). Ein weiterer ER Stress Induktor ist Dithiothreitol (DTT). Es spaltet Disulfidbrücken, die zur Stabilisierung der Proteinstruktur notwendig sind, was eine Fehlfaltung von Proteinen zur Folge hat (Haze et al. 1999). Quercetin ist ein Antioxidans, das ähnlich wie Nelfinavir ER Stress, Zellzyklusarrest, Autophagie und Apoptose hervorruft. Es führt in Krebszellen u.a. durch die Inhibition von Proteasomen zum Zelltod (Klappan et al. 2012). Ein anderer Proteasomeninhibitor ist Bortezomib. Auch Bortezomib führt teilweise über ER Stress, größtenteils jedoch über einen zytosolischen Zellstress-Mechanismus in epithelialen Tumorzellen zur Apoptose (Brüning et al. 2009). Neben Nelfinavir gehört Bortezomib zu den wenigen klinisch anwendbaren Medikamenten, die eine selektive Induktion von ER Stress in Tumorzellen auslösen. Tunicamyzin, Thapsigargin und DTT sind für die systemische Anwendung zu toxisch.

2 Zielsetzung der Arbeit

Nelfinavir ist ein systemisch gut verträgliches Medikament, das ER Stress in Tumorzellen auslöst und zum Zelltod führen kann. Der zur Apoptose führende Mechanismus durch Nelfinavir bleibt jedoch weitgehend unverstanden. Vor Kurzem konnte in der Arbeitsgruppe meiner Doktorarbeit die Hochregulation von Inhibin βE durch ER Stress nachgewiesen werden. Ein besseres Verständnis des durch Nelfinavir induzierten ER Stresses und die Untersuchung der möglichen Induktion anderer Peptidhormone durch Nelfinavir waren u.a. das Ziel meiner Doktorarbeit.

Tatsächlich konnte ein weiteres Peptidhormon, das durch Nelfinavir induziert wird, identifiziert werden. Es handelt sich um das Peptidhormon ADM2. Da es bisher wenige Daten über die Funktion von ADM2 beim Tumorwachstum gibt und auch die Regulation der Transkription von ADM2 nicht ausreichend geklärt ist, sollte die Regulation von ADM2 bei ER Stress genauer untersucht werden. Um herauszufinden, welcher Transkriptionsfaktor für die Induktion von ADM2 bei ER Stress verantwortlich ist, wurden von in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren der ER Stress Reaktion entsprechende Expressionsplasmide generiert.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Instrumente

CO₂ Inkubator, Hera Cell 150i, Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Fluoreszenzmikroskop, Axiophot, Zeiss, Jena

Geldokumentationsgerät, Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Mastercycler gradient, Eppendorf, Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf

Zentrifugen: Stratos Centrifuge, Heraeus Biofuge, Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf

7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Assay plate 96 well, Flat, Iwaki Scitech Division, Asahi Techno Glass, Japan

Chamber Slide, 8-well, Thermo Scientific Nunc Lab-Tek II Chamber Slide, Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Deckgläser: Menzel-Gläser, 24x24mm, BB024024A1, Menzel GmbH+CoKG, Braunschweig

Fertiggel, E-Gel, 2% mit SYBR safe, Invitrogen, Karlsruhe

Microplate, 6-well with Lid, Iwaki Scitech Division, Asahi Techno Glass, Japan

Microtubes, 1,5ml, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

Petrischalen, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Pipetten: 10, 20, 200, 1000 µl eppendorf research, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Pipettenspitzen, Safeseal Tips Premium, 10, 100, 200, 1000µl, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Sealing film – PET, Iwaki Scitech Division, Asahi Techno Glass, Japan

Serological Pipet, 5ml, 10ml, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

Tissue culture dish, 100 x 20mm, Iwaki Scitech Division, Asahi Techno Glass, Japan

Tissue culture flask, Canted neck, 70ml, Iwaki Scitech Division, Asahi Techno Glass, Japan

Tubes, Safe-Lock, 1,5 ml; 2 ml; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Tubes, 15ml, BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

Tubes, 50ml, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

3.1.3 Reagenzien

3.1.3.1 Zellkultur

Nährmedium, Quantum 263 for tumor cells, PAA, Pasching, Österreich

PBS, Dulbecco's, PAA, Pasching, Österreich

Trypsin-EDTA, PAA, Pasching, Österreich

Zelllinien: Die hier verwendeten Zellen wurden von der ATCC (American Type Culture Collection), ATCC/LGC Standards, Wesel, Deutschland bezogen:

HeLa (ATCC HTB-22): HeLa ist eine 1951 aus einem Adenokarzinom der Zervix angelegte Zelllinie einer 31-jährigen Patientin vor der ersten Radiotherapie. Es sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur zur Züchtung genetisch identischer Zellklone aus Einzelzellen etabliert wurde. Die Bezeichnung dieser Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück (Lucey et al. 2009).

Jurkat (ATCC TIB-152): Es handelt sich um eine humane akute T-Zell-Leukämie Zelllinie, gewonnen und etabliert 1977 an der Kinderklinik der Universität Erlangen-Nürnberg. Die Zellen entstammen dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen, der an akuter lymphatischer Leukämie erkrankt war. Die Zellen wurden beim ersten Rückfall nach erfolgter Chemotherapie entnommen (Schneider and Schwenk 1977).

MCF7 (ATCC CCL-2): Angelegt wurde diese Zelllinie 1970 mit Zellen aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin mit einem metastasierten östrogenrezeptorpositiven Adenokarzinom der

Mamma, nachdem diese eine Radio- und Hormontherapie erhalten hatte. MCF steht für Michigan Cancer Foundation, das Institut, wo die Zelllinie etabliert wurde (Soule et al. 1973).

Chemikalien:

Bortezomib (Velcade®), Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA

Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich, München

Nelfinavir (Viracept®), Pfizer, Groton, CT, USA

Quercetin, MP Biomedicals, Straßburg, Frankreich

Thapsigargin, Sigma-Aldrich, München

Tunicamycin, Sigma-Aldrich, München

3.1.3.2 Reverse Transkriptase PCR

Trizol, Invitrogen, Karlsruhe

Chloroform, Sigma-Aldrich, München

Isopropylalkohol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ethanol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

DEPC-H₂O, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Oligo(dT)₁₅ Primer, 100µM, biomers.net, Ulm

M-MLV RT 5x reaction Puffer, #M531A, Promega, Mannheim

PCR Nukleotid Mix, 10mM, #C114H, Promega, Mannheim

M-MLV Reverse Transkriptase, #M170B, Promega, Mannheim

rekombinantes RNasin, Ribonuklease Inhibitor, #N2511, Promega, Mannheim

Primer: etabliert von Dr. Ansgar Brüning, synthetisiert über biomers.net, Ulm

2xPCR Master Mix, enthält Taq-Polymerase und dNTP, #M750C, Promega, Mannheim

Steriles Wasser, #P1193, Promega, Mannheim

10xBlueJuice Ladepuffer (65% Sucrose, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10mM EDTA, 0.3% Bromphenolblau), Invitrogen, Karlsruhe

DNA-Marker, pBR 328 Mix I, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.1.3.3 Real-time-PCR

TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit, Applied Biosystems, Darmstadt: enthält AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs, Puffer

Primer: etabliert von Dr. Ansgar Brüning, synthetisiert über biomers.net, Ulm

3.1.3.4 Immunfluoreszenz

Primärantikörper: ADM2, Kaninchen-Anti-Intermedin (8-47) Serum (Human),
Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe

Sekundärantikörper: CyTM5-conjugated Affini Pure Ziege Anti- Kaninchen IgG, Jackson Immuno
Research, Suffolk, United Kingdom (bezogen über Dianova, Hamburg)

Mounting Medium, Vector Laboratories, Vectashield Hard Set, Peterborough, United Kingdom

Aqua ad iniectabilia, Delta Select GmbH, Pfullingen

Methanol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Pferdeserum, PAA, Pasching, Österreich

3.1.3.5 Plasmid-Klonierung

pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit, Invitrogen, Karlsruhe: enthält TOPO® Vektor, Salt
Solution, SOC Medium, Primer

LB Medium, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

E.coli Bakterien, One shot®TOP10, Invitrogen, Karlsruhe

Ampicillin, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Agar, SELECT Agar powder, Invitrogen, Karlsruhe

NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, Karlsruhe

Primärantikörper: Maus-Anti-V5-TAG monoklonaler Antikörper, AbD Serotec, Düsseldorf

Sekundärantikörper: CyTM5-conjugated Affini Pure Ziege Anti-Maus IgG, Jackson Immuno
Research, Suffolk, United Kingdom (bezogen über Dianova, Hamburg)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden als Dauerkultur im Quantum 263 Zellkulturmedium unter Standardbedingungen (5% CO₂, 100% relative Luftfeuchtigkeit, 37°C) gehalten. Für die Versuchsreihen wurden in 6-well Platten je Kammer 5 x 10⁵ Zellen ausgesät. Nach einer erneuten Inkubationszeit von mindestens 24 h wurden dann die entsprechenden Mengen an Chemikalien hinzugegeben (siehe Ergebnisse). Es wurden entweder Zeitreihen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten oder Konzentrationsreihen angelegt. Vor der Weiterverarbeitung wurde das Medium schließlich aus den 6-well-Platten entfernt und die Zellen einmal in PBS gewaschen.

3.2.2 RNA-Extraktion

Die RNA wurde mithilfe der Trizol-Methode aus den Zellen gewonnen. Das Arbeiten mit der Trizol-Methode erfolgte unter der Abzugshaube. In jede Kammer der mit Zellen beimpften 6-well-Platten wurde 1ml Trizol zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden gelöst. Das Lysat wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt um für 5 min bei Raumtemperatur zu ruhen. Anschließend wurden 200µl Chloroform zugemischt und die Gefäße per Hand gut geschüttelt. Nach 2-3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 12000x g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase, in der sich die mRNA befand, wurde nun vorsichtig in ein neues Eppendorf Gefäß abpipettiert. Dann wurden 500µl Isopropylalkohol zugegeben und mit der Pipette vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur folgte wieder das Zentrifugieren bei 12000 x g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das Pellet mit 500µl 75% Ethanol gewaschen und durch Vortexen gemischt. Bei 7500 x g wurde es erneut für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand entfernt und das Pellet für 5-10 min stehen gelassen um zu trocknen. In 16,5µl DEPC-H₂O wurde das Pellet schließlich gelöst und auf Eis gekühlt.

3.2.3 Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

3.2.3.1 Umschreibung RNA in cDNA

Durch Reverse Transkription wird RNA in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. An den für messenger-RNA (mRNA) typischen poly-A Schwanz des 3'-Endes bindet sich ein komplementärer oligo-dT Primer und ermöglicht dadurch dem Enzym Reverse Transkriptase eine Abschrift der mRNA zu erstellen.

0,75µl des Primers wurden hierfür zu 16,5µl RNA gegeben und für 5 min bei 70°C inkubiert, danach auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 5µl Puffer, 1,25µl des Nukleotid Mix, 0,5µl Ribonuklease Inhibitor und 1µl Reverse Transkriptase hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 42°C 60 min inkubiert und schließlich auf Eis gekühlt.

Primer (oligo-dT)	0,75 µl
RNA	16,5 µl
Puffer	5 µl
Nukleotid Mix	1,25 µl
Ribonuklease Inhibitor	0,5 µl (20U)
Reverse Transkriptase	1 µl (200U)
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 1: Ansatz Umschreibung RNA in cDNA

3.2.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in Vitro*-Methode um selektiv kleinste DNA-Mengen eines bestimmten Gen- bzw. Sequenzabschnittes zu amplifizieren. Die Art der Amplifikation basiert auf der Abfolge von drei Reaktionsschritten: der Hitzedenaturierung von DNA-Doppelsträngen, der Anlagerung von Oligonukleotiden (Annealing) und der enzymatischen Verlängerung der DNA-Einzelstränge (Elongation). Der erste Schritt dient

der Auftrennung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge, so dass sich im zweiten Schritt die Oligonukleotid-Primer an ihre komplementären Sequenzen anlagern können. Mithilfe einer DNA-Polymerase (hitze stabile Taq-DNA-Polymerase, aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert) erfolgt die DNA Synthese der gewünschten Abschnitte beider Stränge in 5'-3'-Richtung. Sie beginnt dabei am 3'-Ende des angelagerten Primers. Kennt man die Nukleotidsequenzen am Anfang und am Ende des gewünschten Bereiches, setzt man spezifische Primer als Startpunkte für die Polymerase ein. Durch wiederholte Zyklen dieser Reaktionsschritte ist eine exponentielle Vermehrung von DNA-Einzelsträngen komplementär zu einem vorliegenden DNA-Einzelstrang möglich, da jeder Zyklus zu einer Verdopplung der im Reaktionsansatz befindlichen zu untersuchenden DNA-Sequenzen führt.

	Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1	94°C	5 min
Amplifikation:			
Denaturierung		94°C	1 min
Annealing	23-36	57-63°C	1 min
Elongation		72°C	1 min
Finale Elongation	1	72°C	10 min

Tabelle 2: Reaktionsprotokoll PCR

1µl cDNA wurde in einem sterilen Reagiergefäß mit 12,5µl PCR Master Mix (Taq-Polymerase, dNTPs), 10,5µl sterilem Wasser und 1µl Primer Mix durch Auf-und Abpipettieren gemischt. Anschließend wurde das Röhrchen mit dem Gesamtvolumen von 25µl in den Thermocycler

gegeben. Die Zyklenzahl und Temperatur für die Anlagerung des Primers variierten je nach verwendetem Primer (siehe Tabelle 4).

cDNA	1 µl
Primer Mix (Vorwärts-und Rückwärtsprimer + H ₂ O im Verhältnis 1:1:18)	1 µl
PCR Master Mix	12,5 µl
Steriles Wasser	10,5 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 3: Ansatz Polymerasekettenreaktion

Primer	Zyklenzahl	Annealing-Temperatur
ATF4	23	57°C
β-Actin	25	57°C
CHOP	29	57°C
ADM2, ATF3, Inhibine α, βA, βB, βC, βE, SESN2	32	57°C
XBP1	36	63°C

Tabelle 4: PCR-Konditionen

Genname	Primersequenz forward	Primersequenz reverse	Amplifikat- länge
Inhibin α	5`-CTCCAGCCACAGATGCCAGC-3`	5`-CTCTCTCCCCTCCACTGGGTG-3`	412bp
Inhibin βA	5`-GTTTGCCGAGTCAGGAACAGCCAG-3`	5`-GAGGAAAGGTCTGTGCGACTG-3`	505bp
Inhibin βB	5`-CTTCGCCGAGACAGATGGCCTCGC-3`	5`-GTAGTAGCCGGTGGGTGCTATGAT-3`	545bp
Inhibin βC	5`-GCTGAGACAGGCCTCTCCACC-3`	5`-CTCCAGTGGTGCCTGCAGCT-3`	634bp
Inhibin βE	5`-GCTACTGTCACAGACTCCACT-3`	5`-GCTGCAGCCACAGGCC TCCAC-3`	765bp
β-Actin	5`- GGAGAAGCTGTGCTACGTCG-3`	5`-CGCTCAGGAGGAGCAATGAT-3`	366bp
ADM2	5`-CCGCCATGGCCCGGATCCCG-3`	5`AGCCATAGCTGTGGGGGCTGCT-3`	450bp
ATF4	5`-CCGCAACATGACCGAAATGAGC-3`	5`-GGGGACCCTTTTCTTCCCCT-3`	1060bp
ATF3	5`- AGCAAATGATGCTTCAACAC -3`	5`- GCTCTGCAATGTTCTTCTTTC-3`	553bp
CHOP	5`-CTGCAGAGATGGCAGCTGAGTC-3`	5`-TGCTTGGTGCAGATTCACCATTC-3`	515bp
XBP1	5`-GAAGAGGAGGCGGAAGCCAAG-3`	5`- GAATGCCCAACAGGATATCAG -3`	189/163bp
SESN2	5`-CCAGGCAGCCTATAGCCTCAC-3`	5`-GGTCATATAGCGGGTAATG-3`	1447bp

Tabelle 5: Primersequenzen: etabliert von Dr. Ansgar Brüning, synthetisiert über biomers.net

3.2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäure-Strängen nach ihrer Größe. Es bezeichnet die Wanderung geladener Teilchen durch ein elektrisches Feld. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch das Gel in Richtung der positiv geladenen Anode, je nach Größe

und Ladung der Moleküle unterschiedlich schnell. Durch den im Gel eingelagerten Farbstoff wird die DNA im UV-Licht sichtbar. Die DNA-Proben wurden in einem vorgefertigten 2% Agarosegel aufgetrennt. Je 10µl der gewonnenen DNA wurde mit 1µl Ladepuffer (65% Sucrose, 10mM Tris-HCl [pH 7.5], 10mM EDTA, 0.3% Bromphenolblau) gemischt und mithilfe von Pipetten in die Taschen des Gels eingeführt. In die erste Tasche des Gels wurde ein DNA-Marker zum Ablesen der Bandengröße gefüllt. Die Laufzeit des Gels unter Stromanschluss betrug circa 15 min. In einem Geldokumentationsgerät wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und für die optische Auswertung fotografiert.

3.2.5 Real-time-PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese erlaubt die Real-Time-PCR die Messung der entstehenden PCR-Produkte bereits während der Amplifikation mithilfe fluoreszenzmarkierter Oligonukleotiden. Die meisten der gewöhnlich verwendeten fluorogenen Oligonukleotide basieren auf dem Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) zwischen zwei fluorogenen Molekülen. Hier gibt ein Donor-Fluorchrom (Reporter), angeregt durch eine Lichtquelle, Energie an ein Akzeptor-Fluorchrom (Quencher) ab. Bei der Verwendung des TaqMan-Assays kommt eine doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde zum Einsatz. Diese Sonde ist an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. TAMRA und FAM) markiert. Der Quencher am 3'-Ende der TaqMan Sonde unterdrückt die Fluoreszenz des Reporters am 5'-Ende. Die Energie des Donor-Fluorochroms wird bei räumlicher Nähe zum Quencher von diesem "geschluckt", so dass keine Fluoreszenz detektierbar ist. Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die nach Anregung des Reporters nun emittierte Fluoreszenz einer definierten Wellenlänge kann mit einer Kamera gemessen werden. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten.

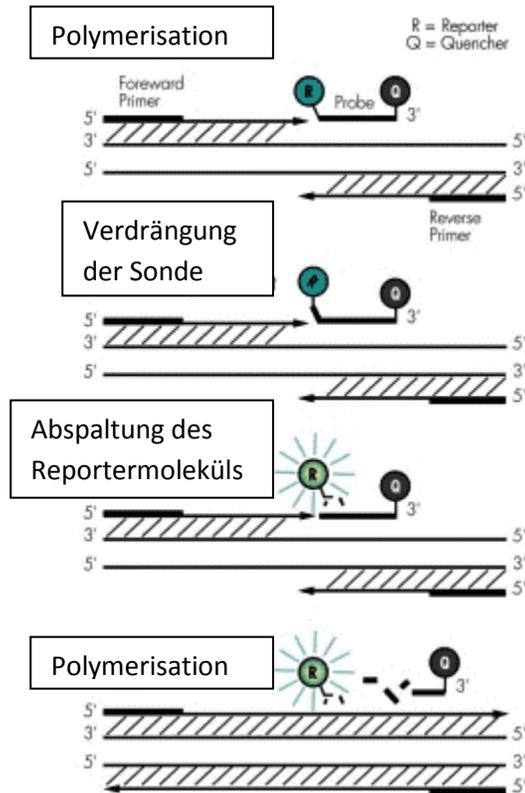


Abbildung 7: Real-time-PCR (IBA Lifesciences)

Nach jedem Zyklus wird die emittierte Fluoreszenzmenge vom PCR Gerät erfasst und sofort in ein Real-time-PCR Diagramm übertragen. Es entsteht eine Kurve, die in drei Phasen untergliedert werden kann: eine exponentielle, eine lineare und eine Plateau Phase (Abbildung 8). In der exponentiellen Phase verdoppeln sich die PCR Produkte nach jedem Zyklus und sind noch reichlich vorhanden. In der linearen Phase beginnen sie auszugehen und die PCR Reaktion verlangsamt sich. In der Plateau Phase kommt die Reaktion zu stoppen, da die DNA Moleküle aufgebraucht sind. Im Vergleich zur konventionellen PCR, die die Amplifikation am Ende der Plateau Phase misst, konzentriert sich die Real-time-PCR auf die exponentielle Phase. Sie liefert die präzisesten Daten für die Quantifizierung. In dieser Phase werden zwei Werte berechnet: der festgelegte Schwellenwert (in Abbildung 8 als grüne Threshold line dargestellt), der eine bestimmte Fluoreszenzintensität voraussetzt und der Threshold-Zyklus (engl.: cycle threshold oder Ct-Wert), der Schnittpunkt der Amplifikationsgraphen mit der Threshold line.

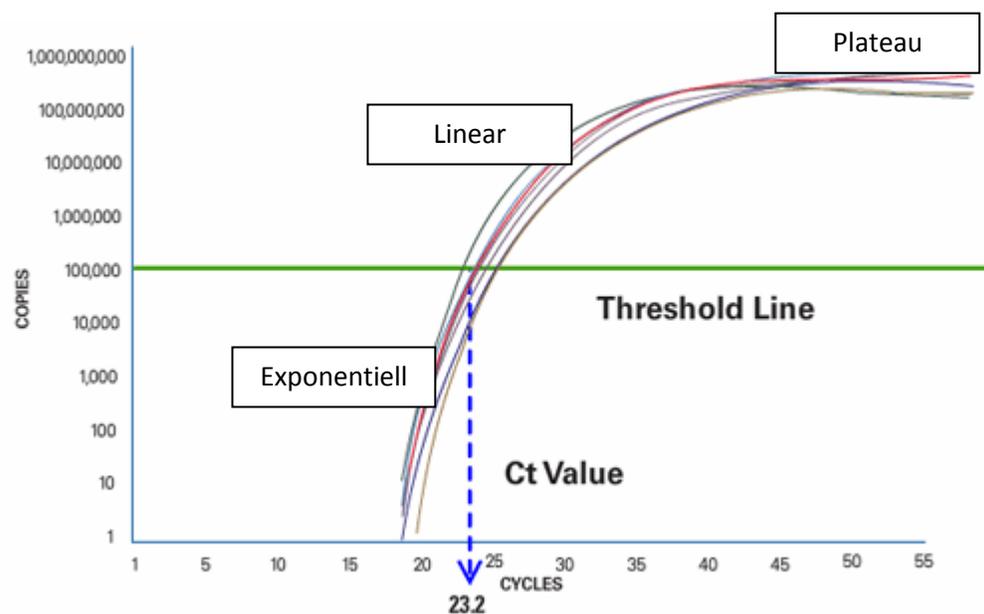


Abbildung 8: Diagramm der Real-time PCR (Applied Biosystems 2011)

Für die Real-time-PCR wurde 1µl cDNA mit 1µl Primer, 12,5µl Real-time-PCR Master Mix (AmpliTaQ Gold DNA Polymerase, dNTPs, Puffer) und 10,5µl sterilem Wasser vermischt und in einer 96-well-Platte in den Thermocycler gegeben. Als Primer wurden β -Actin und XBP1 (siehe Primersequenzen Tabelle 5) verwendet, die die TaqMan Sonden 6-FAM-TCCTTCCTGGGCATGGAGTC-TAMRA für β -Actin und 6-FAM-GCTGAGTCCGCAGCAGGTG-TAMRA für XBP1 (siehe Kapitel 4.5, Abbildung 20) miteinschließen.

cDNA	1 µl
Primer	1 µl
Real-time-PCR Master Mix	12,5 µl
Steriles Wasser	10,5 µl
Gesamtvolumen	25µl

Tabelle 6: Ansatz Real-time-PCR

	Zyklenanzahl	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1	95°C	20 sec
Amplifikation:			
Denaturierung	40	95°C	3 sec
Annealing + Elongation		60°C	30 sec

Tabelle 7: Reaktionsprotokoll Real-time-PCR

3.2.6 Microarray

Zur Genanalyse von mit Nelfinavir inkubierten Jurkatzellen wurde von der IMG M Laboratories GmbH, Lochhamer Str. 29, 82152 Martinsried, Deutschland, vor Beginn meiner Doktorarbeit im Auftrag des Forschungslabors ein Microarray durchgeführt. Mithilfe der Microarray Technologie ist es möglich, die Expression zahlreicher Gene parallel nebeneinander zu analysieren. Der Microarray wurde von der Firma IMG M als sogenannte „Whole Genome“ Microarray Analyse mit sogenannten Affymetrix-Chips durchgeführt, d.h. dass das gesamte menschliche Genom untersucht werden kann. Die Proben wurden von Mitarbeitern des Forschungslabors aufbereitet, die Genchiphybridisierung und Bioinformatik-Analyse wurde von den IMG M Laboratorien vorgenommen. Jurkatzellen wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml sechs Stunden mit Nelfinavir behandelt und die gewonnene mRNA auf regulierte Gene gescreent.

3.2.7 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, bei der bestimmte Proteine mithilfe von an Farbstoffmoleküle gebundenen Antikörper markiert und sichtbar gemacht werden. Bei der hier angewandten indirekten Methode erfolgt im ersten Schritt die Anbindung von spezifischen

Antikörpern (erzeugt in Kaninchen) an das zu untersuchende Protein. Im zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper (erzeugt in Ziege, Anti-Kaninchen) hinzugegeben, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Der Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Carbocyanin 5) markiert. Die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe können so im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden.

Für die Immunfluoreszenz wurden in eine 8-Kammer-Platte je 5×10^3 Zellen pro Kammer gesät und bei 37°C für ca. 24 h inkubiert. Je nach Experiment wurden den Zellen dann die verschiedenen Chemikalien zugefügt (siehe unten). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Methanol fixiert, indem man -20°C kaltes Methanol 5 min zu den Zellen gab. Anschließend wurde das Methanol wieder durch PBS ersetzt, so dass die Zellen rehydrieren konnten. Nach 5 min wurde das PBS abgenommen und die Zellen mit dem Antikörper ADM2 (1:200 in PBS/5% Pferdeserum verdünnt) für 1,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen, 1:200 in PBS/5% Pferdeserum verdünnt) zugegeben wurde. Es folgte eine Inkubation von einer $\frac{3}{4}$ h. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und zuletzt einmal mit destilliertem Wasser gespült. Schließlich wurden die Kammern von der Platte entfernt und *mounting* Medium zum Fixieren der Zellen auf die Platte gegeben. Zuletzt wurde eine Deckplatte aufgelegt und die Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Zellen	Substanz	Inkubationszeit
HeLa	Tunicamycin	6h
HeLa	DTT	6h
HeLa	Nelfinavir	24h

Tabelle 8: Inkubationszeiten Immunfluoreszenz

3.2.8 Plasmidklonierung und Transfektion

3.2.8.1 PCR Klonierung

Bei der Plasmid-Klonierung werden DNA-Fragmente mithilfe eines Vektors (Plasmid) in Wirtszellen (Bakterien) eingeschleust und vermehrt. Plasmide sind kurze ringförmige DNA Moleküle, die sich in Bakterien unabhängig vom Bakterienchromosom replizieren können. Der hier verwendete pcDNA3.1V5-His Vektor hat einen 3' Thymin (T)-Überhang. Die in der PCR eingesetzte Taq-Polymerase, die eine Transferase-Aktivität besitzt, knüpft immer ein Adenin (A) an das 3' Ende des PCR Produktes an. An den T-Überhang des Vektors bindet sich das überhängende A des PCR Produkts. Die Ligation erfolgt mit einer im Vektor-integrierten Topoisomerase I. Plasmidvektoren enthalten zudem ein Antibiotikaresistenzgen, das eine Selektion plasmidtragender Bakterien erlaubt. Nach der Ligation werden die entstandenen Hybridmoleküle in Bakterienzellen überführt (Transformation) und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Dies ermöglicht die Selektion resistenter und somit plasmidtragender Bakterien. Jede entstandene Kolonie repräsentiert die Nachkommen einer Zelle (Klon). Durch Anzucht der Bakterienklone kann dieses Fragment beliebig vermehrt werden. Für die PCR Klonierung wurde der pcDNA3.1V5-His TOPO^R Expression Kit (Invitrogen) verwendet.

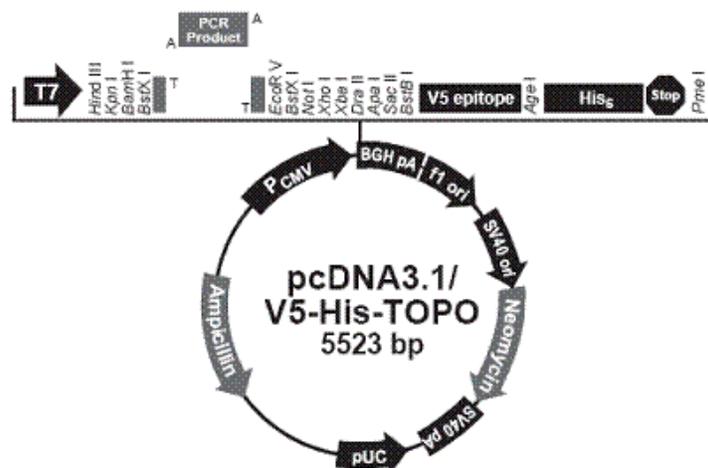


Abbildung 9: pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] Vektor: er enthält Gene für das V5 Epitop und die Ampicillin Resistenz, den T7 und CMV Promotor sowie ein BGH Polyadenylierungssignal (Invitrogen 2009).

Es wurden laut Anleitung 1µl cDNA, 1µl TOPO^R Vektor, 1µl Salt Solution und 2µl H₂O gemischt. Außerdem wurde eine Kontrolle ohne cDNA angesetzt. Anschließend wurden E.coli Bakterien (One shot[®]TOP10, Invitrogen) zugegeben und das Gemisch auf Eis gekühlt. Dann wurde es für 1min auf 42°C erhitzt und wieder auf Eis gekühlt. Nach dem Hinzufügen von 200µl SOC Medium (Invitrogen) wurde der Ansatz bei 37°C 1h inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Agarplatten, die Ampicillin enthielten, verteilt, so dass über Nacht die Bakterienkolonien wachsen konnten. 50ml LB Medium wurde mit 100µl Ampicillin vermischt und je 200µl des Gemisches in Eppendorf Röhrchen verteilt. Von den Agarplatten wurde je eine Bakterienkolonie gepickt, mit einer Pipette in diese Röhrchen überführt und über Nacht inkubiert. Es war möglich, dass sowohl plasmidtragende Bakterien entstehen, die richtige Inserts enthalten als auch Kolonien mit teilweise oder verkehrt herum inserierten PCR-Produkten. Deswegen erfolgte eine Kontrolle durch PCR. In einem ersten Schritt wurde die PCR mit den T7 forward- BGH reverse Primer durchgeführt, um zu bestimmen, welche Kolonien das Plasmid mit dem PCR-Produkt intakt beinhalteten und welche nicht. (32 Zyklen, 57°C, Primer siehe Tabelle 9, PCR Protokoll siehe Kapitel 3.2.3.2).

Primer	Primersequenz
T7 forward	5´-TAATACGACTCACTATAGGG-3´
BGH reverse	5´-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3´
ATF4 reverse	5´-GGGGACCCTTTTCTTCCCCT-3´

Tabelle 9: Primersequenzen PCR Klonierung

Um die Plasmide zu selektieren, die die cDNA in der korrekten Richtung trugen, wurde eine zweite PCR durchgeführt. Hierfür wurden die T7 forward- ATF4 reverse Primer verwendet (36 Zyklen, 57°C, Primer siehe Tabelle 9, PCR Protokoll siehe Kapitel 3.2.3.2).

Nach positivem Ergebnis in der PCR wurden 30µl der Bakterien in LB Medium entnommen und zu 5ml reinem LB Medium (mit Ampicillin gemischt) gegeben, geschüttelt und wiederum über Nacht inkubiert. Nun wurde mit dem NucleoSpin^R Plasmid Kit von Macherney-Nagel, laut deren Protokoll, die Plasmid-DNA gereinigt und gewonnen.

3.2.8.2 Transfektion

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Dies ist mittels verschiedenster Verfahren (z.B. Mikroinjektion, Elektroporation, Calcium-Phosphat-Präzipitation, etc.) möglich. Hier wurde die Lipofektion angewandt. Mithilfe von Liposomen wird das genetische Material in die Zellen eingebracht. Liposomen sind Moleküle mit einer äußeren Lipid-Doppelschicht und einer wässrigen inneren Phase, welche die Plasmide aufnehmen kann. Je 6µl der gewonnenen Plasmide wurden zu 25µl serumfreiem Medium gegeben. Lipofectamine (Invitrogen) wurde im Verhältnis 1:50 ebenfalls mit serumfreiem Medium gemischt. Hiervon wurden je 25µl zu den im Medium gelösten Plasmiden gegeben. Das Gemisch musste nun 10 min ruhen, bevor es auf die Zellen in einer 8-Kammer-Platte verteilt wurde. Die Zellen wurden einen Tag zuvor angesetzt. Die Plasmide wurden dann zusammen mit den Zellen über Nacht mindestens 24 h bei 37°C inkubiert. Entweder wurden anschließend die Zellen mit Methanol fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet (siehe Kapitel 3.2.7 Immunfluoreszenz) oder sie wurden durch die Reverse-Transkription-PCR analysiert.

Als Primärantikörper bei der Immunfluoreszenz kam ein V5-Antikörper zur Verwendung, da auf dem Vektor ein hochimmunaffines V5 Epitop integriert ist. Der Sekundärantikörper war ein Ziege Anti-Maus IgG.

Für die Reverse-Transkription-PCR wurden Primer von ADM2, ATF3, ATF4, CHOP und β -Actin verwendet (Primersequenzen siehe Tabelle 5). Für den Nachweis der ATF4 Transkription aus dem pcDNA3.1 Expressionsplasmid wurde ein Vorwärtsprimer verwendet, der sich an den CMV Promotor des pcDNA3.1 Vektors bindet, kombiniert mit dem Rückwärtsprimer von ATF4 (CMV forward: 5`-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3`).

4 Ergebnisse

4.1 Microarray Analyse Nelfinavir regulierter Gene

Nelfinavir führt in Tumorzellen über ER Stress zur Apoptose. Dieser Mechanismus wurde bereits in verschiedensten Krebsarten beschrieben, darunter beispielsweise Lungenkarzinome, Gliome und Ovarialkarzinome (Gills et al. 2007; Pyrko et al. 2007; Brüning et al. 2009). In unserer Arbeitsgruppe wurde in Vorarbeiten beobachtet, dass Nelfinavir in einer Konzentration zwischen 4 und 10 µg/ml in Leukämiezellen wie Jurkat- und IM9-Zellen zum Zelltod führt (Brüning et al. 2010). Auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie (B- CLL) ist bekannt, dass ER Stress Induktoren zum programmierten Zelltod führen (Rosati et al. 2010). Der zum Zelltod führende Mechanismus ist aber sowohl bei epithelialen Tumorzellen als auch bei Leukämiezellen weitgehend unverstanden geblieben. Um die Wirkung von Nelfinavir auf leukämische Krebszellen besser zu verstehen, wurde darum eine Microarray Analyse mit Nelfinavir behandelten Jurkat-Zellen (T-Zell-Leukämie Zelllinie) veranlasst. Der Microarray, der aus technischen Gründen im eigenen Labor nicht vorgenommen werden konnte, wurde von der Firma IMGGM als sogenannte „Whole Genome“ Microarray Analyse durchgeführt. Es wurden dazu RNA Präparationen von drei unbehandelten Jurkat Zellpopulationen (jeweils 500.000 Zellen) genommen und mit drei mit Nelfinavir behandelten Zellpopulationen verglichen. Diese Probenanzahl stellte die für eine biostatistische Analyse (vorgenommen von Statistikern der IMGGM) mindestnotwendige Anzahl dar. 124 hochregulierte Gentranskripte mit einem cut-off ≥ 2 konnten durch die Microarray Analyse identifiziert werden. Die 25 am stärksten durch Nelfinavir hochregulierten Gene sind in Tabelle 10 zusammengefasst:

Rang	Abkürzung	Beschreibung des Gens	x-fold-change
1	GDAP1L1	Homo sapiens ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	39,86
2	SULT6B1	Homo sapiens sulfotransferase family, cytosolic, 6B, member 1	38,93
3	TSC22D3	Homo sapiens TSC22 domain family, member 3	25,34
4	RNU4ATAC	Human liver regeneration after partial hepatectomy Homo sapiens cDNA	19,41
5	SLC6A9	Homo sapiens solute carrier family 6	17,0
6	CHAC1	Homo sapiens ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	15,97
7	ZNF391	Homo sapiens cDNA clone	14,12
8	FUT1	Homo sapiens fucosyltransferase 1	13,85
9	RHOB	Homo sapiens ras homolog gene family	13,10
10	GPT2	Homo sapiens glutamic pyruvate transaminase	10,52
11	SLC7A11	Homo sapiens solute carrier family 7	10,43
12	SESN2	Homo sapiens sestrin 2	9,81
13	VEGF A	Homo sapiens vascular endothelial growth factor A	9,19
14	ASNS	Homo sapiens asparagine synthetase	8,75
15	MS4A7	Homo sapiens membrane-spanning 4-domains	8,54
16	SCML4	Homo sapiens sex comb on midleg-like 4	8,08
17	VLDLR	Homo sapiens very low density lipoprotein receptor	8,07
18	ADM2	Homo sapiens adrenomedullin 2	7,62

19	PAX6	Homo sapiens paired box 6	7,32
20	ATF3	Homo sapiens activating transcription factor 3	7,31
21	IL2	Homo sapiens interleukin 2	6,97
22	ASS1	Homo sapiens argininosuccinate synthetase 1	6,38
23	FBXO32	Homo sapiens F-box protein 32	6,1
24	CCL3	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 3	6,06
25	LMO2	Homo sapiens LIM domain only 2	5,82

Tabelle 10: Durch Nelfinavir in Jurkat-Zellen hochregulierte Gentranskripte

Da bei der großen Vielfalt an Genen nicht auf alle eingegangen werden konnte, wurden die Gene nach ihrer Relevanz selektiert. Dabei ließen sich mehrere Gruppen bilden, darunter beispielsweise eine Gruppe von ER Stress Proteinen und eine Gruppe von Wachstumsfaktoren bzw. Peptidhormonen.

Die zwei am stärksten hochregulierten Gene sind jedoch GDAP1L1 (*ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*) und SULT6B1 (Sulfotransferase 6). GDAP1L1, dessen ursprünglicher und darum offizieller Name etwas irreführend ist, gehört funktionell zu den Glutathion-S-Transferasen, die eine zentrale Rolle beim Abbau körperfremder organischer Stoffe spielen (Noack et al. 2012; Shield et al. 2006). Auch Sulfotransferasen sind Enzyme, die ihre Funktion u.a. in der Entgiftung haben (Takahashi et al. 2009). Es wurde durch den Microarray also eine Gruppe von Genen identifiziert, die offensichtlich der Detoxifizierung von Nelfinavir in Tumorzellen dienen. Interessanterweise gibt es aber zur Entgiftung von Nelfinavir in Tumorzellen noch keine Studien.

CHAC1, SESN2 und ATF3 gehören zur Gruppe der ER-Stress-Proteine. CHAC1 wird stark hochreguliert und liegt auf Rang 6. CHAC1 (*cation transport regulator-like protein 1*) ist ein unlängst entdecktes Gen, das durch ER Stress induziert und durch ATF4 reguliert wird. Es ist ein

Ausläufer des ATF4-ATF3-CHOP-Signalwegs und könnte den proapoptischen Effekt dieser Transkriptionsfaktoren herbeiführen (Mungrue et al. 2009).

SESN2 (Sestrin 2, auch Hi95 genannt, Rang 12) gehört zur Familie der Sestrine und somit auch zur Gruppe der Stress-induzierten Proteine. Sie wirken als „Beschützer“ der Zellen (Budanov et al. 2002). Zum einen sind sie Antioxidantien (Budanov et al. 2004), zum anderen inhibieren sie die Aktivität von TOR (*target of rapamycin complex 1*). TOR ist eine Proteinkinase, die Zellwachstum und Zellmetabolismus reguliert, um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten (Lee et al. 2010).

ATF3 ist ebenfalls ein beschriebenes ER Stress Protein (siehe Kapitel 1.4.2) und liegt auf Rang 20. Die im Rahmen dieser Arbeit interessanteste Gruppe bilden jedoch die Wachstumsfaktoren und Peptidhormone. Hierzu gehören IL2, VEGF A und ADM2.

IL2 (Interleukin 2, Rang 21) ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor. Es stimuliert die Produktion verschiedenster Abwehrzellen (Bachmann and Oxenius 2007).

Der Wachstumsfaktor VEGF A (*vascular endothelial growth factor A*, Rang 13) spielt in der Vaskulogenese, Angiogenese und im endothelialen Zellwachstum eine wichtige Rolle (Yla-Herttuala et al. 2007).

Das Gen, auf das allerdings im Rahmen dieser Arbeit das Hauptaugenmerk gerichtet wurde, ist das Peptidhormon ADM2. Es liegt auf Rang 18 (7,6 fach hochreguliert). Wie VEGF A führt auch ADM2 zur Neoangiogenese. Die Tumorgenese ist stark von der Neubildung von Blutgefäßen abhängig. Während der Wachstumsfaktor VEGF A bereits vielfach untersucht und beschrieben wurde, gibt es über die Funktion von ADM2 bei der Tumorprogression wenige Daten. Auch die Regulation der Transkription von ADM2 ist nicht ausreichend geklärt. Deswegen sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit die durch ER Stress induzierte Hochregulation von ADM2 genauer untersucht werden.

4.2 PCR Analysen zur Validierung des Microarrays

4.2.1 ADM2 Hochregulation in Jurkat-Zellen

ADM2 wurde im Microarray stark hochreguliert. Um diese vorläufigen Ergebnisse zu bestätigen, wurden PCR Analysen durchgeführt. Jurkatzellen wurden in verschiedenen Konzentrationen mit Nelfinavir inkubiert. Die Konzentration von 2,2µg/ml wurde bei HIV-Patienten als durchschnittlicher therapeutischer Serumspiegel festgelegt und 3,2µg/ml ist die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) (Brüning et al. 2010). Höhere Konzentrationen von > 5µg/ml führen in leukämischen Tumorzellen bereits zur Apoptose (Brüning et al. 2010) und sind wegen einer möglichen Tumorbehandlung von Bedeutung. Die Einwirkungszeit auf die Zellen mit Nelfinavir betrug sechs Stunden. Anschließend wurde die RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach Zugabe des spezifischen Primerpaares für ADM2.

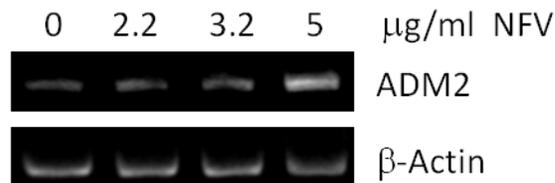


Abbildung 10: Jurkat-Zellen mit Nelfinavir

In Abhängigkeit der Konzentration ist hier eine deutliche Induktion von ADM2 bei höheren Nelfinavirkonzentrationen zu beobachten (Abbildung 10). Genau wie im Microarray findet eine Hochregulation des Peptidhormons, durch Nelfinavir eingeleitet, statt. Die bei HIV-Patienten normalerweise maximal erreichte Konzentration von 3,2µg/ml erzeugt bei Jurkat-Zellen jedoch noch keine Hochregulation von ADM2.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden PCR Analysen von Jurkatzellen mit und ohne Zugabe einer auf 8 µg/ml erhöhten Konzentration von Nelfinavir gemacht. Um zu sehen, ob die Hochregulation des Peptidhormons ADM2 an die Induktion der ER Stress Reaktion gekoppelt ist, wurden gleichzeitig die ER Stress Transkriptionsfaktoren CHOP, ATF4 und ATF3 untersucht (Abbildung 11). Außerdem wurde eine PCR Analyse des Peptidhormons Inhibin βE mit durchgeführt, da auch dieses, wie sich in Vorarbeiten gezeigt hat, nach Nelfinavirzugabe hochreguliert wird.

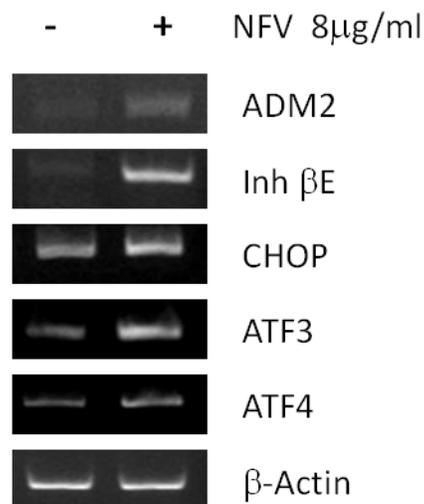


Abbildung 11: Jurkat-Zellen mit/ohne Nelfinavir

Bei den Jurkatzellen mit bzw. ohne Nelfinavir zeigt sich eine Induktion der Peptidhormone; deutlich bei Inh βE, etwas schwächer, dennoch aber zu sehen bei ADM2. Auch die ER Stress Proteine CHOP, ATF4 und ATF3 lassen nach Zugabe von Nelfinavir eine verstärkte Expression erkennen. Diese ist bei CHOP und ATF3 ausgeprägter als bei ATF4.

4.2.2 ADM2 Hochregulation in epithelialen Tumoren

Um zu untersuchen, ob die bei Jurkat-Zellen beobachtbare ADM2 Induktion auch auf epitheliale Tumore übertragbar ist, wurde nun die gynäkologische Zelllinie MCF7 (Mammakarzinom) für die PCR Analyse aufbereitet. Wieder wurde eine Konzentrationsreihe angelegt. Während bei den leukämischen Zelllinien eine Konzentration von 4 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ Nelfinavir bereits zur Apoptose führt (Brüning et al. 2010), ist bei den epithelialen Tumorzellen eine höhere Konzentration von 8 bis 15 $\mu\text{g/ml}$ Nelfinavir nötig (Brüning, 2011). Neben den Primern für die Peptidhormone, wurden Primer der ER Stress Proteine CHOP und XBP1 eingesetzt (Abbildung 12).

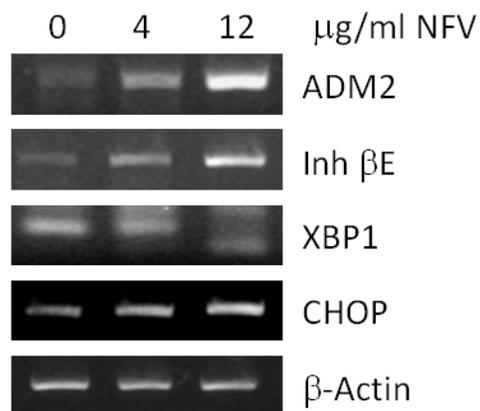


Abbildung 12: MCF7-Zellen mit Nelfinavir: Konzentrationsreihe

Es ist eine deutliche konzentrationsabhängige Induktion von ADM2 und Inh βE nach Nelfinavirzugabe zu erkennen. Diese ist stark an die Induktion der ER Stress Reaktion gekoppelt, was sich v.a. im Splicing von XBP1 widerspiegelt (sichtbar an der zweiten Bande in der Gelelektrophorese). Doch auch CHOP zeigt eine mit der Konzentration von Nelfinavir steigende Signalerhöhung. Da die Induktion der Peptidhormone sogar noch ausgeprägter ist als in den Leukämiezellen, wurde zusätzlich die epitheliale Zelllinie Hela (Zervixkarzinom) untersucht (Abbildung 13). Ähnlich wie bei den MCF7 Zellen ist wieder eine starke ADM2 und Inh βE Induktion zu sehen. Da die Neoangiogenese bei soliden Tumoren eine weitaus wichtigere Rolle spielt, ist es interessant zu beobachten, dass hier eine stärkere Induktion stattfindet.

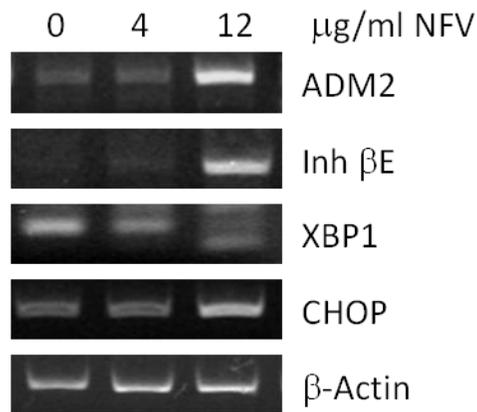


Abbildung 13: HeLa -Zellen mit Nelfinavir: Konzentrationsreihe

4.3 Zeitabhängige PCR Analysen der ER Stress Reaktion

4.3.1 MCF7-Zellen nach Nelfinavirbehandlung

Bisher wurde eine konzentrationsabhängige Induktion der Peptidhormone ADM2 und Inh βE mit starker Kopplung an die Induktion der ER Stress Reaktion nach Nelfinavirzugabe gezeigt. Um zu sehen, wie schnell die Induktion der Peptidhormone auf die ER Stress Reaktion folgt, wurden zeitabhängige PCR Analysen aufbereitet. Nelfinavir wurde hierfür in gleicher Konzentration (20µg/ml), aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu MCF7 Zellen gegeben. Die Einwirkzeit des Proteaseinhibitors auf die Zellen variierte dementsprechend zwischen zwei und acht Stunden (Abbildung 14). Zusätzlich zu den ER Stress Markern XBP1, ATF4, ATF3 und CHOP wurde an dieser Stelle auch SESN2 mit untersucht. SESN2 wurde in der Microarray Analyse stark hochreguliert. Um dieses Ergebnis zu validieren, erfolgten hier PCR Analysen.

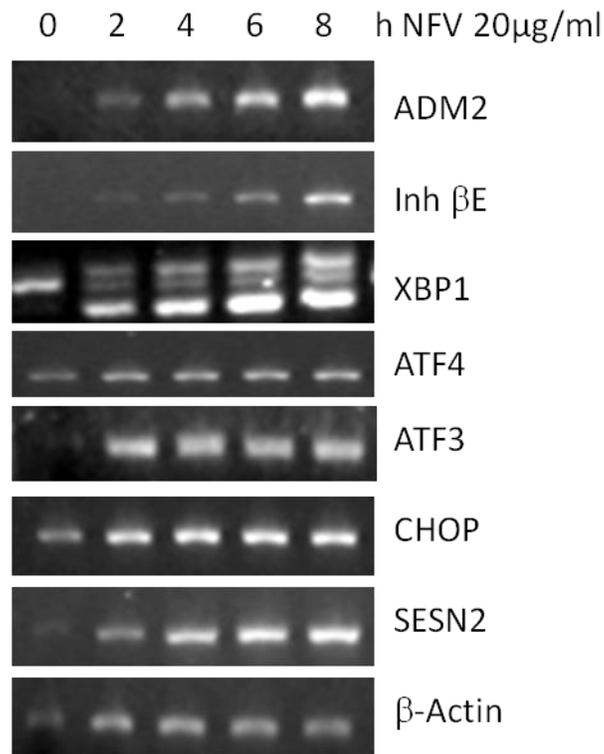


Abbildung 14: MCF7-Zellen mit Nelfinavir: Zeitreihe

Schon nach zwei Stunden Nelfinavireinwirkung auf die Zellen wird die ER Stress Reaktion ausgelöst, was hier am XBP1 Splicing deutlich sichtbar ist. Mit Beginn des Splicings ist auch eine Induktion der Peptidhormone erkennbar. Je länger die Nelfinavireinwirkung ist, desto stärker ist das Signal bei ADM2 und Inh βE. Auch die anderen ER Stress Proteine ATF4, ATF3 und CHOP werden nach Zugabe von Nelfinavir hochreguliert. Bereits nach zwei Stunden Nelfinavireinwirkung gibt es eine deutliche Signalerhebung. ATF4 zeigt dabei jedoch ein deutlich schwächeres Signal als ATF3 und CHOP. SESN2 wird wie in der Microarray Analyse ebenso in der PCR Analyse hochreguliert. Eine zeitabhängige Induktion ist hier ebenfalls zu beobachten.

4.3.2 MCF7-Zellen nach Behandlung anderer ER Stress Induktoren

Die vorausgegangenen Experimente haben gezeigt, dass der Proteaseinhibitor Nelfinavir die ER Stress Reaktion auslöst und gleichzeitig eine Induktion der Peptidhormone ADM2 und Inh β E bewirkt. Als nächstes wurde untersucht, ob dieser Effekt auf Nelfinavir beschränkt ist oder ob auch andere ER Stress Induktoren zu einer Hochregulation der Peptidhormone führen.

4.3.2.1 Tunicamycin

Tunicamycin (Glykosylierungsinhibitor) wurde in einer Konzentration von 2 μ g/ml zu MCF7 Zellen gegeben. Die Substanz wurde zwischen einer und vier Stunden auf den Zellen belassen, bevor diese dann für die PCR Analyse bearbeitet wurden (Abbildung 15).

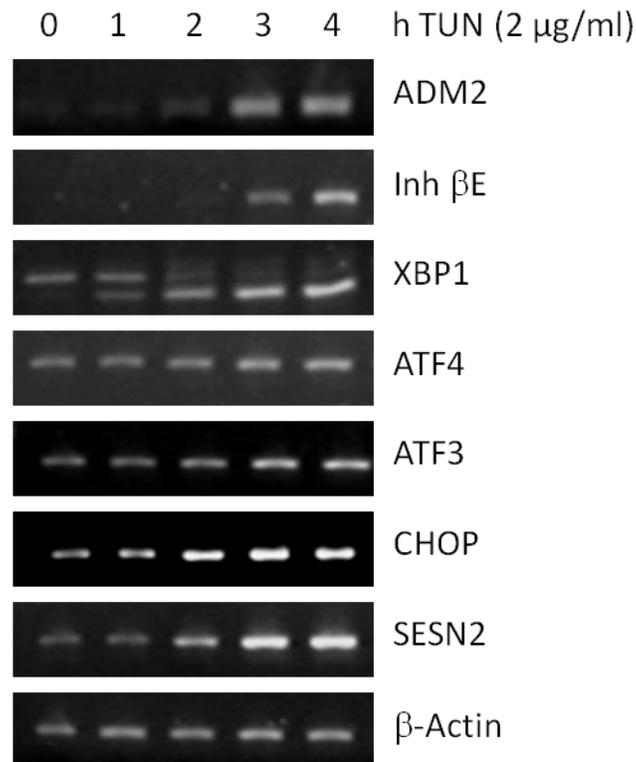


Abbildung 15: MCF7 mit Tunicamycin: Zeitreihe

Am XBP1 Splicing erkennbar wird bereits nach einer Stunde Einwirkzeit ER Stress ausgelöst. Auch die anderen ER Stress Proteine zeigen proportional zu der Zeit, in der Tunicamyzin auf die Zellen wirkt, eine Signalerhöhung. Bei ADM2 und Inh β E ist kurz darauf eine starke Induktion nach drei Stunden zu sehen.

4.3.2.2 Thapsigargin

Dieselbe Versuchsreihe wurde mit Thapsigargin (Ca^{2+} -ATPase -Hemmer), einem weiteren ER Stress Induktor, wiederholt. Wieder wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Chemikalie in einer Konzentration von 100nM zu MCF7 Zellen gegeben (Abbildung 16).

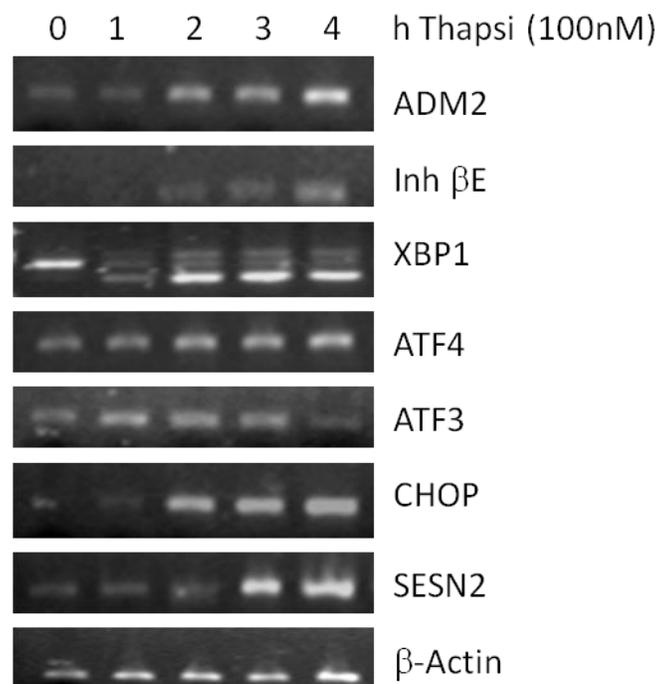


Abbildung 16: MCF7 mit Thapsigargin: Zeitreihe

Auch hier hebt sich bereits nach einer Stunde das XBP1 Splicing heraus. ATF4 zeigt eine über die gesamte Zeit langsame Signalerhöhung, CHOP und SESN2 zeigen eine starke Signalerhöhung nach zwei bzw. drei Stunden. ATF3 erfährt zuerst eine Hochregulation, die aber nach zwei Stunden wieder abnimmt. Bei ADM2 kommt es zu einer stetigen Zunahme des Signals, Inh β E hingegen lässt erst nach zwei Stunden ein schwaches Signal erkennen.

4.3.2.3 Quercetin

Die spezifische Induktion von ADM2 bzw. Inh β E durch ER Stress könnte diese Peptidhormone auch zu mögliche PCR Marker für die ER Stress Reaktion machen. Inh β E wurde von unserer Arbeitsgruppe auch kürzlich als möglicher Marker für sog. „drug-induced ER Stress“ beschrieben (Brüning et al. 2012). Es wurden darum verschiedene im Labor vorhandene Agenzien auf eine Induktion von ADM2 getestet. Dabei konnte u.a. das Flavonoid Quercetin, ein kürzlich von uns als Proteasom-Inhibitor identifiziertes natürliches Antioxidans (Klappan et al. 2012), als schwach ADM2 induzierendes Molekül identifiziert werden, was in Abb. 17 gezeigt ist.

MCF7 Zellen wurden dafür mit Quercetin in einer Konzentration von 100 μ M und unterschiedlichen Zeitdauern inkubiert.

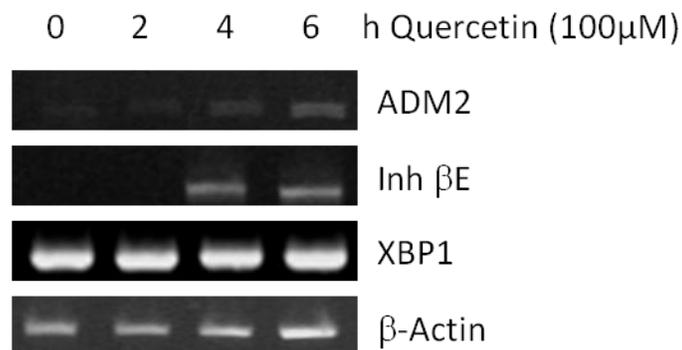


Abbildung 17: MCF7 mit Quercetin: Zeitreihe

Ein XBP1 Splicing lässt sich in der Gel-basierten PCR Analyse nicht darstellen. Weitere Untersuchungen (siehe Kapitel 4.5) konnten jedoch eine schwache Induktion der ER Stress Reaktion durch Quercetin mittels Real-time-PCR aufzeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur Nelfinavir, sondern auch andere ER Stress Induktoren wie Tunicamycin, Thapsigargin und Quercetin zu einer Induktion der Peptidhormone ADM2 und Inh β E führen. Die Hochregulation von ADM2 ist demnach eine generelle Reaktion auf ER Stress und nicht spezifisch von der Nelfinavir Behandlung abhängig.

4.4 Inhibin β E Hochregulation im Vergleich mit anderen Inhibinen

Von allen fünf Untereinheiten der Inhibine ist eine Expression in gynäkologischen Zelllinien nachweisbar (Mylonas et al. 2006; Kimmich et al. 2010). Dass Inhibin β E nach Zugabe von ER Stress Induktoren wie Nelfinavir eine Hochregulation erfährt, konnte in den bisherigen Experimenten dargestellt werden. Um zu sehen, ob eine vermehrte Expression durch Nelfinavir auch bei den anderen Inhibinen induziert werden kann, wurde eine weitere PCR Analyse mit MCF7 und HeLa Zellen durchgeführt (Abbildungen 18 und 19).

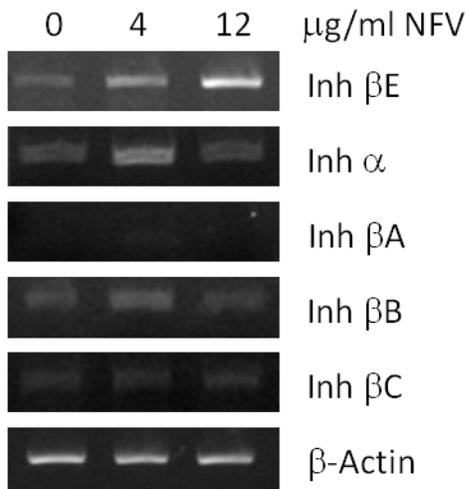


Abbildung 18: MCF7-Zellen mit Nelfinavir

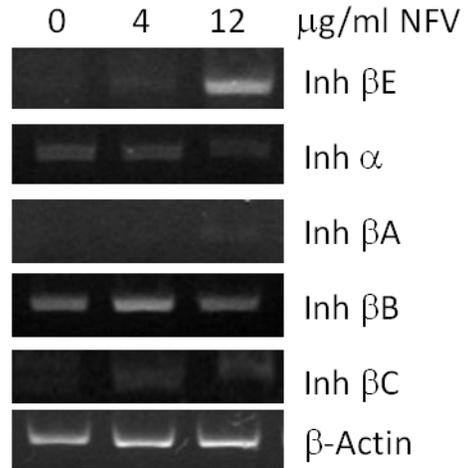


Abbildung 19: HeLa-Zellen mit Nelfinavir

Eine ähnliche konzentrationsabhängige Induktion wie bei Inh β E nach Nelfinavirzugabe kann bei den anderen Inhibinen nicht beobachtet werden. Es zeigt sich eine in etwa konstante Signalerhebung, unabhängig von der Menge an Nelfinavir, die zu den Zellen hinzugegeben wurde.

4.5 Real-time-PCR Analysen

Um eine bessere Quantifizierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurde eine Real-time-PCR Analyse für XBP1 etabliert. Die Real-time-PCR erlaubt eine schnellere und sensitivere Analyse als die konventionelle PCR. Das Splicing von XBP1 ist ein sicheres Kennzeichen für ER Stress. Durch ER Stress wird ein 26 Nukleotide umfassendes Intron aus der mRNA von XBP1 entfernt, wie auf den oben gezeigten Standard-PCR Gelen zu sehen war. Da die TaqMan Sonde sich über die gespleißte Stelle von XBP1 anlagert, wird in der Real-time-PCR nur die gespleißte Form von XBP1 erkannt und erfasst (Abbildung 20). Die Real-time-PCR mit XBP1 als Primer eignet sich deswegen besonders gut, induzierten ER Stress nachzuweisen.

→

TGCTGAAGAGGAGGCCGGAAGCCAAGGGGAATGAAGTGAGG
 CCAGTGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG : CAGCACTCAGACTA
 CGTGACCTCTG : CAGCAGGTGCAGGCCAGTTGTCACCC
 CTCCAGAACATCTCCCATGGATTCTGGCGGTATTGACTC
 TTCAGATTCAGAGTCTGATATCCTGTTGGGCATTCTGGAC

←

Abbildung 20: XBP1 Splicing und Primer: Rot markiert ist das 26 Nukleotide umfassende Intron, das aus der mRNA durch Splicing entfernt wird. Das Exon, aus dem das Intron entfernt wird, ist blau markiert (Exon 4). Die schwarz unterstrichene Sequenz entspricht den peripheren PCR Primer. Die Pfeile markieren die Richtung, aus der abgelesen wird. Die Sequenz für die TaqMan Sonde ist blau unterstrichen (Brüning 2011). Bei dem Splicing handelt es sich um ein untypisches zytosolisches Splicing, während das reguläre Splicing in der Regel im Zellkern stattfindet.

4.5.1 XBP1 Splicing nach Quercetin- und Tunicamyzinbehandlung

In den vorherigen Kapiteln konnte mittels klassischer PCR gezeigt werden, dass durch Zugabe von ER Stress Induktoren wie z.B. Tunicamyzin zu Tumorzellen eine ER Stress Reaktion ausgelöst wird. Diese zeigt sich am XBP1 Splicing. Da die Real-time-PCR das sensitivere Verfahren ist, sollen diese Ergebnisse nun mit dieser Methode bestätigt werden. MCF7-Zellen wurden sechs Stunden mit Tunicamyzin und vier bzw. sechs Stunden mit Quercetin inkubiert. Die cDNA, die anschließend gewonnen wurde, wurde zusammen mit den Primern für entweder XBP1 oder β -Actin (dient als Kontrolle) in der Real-time-PCR gemessen. Abbildung 21 zeigt das vom Real-time-PCR Gerät erstellte Diagramm. Je höher die Kopienzahl des Zielgens in der PCR ist, desto schneller kann eine Amplifikation und ein Anstieg in der Fluoreszenz beobachtet werden und desto kleiner ist der Ct-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationsgraphen mit der grünen Linie, Erläuterung siehe Abbildung 8).

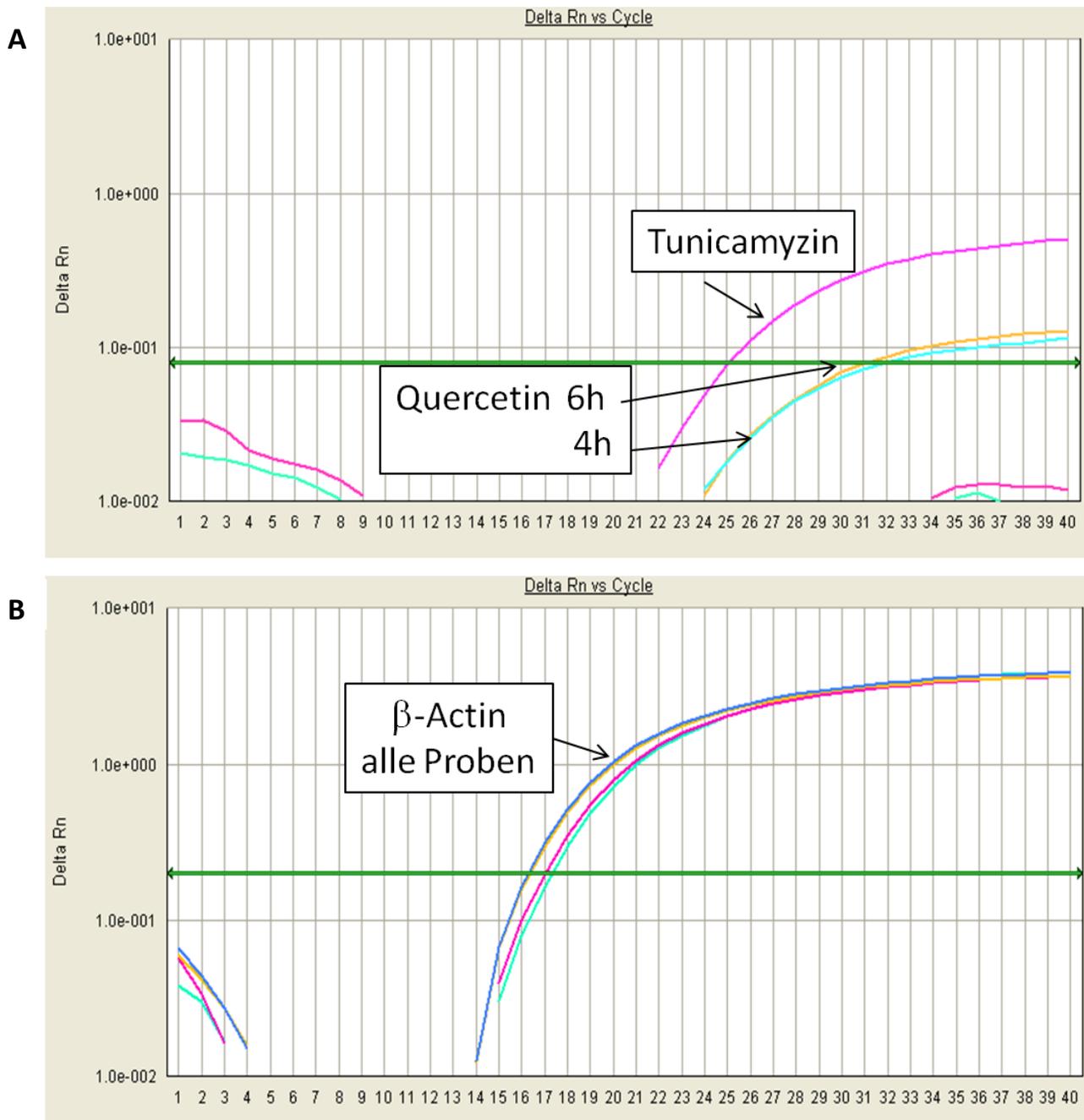


Abbildung 21: Real-time-PCR: MCF7-Zellen behandelt mit Tunicamycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Quercetin (100 μM). MCF7-Zellen wurden 6h mit Tunicamycin, 4 und 6h mit Quercetin inkubiert. Die x-Achse zeigt die Anzahl der PCR-Zyklen, die y-Achse die relative Fluoreszenzintensität. A) XBP1 Primer. B) β -Actin Primer zur Kontrolle.

Die Real-time-PCR bestätigt eine starke Induktion von XBP1 Splicing in Tunicamycin-behandelten MCF7 Zellen. Im Vergleich zur klassischen PCR (Abbildung 17) lässt sich nun auch ein eindeutiges, allerdings schwächeres XBP1 Splicing in Quercetin-behandelten MCF7 Zellen

darstellen, was zur ADM2 Induktion durch Quercetin führen kann. Dennoch löst Quercetin eine schwächere ER Stress Reaktion als Tunicamyzin aus. Der Ct-Wert von Tunicamyzin ist in der XBP1 Analyse mit 25,09 kleiner als die Ct-Werte von Quercetin (31,03 und 31,97).

4.5.2 XBP1 Splicing nach Nelfinavir-, Quercetin- und Bortezomibbehandlung

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die ER Stress Induktoren Nelfinavir, Quercetin und Bortezomib in der Real-time-PCR auf XBP1 Splicing getestet. Je sechs Stunden wurden MCF7-Zellen mit den Substanzen inkubiert. Eine unbehandelte Kontrollprobe wurde ebenfalls angelegt. Um den direkten Vergleich zu haben, wurde von den Proben parallel eine konventionelle PCR durchgeführt (Abbildung 22).

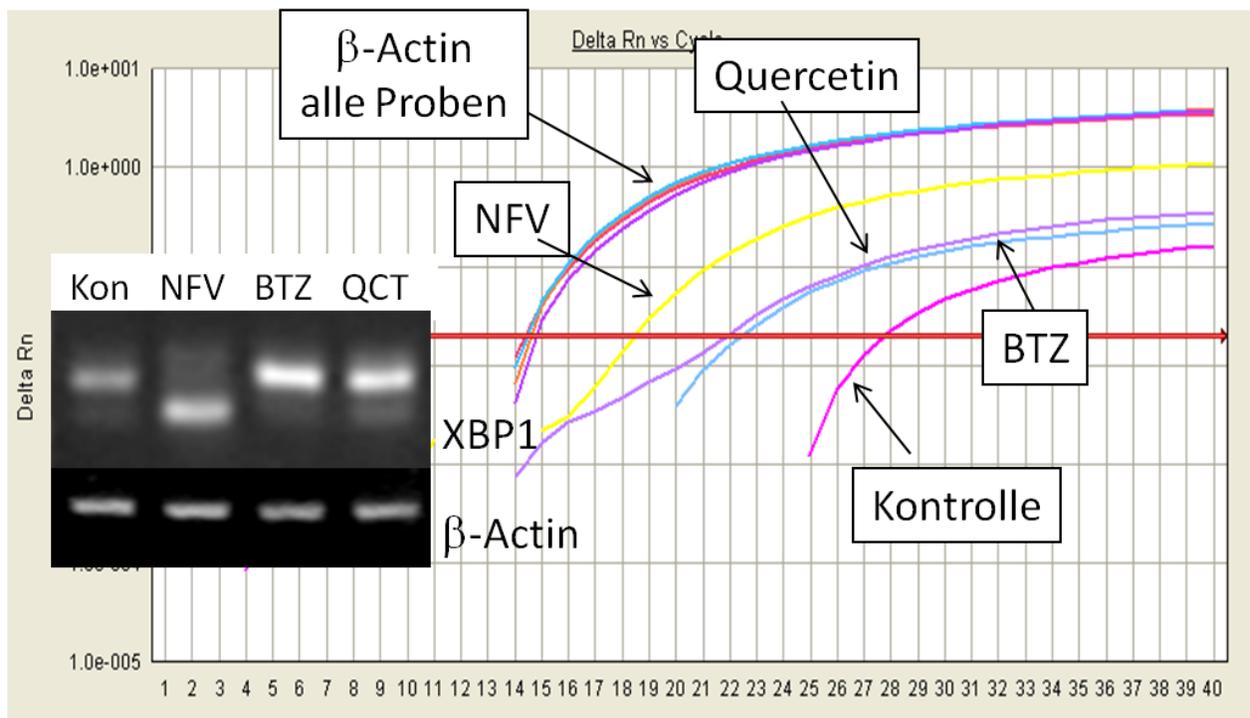


Abbildung 22: Real-time-PCR: MCF7-Zellen wurden für je 6h mit Nelfinavir (20 μ g/ml), Quercetin (60 μ M), Bortezomib (20 ng/ml) oder un behandelt (Kontrolle) inkubiert. Mit XBP1 und β -Actin Primern wurden die konventionelle und die Real-time-PCR durchgeführt (veröffentlicht als Ko- autorschaft in: Klappan et al. 2012).

Nelfinavir zeigt in der Real-time-PCR die stärkste Induktion der gespleißten Form von XBP1 (Ct-Wert = 18,72). In den mit Quercetin und Bortezomib behandelten MCF7-Zellen lässt sich eine deutlich schwächere, dennoch vorhandene Induktion von XBP1 Splicing darstellen. Die aus dem obigen Diagramm abgelesenen Ct-Werte ergeben für Quercetin und Bortezomib die Werte 22,43 und 22,97. Dasselbe Ergebnis kann in der Reverse-Transkriptase-PCR (in Abbildung 22 zum Vergleich eingefügt) verifiziert werden.

Quercetin und Bortezomib sind Proteasomen-Inhibitoren und lösen ER Stress in Tumorzellen nur als Nebenreaktion aus. Sie führen die Zellen hauptsächlich über einen zytosolischen Zellstress-Mechanismus zur Apoptose. Die Real-time-PCR Analysen bestätigen, dass Nelfinavir und Tunicamycin das XBP1 Splicing (als Kennzeichen für ER Stress) deutlich stärker induzieren als Quercetin und Bortezomib.

4.6 Nachweis der ADM2 Hochregulation auf Proteinebene

4.6.1 Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen nach Nelfinavirbehandlung

Um eine stress-induzierte Hochregulation des Peptidhormons ADM2 auch auf Proteinebene zu beweisen, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen vorgenommen. HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden mit Nelfinavir inkubiert und anschließend wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz aufbereitet. Als Primärantikörper kam Anti-Intermedin (erzeugt in Kaninchen von Phoenix Europe GmbH) und als Sekundärantikörper Anti-Kaninchen (erzeugt in Ziege von Jackson Immuno Research) zur Verwendung. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops konnten schließlich folgende Bilder gemacht werden (Abbildung 23).

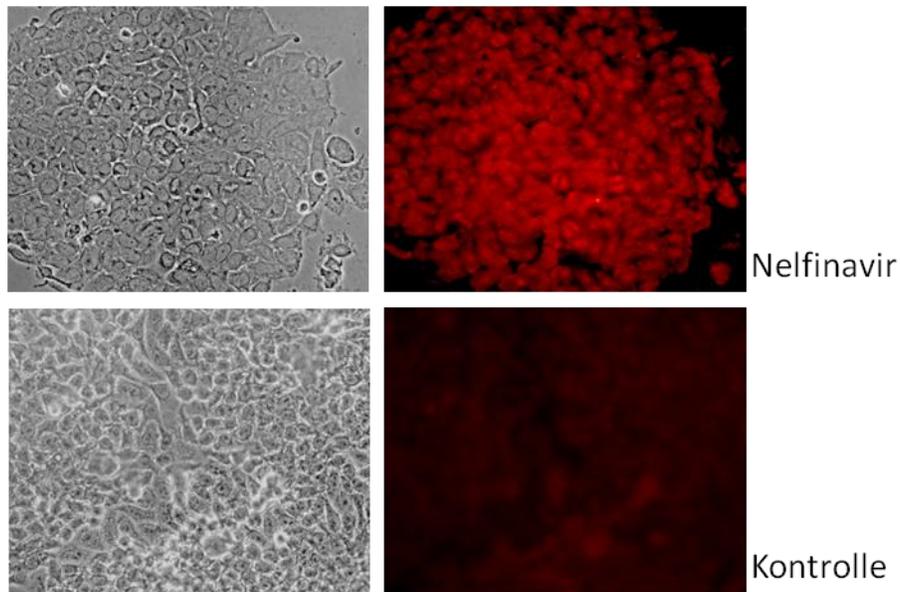


Abbildung 23: Immunfluoreszenz: HeLa-Zellen mit ADM2-Antikörper

Im Vergleich zur Kontrolle (HeLa-Zellen, die nicht mit Nelfinavir behandelt wurden) zeigen die mit Nelfinavir behandelten Zellen eine deutliche stärkere Bindung des ADM2-Antikörpers. Daraus lässt sich schließen, dass nach Gabe von Nelfinavir eine hohe Expressierung des Proteins ADM2 in den Zellen stattfindet.

4.6.2 Immunfluoreszenz nach Behandlung mit anderen ER Stress Induktoren

Auch andere ER Stress Induktoren wie Tunicamycin und DTT sollen auf Proteinebene getestet werden. Im selben Versuchsaufbau wie oben beschrieben wurden die Substanzen zu HeLa-Zellen gegeben. Die Einwirkzeit betrug für Tunicamycin und DTT je sechs Stunden.

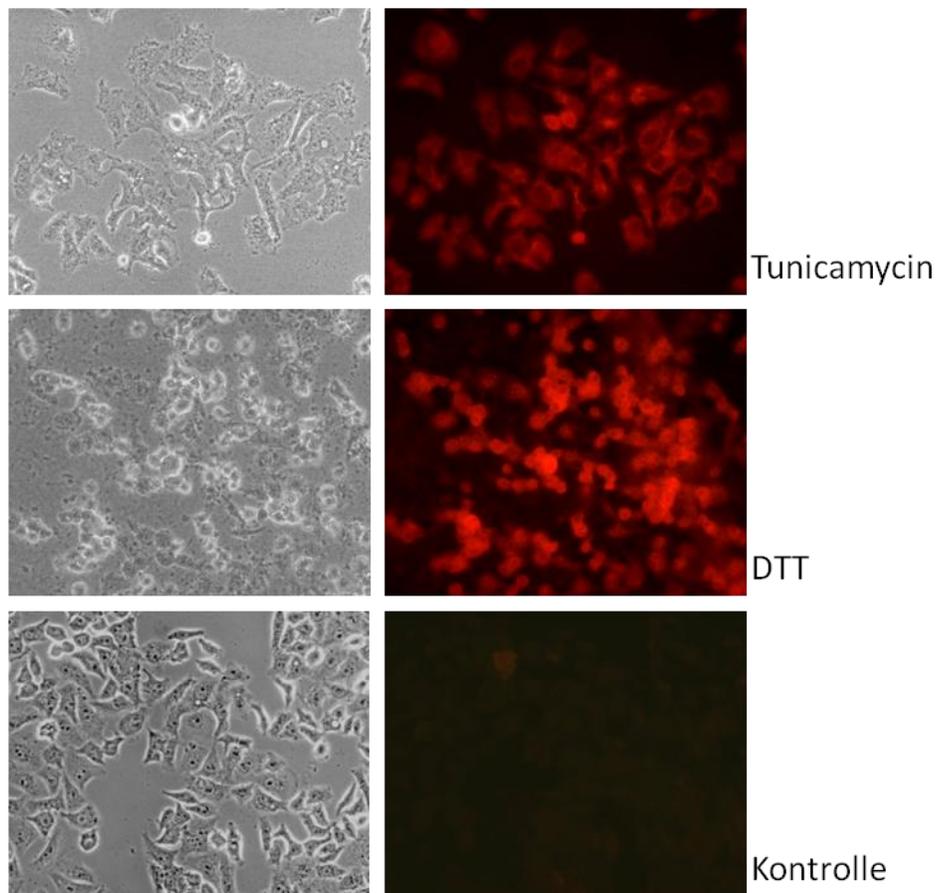


Abbildung 24: Immunfluoreszenz: HeLa-Zellen mit ADM2-Antikörper

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, ist auch mit den ER Stress Induktoren Tunicamycin und DTT eine verstärkte Expression von ADM2 in den Zellen nachweisbar.

4.7 PCR Klonierung von ER Stress regulierenden Transkriptionsfaktoren

Die Regulation der Transkription von ADM2 ist bislang nicht geklärt. Es konnte in den vorherigen Experimenten gezeigt werden, dass eine Hochregulation des Peptidhormons ADM2 nach Auslösen der ER Stress Reaktion stattfindet. Die ER Stress Reaktion ist mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren verbunden, hierzu zählen ATF4, ATF3, ATF6, CHOP und XBP1. Der Transkriptionsfaktor ATF4 nimmt eine besonders wichtige Rolle ein. Es reguliert neben der

Transkription von ATF3 und CHOP die Expression zahlreicher anderer Gene (Ameri and Harris 2008). Ob ein hier aufgeführter Transkriptionsfaktor für die Induktion von ADM2 verantwortlich ist, soll mittels PCR Klonierung untersucht werden. Hierfür wurden von den Transkriptionsfaktoren ATF4, ATF3 und CHOP Expressionsplasmide erzeugt. ATF3 und CHOP wurden bereits vorher von Mitarbeitern des Forschungslabors kloniert. ATF4 wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert. Von mit Nelfinavir-behandelten MCF7-Zellen wurde cDNA in ihrer gesamten Länge mithilfe von Reverse-Transkriptase-PCR amplifiziert. „Full length“ Primerpaare von ATF4, ATF3, und CHOP wurden eingesetzt (Primersequenzen siehe Tabelle 5). Die amplifizierte cDNA wurde per PCR Klonierung in den pcDNA3.1V5-His Vektor inseriert. ATF4, ATF3 und CHOP wurden ohne Stoppkodon amplifiziert, um V5 Fusionsproteine zu erhalten. Mittels Lipofektion (mit Lipofectamine von Invitrogen) wurden die gewonnenen Plasmide schließlich in HeLa-Zellen transfiziert. Die Plasmide wurden zusammen mit den Zellen hierfür über Nacht mindestens 24 h inkubiert.

4.7.1 ATF4 Klonierung: Nachweis in der Immunfluoreszenz

Um den Erfolg der Plasmidklonierung zu überprüfen, wurden von der ATF4 Expression Immunfluoreszenz-Bilder aufgenommen. Nach der Transfektion der Plasmide zu den HeLa-Zellen mittels Lipofectamine wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Nach 24 Stunden wurde als Primärantikörper ein spezifischer V5-Antikörper zu den Zellen gegeben (erzeugt in Maus von AbD Serotec). Der V5-Antikörper erlaubt den einfachen Nachweis der Genexpression, da der Vektor ein hochimmunaffines V5 Epitop besitzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege Anti-Maus IgG (Jackson Immuno Research) benutzt.

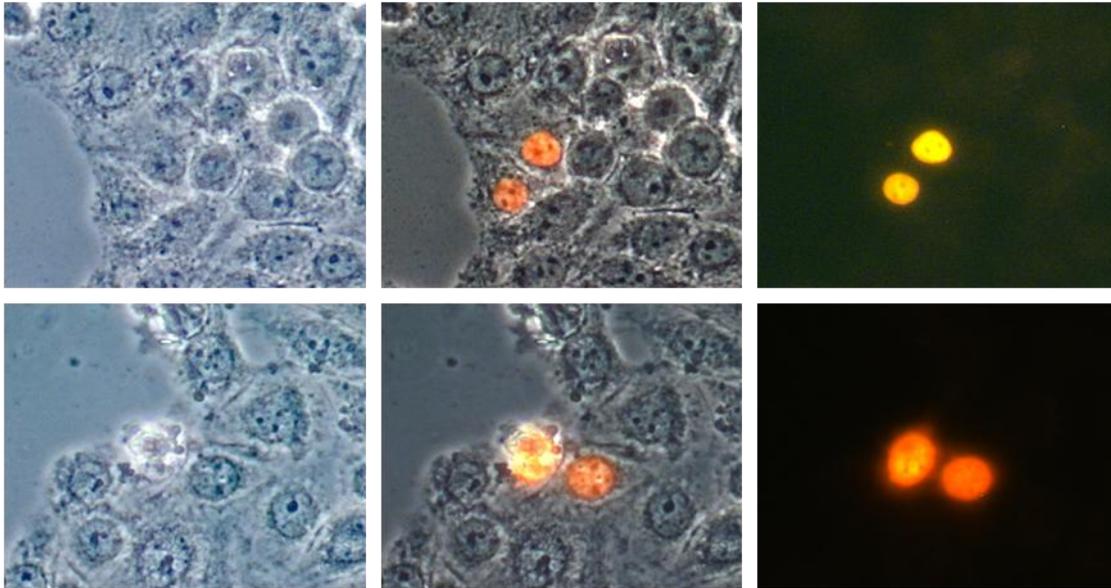


Abbildung 25: Immunfluoreszenz: ATF4 Expression in transfizierten HeLa-Zellen

In den transfizierten HeLa-Zellen ist eine erhöhte Fluoreszenz zu erkennen. ATF4 wird vermehrt exprimiert. Auffallend war, dass in einigen transfizierten Zellen eine Apoptose zu beobachten war, die darauf hinweist, dass ATF4 Überexpression, wie auch verschärfter ER Stress, proapoptotisch wirkt.

4.7.2 ADM2: ein Zielgen von ATF4

Um herauszufinden, ob ADM2 das Zielgen einer der Transkriptionsfaktoren ATF4, ATF3 oder CHOP ist, wurde die Expression des Peptidhormons und der Transkriptionsfaktoren mithilfe der Reverse-Transkriptase-PCR untersucht. Aus den transfizierten HeLa-Zellen wurde RNA gewonnen und für die PCR in cDNA umgeschrieben. Nach Zugabe der spezifischen Primer für ADM2, für die Transkriptionsfaktoren und für β -Actin erfolgte die PCR Analyse.

ATF4 mRNA ist endogen bereits reichlich vorhanden. Die endogene ATF4 mRNA besitzt hemmende offene Leseraster, die die mRNA Translation unter normalen physiologischen Bedingungen inhibieren. Die in die Expressionsvektoren geklonte ATF4 mRNA besitzt diese hemmenden offenen Leseraster nicht. Deswegen wurde für den Nachweis der ATF4

Transkription aus dem pcDNA3.1 Expressionsplasmid ein Vorwärtsprimer verwendet, der sich an den CMV Promotor des pcDNA3.1 Vektors bindet.

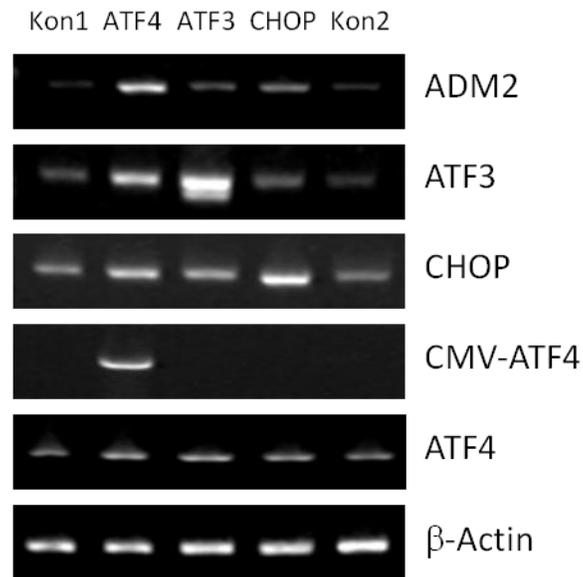


Abbildung 26: PCR Klonierung

Durch die Transfektion der Expressionsplasmide in HeLa-Zellen werden die Transkriptionsfaktoren ATF4, ATF3 und CHOP überexprimiert. Das stärkste Signal in der ADM2 Reihe zeigt sich nach der ATF4 Transfektion. Die Überexpression von ATF4 führt demnach zur Induktion des Peptidhormons ADM2. Das bedeutet, dass ADM2 ein transkriptionelles Zielgen von ATF4 ist.

5 Diskussion

Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen zum ersten Mal eine Adrenomedullin 2 (ADM2) Induktion durch ER Stress in Tumorzellen. ER Stress wird beispielsweise in Tumoren u.a. durch Hypoxie und Nährstoffmangel ausgelöst. Um zu überleben, müssen sich Tumorzellen Stressbedingungen wie Hypoxie oder Nährstoffmangel entgegensetzen. Deswegen kommt es während des Tumor- und Metastasenwachstums zur Neovaskularisation. Dabei spielen Angiogenese und Vaskulogenese eine wichtige Rolle (Rouhi et al. 2010). ADM2 ist ein die Neoangiogenese förderndes Peptidhormon (Smith et al. 2009). Die physiologische bekannte neoangiogene Wirkung von ADM2 könnte dabei helfen, die Tumoren mit besserer Nährstoffversorgung auszustatten. Physiologisch mag ADM2 also Gewebeschädigungen durch Hypoxie vermindern bzw. bei dessen Reparatur helfen. Bei Tumoren wird dieser Prozess höchstwahrscheinlich jedoch als Überlebensstrategie ausgenutzt. Somit scheint von Tumorzellen sezerniertes ADM2 eine überlebensfördernde Wirkung auf Tumoren zu haben.

Da die ER Stress Reaktion eine genetisch festgelegte Reaktion ist, kommt es bei allen ER Stress induzierenden Auslösern zur ADM2 Expression, auch bei Nelfinavir. Bei HIV-Patienten verwendete Nelfinavir Konzentrationen bewirken jedoch keinen ER Stress (siehe Abbildungen 12 und 13), und die für eine mögliche Krebstherapie verwendeten hohen Konzentrationen sind so stark zellschädigend, dass die mögliche neoangiogene Wirkung von ADM2 im Rahmen einer zytotoxischen Krebstherapie nicht mehr zum Tragen kommen kann. Die Bedeutung der ADM2 Expression beim ER Stress ist somit eher während der Tumorprogression zu sehen als bei der Tumorbehandlung durch ER Stress induzierende Substanzen wie Nelfinavir, aber beispielsweise auch wie Bortezomib.

5.1 Die Rolle von ADM2 bei der Neoangiogenese

ADM2 fördert die Neoangiogenese und kann auf diese Weise dabei helfen, die Nährstoffversorgung von Tumoren zu verbessern. ADM2 führt über den eNOS Signalweg und die VEGF Hochregulation direkt über die Aktivierung von Endothelzellen zur Neoangiogenese.

Dies konnte von Smith et al. im Tiermodell an ischämischen Gliedmaßen gezeigt werden (Smith et al. 2009). Neuere Untersuchungen ergaben, dass ADM2 auch in Tumormodellen in Mäusen ein gut organisiertes Gefäßsystem induziert. Wird ADM2 gehemmt, verschlechtert sich die Blutversorgung und das Tumorwachstum wird wahrscheinlich inhibiert (Zhang et al. 2012). In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Hochregulation von ADM2 in epithelialen Tumorzelllinien wie MCF7 (Mammakarzinom) und HeLa (Zervixkarzinom) stärker war als in leukämischen Zelllinien. Die Neoangiogenese spielt in soliden Tumorzellen eine weitaus wichtigere Rolle als in hämatologischen malignen Erkrankungen. Doch auch bei der akuten lymphatischen Leukämie kommt es zu einer vermehrten Neoangiogenese und es ist eine Erhöhung von VEGF nachweisbar (Todorovic et al. 2012). VEGF ist ein gut untersuchter, die Angiogenese fördernder Wachstumsfaktor, der beinahe von allen soliden Tumoren sekretiert wird (Yoo et al. 2006). Im Microarray wurde in den mit Nelfinavir behandelten Jurkat-Zellen neben ADM2 auch VEGF A stark hochreguliert. Zahlreiche therapeutische Ansätze, die die Angiogenese angreifen, sind bereits in Anwendung oder noch in Entwicklung. Darunter ist beispielsweise Sorafenib, ein VEGF Inhibitor, der als Standardtherapie beim fortgeschrittenen Hepatozellulärem Karzinom eingesetzt wird (Folkman 2007; Kuhn et al. 2007; Keating and Santoro 2009). Wie VEGF könnte auch ADM2 als ein neuer Angriffspunkt für die Antitumortherapie in Zusammenhang mit Gefäßneubildung in Betracht kommen.

5.2 Die Induktion von ADM2 durch ER Stress

Das Peptidhormon ADM2 wird genau wie das Peptidhormon Inhibin βE , das in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde (Brüning et al. 2012), durch ER Stress in Tumorzellen hochreguliert. Durch PCR Analysen und Immunfluoreszenz konnte die im Microarray gezeigte Hochregulation von ADM2 in mit Nelfinavir behandelten Jurkat-Zellen bestätigt werden. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch in epithelialen Tumorzelllinien wie MCF7 und HeLa eine spezifisch durch ER Stress ausgelöste Induktion von ADM2 erfolgte. Eine ADM2 Expression zeigte sich nicht nur für Nelfinavir, sondern auch andere ER Stress Induktoren wie Tunicamycin, Thapsigargin und Quercetin führten zur Induktion des Peptidhormons.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus der Gruppe der Peptidhormone neben Inhibin βE mit ADM2 ein neuer Faktor identifiziert werden konnte, dessen Induktion durch ER Stress in Tumorzellen ausgelöst wird.

Die ER Stress Reaktion hat zwei kontroverse Seiten: zum einen dient der zytoprotektive Teil als Resistenz- und Adaptationsmechanismus für Tumorzellen und führt so zur Tumorprogression (Healy et al. 2009). Zum anderen kommt es bei persistierendem ER Stress durch den pro-apoptotischen Weg zum Zelltod (Hitomi et al. 2004; Rosati et al. 2010). Unter Verwendung bestimmter Chemotherapeutika wie Nelfinavir und Bortezomib kommt dies als zusätzlicher Behandlungsweg bei chemoresistenten Karzinomen in Betracht (Gills et al. 2007; Brüning et al. 2011). Die Funktion von ADM2 ist aber weniger in einem pro-apoptotischen Mechanismus zu suchen. Aufgrund seiner physiologischen Wirkung ist eher zu vermuten, dass ADM2 auf übergeordnete Weise durch parakrine Mechanismen den jeweiligen Zellstressreaktionen entgegenwirkt und somit zur Tumorprogression beiträgt. Hier ist insbesondere die proangiogene Funktion von ADM2 von Bedeutung, da die Bewältigung von Hypoxie und Nährstoffmangel zu den wichtigsten Überlebensfähigkeiten von Tumorzellen gehört.

Beide Peptidhormone, ADM2 und Inhibin βE , vermitteln also anders als die meisten anderen ER Stress Marker über autokrine und parakrine Funktionen ER Stress Signale unter Zellen und Geweben. Deswegen könnten sowohl ADM2 als auch Inhibin βE als sensitive Marker für ER Stress eine Rolle spielen.

ADM2 wurde bisher als ein gefäßerweiterndes und blutdrucksenkendes Hormon beschrieben, das eine protektive Wirkung auf das Myokard zeigt (Bell and McDermott 2008). Die protektive Wirkung durch ADM2 auf das Herzgewebe ist in einer Hemmung des myokardialen ER Stresses zu vermuten. ADM2 inhibiert die Hochregulation von ER Stress Markern wie Grp78, CHOP und Caspase 12 sowie den Transkriptionsfaktoren ATF6 und ATF4 nach Gabe von Tunicamycin oder DTT im Herzgewebe. Im Tiermodell zeigte sich bei Ratten mit myokardialer Ischämie durch die Gabe von ADM2 eine Abschwächung des ER Stresses sowie eine Verbesserung von Schäden am Myokard (Teng et al. 2011).

ADM2 scheint also auch eine hemmende Wirkung auf den ER Stress auszuüben. Über diese mögliche rückkoppelnde Wirkung von ADM2 insbesondere auf Tumorzellen ist aber so gut wie nichts bekannt. Es bleibt demnach zu untersuchen, ob ADM2 dieselbe inhibierende Wirkung auf

ER Stress in Tumorzellen ausübt wie auf ER Stress im Myokard. ADM2 wäre allerdings nicht der einzige negative Rückkopplungs-Regulator in der ER Stress Reaktion. Auch GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) kommt eine Rolle in der negativen Rückwärtskopplung zu und es soll die durch ER Stress-induzierte Genexpression inhibieren (Novoa et al. 2001). Beide Gene, GADD34 und ADM2, haben mit ATF4 denselben Transkriptionsfaktor. Ob sie in der ER Stress Reaktion auch ähnliche Funktionen besitzen, bleibt zu untersuchen.

Auch humane Endothelzellen der Aorta exprimieren ADM2 mRNA. Diese ADM2 mRNA Expression reagiert empfindlich auf metabolische Veränderungen und steigt bei oxidativem Stress an. Indem es die Caspase Aktivität senkt, zeigt ADM2 eine anti-apoptotische Wirkung und erhöht das Überleben der endothelialen Zellen. ADM2 könnte deswegen nicht nur als ER Stress Marker sondern auch als Marker für kardiovaskulären Stress dienen (Pearson et al. 2009). Auch Bell et al. konnten eine Induktion von ADM2 nach oxidativem Stress in Herzmuskelzellen zeigen (Bell et al. 2008). Es ist anzunehmen, dass neben ER Stress und oxidativem Stress auch Nährstoffmangel zu einer Induktion von ADM2 führt. Nährstoffmangel und der damit verbundene Aminosäuren-Mangel haben eine Aktivierung von GCN2 (*general control nonrepressed 2*, Serin/Threonin-Protein Kinase) zur Folge. GCN2 wiederum phosphoryliert eIF2 α , was zur Induktion von ATF4 führt (Jiang et al. 2004; Ye et al. 2010; siehe Abbildung 6). Da unseren Ergebnissen zufolge, ADM2 ein transkriptionelles Zielgen von ATF4 ist, ist es wahrscheinlich, dass auch ADM2 durch Nährstoffmangel induziert wird. Außerdem kämpft ADM2 durch seine proangiogene Wirkung in Tumorzellen gegen Nährstoffmangel an. Deswegen sollten weitere Untersuchungen veranlasst werden, die einen Nährstoffmangel in Tumorzellen hervorrufen (Glukose- bzw. Aminosäure-Entzug) und eine wahrscheinliche ADM2 Induktion aufzeigen. Derartige Untersuchungen sollen im Rahmen weitergehender Untersuchungen im Forschungslabor demnächst durchgeführt werden.

5.3 ADM2 ist ein Zielgen von ATF4

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADM2 in Tumorzellen nach Zugabe bestimmter Chemikalien wie beispielsweise Nelfinavir hochreguliert wird. Diese Hochregulation steht im Zusammenhang mit der ER Stress Reaktion. In die ER Stress Reaktion sind wiederum zahlreiche Transkriptionsfaktoren involviert und ein Hauptregulator davon ist ATF4 (Kilberg et al. 2009; Rzymiski et al. 2009; Ye and Koumenis 2009). Durch PCR Klonierung der bei der ER Stress Reaktion beteiligten Transkriptionsfaktoren konnte ADM2 als neues transkriptionelles Zielgen von ATF4 identifiziert werden. Auch Inhibin β E konnte kürzlich als Zielgen von ATF4 in der ER Stress Antwort hinzugefügt werden (Brüning et al. 2012). ATF4 gehört zur Familie der bZIP Transkriptionsfaktoren. Viele Zielgene von ATF4 werden durch das C/EBP-ATF (CCAAT-*enhancer binding protein-activating transcription factor*) Reaktionselement (engl. *response element*) aktiviert (Kilberg et al. 2009). Inhibin β E besitzt in Leberzellen zwei C/EBP-Stellen in seinem Promotor, die die Bindung von C/EBP- β (= LAP, *liver activating protein*) erlauben. LAP ist ein in Leberzellen exprimierter Transkriptionsfaktor. Dies zeigt, dass die Expression des Peptidhormons über Transkriptionsfaktoren der bZIP Familie in bestimmten Zelltypen wie z.B. Leberzellen reguliert werden kann (Hashimoto et al. 2002; Brüning et al. 2012). Ob auch die Expression von ADM2 über C/EBP-ATF Reaktionselemente geregelt werden kann, bleibt zu untersuchen. Bislang gibt es keine Daten, die nachweisen, dass ADM2 C/EBP-Bindungsstellen besitzt.

In den zeitabhängigen PCR Analysen war zu beobachten, dass nach Zugabe der ER Stress Induktoren Nelfinavir, Tunicamycin und Thapsigargin stets eine schnelle Hochregulation der Peptidhormone erfolgte. Mit Beginn des XBP1 Splicings, was als Marker für ER Stress gilt (Yoshida et al. 2001), war jeweils eine einsetzende Signalerhebung bei ADM2 und Inh β E sichtbar. ATF4 mRNA ist endogen reichlich vorhanden (Shan et al. 2009). Das ist auch an dem vorhandenen Signal von ATF4 bereits vor Zugabe von ER Stress Induktoren in den PCR Analysen zu sehen. Da die Zellen unter ständiger Alarmbereitschaft stehen, um sofort auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren, findet bei Auslösung von ER Stress deswegen eine schnelle Reaktion statt und ATF4 kann ohne größere Verzögerungen als aktives Protein gebildet werden.

Durch die Tatsache, dass ATF4 Transkriptionsfaktor von ADM2 und Inh β E ist, lässt sich die schnelle Induktion der Peptidhormone bei ER Stress erklären.

5.4 ADM2 Expression in Tumoren

ADM2 wird wie Inhibin β E in gynäkologischen Tumoren nach ER Stress hochreguliert. Eine hohe ADM2 Expression konnte vor Kurzem in Hepatozellulären Karzinomen von Guo et al. nachgewiesen werden. Bereits in frühen Stadien der Erkrankung wurde eine starke ADM2 mRNA Expression beobachtet. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von ADM2 zur Apoptose von Tumorzellen und somit zur Unterdrückung des Tumorwachstums führt (Guo et al. 2012). Als Inhibitoren von ADM2 stehen ein polyklonaler Antikörper sowie ein kompetitiver Antagonist am CRLR/RAMP-Rezeptorkomplex zur Verfügung. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass ADM2 als Biomarker und therapeutischer Angriffspunkt für das Hepatozelluläre Karzinom in Frage kommt. Auch in Nebennierentumoren sowohl kortikalen als auch medullären Ursprungs konnte eine ADM2 Expression nachgewiesen werden. ADM2 könnte auch hier eine Rolle als autokriner bzw. parakriner Regulator für das Zellwachstum einnehmen (Morimoto et al. 2008).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit war es aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich, den Nachweis einer ADM2 Expression in verschiedenen gynäkologischen Tumoren sowie im Mammakarzinom zu erbringen. Die histologischen Untersuchungen zur Expression von ADM2 sind von unserer Arbeitsgruppe aber in Planung und sollen demnächst in ähnlicher Form wie die zu Inh β E durchgeführt werden. Zudem sollen über die Klonierung von ADM2 in den pcDNA3.1 Vektor einfache, stabile Zellklone von MCF7 Zellen generiert werden. Diese Klone können dann im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzelllinien für das Nacktmausmodell verwendet werden. Es ist vorgesehen, die Tumorentwicklung von mit MCF7-ADM2-Zellen geimpften Nacktmäusen mit der von mit MCF7-Kontrollzellen geimpften Nacktmäusen zu vergleichen. Bei den histologischen Untersuchungen ist das Hauptaugenmerk auf die Tumervaskularisierung zu legen.

5.5 Andere ER Stress Marker

In zahlreichen Publikationen wurden bisher Methoden beschrieben, wie ER Stress und die darauffolgende Reaktion gemessen werden kann. Als ein frühes und spezifisches Kennzeichen für ER Stress wird die gespleißte Form von XBP1 betrachtet (Yoshida et al. 2001). XBP1 ist ein Transkriptionsfaktor aus der bZIP Familie, und die XBP1 mRNA Expression wird durch ER Stress induziert. Unter den veröffentlichten Methoden gibt es einige, die die konventionelle Reverse-Transkriptase-PCR zum Nachweis von XBP1 Splicing vorschlagen (Samali et al. 2010; Zhao et al. 2011). Im Rahmen meiner Arbeit wurde zur Messung des XBP1 Splicings zum ersten Mal eine Real-time-PCR etabliert. Die Real-time-PCR konnte die Ergebnisse der Reverse-Transkriptase-PCR, bei der sich das XBP1 Splicing in der Gelelektrophorese anhand von Doppelbanden zeigt, verifizieren und sogar noch deutlicher zum Ausdruck bringen. Diese Ergebnisse wurden von unserer Arbeitsgruppe in der Zeitschrift „Histochemistry and Cell Biology“ 2012 veröffentlicht (Klappan et al. 2012). Dass die Real-time-PCR ein sensitives, quantitatives Verfahren zur Messung von XBP1 Splicing ist, wurde parallel auch von anderen Autoren beschrieben (van Schadewijk et al. 2012).

Wie bereits erwähnt wurde in Vorarbeiten gezeigt, dass Inhibin β E durch die ER Stress Reaktion hochreguliert wird (Brüning et al. 2012). Neben ADM2 wurde die durch ER Stress Induktoren ausgelöste Hochregulation des Inhibins auch in dieser Arbeit bestätigt. Auch das Verhalten der anderen Inhibine (Inh α , Inh β A, Inh β B und Inh β C) wurde bei ER Stress untersucht. Hier zeigte sich in MCF7 und HeLa-Zellen allerdings entweder überhaupt keine Expression oder die Expression wurde durch Nelfinavir nicht beeinflusst. Außer Inhibin β E kommen daher die anderen Inhibine als ER Stress Marker nicht in Frage.

In der Microarray Analyse zeigte sich ferner in den Nelfinavir-behandelten Jurkat-Zellen eine starke Hochregulation von Sestrin 2. In den zeitabhängigen PCR Analysen konnte nach Zugabe von Nelfinavir, Tunicamycin und Thapsigargin zu MCF7-Zellen dieses Ergebnis bestätigt werden. Sestrin 2 wurde als neues auf Stress reagierendes Gen identifiziert, das in die Regulation von Zellüberleben involviert ist. Eine vermehrte Expression von Sestrin 2 konnte durch verschiedene Zellstressbedingungen wie Hypoxie, oxidativer Stress oder UV-Bestrahlung induziert werden (Budanov et al. 2002; Liu et al. 2011). Im Rahmen dieser Doktorarbeit kann zum ersten Mal eine

vermehrte Sestrin 2 Induktion durch ER Stress gezeigt werden. Neben CHOP, ATF3, ATF4, XBP1 und den neu identifizierten Peptidhormonen Inhibin β E und ADM2 ist somit auch Sestrin 2 ein sensitiver Marker für ER Stress.

6 Zusammenfassung

Kommt es im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von Tumorzellen zu einer Störung des Gleichgewichtes durch die Ansammlung nicht- oder fehlgefalteter Proteine, wird eine genetisch festgelegte ER Stress Reaktion ausgelöst. Diese ER Stress Reaktion induziert die Expression einer Vielzahl von regulatorischen Genen. Darunter befinden sich u.a. die Transkriptionsfaktoren ATF6, ATF4 und XBP1. Die von diesen „Schlüselfaktoren“ induzierten Gene (Chaperone und Hitzeschockproteine) versuchen entweder die Homöostase im ER aufrechtzuerhalten oder führen bei persistierendem ER Stress, z.B. durch die Expression des pro-apoptischen Transkriptionsfaktors CHOP, zur Apoptose der Zelle. Da dieser Apoptoseweg sich von den klassischen Zelltodmechanismen differenziert, kommen ER Stress induzierende Substanzen als mögliche Medikamente in der Tumorthherapie in Frage. ER Stress lässt sich neben den gängigen Induktoren wie Tunicamycin oder DTT auch mit dem HIV-Proteaseinhibitor Nelfinavir auslösen. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es nach der Induktion der sogenannten ER Stress Reaktion in Mammakarzinomzellen durch Nelfinavir zu einer selektiven und ausgeprägten Expression des Peptidhormons Inhibin βE kommt. Dies führte zu der Fragestellung, ob auch andere Peptidhormone durch Nelfinavir-induzierten ER Stress hochreguliert werden.

In einer Microarray Analyse wurde in einer leukämischen Zelllinie (Jurkat-Zellen) Adrenomedullin 2 (ADM2) als ein neues durch Nelfinavir induziertes Peptidhormon identifiziert. Durch PCR Analysen und Immunfluoreszenz konnte dieses Ergebnis verifiziert werden. ADM2 wurde bislang als gefäßerweiterndes und blutdrucksenkendes Hormon beschrieben, das zudem eine protektive Wirkung auf das Myokard besitzt, indem es myokardialen ER Stress hemmt. Außerdem fördert ADM2 die Neoangiogenese und wird in Leber- und Nebennierentumoren stark exprimiert.

Zum ersten Mal kann in dieser Arbeit eine durch ER Stress ausgelöste ADM2 Induktion in Tumorzellen gezeigt werden. Über die Funktion von ADM2 bei ER Stress ist bisher nichts bekannt. In Tumoren wird ER Stress u.a. durch Hypoxie und Nährstoffmangel ausgelöst. Deshalb vermuten wir, dass ADM2 über parakrine Mechanismen den jeweiligen Zellstressreaktionen

entgegenwirkt und hauptsächlich durch seine proangiogene Wirkung zur Tumorprogression beiträgt.

Um den für ADM2 verantwortlichen Transkriptionsfaktor zu finden, wurden von in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren der ER Stress Reaktion Expressionsplasmide generiert. ADM2 konnte hierdurch als neues transkriptionelles Zielgen von ATF4 identifiziert werden. ATF4 ist ein Hauptregulator der ER Stress Reaktion. Kürzlich konnte auch Inhibin β E als Zielgen von ATF4 hinzugefügt werden. Deshalb könnte neben Inhibin β E auch ADM2 als sensitiver Marker für ER Stress eine Rolle spielen.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich deshalb für die weiterführende Forschung u.a. folgende Fragestellungen:

- ADM2 hemmt ER Stress in Myokardzellen. Es bleibt zu untersuchen, ob ADM2 auch ER Stress in Tumorzellen hemmt und ob diese hemmende Wirkung auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus in der ER Stress Reaktion beruht.
- Gegenstand weiterer Untersuchungen ist außerdem, ob ADM2 auch in verschiedenen gynäkologischen Tumoren sowie im Mammakarzinom exprimiert wird. Bei einem positiven Nachweis sollte die Beeinflussung von ADM2 auf die Tumolvaskularisierung genauer untersucht werden. Die Frage wäre dann, ob eine Hemmung von ADM2 zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums und somit zu einem neuen Therapieansatz führen könnte.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADM2	Adrenomedullin 2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF3	<i>activating transcription factor 3</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATPase	Adenosintri-phosphatasen
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
bp	Basenpaare
BTZ	Bortezomib
bZIP	<i>basic Leucine Zipper Domain</i>
Ca	Kalzium
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CHOP	<i>CCAAT-enhancer-binding homologous protein</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>cycle threshold</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor 2 alpha</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FAM	Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HCl	Chlorwasserstoff
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Inh	Inhibin
Kon	Kontrolle
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium)
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NFV	Nelfinavir
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
QCT	Quercetin
RNA	Ribonukleinsäure
SESN2	Sestrin 2
SOC	<i>super optimal broth</i> + Glucose (Nährmedium)
TAMRA	Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
Thapsi	Thapsigargin
TUN	Tunicamyzin
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

8 Literaturverzeichnis

Ameri, K. and A. L. Harris (2008). "Activating transcription factor 4." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 14-21.

Applied Biosystems (2011). "Real Time PCR vs Traditional PCR vs Digital PCR."

Retrieved 25.09.2012, from URL:

http://www.appliedbiosystems.com/etc/medialib/appliedbio-media-library/images/application-and-technology/real-time-pcr/Real-Time-PCR-vs-Traditional-PCR/data-images.Par.77184.Image.500.309.1.gif.Real_Time_Vs_Figure_3.gif.

Bachmann, M. F. and A. Oxenius (2007). "Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again." EMBO Rep **8**(12): 1142-1148.

Bell, D. and B. J. McDermott (2008). "Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems." Br J Pharmacol **153 Suppl 1**: S247-262.

Bell, D., Y. Zhao, et al. (2008). "Expression of the counter-regulatory peptide intermedin is augmented in the presence of oxidative stress in hypertrophied cardiomyocytes." Cell Physiol Biochem **21**(5-6): 409-420.

Biokurs. "Das Endoplasmatische Retikulum."

Retrieved 15.09.2012, from URL: <http://www.biokurs.de/skripten/bs11-53.htm>.

Brüning, A. (2011). "Analysis of nelfinavir-induced endoplasmic reticulum stress." Methods Enzymol **491**: 127-142.

Brüning, A., P. Burger, et al. (2009). "Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis." Invest New Drugs **27**(6): 543-551.

Brüning, A., P. Burger, et al. (2009). "Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis." Cancer Biol Ther **8**(3): 226-232.

- Brüning, A., A. Gingelmaier, et al. (2010). "New prospects for nelfinavir in non-HIV-related diseases." Curr Mol Pharmacol **3**(2): 91-97.
- Brüning, A., C. Matsingou, et al. (2012). "Inhibin beta E is upregulated by drug-induced endoplasmic reticulum stress as a transcriptional target gene of ATF4." Toxicol Appl Pharmacol.
- Brüning, A., M. Rahmeh, et al. (2010). "The mitochondria-independent cytotoxic effect of nelfinavir on leukemia cells can be enhanced by sorafenib-mediated mcl-1 downregulation and mitochondrial membrane destabilization." Mol Cancer **9**: 19.
- Brüning, A., M. Vogel, et al. (2011). "Bortezomib Targets the Caspase-Like Proteasome Activity in Cervical Cancer Cells, Triggering Apoptosis That Can be Enhanced by Nelfinavir." Curr Cancer Drug Targets.
- Budanov, A. V., A. A. Sablina, et al. (2004). "Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD." Science **304**(5670): 596-600.
- Budanov, A. V., T. Shoshani, et al. (2002). "Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability." Oncogene **21**(39): 6017-6031.
- Butler, C. M., E. J. Gold, et al. (2005). "Should activin betaC be more than a fading snapshot in the activin/TGFbeta family album?" Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 377-385.
- Chauhan, M., U. Yallampalli, et al. (2009). "Expression of adrenomedullin 2 (ADM2)/intermedin (IMD) in human placenta: role in trophoblast invasion and migration." Biol Reprod **81**(4): 777-783.
- Chen, B. P., C. D. Wolfgang, et al. (1996). "Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10." Mol Cell Biol **16**(3): 1157-1168.
- Deli, A., E. Kreidl, et al. (2008). "Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **14**(11): 1699-1709.

- Dey, S., T. D. Baird, et al. (2010). "Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response." J Biol Chem **285**(43): 33165-33174.
- Folkman, J. (2007). "Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?" Nat Rev Drug Discov **6**(4): 273-286.
- Gachon, F., G. Gaudray, et al. (2001). "The cAMP response element binding protein-2 (CREB-2) can interact with the C/EBP-homologous protein (CHOP)." FEBS Lett **502**(1-2): 57-62.
- Gills, J. J., J. Lopiccolo, et al. (2007). "Nelfinavir, A lead HIV protease inhibitor, is a broad-spectrum, anticancer agent that induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in vitro and in vivo." Clin Cancer Res **13**(17): 5183-5194.
- Grusch, M., C. Drucker, et al. (2006). "Deregulation of the activin/follistatin system in hepatocarcinogenesis." J Hepatol **45**(5): 673-680.
- Guo, X., J. C. Schmitz, et al. (2012). "Intermedin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and regulates cell proliferation and survival." Cancer Sci **103**(8): 1474-1480.
- Gupta, A. K., B. Li, et al. (2007). "The HIV protease inhibitor nelfinavir downregulates Akt phosphorylation by inhibiting proteasomal activity and inducing the unfolded protein response." Neoplasia **9**(4): 271-278.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2000). "Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response." Mol Cell **5**(5): 897-904.
- Hashimoto, O., K. Tsuchida, et al. (2002). "cDNA cloning and expression of human activin betaE subunit." Mol Cell Endocrinol **194**(1-2): 117-122.
- Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell **10**(11): 3787-3799.

- Healy, S. J., A. M. Gorman, et al. (2009). "Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy." Eur J Pharmacol **625**(1-3): 234-246.
- Hitomi, J., T. Katayama, et al. (2004). "Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death." J Cell Biol **165**(3): 347-356.
- IBA Lifesciences. "Labeled DNA for quantitative real-time PCR (qPCR) probes."
Retrieved 05.10.2012, from URL:
http://www.iba-lifesciences.com/Services_custom_oligos_custom_DNa_Fluorescent_label_Real-time_PCR_probes.html.
- Invitrogen (2009). "pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit: Five-minute cloning and expression of Taq polymerase-amplified PCR products in mammalian cells. User manual "
Retrieved 11.10.2012, from URL:
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1topota_man.pdf.
- Jiang, H. Y., S. A. Wek, et al. (2004). "Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response." Mol Cell Biol **24**(3): 1365-1377.
- Karp, G. (2010). Cell and molecular biology : concepts and experiments. Hoboken, NJ, John Wiley: 273-284.
- Karpinski, B. A., G. D. Morle, et al. (1992). "Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4820-4824.
- Keating, G. M. and A. Santoro (2009). "Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma." Drugs **69**(2): 223-240.
- Kilberg, M. S., J. Shan, et al. (2009). "ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation." Trends Endocrinol Metab **20**(9): 436-443.
- Kimmich, T., A. Brüning, et al. (2010). "Inhibin/activin-betaC and -betaE subunits in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line." Arch Gynecol Obstet **282**(2): 185-191.

- Klappan, A. K., S. Hones, et al. (2012). "Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity." Histochem Cell Biol **137**(1): 25-36.
- Kuhn, H., S. Hammerschmidt, et al. (2007). "Targeting tumorangiogenesis in lung cancer by suppression of VEGF and its receptor - results from clinical trials and novel experimental approaches." Curr Med Chem **14**(30): 3157-3165.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol **23**(21): 7448-7459.
- Lee, J. H., A. V. Budanov, et al. (2010). "Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies." Science **327**(5970): 1223-1228.
- Liu, S. Y., Y. J. Lee, et al. (2011). "Association of platelet-derived growth factor receptor beta accumulation with increased oxidative stress and cellular injury in sestrin 2 silenced human glioblastoma cells." FEBS Lett **585**(12): 1853-1858.
- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees, et al. (2009). "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination." Arch Pathol Lab Med **133**(9): 1463-1467.
- Morimoto, R., F. Satoh, et al. (2008). "Expression of adrenomedullin 2/intermedin in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues." J Endocrinol **198**(1): 175-183.
- Mungrue, I. N., J. Pagnon, et al. (2009). "CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade." J Immunol **182**(1): 466-476.
- Muttukrishna, S., D. Tannetta, et al. (2004). "Activin and follistatin in female reproduction." Mol Cell Endocrinol **225**(1-2): 45-56.

- Mylonas, I., J. Makovitzky, et al. (2006). "Inhibin/activin subunits beta-A (-betaA) and beta-B (-betaB) are differentially localised in normal, hyperplastic and malignant human endometrial tissue." Acta Histochem **108**(1): 1-11.
- Mylonas, I., C. Matsingou, et al. (2011). "Inhibin/activin betaE-subunit in uterine endometrioid adenocarcinoma and endometrial cancer cell lines: from immunohistochemistry to clinical testing?" Gynecol Oncol **122**(1): 132-140.
- Nishitoh, H. (2012). "CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response." J Biochem **151**(3): 217-219.
- Noack, R., S. Frede, et al. (2012). "Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential." Hum Mol Genet **21**(1): 150-162.
- Novoa, I., H. Zeng, et al. (2001). "Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha." J Cell Biol **153**(5): 1011-1022.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-389.
- Pearson, L. J., T. G. Yandle, et al. (2009). "Intermedin (adrenomedullin-2): a potential protective role in human aortic endothelial cells." Cell Physiol Biochem **23**(1-3): 97-108.
- Pyrko, P., A. Kardosh, et al. (2007). "HIV-1 protease inhibitors nelfinavir and atazanavir induce malignant glioma death by triggering endoplasmic reticulum stress." Cancer Res **67**(22): 10920-10928.
- Roh, J., C. L. Chang, et al. (2004). "Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes." J Biol Chem **279**(8): 7264-7274.
- Rosati, E., R. Sabatini, et al. (2010). "Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL." Blood **116**(15): 2713-2723.

- Rouhi, P., S. L. Lee, et al. (2010). "Pathological angiogenesis facilitates tumor cell dissemination and metastasis." Cell Cycle **9**(5): 913-917.
- Rzyski, T., M. Milani, et al. (2009). "Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia." Cell Cycle **8**(23): 3838-3847.
- Samali, A., U. Fitzgerald, et al. (2010). "Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response." Int J Cell Biol **2010**: 830307.
- Schneider, U. and H. U. Schwenk (1977). "Characterization of "T" and "non-T" cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after leukemic transformation." Haematol Blood Transfus **20**: 265-269.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." Mutat Res **569**(1-2): 29-63.
- Sgadari, C., P. Monini, et al. (2003). "Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth." Lancet Oncol **4**(9): 537-547.
- Shan, J., D. Ord, et al. (2009). "Elevated ATF4 expression, in the absence of other signals, is sufficient for transcriptional induction via CCAAT enhancer-binding protein-activating transcription factor response elements." J Biol Chem **284**(32): 21241-21248.
- Shield, A. J., T. P. Murray, et al. (2006). "Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase." Biochem Biophys Res Commun **347**(4): 859-866.
- Smith, R. S., Jr., L. Gao, et al. (2009). "Intermedin is a new angiogenic growth factor." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(3): H1040-1047.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-1416.

- Suresh, P. S., T. Rajan, et al. (2011). "New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited." Endocr J **58**(4): 223-235.
- Takahashi, S., Y. Sakakibara, et al. (2009). "Molecular cloning, expression and characterization of a novel mouse SULT6 cytosolic sulfotransferase." J Biochem **146**(3): 399-405.
- Teng, X., J. Song, et al. (2011). "Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin(1-53) protects against myocardial injury through a PI3 kinase-Akt signaling pathway." J Mol Med (Berl) **89**(12): 1195-1205.
- Todorovic, M., Z. Radisavljevic, et al. (2012). "Increased angiogenesis-associated poor outcome in acute lymphoblastic leukemia: a single center study." Appl Immunohistochem Mol Morphol **20**(5): 488-493.
- van Schadewijk, A., E. F. van't Wout, et al. (2012). "A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress." Cell Stress Chaperones **17**(2): 275-279.
- Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." J Clin Invest **115**(10): 2656-2664.
- Ye, J. and C. Koumenis (2009). "ATF4, an ER stress and hypoxia-inducible transcription factor and its potential role in hypoxia tolerance and tumorigenesis." Curr Mol Med **9**(4): 411-416.
- Ye, J., M. Kumanova, et al. (2010). "The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation." EMBO J **29**(12): 2082-2096.
- Yla-Herttuala, S., T. T. Rissanen, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine." J Am Coll Cardiol **49**(10): 1015-1026.

- Yoo, P. S., A. L. Mulkeen, et al. (2006). "Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor: implications for tumor angiogenesis." World J Gastroenterol **12**(31): 4937-4942.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell **107**(7): 881-891.
- Zhang, W., L. J. Wang, et al. (2012). "Intermedin: A Novel Regulator for Vascular Remodeling and Tumor Vessel Normalization by Regulating Vascular Endothelial-Cadherin and Extracellular Signal-Regulated Kinase." Arterioscler Thromb Vasc Biol.
- Zhao, H., J. Yang, et al. (2011). "Measuring the impact of cigarette smoke on the UPR." Methods Enzymol **489**: 147-164.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit auf ihre Art und Weise beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ioannis Mylonas für die Möglichkeit der Promotion sowie die Bereitstellung und Überlassung des Themas.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Herrn Dr. Ansgar Brüning für die ausgezeichnete Betreuung, seine wertvolle Unterstützung, seine Geduld mit uns Doktoranden, sein Wissen, dass er uns vermittelt hat und vor allem für seine ständige Präsenz und Hilfsbereitschaft.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Damen des Forschungslabors der Frauenklinik in Großhadern, Frau Martina Rahmeh, Frau Marianne Vogel und Frau Petra Burger. Danke für die gute Einführung in die Forschungsarbeit, die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und das Beantworten aller Fragen.

Ich bedanke mich bei der IMG M Laboratories GmbH in Martinsried für die Durchführung der Microarray Analyse.

Ein großes herzliches Dankeschön geht natürlich an meine Eltern und Familie, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und stets an mich geglaubt haben. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Schwestern Katrin Kuhnle fürs Korrekturlesen und Hanna Farfeleder, die mir mit allen Computerfragen weitergeholfen hat.

Zuletzt danke ich meinem Mann Uli für seine Unterstützung, die Geduld und das Mich-Ertragen während des Schreibens dieser Arbeit.

