

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

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**Die Inhibin/Aktivin Expression in gynäkologischen
Krebszellen und selektive Expression der Inhibin beta E
Untereinheit unter ER-Stressinduktion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christina Matsingou

aus Thessaloniki

2013

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Werner Meier

Prof. Dr. Doris Mayr

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: 12.12.2013

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet.

Ὁ μὲν βίος βραχύς, ἡ δὲ τέχνη μακρὴ, ὁ
δὲ καιρὸς ὀξύς, ἡ δὲ πείρα σφαλερὴ, ἡ δὲ
κρίσις χαλεπὴ.

Ἱπποκράτης ο Κώος (460–377 π. Χ.)

Das Leben ist kurz, die Kunst ist lang, die
Gelegenheit flüchtig, die Erfahrung trügerisch,
das Urteil schwierig.

Hippokrates von Kos (um 460–377 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	4
2 Einleitung	6
2.1 Nelfinavir und weitere Proteaseinhibitoren	6
2.2 Nelfinavir: eine Substanz mit vielen Gesichtern	8
2.3 Das endoplasmatische Retikulum	9
2.3.1 Stress im endoplasmatischen Retikulum	11
2.3.1.1 ER-Stress-induzierende Substanzen	13
2.4 Inhibine und Aktivine	14
2.4.1 Hormonelle Regulation und weitere Funktionen.....	14
2.4.2 Inhibin und Aktivin Untereinheiten.....	17
2.4.3 Die Inhibinsynthese	18
2.5 Fragestellungen	19
3 Materialien und Methoden	20
3.1 Die Zellkultur	20
3.2 Die RNA Extraktion aus den Zellen der Zellkultur	20
3.2.1 RNeasy Mini Kit.....	20
3.2.1.1 Materialien.....	20
3.2.1.2 Das RNeasy Mini Kit Protokoll	21
3.2.2 Präparationen mit dem TRIzol® Reagenz	22
3.2.2.1 Materialien.....	22
3.2.2.2 Das TRIzol® Protokoll	22
3.3 Die Reverse Transkriptase Reaktion und die anschließende Polymerase- Kettenreaktion.....	24
3.3.1 Materialien	24
3.3.2 RT-Reaktion und PCR-Protokolle.....	24
3.4 PCR polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion).....	26
3.4.1 Materialien	26
3.4.2 PCR-Protokoll.....	26

- Inhaltsverzeichnis -

3.4.3	Die Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion (DNA-Gelelektrophorese).....	27
3.4.3.1	Materialien.....	27
3.4.3.2	Auswertung.....	27
3.5	Die PCR-Klonierung.....	28
3.5.1	Die PCR-Produkt-Aufnahme in Vektoren und Transformation der Bakterien.....	29
3.5.1.1	Materialien.....	30
3.5.1.2	Transformationsprotokoll.....	31
3.5.2	Vermehrung der Bakterien.....	31
3.5.2.1	Materialien.....	31
3.5.2.2	Herstellung von flüssigem Wachstumsmedium und LB Agar Herstellung.....	32
3.5.3	Selektionieren der Bakterien.....	32
3.5.3.1	Ausplattieren der Bakterien.....	32
3.5.3.2	T7 BGH-PCR.....	32
3.5.3.3	T7 Inhibin beta E rückwärts-PCR.....	33
3.5.4	Plasmid Präparation	33
3.5.4.1	Materialien.....	33
3.5.4.2	Plasmidpräparationsprotokoll	33
3.5.5	Sequenzierung.....	34
3.5.6	Transfektion.....	35
3.5.6.1	Materialien.....	35
3.5.6.2	Durchführung der Transfektion	35
3.5.7	Zellfixierung	35
3.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	36
3.6.1	Materialien	36
3.6.2	Präparation der Zellen und Mikroskopie.....	36
3.7	Western Blot.....	37
3.7.1	Materialien	37
3.7.2	Western Blot Protokoll	38
4	Ergebnisse	41
4.1	Microarray.....	41

- Inhaltsverzeichnis -

4.1.1	Allgemeine Bemerkungen	41
4.1.2	Der Microarray als Grundlage weiterer Untersuchungen.....	42
4.1.2.1	Hochregulierte Gentranskripte.....	44
4.1.2.2	Reprimierte Gentranskripte.....	46
4.1.3	Verifikation der Ergebnisse	48
4.2	Inhibin-Regulation durch Nelfinavir	49
4.2.1	Epitheliale Zelllinien.....	49
4.2.1.1	Inhibin beta E	50
4.2.1.2	Andere Inhibin-Untereinheiten	50
4.2.1.3	Endothelin 2	50
4.2.1.4	XBP 1	51
4.2.2	Leukämiezelllinien	52
4.2.2.1	Inhibin beta E	53
4.2.2.2	Andere Inhibin-Untereinheiten	53
4.2.2.3	Endothelin 2	53
4.2.2.4	HIVEP3.....	53
4.2.2.5	XBP 1	53
4.3	Weitere durch Nelfinavir regulierte Gene.....	54
4.4	Konzentrationsabhängigkeit	55
4.5	Untersuchungen an Endometriumkarzinomzelllinien	57
4.6	Die Inhibin beta E Klonierung.....	60
4.6.1	Klonierung und Screening.....	60
4.6.1.1	Klonierung der cDNA aus Ishikawa plus Zellen.....	60
4.6.2	Sequenzierung	64
4.6.2.1	Die Inhibin beta E Sequenz	64
4.6.2.2	Die Sequenz von „Plasmid 10“	65
4.6.3	Transfektion: Western Blot- und Immunfluoreszenz Ergebnis... ..	68
4.7	Die Inhibin beta E Expression unter ER-Stress	70
5	Diskussion	73
5.1	Inhibin beta E: ein neuer ER-Stress Marker	73
5.2	Nelfinavir und die Auslösung von ER-Stress.....	75
5.3	Nelfinavir als chemotherapeutisches Adjuvanz in klinischen Studien	77
5.4	Stress im endoplasmatischen Retikulum	79

- Inhaltsverzeichnis -

5.4.1	Aktivierung von Stress im endoplasmatischen Retikulum in physiologischen Prozessen	79
5.4.2	ER-Stress: relevante Erkrankungen und andere pathologische Prozesse	80
5.4.2.1	ER-Stress relevante Erkrankungen.....	80
5.4.2.2	Kanzerogenese und ER-Stress.....	81
5.4.2.3	Malignitätserhöhung bei Tumoren in Verbindung mit ER-Stress und Hypoxie	82
5.5	Die Inhibin beta E Regulation unter ER-Stress	83
5.5.1	Die Überexpression der INHBE-Untereinheit unter ER-Stress	83
5.5.2	Modelle für die Erklärung der Überexpression der INHBE-Untereinheit unter ER-Stress.....	84
5.6	Die Inhibin beta E Überexpression	87
5.6.1	Physiologische Rolle der INHBE-Untereinheit-Überexpression ..	87
5.6.2	Pathologien hinter der INHBE-Untereinheit-Überexpression.....	87
6	Anhang.....	90
6.1	Genfunktionstabellen und Tabellen zu untersuchten Zelllinien	90
6.1.1	Genfunktionen.....	90
6.1.2	Zelllinien.....	92
6.2	Primerliste	94
	Vorabpublikationen.....	96
	Eidesstattliche Versicherung.....	97
	Danksagung	98
	Literaturverzeichnis.....	100

Abkürzungsverzeichnis

A		DDIT	DNA-damage-inducible transcript
ADM2	Adrenomedullin 2	DDR2	discoidin domain receptor family, member 2
AK	Antikörper	DEPC	Diethylpyrocarbonat
AKNA	AT-hook transcription factor	dGTP	Desoxyguanintriphosphat
AKT	Protein Kinase B	DKK1	dickkopf related protein-1
ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ATF	activating transcription factor	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
AYTL2	Homo sapiens mRNA for FLJ00365 protein	DR5	death receptor 5
B		DTT	Dithiothreitol
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	dTTP	Desoxythymintriphosphat
BGH	bovine growth hormone	E	
BiP	Binding immunoglobulin Protein	EDN2	endothelin 2
bp	Basenpaare	eIF2a	α -subunit of the eukaryotic initiation factor 2
C		EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
CCND1	cyclin D1	ER	endoplasmic reticulum, endoplasmatisches Retikulum
CD	cluster of differentiation	ERN1	endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1 (ERN1), transcript variant 1
cDNA	complementary DNA	ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
CHAC1	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	EPPK1	epiplakin 1
CHOP	C/ERB homologous protein	F	
CLL	chronisch lymphatische Leukämie	FGF21	fibroblast growth factor 21
COX	Cyclooxygenase	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1
CTH	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	FIT	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
D			
dATP	Desoxyadenosintriphosphat		
dCTP	Desoxycytosintriphosphat		

- Abkürzungsverzeichnis -

FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	IM9	human B lymphoid-derived cell line
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon	INHBE	Inhibin beta E
G		IRE1	inositol requiring protein 1
GADD45A	growth arrest and DNA-damage inducible, alpha	J	
GER	glattes endoplasmatisches Retikulum	K	
GI-Trakt	gastrointestinaler Trakt	KLHDC7B	kelch domain containing 7B
H		L	
Hec	human endometrial cancer cell line	LB	lysogeny broth
HEK 293	human embryonic kidney 293	LDOC	Leucine zipper protein down-regulated in cancer cells
HeLa	Henrietta Lacks	LH	Luteinisierendes Hormon
Hep G2	human hepatocellular carcinoma cell line	M	
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	MCF 7	Michigan Cancer Foundation 7
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus	MDA-MB	Breast Adenocarcinoma Cells
HIVEP	human immunodeficiency virus enhancer binding protein	MEK/ERK	Mitogene-aktivierte Proteinkinase /extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
HL60	human promyelocytic leukemia cell line	M-MLV RT	Moloney Murine Virus Reverse Transcriptase
HPV	humane Papillomviren	mRNA	messenger RNA
Hsp70	Hitzeschockproteine von 70 kDa	N	
HSPA	heat shock 70kDa protein	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
I		NCI-60	National Cancer Institute 60
IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats	ND3	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 NADH dehydrogenase subunit 3
IGF I	Insulin-like growth factor 1	NFV	Nelfinavir
IgM	Immunoglobulin M	NSCLC	non-small cell lung carcinoma
		O	
		OVCAR	ovarian carcinoma cell line

- Abkürzungsverzeichnis -

P		SDS	Sodiumdodecylsulfat
PAOX	polyamine oxidase (exo-N4-amino)	SERCA	sarcoendoplasmatic reticulum Ca ²⁺ ATPase
PBMC	periphere mononukleäre Zellen	SESN2	sestrin 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	SOC	SOB (Super Optimal Broth) mit 20 mM Glucose
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion	SREB	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
PERK	Protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase	T	
peIF2	phosphorylated α -subunit of the eukaryotic initiation factor 2	T47D	human ductal breast epithelial tumor cell line
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	Taq	Thermus aquaticus
PI3K/Akt	Phosphatidylinositid 3-Kinase/Akt	TGF	Tumor growth factor
p.o.	per os	TLC1	TeLomerase Component 1
PSG4	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
PVDF	Polyvinylidenfluorid	tRNA	transfer RNA
Q		TUSC	tumor suppressor candidate
R		TSPAN2	tetraspanin 2
RL-95-2	humane endometriale Krebszelllinie aus Grad 2 moderat differenzierten adenosquamösen Endometriumkarzinomzellen	TX	thioredoxin interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure	TXNIP	Thioredoxin interacting protein
rRNA	ribosomale RNA	TXNL4B	thioredoxin-like 4B
RT	Reverse Transkriptase	U	
S		UPR	unfolded protein response
		UV-Licht	ultraviolettes Licht
		V	
		W	
		X	
		XBP 1	x-box-binding protein 1
		Y	
		Z	
		ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte:

- die Effekte des Proteaseinhibitors Nelfinavir auf das Genexpressionsmuster des menschlichen Genoms in der Zelllinie MCF7,
- die Expression von Inhibin/Aktivin Untereinheiten in gynäkologischen Krebszelllinien und
- die selektive Expression der Inhibin beta E Untereinheit unter ER-Stressinduktion.

Das anfängliche Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von transkriptionellen Veränderung im menschlichen Genom unter dem Einfluss des Medikaments Nelfinavir. Nelfinavir ist ein HIV-Proteaseinhibitor, welcher zusätzlich endoplasmatischen Retikulum Stress und Apoptose in Tumorzellen induziert, was zurzeit im Rahmen von klinischen Studien als neuer Mechanismus der Krebsbekämpfung getestet wird. Die Effekte von Nelfinavir auf molekularer Ebene sind allerdings nur unzureichend geklärt. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein Mikroarray durchgeführt. Somit konnten Veränderungen in der transkriptionellen Rate des gesamten Genoms aufgezeigt werden, soweit es die Sensitivität des Microarrays erlaubte.

Durch die Microarrayanalyse konnten vorwiegend drei Gruppen selektierter regulierter Gentranskripte identifiziert werden: 1. Gene, welche ER-Stress relevante Proteine kodieren, 2. Gene, welche Proteine kodieren, die mit dem oxidativen Stress zusammenhängen und 3. bestimmte Peptidhormone wie Inhibin beta E.

Die Ergebnisse des Mikroarrays, insbesondere bezüglich der Inhibin Regulation, wurden mit Hilfe der qualitativen PCR sowohl auf epithelialen Tumorzellen (MCF7, HeLa), transformierten Zellen (HEK293), als auch auf Leukämiezelllinien (IM9, Jurkat, HL60) überprüft. Bei der Verifikation der Ergebnisse mittels PCR fiel auf, dass die Inhibin beta E Expression in allen getesteten Zelllinien durch Nelfinavir erhöht werden konnte und dass dieser Effekt mit der Nelfinavir-Konzentration korrelierte.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Induktion von Inhibin beta E nicht auf Nelfinavir beschränkt ist, sondern ein genereller physiologischer Mechanismus nach ER-Stressinduktion ist. Zellen der Zelllinie MCF7 wurden mit verschiedenen ER-Stress induzierenden Substanzen (Nelfinavir, Bortezomib, Thapsigargin, Tunicamycin, DTT) inkubiert und bezüglich der Expression von Inhibin beta E untersucht. Als „Indikator“ für den ER-Stress wurde parallel das Spleißen von XBP 1 nachgewiesen. Es konnte in gynäkologischen Krebszellen festgestellt werden, dass die Erhöhung der

Inhibin beta E Expression mit der Entstehung und Stärke des ER-Stresses in der Zelle korreliert. Dies ist ein erstmaliges Erkenntnis dieser Arbeit. Wir konnten zusätzlich nachweisen, dass eine Konzentrationsabhängigkeit der Stärke der Inhibin beta E Expression mit ER-Stress induzierenden Substanzen (wie NFV) besteht.

Die Untersuchung der Expression von Inhibin beta E und weiterer Inhibin Untereinheiten wurden auf weitere, vorwiegend endometriale Krebszelllinien (Ishikawa plus, Ishikawa minus, Hec 1 A, Hec 1 B, RL 95-2) ausgeweitet und mit der Expression im normalem Endometrium verglichen. Die extreme Variabilität der endogenen Inhibin Expression unter diesen Zelllinien und die starke Inhibin beta E Expression von Ishikawa plus Zellen waren die wichtigsten Erkenntnisse der Untersuchungen. Die genaue Bedeutung der verschiedenen Expressionsmuster und deren Rolle in der Kanzerogenese waren allerdings nicht von diesen Zelllinien ableitbar. Durch die Klonierung der Inhibin beta E Einheit und die Transfektion in Tumorzelllinien konnte jedoch diesbezüglich ein Modell für funktionelle Untersuchungen an gynäkologischen Tumorzellen etabliert werden.

Das Wissen über die ER-Stress-Auslösung durch Nelfinavir und die neue Erkenntnis der transkriptionellen Regulation der Inhibin beta E Einheit durch dieses Medikament führten zum ersten Mal zur Identifikation eines autokrinen bzw. möglicherweise auch parakrin wirkenden Peptidhormons beim ER-Stress. Ferner konnten so erste Erkenntnisse über die bislang kaum verstandene physiologische Funktion der Inhibin beta E Untereinheit gewonnen werden, von der, anders als bei den bekannten beta A und beta B Untereinheiten, keinerlei Funktion als Geschlechtshormon angenommen wird.

2 Einleitung

2.1 Nelfinavir und weitere Proteaseinhibitoren

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchungen schwerpunktmäßig das antiretrovirale Medikament Nelfinavir (Viracept®) eingesetzt. Die Untersuchungen wurden primär unter dem Aspekt der antitumoralen Wirkung von Nelfinavir durchgeführt. Dennoch ist das Medikament vorwiegend bekannt als ein HIV-Proteaseinhibitor, welcher früher häufig in der klinischen Therapie eingesetzt wurde.

Nelfinavir (Viracept®) wurde erstmalig 1998 in den Markt eingeführt und ist eines der ersten antiretroviralen Pharmaka aus der Gruppe der Proteaseinhibitoren. Das Medikament wird heutzutage ausschließlich als Teil einer anti-HIV-1-Kombinationstherapie verschrieben. In der Kombinationstherapie wird es meist mit Nukleosidanaloga (Kombinationen wie z.B. Zidovudin + Lamivudin + Nelfinavir) verordnet (Karow, 2010), um Resistenzentwicklung des HI-Virus vorzubeugen und die Effektivität der antiretroviralen Therapie zu steigern. Nelfinavir hemmt die virale Protease und unterbindet somit die Neusynthese funktionsfähiger viraler Proteine.

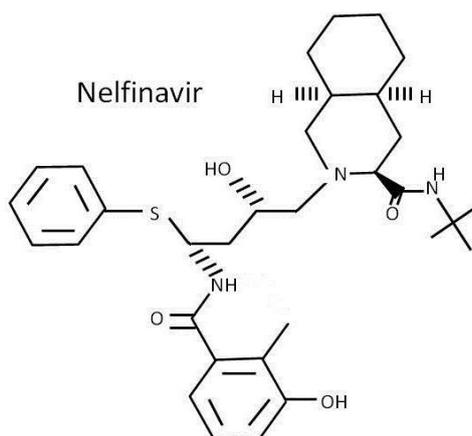


Abbildung 1: Strukturformel des Proteaseinhibitors Nelfinavir (Viracept®).

Die Hauptnebenwirkungen von Nelfinavir sind gastrointestinale Beschwerden und endokrinologische Störungen (Fachinformationen des Herstellers, Beipackzettel aus der Roten Liste, Stand Mai 2011, ROTE LISTE, 2011). Was die endokrinologischen Störungen und insbesondere die Insulin-Resistenz angeht, führt die Substanzeinnahme zu verminderter Glukosetoleranz (oftmals resultierend in einen klinisch relevanten Diabetes mellitus Typ II) und Hyperlipidämien. Dennoch sind Beschwerden, wie Blähungen und Durchfälle, weitaus häufiger. Eine der schwersten Nebenwirkungen im Bereich des GI-Trakts ist die medikamentös induzierte Hepatitis. Deshalb ist

die Einnahme bei leberkranken Patienten nur eingeschränkt und unter kontrollierten Bedingungen möglich. Es handelt sich ansonsten im Allgemeinen um ein gut verträgliches Medikament.

Die Boosterung, das bedeutet die Plasmaspiegelerhöhung von anderen Proteaseinhibitoren bei Einnahme, ist unter Nelfinavireinnahme nicht so effektiv, wie unter Einnahme anderer Proteaseinhibitoren. Solche sind z.B. Ritonavir (Norvir®), Lopinavir (als Teil einer Lopinavir-Ritonavir-Kombination im Präparat Kaletra® enthalten) oder Saquinavir (Invirase®, Fortovase®).

Einen Überblick über die Proteaseinhibitoren, welche heutzutage in der antiretroviralen Therapie eingesetzt werden bietet Tabelle 1. In der Tabelle sind auch die Handelsnamen der Präparate, sowie gebräuchliche Dosierungen zusammengefasst.

Tabelle 1: Proteaseinhibitoren.

PROTEASEINHIBITOREN

Freiname	Handelsname	antivirale Kombinationstherapie bei HIV (Erwachsene und Jugendliche)
AMPRENAVIR	Agenerase™	Erwachsene + Jugendliche > 12 J.: 2 x 1200 mg, bei Kombination mit Ritonavir: Amprenavir 2 x 600 mg, Ritonavir 100-200 mg
INDINAVIR	Crixivan®	Erwachsene: 3 x 800 mg/die p.o.; alternatives Dosierungsschema: Indinavir 400 mg + Ritonavir 100 mg 2 mal/Tag p.o.
LOPINAVIR +Ritonavir	Kaletra®	Erwachsene +Jugendliche: 2 x 5ml Lösung (in 5 ml 400 mg Lopinavir/100 mg Ritonavir/die) oder 2 x 2 oder 1 x 4 Filmtabletten à 200 mg Lopinavir/50 mg Ritonavir/die
NELFINAVIR	Viracept®	Erwachsene + Jugendliche > 13J: 3 x 750 mg oder 2 x 1250 mg; eventuell in Kombination mit Ritonavir 2 x 100 mg
RITONAVIR	Norvir®	Erwachsene: 2 x 600 mg (2 x 600 mg Filmtabletten bzw. 2 x 7,5ml Lsg/die, 80mg/ml Lösung)
SAQUINAVIR	Invirase®	Erwachsene + Jugendliche > 16 J.: 2 x 1000 mg (entspricht 2 x 500 mg Filmtbl.) + Ritonavir 2 x 100 mg

Zu Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der zu Verfügung stehenden Proteaseinhibitoren und deren gebräuchlichen Dosierungen (Empfehlungen der Hersteller, Stand 2011, ROTE LISTE, 2011). Die Dosierungsschemata der kommerziellen Präparate wurden mithilfe der „Roten Liste 2011“ (ROTE LISTE, 2011) und weiterer Quellen (Karow, 2010; Estler and Allendörfer, 2007, p. 871) erfasst.

2.2 Nelfinavir: eine Substanz mit vielen Gesichtern

Nelfinavir spielt aktuell durch die Entwicklung effektiverer und besser boosterbarer Proteaseinhibitoren - Nelfinavir kann weder geboostert werden, noch als Booster eingesetzt werden - eine weniger wichtige Rolle in der antiretroviralen Therapie. Dennoch besteht seit Jahren ein erhöhtes Interesse für diese Substanz, da sie vielseitige Effekte auf der Ebene des zellulären Stoffwechsels und der Apoptose hat (Bruning *et al.*, 2009a). Nelfinavir hat in mehreren Untersuchungen gezeigt, dass es bei Krebszellen die Apoptose induzieren kann und, dass es sogar als Krebsmedikament potentiell eingesetzt werden kann (Cohen, 2007). Im Fall von Ovarialkarzinomzellen kommt es zur Apoptose durch die Hochregulation des TRAIL-Rezeptors (Bruning *et al.*, 2008). Die kombinierte Anwendung von Nelfinavir und Tamoxifen maximiert die zytotoxischen Effekte der Substanz und führt zu einer effizienteren *in vitro* Elimination der Mammakarzinomzellen (Bruning *et al.*, 2010a). Dieser Effekt der Tumorzellenelimination wird auch durch Erhöhung des ER-Stresses mittels Nelfinavir und COX-2-Inhibitoren (Celecoxib) erzielt (Cho *et al.*, 2009). Zusätzlich wirkt Nelfinavir TRAIL-sensitivierend bei Glioblastom-Zellen (Tian *et al.*, 2011).

Nelfinavir und seine zytotoxischen Effekte auf Krebszellen machen Nelfinavir zum interessanten Kandidaten für die onkologische Therapie. Die radiosensitivierende Wirkung der Proteaseinhibitoren ist ein zusätzlicher Vorteil in der Radiotherapie und macht sie zu zulässigen Adjuvanzen in der Krebstherapie bei HIV-positiven Patienten (See *et al.*, 2011).

Aus den oben erwähnten Tatsachen wird ersichtlich, dass Nelfinavir ein vielseitiges Medikament ist. Darüber hinaus sind seine Effekte auf die Transkription verschiedener Gene zum größten Teil unerforscht. Deshalb wurde als erster Schritt in dieser Arbeit ein Mikroarray durchgeführt. Durch diesen Mikroarray, der in Auftrag der Frauenklinik Maistraße angefertigt wurde, konnte die Regulation vieler unterschiedlicher Gentranskripte unter dem Einfluss von Nelfinavir untersucht werden. Die Erfassung der Auswirkungen des Proteaseinhibitors auf die Transkriptionsrate dieser Gene bot Orientierung für weitere Untersuchungen in dieser Arbeit.

2.3 Das endoplasmatische Retikulum

Voruntersuchungen zeigten, dass Nelfinavir ER-Stress induzierend auf Krebszellen wirkt (Bruning, 2011). Der ER-Stress und seine Wirkung auf die Inhibin beta E Expression stellen einen wichtigen Teil dieser Arbeit dar. Deshalb werden in diesem Teil die Aufgaben des endoplasmatischen Retikulums und die Grundzüge der Entstehung von ER-Stress besprochen.

Das endoplasmatische Retikulum ist der Proteinsyntheseort der Zelle. Es besteht aus verschiedenartig angeordneten membranbegrenzten Zisternen im Zytoplasma und wird in raues- (ribosomenbesetztes-) und glattes (ribosomenfreies) ER eingeteilt (Vgl. Welsch, 2006, p. 45). Das Ribosomen-besetzte ER ist der Hauptproduktions- und Modifikationsort für Proteine. Das glatte endoplasmatische Retikulum ist der Ort der Zweitmodifikationen mittels Enzymen und der Ca^{2+} -Speicherort der Zellen (Welsch, 2006, pp. 46–47). Insbesondere bei Muskelzellen ist das GER eine sehr wichtige funktionelle Einheit. Das ER wird in Abbildung 2 dargestellt.

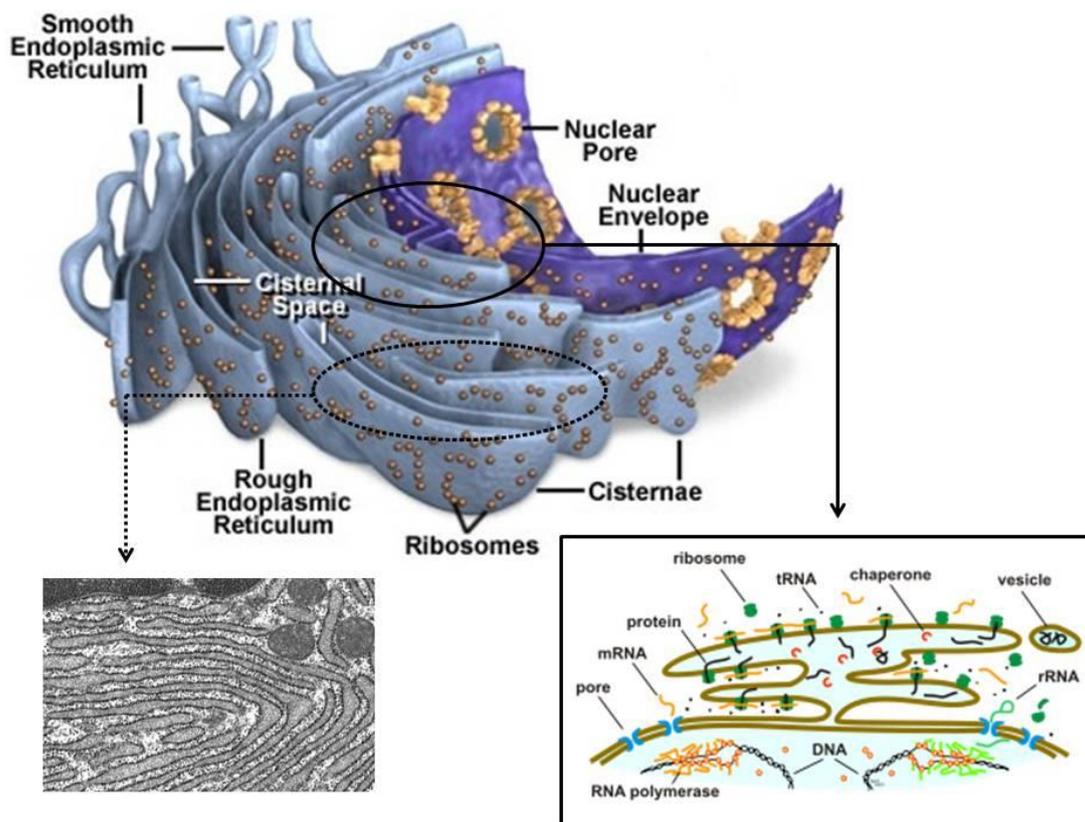


Abbildung 2: Das endoplasmatische Retikulum (Davidson W. Michael, 2004; Wikipedia, 2011a; Deborah W. Vaughan, 2002). Mit freundlicher Genehmigung von Michael M. Davidson (copyright © 2004 Michael M. Davidson) und Deborah W. Vaughan (copyright © 2002 Deborah W. Vaughan).

- Einleitung -

In Abbildung 2 sieht man im oberen Teil eine Skizze des glatten und rauhen endoplasmatischen Retikulums (obere Skizze Davidson W. Michael, 2004). Es wird besonders gut gezeigt, wie das ER mit dem Zellkern in Kontakt steht. Als „Vergrößerung“ eines Teils des rauhen ER der ersten Skizze, sieht man in der rechten unteren Skizze (Wikipedia, 2011a) die funktionellen Einheiten des ER. Auf der linken unteren Seite von Abbildung 2 wird das ER mit einer elektronenmikroskopischen Aufnahme dargestellt (Deborah W. Vaughan, 2002). Die mikroskopische Aufnahme zeigt Teile des ER einer Plasmazelle, welche einen sehr hohen Gehalt an rauem ER hat.

2.3.1 Stress im endoplasmatischen Retikulum

ER-Stress bedeutet, es kommt zu einer übermäßigen Akkumulation von vielen ungefalteten oder nur teilweise gefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum. Eine Zusammenfassung der Mechanismen für die Auslösung und die Vorgänge bei ER-Stress und UPR bietet Abbildung 3.

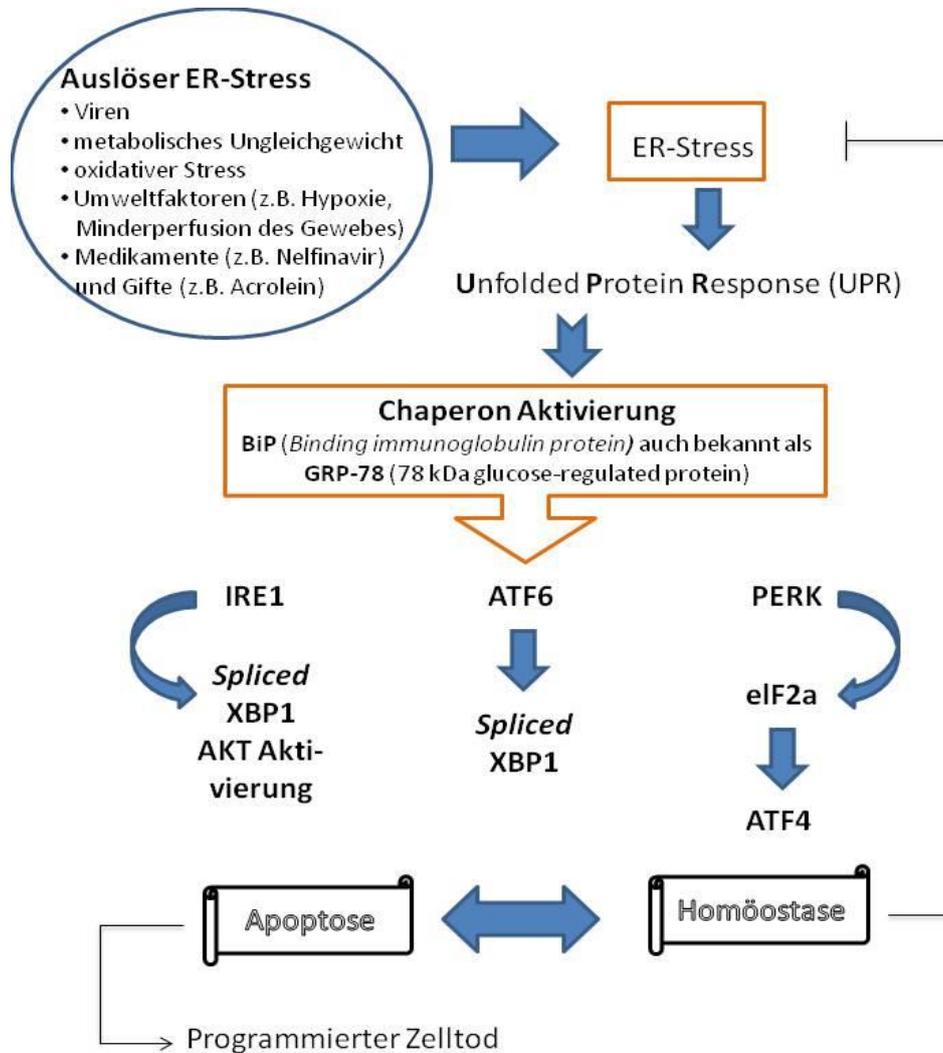


Abbildung 3: Mechanismen der ER-Stress- und UPR-Induktion.

Auslöser von ER-Stress können endogene oder exogene Stimuli sein. Die ER-Stress-Auslöser sind stichpunktartig in Abbildung 3 aufgeführt. Zu diesen gehören Viren (He, 2006; Yu *et al.*, 2006), metabolisches Ungleichgewicht wie z.B. bei Hyperhomocysteinämie (Ji and Kaplowitz, 2004), oxidativer Stress (Gao *et al.*, 2012a), Um-

weltfaktoren wie z.B. Hypoxie (Feldman *et al.*, 2005), Medikamente oder Gifte wie z.B. Acrolein (Mohammad *et al.*, 2012).

Die Zellen haben einen effektiven Mechanismus um bei ER-Stress zu reagieren. Es handelt sich hierbei um die sogenannte Unfolded Protein Response (UPR). Die UPR bewirkt Änderungen in der zellulären Stoffwechsellage, eine Beschleunigung der transkriptionellen Vorgänge und die Hochregulation von Chaperon-Genen (Zhao and Ackerman, 2006).

Chaperone spielen eine sehr wichtige Rolle sowohl in physiologischen als auch pathologischen Vorgängen der Proteinfaltung. Sie sind Proteine der Familie der sogenannten Hitzeschockproteine (Hartl, 1991), welche Proteine unter extremen Bedingungen („Hitzeschock“) stabilisieren (Hartl *et al.*, 1994) und somit deren weitere komplette Faltung unterstützen. BiP (Binding immunoglobulin Protein) gehört zur Familie der Hsp70-Chaperone (Hitzeschockproteine von 70 kDa). Eine weitere wichtige Rolle von Chaperonen ist die Erkennung falsch gefalteter Proteine (Naylor and Hartl, 2001) und die Einleitung ihrer Elimination im Fall, dass sie nicht korrekt gefaltet werden können (Stolz and Wolf, 2010).

Die ER-Stress-Signalwege stehen somit eng mit der Chaperon-Aktivierung zusammen. Das sogenannte Binding immunoglobulin protein (BiP) startet die drei wichtigsten Signalwege („pathways“) in der UPR: den IRE1-, PERK- (Bertolotti *et al.*, 2000) und ATF6-Signalweg.

IRE1 (inositol requiring protein 1) ist eine Serin-/Threonin-Proteinkinase. Durch die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum wird IRE1 aktiviert und dimerisiert (Tirasophon *et al.*, 1998). IRE1 induziert das Spleißen von XBP 1 (Yoshida *et al.*, 2001) und die Aktivierung des Akt-Signalweges (Hu *et al.*, 2007).

Ein weiterer Signalweg ist der PERK (Protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) Signalweg (Abbildung 3, S. 11). PERK phosphoryliert einen weiteren Transkriptionsfaktor, eIF2 α (α -subunit of the eukaryotic initiation factor 2) (Harding *et al.*, 1999). eIF2 α führt weiterhin zu einer Translation des Transkriptionsfaktors ATF4 (Activating transcription factor 4 oder auch tax-responsive enhancer element B67 genannt) (Weizmann Institute of Science and Xenex). ATF4 ist ein Transkriptionsaktivator, bindet das sogenannte cAMP response element (CRE) und gehört der Familie der Leucin Zipper an (Ameri and Harris, 2008). Er spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Hypoxieresistenz in Zellen (Rzymski *et al.*, 2009).

Der dritte wichtige ER-Stress-Signalweg ist der ATF6 (active transcription factor 6)-Signalweg. ATF6 entsteht in ER-Stress exponierten Zellen (Haze *et al.*, 1999). Der

Transkriptionsfaktor führt zu einer erhöhten Expression von XBP 1 (Teske *et al.*, 2011) (Abbildung 3, S. 11).

Wenn die Zelle die Proteinfaltung korrigieren kann, erlangt sie durch komplexe Reparaturmechanismen wieder ihr anfängliches Gleichgewicht. In den meisten Fällen ist sie zu diesem Zeitpunkt dem ER-Stress nicht mehr - oder im kleineren Maße - ausgesetzt. Im Fall eines prolongierten ER-Stresses oder eines zu starken Auslösers kommt es u.a. mangels ausreichender Reparaturmöglichkeiten zum programmierten Zelltod. Die Zelle wird apoptotisch.

2.3.1.1 ER-Stress-induzierende Substanzen

In dieser Arbeit wurde der ER-Stress mit verschiedenen Substanzen induziert, welche nachweislich zu dieser zellulären Reaktion führen. Diese sind: *Thapsigargin*, *Tunicamycin*, *Nelfinavir* und *Dithiothreitol*. Medikamente wie Bortezomib, Staurosporin, Paclitaxel, Cisplatin wurden hier als Negativkontrollen bzw. zum Vergleich eingesetzt. Eine genauere Auflistung der Medikamente und ihrer molekularen Wirkmechanismen, insofern sie bekannt sind, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: ER-Stress induzierende Substanzen.

SUBSTANZ	MECHANISMUS
THAPSIGARGIN	Thapsigargin ist ein SERCA-(sarcoendoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase-) Inhibitor (Rogers <i>et al.</i> , 1995) und führt zur Steigerung der zytosolischen Ca ²⁺ Konzentration. Thapsigargin ist ein potenter ER-Stress-Induktor.
TUNICAMYCIN	Tunicamycin ist eine Nukleosid-Antibiotika-Mischung. ER-Stress-induzierend durch die Blockade der Synthese von N-Glykanen im ersten Schritt der Glykosylierung (Produktinformationen der Firma Sigma-Aldrich (Firma SIGMA-ALDRICH; Varki, 1999).
NELFINAVIR	Der Mechanismus der ER-Stress Induktion ist bei Nelfinavir weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass Nelfinavir als Proteaseinhibitor durch Proteaseinhibition zur Entstehung von ER-Stress beiträgt. Hier ist besonders die S-Proteinase 2 zu erwähnen.
DITHIOTHREITOL	Dithiothreitol (kurz DTT) ist ein Zellkonservierungsmittel. Es blockiert die Sulfhydryl-Gruppen-Oxidation und konserviert die Proteine in ihrer funktionellen Form (Wikipedia, 2011b).

2.4 Inhibine und Aktivine

Nach mehreren Vorselektionen und Untersuchungen stellten sich die Inhibine und insbesondere die Inhibin beta E-Untereinheit, wegen ihrer zum großen Teil unerforschten Wirkungen und aufgrund ihrer Transkriptionsregulation durch Nelfinavir, als interessante Kandidatengene dar.

2.4.1 Hormonelle Regulation und weitere Funktionen

Inhibine sind heterodimere Polypeptidhormone (Kaufmann *et al.*, 2006, p. 40; Groome and O'Brien, 1993) und gehören zur Tumor growth factor (TGF) β -Superfamilie (Löffler, 2007, p. 872). Sie werden in Sertoli-Zellen des Hodens und Granulosazellen des Ovars (Kiechle, 2007, p. 107) gebildet und sind wichtige Regulationshormone für die Sekretion der Gonadotropine LH und FSH.

Inhibine und ihre Gegenspieler, Aktivine, sowie eine dritte Gruppe von Hormonen, die Follistatine, beeinflussen die Sekretion der Gonadotropine im hypothalamisch-hypophysären-System (Löffler, 2007, p. 872). Inhibine haben vielfältige Wirkungen auf den menschlichen Organismus. Es wird vermutet, dass die Inhibin-Konzentrationschwankungen bei der Frau den Ablauf der Zyklusphasen regeln (Sehested *et al.*, 2000). Die Inhibin/Estradiol Interaktion ist auch bei der Reifung und Selektion sprungreifer Follikel bei der Frau kritisch (Schmidt-Matthiesen and Fournier, 2005, p. 42). Sie spielen sogar in der Fertilität eine wichtige Rolle, da gezeigt werden konnte, dass Mutationen der Inhibin kodierenden Gene mit der Entstehung der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz assoziiert sind (Chand *et al.*, 2010).

Inhibine spielen ebenfalls eine Rolle in der Kanzerogenese, im Wachstum und in der Prognose von Malignomen. Die Serumkonzentration bestimmter Inhibine korreliert z.B. im Fall von Granulosazell-Tumoren, aber auch bei zahlreichen anderen Neoplasmen, mit der Tumorgroße. In einzelnen Fällen können Inhibin-Einheiten als prognostische Marker für den Verlauf von Krebsleiden herangezogen werden, wie z.B. Inhibin alpha beim Patientinnen mit Endometriumkarzinom (Mylonas *et al.*, 2009).

Beim Mann ist die Rolle der Inhibine noch weitgehend unklar. Dennoch belegen Studien, dass Inhibine, und insbesondere Inhibin beta B, mit der Funktionalität der Sertoli-Zellen des Hodens und somit mit einem sehr wichtigen Parameter der Fertilität des Mannes korrelieren (Anawalt *et al.*, 1996). Bei männlichen Patienten können Inhibine ebenfalls als Verlaufsparemeter bei Neoplasmen des männlichen Urogenitalsystems eingesetzt werden. Als Beispiel hierfür dient die Inhibin alpha Untereinheit, deren Expression beim Prostatakarzinom supprimiert ist und deren Gen-

Methylierung als prognostischer Faktor für die Erkrankung dient (Balanathan *et al.*, 2009).

Weitere Vorgänge, bei denen Inhibine involviert sind, sind folgende: die Differenzierung der Erythrozyten (Shav-Tal and Zipori, 2002), die Insulin Sekretion (Codner *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2009) und die embryonale axiale Entwicklung. Darüber hinaus sind Inhibine auch in verschiedene Pathologien der Schwangerschaft verwickelt (Fitzgerald *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2011; El-Gharib and Morad, 2011). Auch bei regulatorischen Vorgängen des Immunsystems scheinen sie eine Schlüsselrolle zu spielen (Aleman-Muench and Soldevila, 2011).

Die Hauptrolle von Aktivinen wurde oben schon erwähnt und bezieht sich auf die Hochregulation der FSH-Synthese. Diese Hormone sind ebenfalls in der Apoptose und Karzinogenese involviert. Eine letztlich sehr interessante Aufgabe der Aktivine findet sich in der Wundheilung. Um genauer zu sein, konnten Studien zeigen, dass Aktivine mittels der Proliferationsregulation der Stromazellen und Keratinozyten der Haut die Wundregeneration beeinflussen (Bamberger *et al.*, 2005). Außerdem ist „Aktivin-A auch ein Regulator der Zahnentwicklung und ein möglicher autokriner Stimulus der Plazenta“ (Kleine and Rossmannith, 2010, p. 93).

Die Interaktionen der Inhibine und Aktivine in der Physiologie des weiblichen hormonellen Systems werden in Abbildung 4 dargestellt.

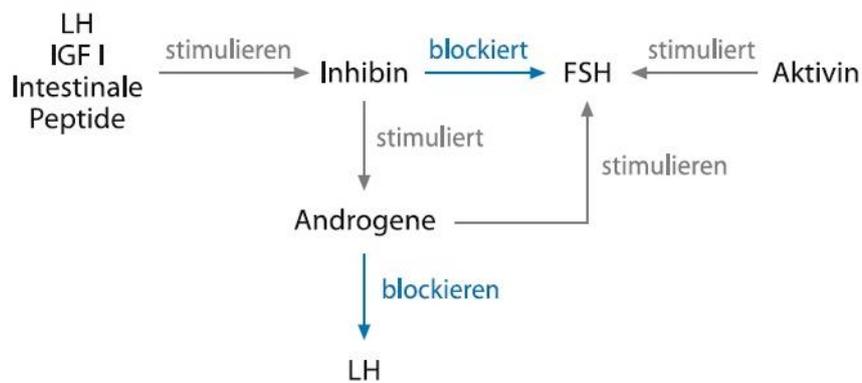


Abbildung 4: Inhibin/Aktivin und die FSH-/LH-Freisetzung (Kaufmann *et al.*, 2006, p. 41). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags (copyright © 2006 Springer Verlag).

- Einleitung -

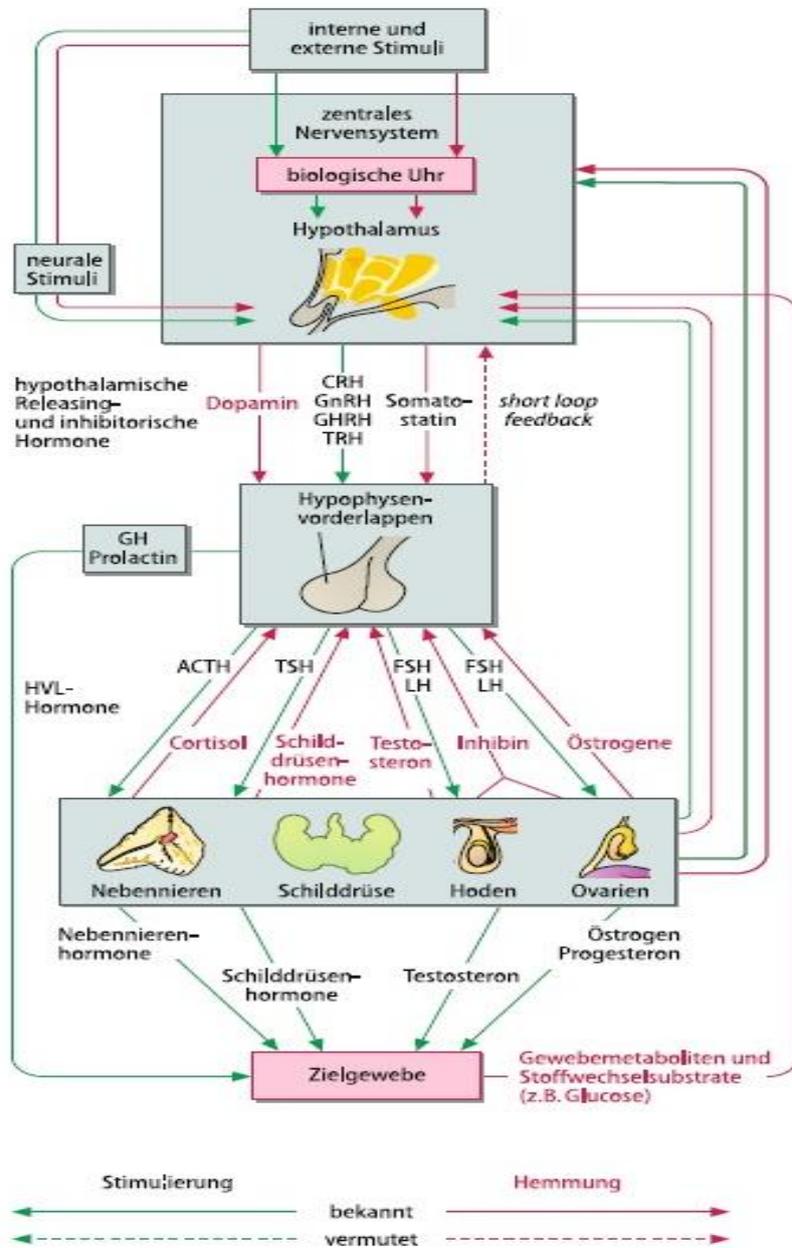


Abbildung 5: Hypophysäres Rückkopplungssystem (Löffler, 2007, p. 846). Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags (copyright © 2007 Springer Verlag).

In Abbildung 5 werden die komplexen Rückkopplungsmechanismen des hypophysären Systems, deren Teil auch die Inhibine und Aktivine sind, und seine Verbindungen mit peripheren Zielgeweben graphisch dargestellt.

2.4.2 Inhibin und Aktivin Untereinheiten

Beim Menschen sind fünf Inhibin-Untereinheiten bekannt: Inhibin alpha, -beta A, -beta B, -beta C und -beta E. Inhibine bestehen aus einer identischen alpha Untereinheit und unterscheiden sich in der beta Untereinheit. Die beta-Untereinheiten β_A , β_B , β_C , β_E sind namensgebend für die jeweiligen Inhibine. Die dimeren Proteine werden durch zwei Disulfidbrücken zwischen dem sechsten und dem neunten Cystein des reifen Proteins zusammengehalten.

Die funktionellen Gegenspieler der Inhibine sind die Aktivine. Sie aktivieren unter anderen die Sekretion der Gonadotropine. Aktivine sind dimere Proteine, die, mit Ausnahme dem heterodimeren Aktivin AB, aus zwei identischen beta-Untereinheiten (β_A , β_B , β_C , β_E) bestehen. Diese sind namensgebend für die jeweiligen Aktivine. So bilden zwei β_A -Untereinheiten Aktivin A, zwei β_B -Untereinheiten Aktivin B etc.

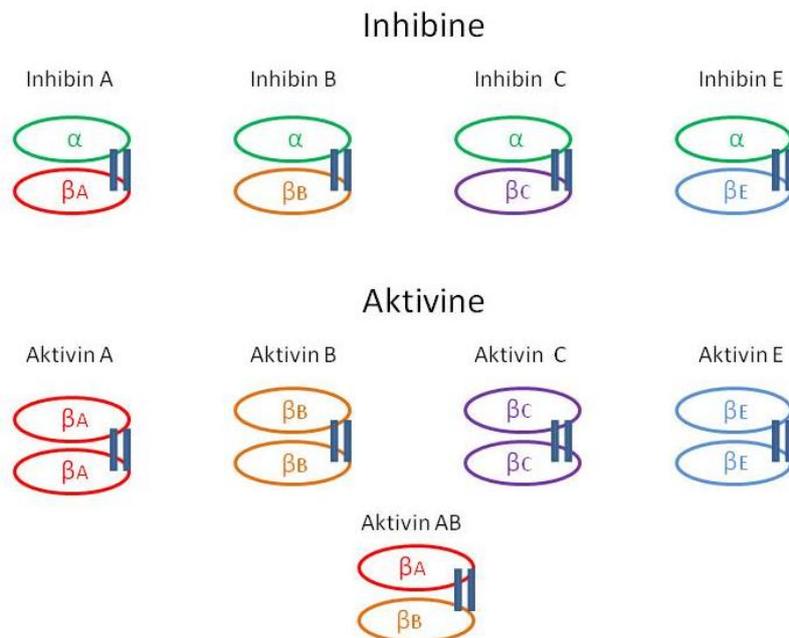


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Inhibine und Aktivine.

In Abbildung 6 sind die Inhibine und Aktivine des Menschen graphisch dargestellt. Die identische alpha Untereinheit der Inhibine ist grün unterlegt, wobei die beta Untereinheit variabel ist und für das jeweilige Inhibin namensgebend ist. Aktivine sind dagegen homodimere Proteine (mit Ausnahme das Aktivin AB) mit jeweils zwei identischen und namensgebenden beta-Untereinheiten.

2.4.3 Die Inhibinsynthese

Die Inhibin-kodierenden Gene befinden sich auf unterschiedlichen Lokalisationen auf den menschlichen Chromosomen. Inhibin alpha- und Inhibin beta B-Gene sind dabei auf Chromosom 2 lokalisiert, während sich die Inhibin beta C- und -E-kodierenden Gene auf Chromosom 12 befinden. Das Inhibin beta A-Gen ist als einziges Inhibin-kodierendes Gen auf Chromosom 7 lokalisiert. Die genauen Lokalisationen der Inhibine auf den menschlichen Chromosomen sind in Tabelle 3 unterlegt.

Tabelle 3: Lokalisation der Inhibin-Gene auf den Chromosomen des Menschen. Informationen zu den genauen Lokalisationen auf den menschlichen Chromosomen über die Datenbank der HUGO Gene Nomenclature Committee (Dr Phyllis McAlpine).

INHIBIN	LOKALISATION (MENSCHLICHES CHROMOSOM)
INHA	2q33-qter
INHBA	7p15-p13
INHBB	2cen-q13
INHBC	12q13
INHBE	12q13.2

Die verschiedenen Inhibine werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Inhibin beta A und Inhibin beta B kommen fast ubiquitär vor. Inhibin beta C wird hauptsächlich in der Leber produziert, ohne dass seine Funktion in diesem Organ bekannt ist. Inhibin beta E ist nachweislich in Phospholipidosen bei der Zelllinie HepG2 erhöht (Sawada *et al.*, 2005b; Atienzar *et al.*, 2007a). Wegen ihrer wichtigen Rollen in der Regulation der Gonadotropinsekretion sind die Inhibin-Expressionsmuster der verschiedenen Organe des weiblichen Genitaltrakts von großem Interesse. Die beta E Untereinheit wird zum Beispiel größtenteils in der Leber synthetisiert. Dennoch konnte sie sowohl in Ovarien, wie auch in endometrialem (Mylonas *et al.*, 2011), zervikalem (Mylonas and Dian, 2011) und plazentalem Gewebe des Menschen nachgewiesen werden.

Bei der Biosynthese der alpha Untereinheit wird ein Vorläufermolekül synthetisiert, welches aus drei Teilen besteht: dem Pro-, α N- und α C-Teil. Die beta Untereinheiten bestehen dagegen nur aus einem Pro- β - und β -Teil. Nach Abspaltung des Pro-Teils und des α N-Teils in zwei Schritten kommt es zur Entstehung der alpha Untereinheit. Diese lagert sich nach Abspaltung des Pro β vom β mit der funktionellen β -Untereinheit zusammen und bildet dann das Hormon Inhibin (Walton *et al.*, 2011).

2.5 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit sollte primär die Wirkung von Nelfinavir auf die Transkriptionsrate verschiedener Gene des menschlichen Genoms untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob der Proteaseinhibitor Nelfinavir die Transkriptionsrate der Gene des Menschen beeinflusst und im welchen Maße er dieses bewerkstelligt.

Zu den Wirkungen von Nelfinavir gibt es mehrere Vorpublikationen. Dennoch wird in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die potenziellen antitumoralen Wirkungen der Substanz in Verbindung mit seinen molekularen Wirkungen gesetzt.

Mit Hilfe mehrerer Selektionsverfahren sollten die interessierenden Gene eingegrenzt werden und in weiteren Versuchsreihen gründlicher untersucht werden.

Als besonders interessantes Transkriptionsprodukt bezüglich seiner Interaktionen mit Nelfinavir, sollte die beta E Untereinheit des Inhibins/Aktivins E kloniert werden. Auch das Transkriptionsverhalten bestimmter Zelllinien unter ER-Stress-induzierenden Substanzen, wie Nelfinavir, sollte im letzten Teil der Arbeit untersucht werden.

Die Untersuchungen wurden schwerpunktmäßig mit molekularbiologischen Methoden durchgeführt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Die Zellkultur

Die Zellkultur wurde routinemäßig durch Mitarbeiter der Frauenklinik des Universitätsklinikums durchgeführt. Die im Labor etablierten Zelllinien wurden unter standardisierten Zellkulturbedingungen kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde das „Quantum 263 mit L-Glutamin“ (# U15-815 PAA Pasching, Österreich) eingesetzt. Für die hier beschriebenen Experimente wurden die entsprechenden Zellmengen zur Verfügung gestellt.

Die PBMCs (peripheren mononukleären Zellen) wurden durch die Mitarbeiter der Frauenklinik aus dem „Buffy Coat“ mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnen. Die hierzu benötigten Buffy Coats wurden aus dem Blut einer freiwilligen gesunden Spenderin gewonnen.

3.2 Die RNA Extraktion aus den Zellen der Zellkultur

Zur Extraktion der RNA aus den Zellen der Zellkultur wurden zwei Methoden eingesetzt: die Präparation mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und die Extraktion mittels des TRIzol[®] Reagenzes (invitrogen).

3.2.1 RNeasy Mini Kit

3.2.1.1 Materialien

Das RNeasy Mini Kit (Cat. # 74104, Qiagen) hat folgende Bestandteile:

- RNeasy Mini Spin Gefäße
- RLT Puffer (Zugabe von 10 µl β-ME pro 1 ml Puffer)
- RW1 Puffer
- RPE Pufferkonzentrat (zu 11ml des RPE Puffers wurden 44 ml Ethanol (96–100%) – also das vierfache Puffervolumen – gegeben um eine gebrauchsfertige Lösung zu erzeugen)
- RNase-freies Wasser

Es wurden noch folgende Reagenzien eingesetzt:

- ≥99,5%iges Ethanol (ROTH Ethanol Art. # 5054.1)
- 14.3 M β-Mercaptoethanol (z.B. # M7154, Sigma Aldrich)
- PBS Medium (# H15-001, Dulbecco's PBS with Ca & Mg, PAA Pasching)

3.2.1.2 Das RNeasy Mini Kit Protokoll

Das RNeasy Mini Kit Protokoll wurde zu Beginn der Arbeit eingesetzt, um mRNA aus MCF7 Zellen zu isolieren. Die RNA, die mit dieser Methode isoliert wurde, diente der Mikroarray Untersuchung. Das Protokoll hat den Vorteil, dass bei der RNA-Präparation keine Phenol-Reste übrigbleiben. Diese würden bei der Mikroarray Analyse stören.

Zur RNA Präparation wurden folgende Schritte durchgeführt:

Die Zellen der Zelllinie MCF7 wuchsen als adhärenente Zellen auf einem Zellrasen. Im ersten Schritt wurde das flüssige Kulturmedium abgegossen. Es wurden 350 µl RLT Puffer auf den Zellrasen gegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren komplett lysiert.

Dem Lysat wurden ungefähr 350 µl 70%iges Ethanol beigemischt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde das Gemisch homogenisiert.

Das Gemisch wurde in ein RNeasy Mini Spin Gefäß überführt und in ein 2 ml Sammelgefäß platziert. Nach 15 Sekunden zentrifugieren bei 8000 x g wurde die durchgeflossene Flüssigkeit entfernt.

In das RNeasy Mini Spin Gefäß wurden zunächst 700 µl RW1 Puffer zugegeben. Die Membran wurde durch erneute Zentrifugation bei 8000 x g für 15 Sekunden gewaschen. Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde auch hier entfernt.

500 µl RPE Puffer wurden in das RNeasy Mini Spin Gefäß gegeben und bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und dasselbe Puffervolumen wurde erneut zugegeben. Die Membran wurde durch die letzte, 2-minütige, Zentrifugation bei 8000 x g getrocknet.

Das RNeasy Mini Spin Gefäß wurde zunächst in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß platziert. In das RNeasy Mini Spin Gefäß wurden 50 µl RNase-freies Wasser gegeben. Das Ganze wurde bei 8000 x g für 1 Minute zentrifugiert um die RNA auszuwaschen.

Durch die RNA-Präparation konnten jeweils 50 µl RNA-Lösungen gewonnen werden. Die RNA, die darin enthalten war, wurde direkt nach der Präparation in cDNA umgeschrieben (wie unter 3.3 beschrieben). Die cDNA wurde der Firma IMG M Laboratories München (www.imgm.com) zur Durchführung des Microarrays übergeben.

3.2.2 Präparationen mit dem TRIzol® Reagenz

Die Präparation mit Hilfe des TRIzol® Reagenzes ist ebenfalls eine effiziente Methode zur Isolation von RNA aus Zellen oder Geweben. Das TRIzol® Reagenz ist eine zum Gebrauch fertige Lösung zur Isolation von RNA aus Zellen oder Geweben. Diese Methode wurde bei allen weiteren RNA Präparationen eingesetzt.

3.2.2.1 Materialien

- TRIzol® Reagenz (# 15596-018, invitrogen)
- Chloroform (# 25690, Fluka Chemika)
- Isopropylalkohol (z.B. # AE73.1 ROTISOLV® ≥ 99,95 %, LC-MS-Grade, ROTH)
- 75%iges Ethanol, gelöst in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser (Art. # 9065.1, ROTH)
- RNase-freies Wasser (# P119C, Nuclease-Free Water, Promega)

3.2.2.2 Das TRIzol® Protokoll

Zur RNA Extraktion aus den Zellen mit Hilfe des TRIzol® Reagenzes wurden folgende Schritte durchgeführt:

Gewinnung der Zellen für die RNA Präparation:

- a. Suspensionszellen (Jurkat, IM9 und HL60): Das flüssige Kulturmedium „Quantum 263 mit L-Glutamin“ (# U15-815, PAA Pasching, Österreich), in dem sich die Zellen befanden, wurde abpipettiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 1200 rpm für 3-5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. 500 µl des TRIzol® Reagenzes wurden direkt auf das Zellpellet gegeben. Im Anschluss wurde auf- und abpipettiert, um eine homogene Mischung herzustellen.
- b. Adhärenente Zellen (HEK293, MCF7, Hela, analog auch für die Zellen der Zelllinien Ishikawa minus, Ishikawa plus, RL 95-2, Hec 1A und Hec 1B): Das flüssige Kulturmedium wurde abgegossen. Die Zellen der jeweiligen Zelllinien waren auf einem Zellrasen auf der Platte gewachsen. 500 µl des TRIzol® Reagenzes wurden erst auf den Zellrasen gegeben. Nach mehrfachen Schwenken der Well-Platte wurde die Mischung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.
- c. Zellen aus Gewebe: Zur Gewinnung der Zellen des Endometriums wurde ein kleine Gewebeprobe entnommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eingeführt und unter Einfrieren in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Mit dieser Methode wurde das Gewebe aufgeschlossen und für die Präparation der RNA zugänglicher gemacht. 500 µl des TRIzol® Reagenzes wurden direkt auf das zerkleinerte Gewebe gegeben.

Die Zellysate wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ab hier konnten alle Zellysate gleich behandelt werden.

RNA Präparation:

Es wurden jeweils 100 µl Chloroform dazugegeben. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden geschlossen und für 15 Sekunden per Hand gut geschüttelt. Dadurch trübte sich die Lösung und bekam nun eine milchig-rosige Farbe. Die Lösung wurde für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 12000 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen: eine untere, rötliche Phase, darüber eine dünne weißliche Phase und darüber eine voluminöse wässrige Phase. Die weiße und rötliche Phase enthielten verschiedene Zellbestandteile wie denaturierte Proteine, Polysaccharide, zelluläre Membranen und DNA. Die obere, wässrige Phase enthielt RNA und wurde deshalb vorsichtig abpipettiert, sodass sie sich nicht mit den anderen Phasen vermischte. Diese Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Es wurden daraufhin jeweils 250 µl Isopropylalkohol (500 µl Isopropylalkohol pro 1 ml TRIzol® Reagenz) in die neuen Eppendorf-Reaktionsgefäße zugeführt. Dadurch ist die RNA präzipitiert worden. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 1200 g für 2-8 °C für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde nun entfernt. Im Pellet, der sich am Reaktionsgefäßgrund bildete, befand sich die RNA.

Das RNA-Pellet wurde mit 600 µl 75%igem Ethanol gewaschen (mindestens 500 µl 75%iges Ethanol für 500 µl TRIzol® Reagenz). Nach Zugabe von Ethanol wurde das Gemisch gevortext und daraufhin bei einer Drehzahl von 7500 g bei 2-8 °C für 5 Minuten zentrifugiert.

Als vorletzter Schritt wurde der Überstand abgegossen und der RNA-Pellet für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Die RNA wurde im letzten Schritt in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

Somit wurde RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert, womit auch der nächste Schritt ermöglicht wurde: die Umschreibung von RNA in DNA.

3.3 Die Reverse Transkriptase Reaktion und die anschließende Polymerase-Kettenreaktion

Die reverse Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion) ist eine Methode, welche die reverse Transkription, also die Umschreibung von RNA in DNA ermöglicht. Die RNA, die in dieser Arbeit erzielt worden ist, ist eine Mischung aus tRNA (transfer RNA), rRNA (ribosomale RNA) und mRNA (messenger RNA). Diese Mischung der verschiedenen RNA-Typen wurde von den untersuchten Zellkulturen mittels des TRIzol® Reagenzes isoliert.

3.3.1 Materialien

- Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor, # N2511, Promega
- dNTP Mischung aus jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (# C114H, PCR Nucleotide Mix, Promega)
- M-MLV RT (Moloney Murine Virus Reverse Transcriptase), # M1701 Promega
- M-MLV RT (Moloney Murine Virus Reverse Transcriptase), # M531A, 5x Reaktionspuffer, Promega
- Oligo(dT)₂₀ Primer, bestellt über die Firma „biomers.net“.

Der 25 µl Reaktionsansatz, der für die RT-Reaktion und die anschließende PCR angewendet worden ist, bestand aus:

- 6,75 µl mRNA Lösung, wie sie bei der TRIzol®-Methode hergestellt wurde.
- 0,75 µl Oligo(dT)₂₀ Primer, bestellt über die Firma „biomers.net“. Den Empfehlungen des Herstellers nach, wurde 1 µl Oligo(dT)₂₀ Primer pro 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt.
- 5 µl M-MLV RT 5x Reaktionspuffer,
- 1,25 µl vom PCR Nucleotide Mix,
- 0,5 µl Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor (25 IE),
- 1 µl M-MLVRT (200 IE)

Gesamtvolumen: 7,75 µl Reaktionsansatz und 16,75 µl mRNA Lösung ergibt ein Gesamtvolumen von 25 µl.

3.3.2 RT-Reaktion und PCR-Protokolle

Bei der RT-Reaktion findet im ersten Schritt die Denaturierung der mRNA (bei einer Temperatur von 70 °C) statt. Die aufgelockerte mRNA dient als Matrize für die Synthese der cDNA. Die cDNA-Synthese wird durch die Anlagerung der Primer an die mRNA Einzelstränge bei einer Temperatur von 42 °C initiiert. Die Elongation der cDNA-Produkte geschieht mit Hilfe des Enzyms „reverse Transkriptase“ bei der gleichen Temperatur.

- Materialien und Methoden -

Zur Durchführung der RT-Reaktion und der daraufhin folgenden PCR fanden folgende Schritte statt:

Die mRNA Lösung und der Oligo(dT)₂₀ Primer wurden im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und bei 70 °C für 5 Minuten erhitzt, so dass sich die sekundäre Struktur der mRNA auflöste. Danach wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße sofort auf Eis gekühlt, damit sich die mRNA Sekundärstruktur nicht wieder bilden konnte.

Der M-MLV RT 5x Reaktionspuffer, die dNTP Mischung, der Recombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor und die M-MLV RT wurden in den angegebenen Mengen, unter Kühlung, der mRNA zugegeben.

Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden gut geschüttelt und für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert.

Nach 60 Minuten war die cDNA-Synthese vervollständigt. Die cDNAs der Zelllinien wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -18 °C aufbewahrt.

3.4 PCR polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR erlaubte die exponentielle Vervielfältigung von genetischem Material, so dass der Nachweis von minimaler DNA Menge oder genau definierten DNA Abschnitten ermöglicht wurde. In der Arbeit wurde komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) benutzt, die wie oben beschrieben, aus Zellen und Geweben isoliert und generiert wurde. Die zu amplifizierenden DNA-Sequenzabschnitte wurden durch zwei Oligonukleotide flankiert, die sogenannten Primer.

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus drei Schritten: der Denaturierung der DNA Doppelstränge (bei einer Temperatur von 95 °C), dem Annealing (die Anlagerung der Primer an die DNA Einzelstränge bei einer Temperatur von 50-60 °C), also die Initiierung der enzymatischen Reaktion und der Elongation der DNA Produkte (bei einer Temperatur von 72 °C).

3.4.1 Materialien

- PCR Master Mix, # M750C, Promega
- Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer). Die in der Arbeit eingesetzten Primersequenzen werden in Tabelle 9 (s. S. 94) veranschaulicht.
- nukleasefreies Wasser, # P1193, Promega
- cDNA
- Thermocycler, Modell „Mastercycler Gradient“, Eppendorf.

Der 25 µl Reaktionsansatz, der für die Polymerase-Kettenreaktion angewendet worden ist, bestand aus:

- 23 µl PCR Master Mix Lösung (12,5 µl PCR Master Mix und 10,5 µl nukleasefreies Wasser).
- 1 µl Lösung der Primer, bestellt über die Firma „biomers.com“. Die Lösung der Primer für die PCR wurde aus einer Primer-Stammlösung entnommen. Diese bestand aus 5 µl Vorwärts-Primer Lösung, 5 µl Rückwärts-Primer Lösung und 90 µl nukleasefreiem Wasser.
- 1 µl der zu amplifizierenden cDNA

Die Primerlösungen wurden den Herstelleranweisungen nach, durch Zugabe von vorgegebenen Mengen von nukleasefreiem Wasser zu einem lyophilisierten Pellet hergestellt, um eine standardisierte Konzentration von 100 pM in allen Primer-Stammlösungen zu erreichen.

3.4.2 PCR-Protokoll

Dem Reaktionsansatz wurde die zu amplifizierende DNA zugegeben.

Die Reaktion fand in sich wiederholenden Temperaturzyklen in einem sogenannten Thermocycler statt (in der Arbeit wurden hauptsächlich Programme mit 25 (für die Amplifikation des beta actin Gens), 32, 34 und 36 Zyklen angewendet.

Bei jedem folgenden Zyklus wurden die entstandenen DNA Produkte des Zyklus davor erneut denaturiert, Primer und Enzyme lagerten sich an und die Einzelstränge wurden verlängert. Die Vermehrung erfolgte exponentiell bis zum Erreichen eines Plateaus bei dem sich die DNA Menge nicht mehr signifikant erhöhte.

3.4.3 Die Auswertung der Polymerase-Kettenreaktion (DNA-Gelelektrophorese)

3.4.3.1 Materialien

- Spannungsquelle (# 451254 Power Base™ für E-Gel® invitrogen, 880mA Min., Ethrog Biotechn. Ltd)
- E-Gel® 2 % with SYBR Safe™ (# G5218-02, invitrogen)
- BlueJuice™ Gel Loading Buffer (# 10816-015, invitrogen)
- nukleasefreies Wasser, (# P1193, Promega)
- Amplifizierte cDNA nach Vervollständigung der ausgewählten Zykluszahlen im Thermocycler
- UV-Bestrahlung und Auswertung in der Universal Hood II der BIORAD Laboratories
- Programm „Quantity One“ für qualitative DNA-Auswertungen
- DNA-Marker: pBR Marker und 100 bp ladder (DNA Marker pBR 328 Mix I mit pBR Mix I-DNA und 1 x Probepuffer (TE/G), # T147.1 und # T148.1, ROTH, sowie 100 bp DNA ladder, # N3231L, New England BioLabs® Inc.)
- DNA Probe (PCR)

3.4.3.2 Auswertung

Die 2%igen Agarosegele, die zur Auswertung angewendet worden sind, verfügten über eine Reihe von zwölf Vertiefungen zum Auftragen der DNA Proben. Jede Probe befand sich in einer separaten Vertiefung, so dass ein Ineinanderlaufen der Proben nicht möglich war.

Die Pufferlösung, die mit jeder Probe aufgetragen worden ist, bestand aus 1µl Blue-Juice™ Gel Loading Buffer, dass mit 10 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt wurde. Dazu wurden in der Regel 10 µl der PCR Probe aufgetragen.

Zur Auswertung der Gele wurde die Universal Hood II der BIORAD Laboratories und das Programm Quantity One für qualitative DNA Auswertung eingesetzt.

3.5 Die PCR-Klonierung

Flussdiagramm PCR Klonierung

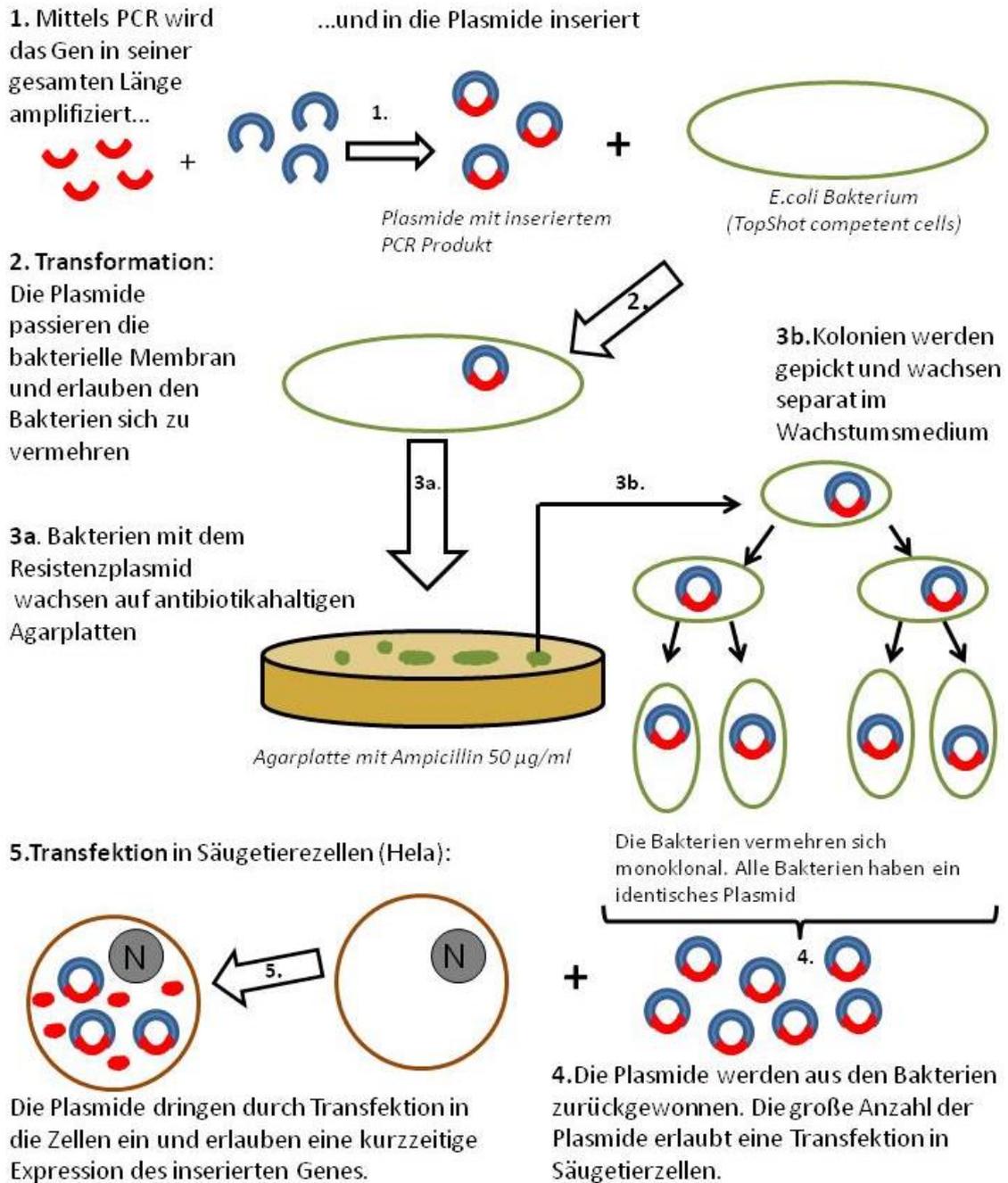


Abbildung 7: Flussdiagramm der PCR-Klonierung.

Der Vorgang der PCR Klonierung wird in Abbildung 7 (S. 28) schematisch, von der Insertion des PCR Produkts bis zur Transfektion in Hela Zellen, zusammengefasst.

3.5.1 Die PCR-Produkt-Aufnahme in Vektoren und Transformation der Bakterien

Transformation nennt sich die DNA-Aufnahme durch kompetente E. coli Bakterien. Die Bakterien werden als „kompetent“ bezeichnet, weil sie die Eigenschaft haben DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Zur Transformation der Bakterien wurde der pcDNA3.1/V5-His© TOPO© TA Expression Kit (invitrogen) angewendet.

„TOPO® Cloning“ ist eine Methode, die eine schnelle und direkte Insertion des Taq-Polymerase-amplifizierten PCR Produktes in einen Plasmid Vektor erlaubt.

Der Plasmidvektor, der im Kit enthalten ist (pcDNA3.1/V5-His© TOPO©) enthält:

- einen 3' Thymin(T)-Überhang für die TA® Klonierung und
- eine kovalent am Vektor gebundene Topoisomerase.

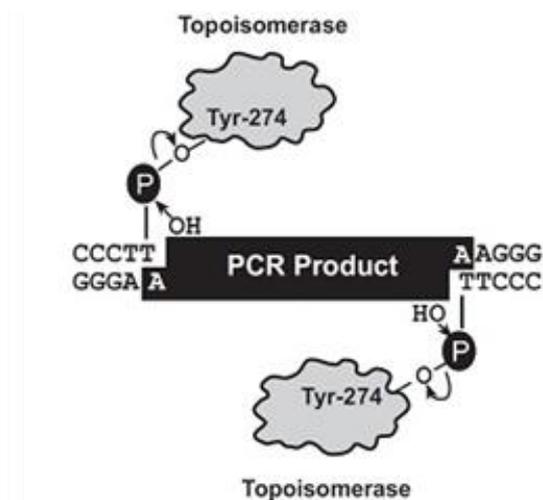


Abbildung 8: Aufnahme des PCR-Produkts in den Vektor (Life Technologies Corporation and invitrogen, 2009, p. 1). Mit freundlicher Genehmigung der Life Technologies Corporation. Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. Used under permission.

Der Vektor heißt TOPO®, weil er Topoisomerase I beinhaltet. Die Topoisomerase I ist ein Enzym, das superspiralisierte DNA entspannt. Es fügt der DNA vorübergehend Einzelstangbrüche zu. Das Enzym wickelt die DNA also so auf, dass sie in den Vektor integriert werden kann.

Die Taq Polymerase, die bei der PCR eingesetzt worden ist, hat eine Transferase-Aktivität, die ein einziges Adenin (A) an das 3' Ende des PCR Produktes anknüpft. Da der Vektor über einen 3' Thymin(T)-Überhang verfügt, kann sich das PCR Produkt

problemlos an den Vektor binden (s. Abbildung 8, S. 29). Deshalb ist es nicht notwendig zuvor mit Restriktionsenzymen zu schneiden.

Der pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] Vektor enthält unter anderen Gene für das V5 Epitop, ein Gen für Ampicillin Resistenz, den T7 Promotor sowie ein BGH Polyadenylierungssignal (s. Abbildung 9).

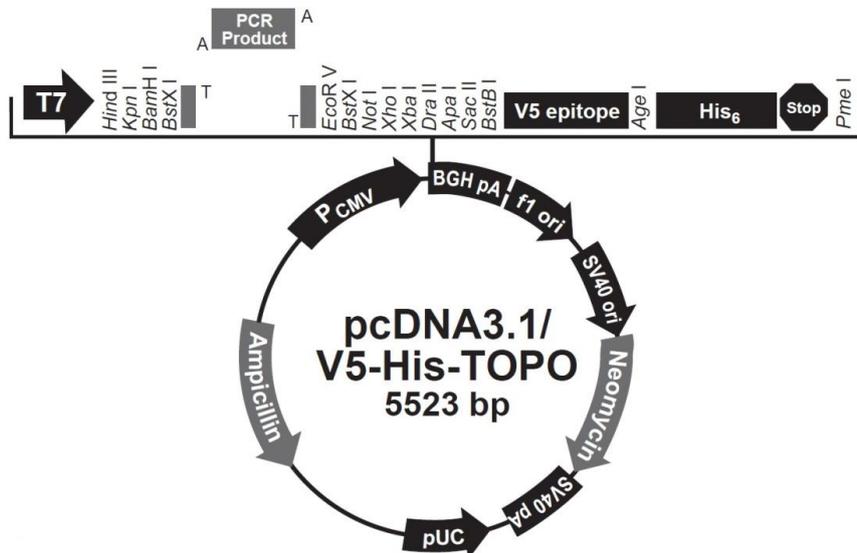


Abbildung 9: Gene des pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] Vektors (Life Technologies Corporation and invitrogen, 2009, p. 20). Mit freundlicher Genehmigung der Life Technologies Corporation. Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. Used under permission.

In Abbildung 9 werden die wichtigsten Gene des pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] Vektors graphisch veranschaulicht. Der T7 Promotor (T7) umfasst die Basen 863-882, die TOPO[®]-Klonierungsstelle befindet sich zwischen den Basen 953 und 954 und das V5 Epitop wird durch Basen 1020-1061 kodiert. Das BGH Polyadenylierungssignal umfasst die Basen 1110-1324.

Das PCR Produkt wurde somit zwischen den Basen 953 und 954 des Vektors integriert.

3.5.1.1 Materialien

- pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA Expression Kit (# K4800-01, invitrogen)
- nukleasefreies Wasser, Promega (# P1193)
- Kompetente E. coli Bakterien (Strata Clone[™] Solo Pack[®] competent cells, Agilent)
- PCR-Lösung. Die PCR-Produkt-Lösung bestand aus 23 µl PCR Master Mix Lösung (s. 3.4.1, S. 26), 1 µl Lösung des Inhibin E full length Primers (s. Tabelle 9, S. 94)

und 1 µl cDNA der Zelllinie Ishikawa plus. Die PCR der PCR-Produkt-Lösung fand bei 36 Zyklen statt.

Für die TOPO® Klonierungsreaktion wurden folgende Materialien angewendet:

- 1 µl PCR der Produkt-Lösung
- 2 µl nukleasefreies Wasser
- 1 µl Salzlösung aus dem pcDNA3.1/V5-His© TOPO© TA Expression Kit, invitrogen
- 1 µl pcDNA3.1/V5-His© TOPO© Vektor aus dem pcDNA3.1/V5-His© TOPO© TA Expression Kit

3.5.1.2 Transformationsprotokoll

Für die Transformation der Bakterien wurden die Lösung, das nukleasefreie Wasser, die Salzlösung und der Vektor (s. 3.5.1.1., S. 30 für nähere Mengenangaben) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden mehrere Ansätze vorbereitet. Es wurde jeweils ein Aliquot kompetenter E. coli Bakterien zu den Ansätzen dazugegeben und für 5 Minuten, unter Kühlung mit Eis, inkubiert. Die Bakterien untergingen danach einen Hitzeschock. Dabei wurden sie für 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien sofort auf Eis inkubiert und es wurden 250 µl SOC Medium (aus dem pcDNA3.1/V5-His© TOPO© TA Expression Kit) dazugegeben. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.5.2 Vermehrung der Bakterien

Damit sich die Bakterien des Transformationsansatzes vermehren konnten, war es notwendig LB Agar und flüssiges Wachstumsmedium herzustellen.

3.5.2.1 Materialien

Für 1 L LB Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 50 µg/ml wurden folgende Materialien benötigt:

- destilliertes Wasser (500 ml)
- LB Medium(Lennox) für die Molekularbiologie (Art. # X964.1, ROTH)
- Ampicillin, Sigma
- Agar (# 30391023, SELECT Agar powder, invitrogen)
- Präzisionswaage Mattler PM460 (Delta Range®)

Die Hälfte des LB Mediums wurde als Flüssigmedium für die Bakterienkulturen eingesetzt und die andere Hälfte wurde für das Ausplattieren der Bakterien verwendet.

3.5.2.2 Herstellung von flüssigem Wachstumsmedium und LB Agar Herstellung

Dem destillierten Wasser (250 ml) wurden 5 g Trockenmedium in einem sterilisierten Glaskolben zugegeben. Das Medium wurde nach seiner Auflösung für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Um eine Ampicillinkonzentration von 50 µg/ml beim Flüssigmedium zu erreichen, wurden nach Abkühlen des LB Mediums 12,5 mg Ampicillin dazugegeben.

Für das Ausplattieren der Bakterien wurden Agarplatten gegossen. Dem destillierten Wasser (250 ml) wurden ebenfalls 5 g Trockenmedium in einem sterilisierten Glaskolben zugefügt. Es wurden zusätzlich 2,5 g Agar beigemischt um eine Endkonzentration von 1% Agar zu erreichen. Daraufhin wurde das Gemisch für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach kurzer Abkühlung und bevor der Agar fest wurde, wurden 12,5 mg Ampicillin beigemischt. Der Agar wurde auf Petrischalen verteilt. Nach kurzer Zeit wurde das Gemisch fest und konnte als Nährmedium für Bakterien eingesetzt werden.

3.5.3 Selektionieren der Bakterien

3.5.3.1 Ausplattieren der Bakterien

Im letzten Schritt der Transformation wurden die Transformationsansätze auf LB Agarplatten (Ampicillinkonzentration 50 µg/ml) durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach 12-stündiger Inkubation bei ca. 37 °C wurden die resistenten Kolonien auf den Agarplatten sichtbar.

Die Kolonien wurden auf Grund der enthaltenen Resistenzplasmide selektiert, unabhängig davon ob die Plasmide das PCR-Produkt aufgenommen hatten oder nicht. Es sind also Kolonien entstanden die richtige Inserts enthielten, aber auch Kolonien mit nur teilweise oder falsch rum inserierten PCR-Produkten.

Im nächsten Schritt wurden willkürlich Kolonien (z.B. 8 Kolonien) gepickt, die sich in separaten flüssigen Wachstumsmedien vermehrten. Nach 12-stündigem Wachstum (bei ca. 37 °C) wurden sie mit Hilfe der PCR auf das Vorliegen der korrekten Inserts geprüft.

3.5.3.2 T7 BGH-PCR

Es wurde eine PCR mit dem T7-BGH Primer durchgeführt, um zu bestimmen welche Kolonien das Plasmid mit dem PCR Produkt intakt beinhalten und welche nicht. Die PCR wurde mit 36 Zyklen durchgeführt. Es handelte sich hierbei um eine Routine-PCR, wie oben, unter 3.4, beschrieben. Anstatt 1 µl cDNA wurde 0,5 µl Bakterien-suspension eingesetzt.

3.5.3.3 T7 Inhibin beta E rückwärts-PCR

Bei den selektierten Plasmiden wurde eine PCR mit dem T7-Inhibin beta E rückwärts durchgeführt. Auch hier handelte es sich um eine Routine-PCR mit 36 Zyklen. Anstatt 1 µl cDNA wurde 0,5 µl Bakteriensuspension eingesetzt. Durch Auswertung der Elektrophorese-Gele wurden die Bakteriensuspensionen selektiert, bei denen „T7Inhibin beta E rückwärts“ amplifiziert werden konnte. Diese enthielten die zu klonierende cDNA in der richtigen Orientierung.

Durch die PCR (T7BGH- und T7 Inhibin beta E rückwärts-PCR) konnten mitsamt vier Kolonien mit korrekten Inserts selektiert werden. Aus diesen Kolonien wurden im nächsten Schritt die Plasmide isoliert.

3.5.4 Plasmid Präparation

Nach Abschluss der Vorselektion der Kolonien wurde die Plasmid Präparation durchgeführt.

3.5.4.1 Materialien

Es wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit (# 740588.50), Macherey-Nagel angewendet.

Das Kit hat folgende Bestandteile:

- Resuspensionspuffer A1 (15 ml, wurde erst nach Zugabe von 6 mg der RNase A eingesetzt)
- Lysepuffer A2 (15 ml)
- Neutralisierender Puffer A3 (20 ml)
- Waschpuffer AW (30 ml, wurde in der Präparation nicht eingesetzt)
- Waschpuffer A4 (2 x 6 ml Konzentrat, Zugabe von 24 ml ≥ 99,5%igem Ethanol jeweils notwendig)
- Eluierungspuffer AE (15 ml 5 mM Tris/HCl, pH 8,5)
- RNase A (lyophilisiert) 6 mg
- NucleoSpin® Plasmid-Kappe (50 Stück)
- 2ml Sammelgefäße (50 Stück)

Es wurden noch folgende Reagenzien eingesetzt:

- ≥99,5%iges Ethanol (ROTH Ethanol Art. # 5054.1)

3.5.4.2 Plasmidpräparationsprotokoll

Zur Plasmid Präparation wurden folgende Schritte durchgeführt:

1-5 ml der LB Kultur der transformierten E. coli wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. In diesem Schritt wurde versucht eine maximale Aussaat von Bakterien zu erhalten.

Es wurden 250 µl A1 Puffer auf das Zellpellet gegeben. Die Bakterien wurden durch Auf- und Abpipettieren komplett resuspendiert.

Daraufhin wurden 250 µl A2 Puffer dazugegeben. Die Substanzen wurden durch Schütteln der Reaktionsgefäße gemischt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden 300 µl A3 Puffer dazugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden erneut geschüttelt. Durch die Zugabe der Puffer A1, A2 und A3 wurden die Bakterien lysiert.

Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 11.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die NucleoSpin® Plasmid-Kappe wurde auf ein 2 ml Sammelgefäß platziert. Der Überstand des zentrifugierten Gemisches wurde auf die Vertiefung der Kappe aufgetragen (maximal 750 µl wurden abpipettiert). Der Überstand wurde für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Ziel war die Bindung der DNA an die Membran der Plasmid-Kappe. Die Flüssigkeit, die durch die Membran geflossen war, wurde entfernt.

Es wurden 600 µl Puffer A4 (in Ethanol gelöst) auf die Membran der Plasmid-Kappe gegeben. Der Überstand wurde erneut für 1 Minute bei 11.000 g zentrifugiert und das Sammelgefäß wurde entfernt.

Die Membran wurde durch Zentrifugieren (für 2 Minuten bei 11.000 g) getrocknet. Die restliche Flüssigkeit, die durch die Membran geflossen war, wurde entfernt.

Nun konnte die DNA ausgefällt werden. Die NucleoSpin® Plasmid-Kappe wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert und 50 µl AE Puffer wurden auf die Membran gegeben. Der Puffer wurde für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für eine Minute bei 11.000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit, die durch die Membran geflossen war, enthielt die zu untersuchenden Plasmide.

Durch die Plasmid-Präparation konnten jeweils 50 µl Plasmidlösungen gewonnen werden.

3.5.5 Sequenzierung

Die interessierenden Plasmide wurden als potenzielle Kandidaten für die Transfektion selektiert. Sie wurden dem Institut für Biologie III der Universität Freiburg (Rese-

arch Group G.L. Igloi) zur Sequenzierung ausgehändigt. Die Methoden die für die Sequenzierung eingesetzt worden sind wurden vom Institut für Biologie III der Universität Freiburg durchgeführt und werden deshalb hier nicht weiter beschrieben.

3.5.6 Transfektion

Die selektierten Plasmidlösungen wurden im nächsten Schritt in HeLa Zellen transfiziert. Somit konnte eine temporäre Überexpression des Inhibin beta E Gens zustande kommen.

3.5.6.1 Materialien

- 50 µl serumfreies Medium (PAA Pasching, Österreich) pro 1 µl Plasmidlösung
- 1 µl Lipofektamine (Cat. # 11668-027, Lipofectamine™ 2000 Transformation Reagent, Invitrogen) pro 1 µl Plasmidlösung
- Plasmidlösungen
- HeLa Zellen

3.5.6.2 Durchführung der Transfektion

Es wurden 200 µl serumfreies Medium pipettiert. In das serumfreie Medium wurden 4 µl Lipofektamine dazugegeben. Dieser Stammansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf 4 Eppendorf Reaktionsgefäße verteilt. Zu den Eppendorf Reaktionsgefäßen wurde vorher jeweils 1 µl von der jeweiligen Plasmidlösung dazugegeben.

Die Gemische aus dem Ansatz und der jeweiligen Plasmidlösung wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transformationsansatz von jedem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde HeLa Zellen zugeführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.5.7 Zellfixierung

Nach 24 Stunden wurden die transfizierten HeLa Zellen aus dem Brutschrank genommen und fixiert. Das Wachstumsmedium mit dem Transformationsansatz wurde abgegossen. Über die Zellen wurde auf - 20 °C gekühltes Methanol (z.B. # HN41.1, ROTISOLV® ≥99,98 %, Ultra LC-MS, ROTH) gegossen und 3 Minuten stehen gelassen. Das Methanol wurde entfernt und die Zellen wurden erneut bis zur Immunfluoreszenzuntersuchung eingefroren.

3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.6.1 Materialien

- AK (Mouse-Anti-V5-TAG monoklonaler Antikörper (# MCA1360D405, Serotec Martinsried)
- AK Carboguanin gekoppelt (Carbocyanin 3, dianova Hamburg)
- Mikroskop Axiophot von Zeiss
- Filter für die Wellenlänge 460 nm (Zeiss)
- Objektträger (# 154534, Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Nalgene Nunc International)

3.6.2 Präparation der Zellen und Mikroskopie

Zu Beginn wurden Zellen, die aus der Kultur gewonnen wurden, auf die Objektträger überführt. Die Zellen wurden in Kontrollgruppen und Fallgruppen unterteilt. Die Fallgruppen wurden über 5 Stunden mit den interessierenden Substanzen (Nelfinavir, Tunicamycin, DTT) inkubiert. Die Kontrollen wurden ohne Medikamentenzugabe bei 37 °C für 5 Stunden inkubiert. Nach Fixierung der Zellen (s. hierzu 3.5.7, S. 35) wurden die Zellen mit dem Erstantikörper für eine Stunde inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Zweitantikörper (Carboguanin-gekoppelt) dazugegeben. Die Zellen wurden mit diesem Antikörper für eine halbe Stunde inkubiert.

Die Zellen wurden unter dem Mikroskop (20 x Objektiv) ohne und mit Immunfluoreszenz (Filter für die Wellenlänge 460 nm, grünes Licht) angeguckt. Die Zellen, die Inhibin beta E überexprimierten leuchteten in der Immunfluoreszenz rot-orange auf. Die Aufnahmen, sowie die Belichtungszeiten, wurden mit Hilfe des Programms Axiovision eingestellt.

3.7 Western Blot

Bei den transfizierten Zellen kam es durch die Inhibin beta E cDNA Einschleusung zu einer temporären Überexpression von Inhibin beta E. Der Western Blot wurde in dieser Arbeit eingesetzt um nachzuweisen, dass eine erhöhte Inhibin beta E Expression auch tatsächlich stattfindet. Da es momentan keine adäquaten Antikörper gegen die Inhibin beta E Einheit gibt, die im Western Blot anwendbar sind, wurde dieses Defizit durch den Einsatz des V5 Epitopes überbrückt.

Das V5 Epitop ist im Plasmid eingebaut, dass für die Transfektion eingesetzt worden ist. Das bedeutet, dass die Expressionsrate des V5 Epitopes, also auch die V5-Proteinmenge, die gebildet wird, direkt mit der Proteinmenge der Inhibin beta E Untereinheit korreliert.

3.7.1 Materialien

- 10 x Tris/Glyzin/SDS Puffer (# 161-0732, BIORAD)
- Destilliertes Wasser
- Sample Puffer für Proteingelektrophorese (# K929.1, Roti®-Load 1, ROTH)
- Probe
- Marker (# 27-2110, PeqGOLD Protein-Marker, Peqlab)
- Precast Gel (# 456-1083, Mini-PROTEAN®TGX™ 4-15%, 10 well comb, 30ml)
- Elektrophorese Gerät (# 5276, Electrophoresis Power Supply, Gibco BRL)
- Methanol (z.B. # HN41.1, ROTISOLV® ≥ 99,98 %, Ultra LC-MS, ROTH)
- PVDF Membran (# T830.1, Roti®-PVDF, ROTH)
- Fiber pads (# 170-3933EDU, BIO-RAD)
- Blot Filter (# 170-3955, Thick Blot Paper, BIO-RAD)
- Blockpuffer (4 % Milchpulver # T145.2, ROTH in PBS Puffer, PAA-Pasching Österreich)
- Mouse-Anti-V5-TAG monoklonaler Antikörper (# MCA1360D405, Serotec Martinsried)
- Goat-Anti-Mouse Antikörper, alkalische Phosphatase gekoppelt (Dianova Hamburg)
- PBS Puffer (# L1825, PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca²⁺ Mg²⁺ LE Low Endotox)
- alkalischer Phosphatase Puffer (100 mM Tris-HCl [pH 9.0], 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂)
- Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (kurz NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (kurz BCIP) (# S3771, BCIP/NBT Color Development Substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-phosphate/nitro blue tetrazolium, Promega)

3.7.2 Western Blot Protokoll

Der Western Blot besteht aus folgenden Schritten:

1. Die Präparation und Elektrophorese der proteinhaltigen Probe.

Den transfizierten Hela Zellen wurde Proteinauftragspuffer (Roti®-Load 1, ROTH) für die Proteingelektrophorese zugegeben. Dem Probevolumen wurde ein Drittel des Volumens Puffer dazugegeben. Anschließend wurde die präparierte Probe auf 80-90 °C für 3-5 Minuten erhitzt und konnte dann direkt auf das Gel aufgetragen werden.

Die innere Kammer des Precast Gels wurde mit 500 ml des 1:10 verdünnten 10 x Tris/Glyzin/SDS Puffer (50 ml Puffer in 500 ml destilliertes Wasser verdünnt) aufgefüllt. Die Flüssigkeit wurde zunächst zusätzlich in die Taschen des Precast Gels pipettiert. Die Taschen des Gels wurden gründlich mit der Flüssigkeit gewaschen. In die Taschen wurden jeweils 10 µl des Proteinmarkers und 20 µl der Probe pipettiert.

Das Gel lief für eine Stunde bei 90 mA. Die Proteine wurden mit Hilfe SDS-Puffers (anionischer Puffer) lysiert und somit negativ geladen.

2. Die Übertragung der Proteine auf eine PVDF Membran (das sogenannte „Blotting“)

Die PVDF Membran wurde mit Methanol benetzt und in gekühlten 1:10 verdünnten 10 x Tris/Glyzin/SDS Puffer getränkt.

Das Gel wurde vorsichtig aus dem Gerüst (Precast) genommen und auf die PVDF Membran gelegt. Die PVDF Membran und das darauf liegende Gel wurden zwischen Filtern und Polsterungen (Fiber pads) eingespannt.

Abbildung 10 (s. S. 39) verdeutlicht die Reihenfolge der Bestandteile des Western Blots mit dem Protein-Gel als zentrales Element. Das „Sandwich“, das durch diese Konfiguration entsteht diente der Proteinübertragung auf die PVDF Membran. Das Gel befand sich in Richtung der Kathode.

Das „Sandwich“, das entstand, wurde in das Elektrophorese-Gerät eingespannt und mit kaltem 10 x Tris/Glyzin/SDS Puffer übergossen. Die Wanne wurde mit dem Puffer aufgefüllt.

Das Gel wurde erneut für eine Stunde bei 200 mA elektrophoretisiert.

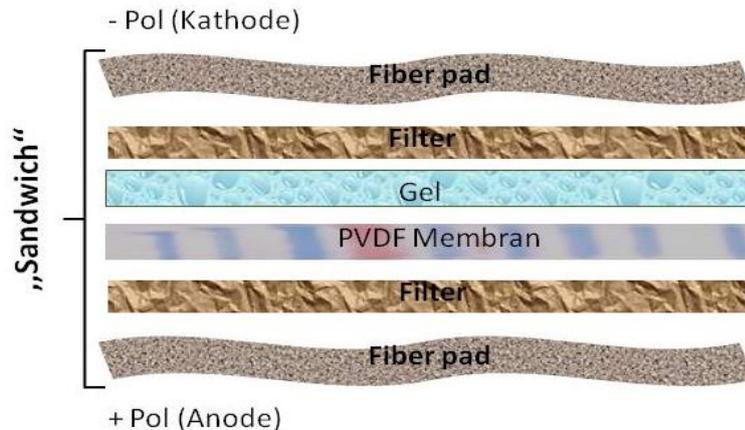


Abbildung 10: Bestandteile des Western Blots.

3. Die „Markierung“ des interessierenden Proteins

Die „Markierung“ des interessierenden Proteins wurde mittels Zugabe eines Erst- und Zweitantikörpers vorgenommen. Zu diesem Zweck waren mehrere Schritte notwendig.

Zuerst wurde das „Sandwich“ nach einer Stunde aus der Wanne entfernt. Die PVDF Membran wurde aus dem Blot genommen. Die Membran wurde über zwei Stunden in Blockpuffer gelegt. Dadurch konnten unspezifische Proteinbindungen blockiert werden.

Nach zwei Stunden wurde der Mouse-Anti-V5-TAG dem Blockpuffer zugeführt, um die V5-Tags zu binden. Dieser Antikörper verblieb über Nacht auf der Membran. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Mouse-Anti-V5-TAG-Lösung entfernt. Die PVDF Membran wurde zweimalig mit PBS Puffer gewaschen.

Als nächstes wurde ein Zweitantikörper, der Goat-Anti-Mouse Antikörper dazugegeben. Die Membran wurde mit diesem Antikörper für ca. zwei Stunden inkubiert. Beim Zweitantikörper handelte es um einen alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörper. Dieser war notwendig, weil der Erst-Antikörper (Mouse-Anti-V5-TAG) einen Marker trug, der erst nach Zugabe des zweiten Antikörpers sichtbar wird.

4. Die Farbreaktion und Detektion proteinspezifischer Banden.

Der Zweitantikörper wurde ebenfalls entfernt und die PVDF Membran wurde erneut mit PBS Puffer gewaschen.

Der Membran wurden 10 ml des alkalischen-Phosphatase-Puffers zugegeben.

- Materialien und Methoden -

Nach Gabe von 50 μl des NBT und 100 μl des BCIP entwickeln sich langsam die Banden auf der PVDF Membran. Der Mechanismus der Reaktion ist folgender: das BCIP spaltet aus dem alkalischen Phosphatase Puffer Phosphat ab. Dieses reagiert mit dem MBTC, wodurch Farbstoff ausfällt.

Die PVDF Membran wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Danach wurden die Banden mit Hilfe der Proteinmarkerbanden ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Microarray

4.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Nelfinavir ist einer der ersten HIV-Proteaseinhibitoren, der in der antiretroviralen Therapie eingesetzt wurde. Obwohl der Wirkstoff inzwischen durch effizientere Medikamente zum größten Teil ersetzt wurde, erweckt er erneut das Interesse aufgrund seiner diversen Effekte auf den Zellstoffwechsel (Bruning, 2011). Um eine Übersicht über die Wirkung von Nelfinavir auf genomischer Ebene zu erlangen, wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Microarray durchgeführt. Ziel der Arbeit war es, die Mikroarray-Ergebnisse zu validieren und mit der Wirkung von Nelfinavir auf eukaryontische Zellen in Verbindung zu bringen. Die Durchführung des eigentlichen Microarrays wurde aus technischen Gründen der Firma IMG M Laboratories München (www.imgm.com) in Auftrag gegeben. Ziel des Microarrays war, die mRNA Expression in einer Gruppe von Proben zu untersuchen.

Der Microarray diente dem Screening des gesamten Genoms und somit der Identifizierung der durch Nelfinavir regulierten Gene.

Es wurden in unserem Labor 6 Proben generiert um die frühen Effekte von Nelfinavir auf das transkriptionelle Verhalten der Gene in der Zelllinie MCF7 zu untersuchen. Die Hälfte der Proben bestand aus einer Kontrollgruppe (unbehandelt), die andere Hälfte wurde mit Nelfinavir (in einer Konzentration von 15 µg pro ml über 5,5 Stunden) behandelt.

Bei allen 6 Proben (drei mit 15 µg pro ml behandelte Proben und drei unbehandelte Proben) wurde die mRNA mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ von Qiagen präpariert (s. Abschnitt 3.2.1, S. 20). Die mRNA wurde der Firma IMG M für die Microarray-Analyse ausgehändigt, da im Labor der Frauenklinik der Universität München keine technischen Möglichkeiten für die Durchführung des Microarrays gegeben sind. Alle weiteren Methoden, die den Microarray betreffen, wie z.B. die Hybridisierung, wurden durch die Firma übernommen und werden deshalb hier nicht weiter untersucht. Außerdem wurde auch die Bioinformatik von der Firma IMG M Laboratories München durchgeführt.

Für den Microarray wurden 40K Affymetrix chips (welche 40.000 Oligonukleotid-DNA-Sequenzen umfassen) verwendet. Der Microarray wird als „whole human genome microarray“, bezeichnet, er ist also ein Microarray mit dem das gesamte menschliche Genom untersucht werden kann. Bei den Tabellen, die die Ergebnisse des Microarrays für hochregulierte und reprimierte Gene zusammenfassen (Tabelle 4,

S. 44-45 und Tabelle 5, S. 46-47), wurde der willkürliche, aber allgemein verbreitete cut-off bei 2,0-facher Regulation gesetzt.

4.1.2 Der Microarray als Grundlage weiterer Untersuchungen

Der Microarray diene als Wegweiser für die am stärksten durch Nelfinavir regulierten Gene. Da der Microarray trotz multiplem Testen der Proben manchmal falsch positive Ergebnisse liefert, war es notwendig die Ergebnisse mit anderen Methoden, wie zum Beispiel der quantitativen PCR zu verifizieren.

Durch den Microarray konnten 284 hochregulierte und 108 reprimierte Gentranskripte identifiziert werden, die über dem besagten cut-off von 2 lagen. Da es nicht möglich war die Ergebnisse des Microarrays für alle Gentranskripte mittels PCR zu testen, wurde mit Hilfe von Mitarbeitern der Frauenklinik Innenstadt die ursprüngliche Tabelle des Microarrays auf relevante Gene untersucht um eine Vorauswahl an Genen zu ermöglichen. Diese Genauswahl wird in den Tabellen für hochregulierte und reprimierte Gentranskripte veranschaulicht (Tabelle 4, S. 44-45 und Tabelle 5, S. 46-47). Diese Tabellen stellen eine gekürzte Form der ausführlicheren Tabelle des Microarrays dar, da die Aufführung der ursprünglichen Liste des Microarray lang und zu unübersichtlich sein würde, und auch sehr viele „orphan genes“ mit unbekannter Funktion enthielt.

Es wurden prinzipiell die ersten zehn Gene bei den Tabellen beibehalten (mit Ausnahme der „orphan genes“, die Teil der ursprünglichen Auflistung waren). Die restlichen Gene wurden aufgrund ihrer potenziellen Wichtigkeit für das Projekt selektiert und behielten den jeweils ursprünglichen Rang, der ihnen in der ausführlichen Microarray-Auflistung zugeteilt wurde (Rangordnung inklusive der „orphan genes“, die mit aufgelistet waren und einen Rang erhielten). Es handelt sich hierbei insbesondere um Gene, die in Verbindung mit Apoptose, Krebs oder ER-Stress gebracht werden.

Die Gene, die selektiert wurden, können in drei Gruppen eingeteilt werden:

1) Die Gruppe der Gene, die ER-Stress Proteine kodieren. Solche sind DDIT3 und DDIT4, ATF3, GADD4A, ERN1, HERPUD1 und XBP 1. Diese Proteine wurden auch als ER-Stress-Proteine identifiziert und dies zeigt erneut, dass Nelfinavir ER-Stress induziert, was von verschiedenen Gruppen schon veröffentlicht wurde (Gills *et al.*, 2007, Pyrko *et al.*, 2007, Bruning, 2011). Dieser Gruppe von Genen wurde nicht weiter nachgegangen, da ihre Funktion bei ER-Stress und Nelfinavir bereits gezeigt und veröffentlicht wurde.

2) Die zweite Gruppe enthält Gene, die Proteine wie TXNIP, PAOX, CTH und TXNL4NB kodieren. Diese Proteine sind in Vorgängen des oxidativen Stresses involviert. Diese Tatsache war für uns insofern interessant, weil durch die Arbeitsgruppe auch bereits die Induktion von oxidativem Stress durch Nelfinavir gezeigt werden konnte (Bruning *et al.*, 2010a). Der Einfluss von Nelfinavir auf die Auslösung und Modulation von oxidativem Stress wird insbesondere auf Proteinebene in unabhängigen Arbeiten von Mitgliedern der Arbeitsgruppe untersucht.

3) In der letzten Gruppe befinden sich die auffälligsten Gene und Gene, deren Gentranskripte am stärksten reguliert werden. In dieser allerdings sehr heterogenen Gruppe wurden Wachstumsfaktoren und Peptidhormone wie FGF21, HDM2 und Inhibin beta E mit eingeschlossen.

Diese Faktoren, als auch einige weitere einzeln auffallende Faktoren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt und vorgestellt.

Diese letzte Gruppe stellt eine äußerst interessante Gruppe dar, da die Funktion der aufgelisteten Gene zum größten Teil unbekannt ist. Die Regulation der Transkription dieser Gene unter Nelfinavir ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausreichend geklärt.

4.1.2.1 Hochregulierte Gentranskripte

Tabelle 4 enthält die hochregulierten Gentranskripte der Zelllinie MCF7 nach NFV Inkubation. Die fettgedruckten Gene stellen die zehn am stärksten regulierten Gene dar. Die blau markierten Gene sind die Gene, deren Regulation im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt wird. Die sogenannte „fold change“ bezieht sich auf die Werte der MCF7 Zellen mit, versus den Werten der MCF7 Zellen ohne Nelfinavir Behandlung.

Tabelle 4: Tabelle der hochregulierten Gentranskripte.

HOCHREGULIERTE GENTRANSKRIPTE			
Rang	Abkürzung	Beschreibung des Gens	Fold change
1	FGF21	Homo sapiens fibroblast growth factor 21	17,120132
2	ADM2	Homo sapiens adrenomedullin 2 (ADM2)	16,220627
3	INHBE	Homo sapiens inhibin, beta E (INHBE)	13,9002285
4	TXNIP	Homo sapiens thioredoxin interacting protein	13,342764
5	KLHDC7B	Homo sapiens kelch domain containing 7B	13,325549
6	IFIT2	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats	9,171427
7	DDIT3	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 3	8,498121
8	AKNA	Homo sapiens AT-hook transcription factor	6,979655
9	ARHGAP9	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 9	6,774905
10	CHAC1	Homo sapiens ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	6,680128
...
18	SESN2	Homo sapiens sestrin 2	6,2422743
...
20	ATF3	Homo sapiens activating transcription factor 3	5,5309668
...

- Ergebnisse -

29	PAOX	Homo sapiens polyamine oxidase (exo-N4-amino)	4,8173637
...
40	DDR2	Homo sapiens discoidin domain receptor family, member 2	4,1558986
...
47	GADD45A	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage inducible, alpha	3,9730575
...
57	ERN1	Homo sapiens endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (ERN1), transcript variant 1	3,6716094
...
82	CTH	Homo sapiens cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	3,1684964
...
96	XBP 1	Homo sapiens X-box binding protein 1	3,0282774
...
124	HERPUD1	Homo sapiens homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	2,713118
...
172	TXNL4B	Homo sapiens thioredoxin-like 4B	2,4300544
...
221	DDIT4	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 4	2,2050872
...
256	ERRF1	Homo sapiens ERBB receptor feedback inhibitor 1	2,0654216

4.1.2.2 Reprimierte Gentranskripte

Tabelle 5 enthält die reprimierten Gentranskripte der Zelllinie MCF7 nach NFV Inkubation. Die blau markierten Gene sind die Gene, deren Regulation im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt wird. Auch hier stellen die fettgedruckten Gene die zehn am stärksten regulierten Gene dar. Die sogenannte „fold change“ bezieht sich auch hier auf die Werte der MCF7 Zellen mit, versus den Werten der MCF7 Zellen ohne Nelfinavir Behandlung.

Tabelle 5: Tabelle der reprimierten Gentranskripte.

REPRIMIERTE GENTRANSKRIPTE			
Rang	Abkürzung	Beschreibung des Gens	Fold change
1	EDN2	Homo sapiens endothelin 2	4,6312814
2	FGFBP1	Homo sapiens fibroblast growth factor binding protein 1	4,324129
3	FOS	Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	3,9186144
4	HSPA6	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 6	3,7918243
5	DKK1	Homo sapiens dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	3,736089
6	TSPAN2	Homo sapiens tetraspanin 2	3,4593983
7	PFKFB4	Homo sapiens 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	3,4307418
8	PSG4	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	3,3225276
9	EPPK1	Homo sapiens epiplakin 1	3,307389
10	HSPA2	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 2	3,2106516
...
44	EIF4E	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E	2,385446
...
65	AYTL2	Homo sapiens mRNA for FLJ00365 protein	2,2070282

- Ergebnisse -

...
71	ND3	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 NADH dehydrogenase subunit 3	2,1634257
...
93	CCND1	Homo sapiens cyclin D1	2,0458705
...
107	HIVEP3	Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3	2,002045

4.1.3 Verifikation der Ergebnisse

Ziel der ersten Versuche war, das Ergebnis des Microarrays für die Gene beider Tabellen, die in der letzten Gruppe aufgelistet sind, mit Hilfe der semiquantitativen PCR zu überprüfen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden neben der Mammakarzinomzelllinie MCF7 auch zwei weitere Zelllinien, nämlich HEK293 und HeLa eingesetzt.

Für die Durchführung der PCR war es notwendig Primer für die jeweiligen Gene richtig zu setzen und die Primer zu etablieren. Dies gelang für die Mehrheit der getesteten Gene, wie in Tabelle 6 dargestellt. Somit konnte die Anzahl der zu untersuchenden Gene noch einmal eingeschränkt werden.

Tabelle 6: Regulationsbestätigungsversuch.

GENE	PRIMER-ETABLIERUNG (GELUNGEN: X, MISSLUNGEN: -)	REGULATION BESTÄTIGT (JA: X, NEIN: -)
Inhibin beta E	x	x
TX	x	x
FIT	x	x
XBP 1	x	x
AKNA	x	x
Endothelin 2	x	x
HIVEP3	x	x
FGF21	-	-
KLHDC7B	-	-
DDIT3	-	-
ERN1	-	-

Die Verifizierung mittels PCR gelang im Fall von Inhibin beta E, dem Thioredoxin interagierenden Protein (TX), dem Interferon-induzierten Protein mit tetratricopeptidischen repeats (FIT), XBP 1, AKNA, Endothelin 2 und HIVEP3. Für FGF21, KLHDC7B, DDIT3, ERN1 war die Etablierung von funktionstüchtigen Primern nach mehreren Versuchen nicht möglich.

Da die Etablierung funktionstüchtiger Primer mit der erfolgreichen PCR-Durchführung gekoppelt ist, konnte eine PCR nicht für die Gesamtheit der Gene durchgeführt werden.

4.2 Inhibin-Regulation durch Nelfinavir

4.2.1 Epitheliale Zelllinien

Die Zelllinien HEK293, MCF7 und HeLa sind transformierte (HEK293) bzw. maligne (MCF7, HeLa) epitheliale Zelllinien. Sie wurden bezüglich der Regulation der Transkription verschiedener Gene durch Zugabe von Nelfinavir untersucht. Die Zellen wurden sechs Stunden mit Nelfinavir (erhalten über Pfizer, Groton, CA, USA) in einer Konzentration von 12 µg/ml inkubiert.

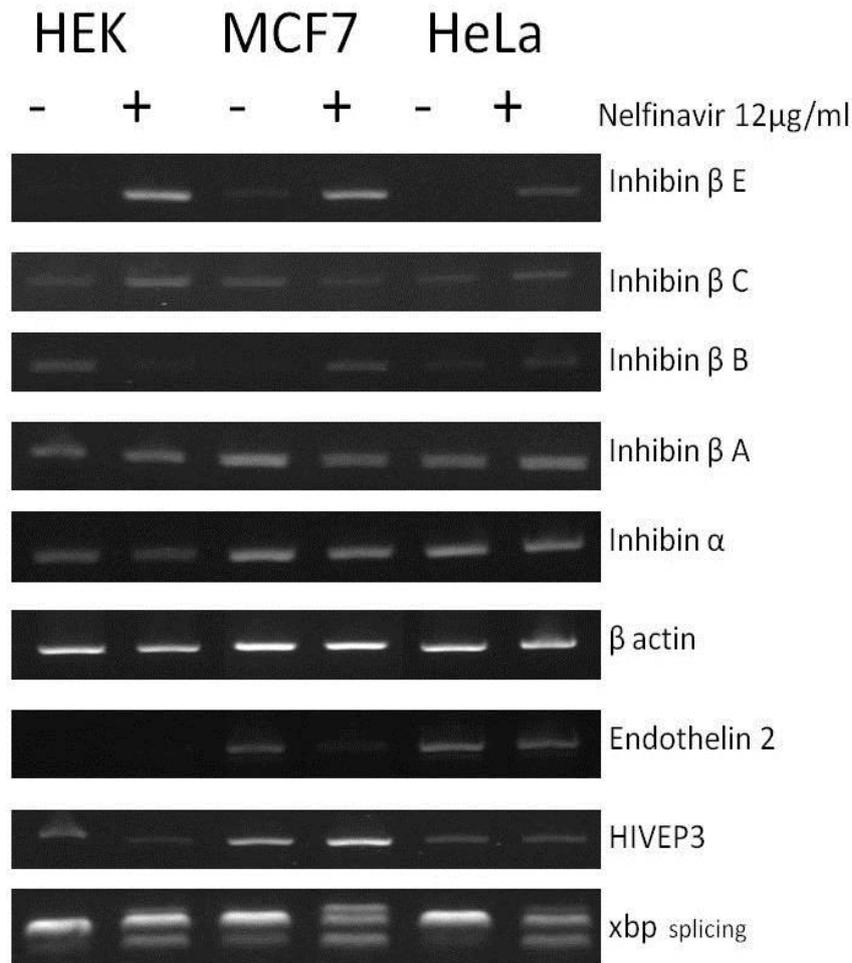


Abbildung 11: Analyse der Zelllinien HEK293, MCF7 und HeLa für ausgewählte Gentranskripte (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese).

Die Gene, die getestet worden sind wurden, wie oben beschrieben, aus der tabellarischen Auflistung des Microarrays selektiert. Inhibin beta E gehört zu den am stärksten durch Nelfinavir regulierten Genen. Beta actin ist ein Protein des Zellskeletts. Es ist also ein ubiquitär vorkommendes Protein, dass in der PCR bei intakten

Zellen immer vorhanden ist und bei getesteten Zellen gleich stark exprimiert sein sollte (ein sogenanntes „housekeeping gene“). Die Endothelin 2 Transkription wird am stärksten durch Nelfinavir reprimiert. Das XBP 1 Gen stellte durch das XBP 1 Spleißen ein interessantes Gen für weitere Untersuchungen dar. Die Genfunktion wird in Tabelle 7 (S. 90) kurz erläutert. Die anderen Inhibin-Untereinheiten wurden zu Vergleichszwecken mit getestet, aber auch weil die Inhibin beta E Untereinheit mit ihnen Heterodimere bilden kann.

4.2.1.1 Inhibin beta E

Das Inhibin beta E Gen war beim Microarray eines der am stärksten hochregulierten Gene der Zelllinie MCF7 unter Nelfinavir Einfluss (s. Tabelle 4, S. 44). Die Tatsache, dass die Zelllinie MCF7 eine Inhibin beta E-Hochregulation durch Nelfinavir Zugabe erfährt, wie in den Microarrays ermittelt, wurde somit mittels PCR bestätigt. Dennoch konnte hiermit gezeigt werden, dass auch bei anderen epithelialen Zelllinien, wie HEK293 und HeLa, eine Hochregulation der Inhibin beta E Einheit stattfindet.

Zusammenfassend zeigten alle drei getesteten epithelialen Zelllinien eine eindeutige Hochregulation der Inhibin beta E Einheit nach sechsständiger Nelfinavir-Inkubation.

4.2.1.2 Andere Inhibin-Untereinheiten

Durch den Microarray war die starke Regulation der Inhibin beta E Transkripte durch Nelfinavir eindeutig aufgefallen (13fache Hochregulation). Obwohl keine weiteren Inhibin Untereinheiten im Microarray aufgefallen waren, wurden auch weitere Untereinheiten untersucht, um festzustellen ob eine Nelfinavir induzierte Hochregulation für die Gesamtheit der Inhibin Untereinheiten zutrifft, oder ob dieser Effekt nur bei Inhibin beta E vorkommt.

Die Expression der weiteren Inhibin Untereinheiten zeigte Schwankungen unter den Zelllinien. Diese Schwankungen wurden als technisch bedingte Schwankungen bei der PCR betrachtet und wurden deshalb nicht weiter untersucht.

4.2.1.3 Endothelin 2

Endothelin 2 war das am stärksten reprimierte Gen beim MCF7-Microarray. Dies ließ sich auch durch die PCR bestätigen, da eine eindeutige Repression des Endothelin 2 Gens anhand der PCR zu sehen ist. Bei der Zelllinie HEK293 ist andererseits kaum eine Expression oder Regulation festzustellen und bei den HeLa-Zellen zeigte sich keine Endothelin 2-Regulation unter Nelfinavir-Einfluss. Da die Ergebnisse hier inkonsistent waren, wurde auf weitere Untersuchungen des Endothelin 2 Gens verzichtet.

4.2.1.4 XBP 1

Das XBP 1-Gen war durch den Microarray als Gen mit einer dreifachen Hochregulation der Transkription unter Nelfinavir Einfluss aufgefallen. Bei diesem Gen war die Entstehung einer Spleißvariante durch ER-Stress unter Einwirkung von Nelfinavir bekannt. Diese Spleißvariante des XBP 1 Gens konnte in der PCR durch die Entstehung einer weiteren Bande nachgewiesen werden. Dies trifft für alle drei Zelllinien nach sechsstündiger Nelfinavir-Inkubation zu.

Das XBP 1-Spleißen wird auch in weiteren Projekten als ER-Stressmarker benutzt. Theoretische Modelle beschreiben, dass durch das XBP 1- Spleißen ein aktiver Transkriptionsfaktor entsteht, welcher möglicherweise die Expression von Inhibin-Untereinheiten regulieren könnte.

4.2.2 Leukämiezelllinien

In früheren Publikationen der Arbeitsgruppe der Frauenklinik Maistraße konnte gezeigt werden, dass leukämische Zellen sehr sensitiv auf Nelfinavir reagieren (Bruning *et al.*, 2010b). In weiteren Experimenten wurde deshalb untersucht, welche die Effekte von Nelfinavir auf die Gentraskription der ausgewählten Gene waren. Außerdem wurden diese Versuche durchgeführt, um einen Vergleich zu epithelialen Tumorzelllinien darzustellen, an denen zuvor dieselben Gene getestet worden sind (HEK293, MCF7, HeLa).

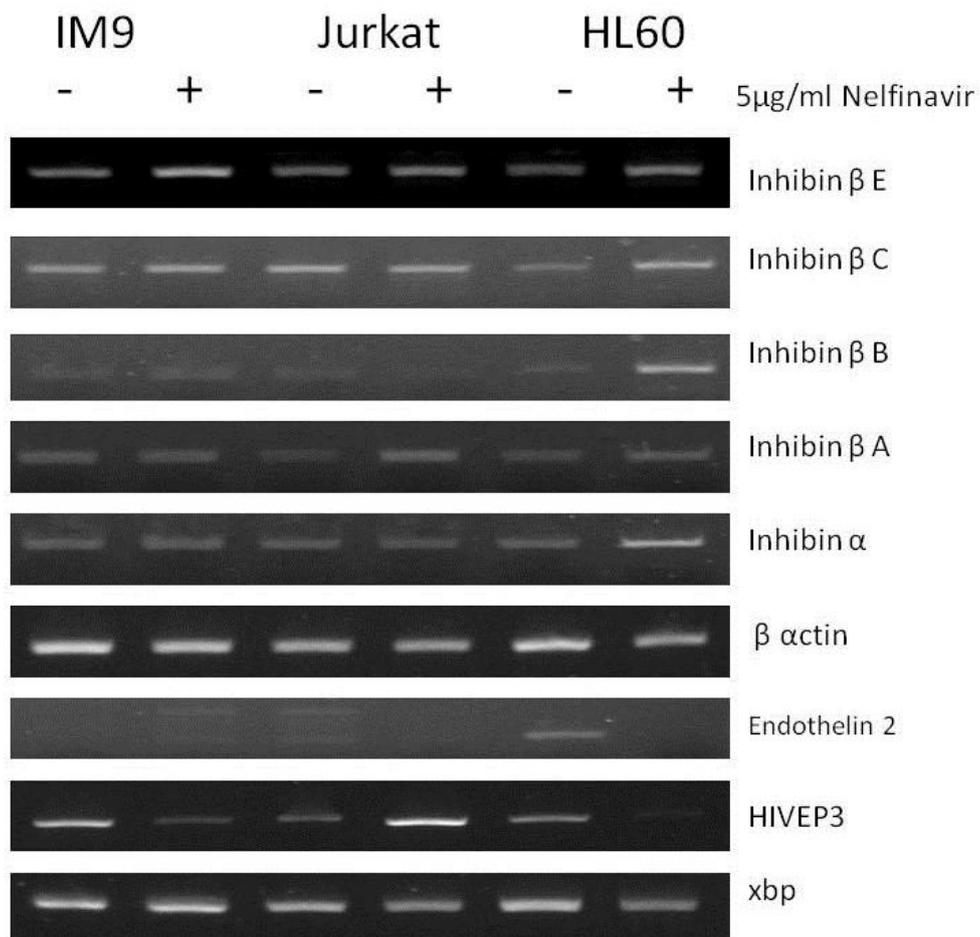


Abbildung 12: Analyse der Zelllinien IM9, Jurkat und HL60 für ausgewählte Gentranskripte (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese).

Die leukämischen Zelllinien, die für diesen Zweck eingesetzt wurden, sind IM9, Jurkat und HL60. Die Zellen wurden sechs Stunden mit Nelfinavir in einer Konzentration von 5 µg/ml inkubiert. Die Konzentration von Nelfinavir wurde in dieser Versuchs-

reihe niedriger gewählt, da Leukämiezelllinien empfindlicher auf Nelfinavir reagieren und bei höheren Konzentrationen apoptotisch werden.

4.2.2.1 Inhibin beta E

Die Zelllinien IM9, Jurkat und HL60 zeigen in dieser Versuchsreihe auch eine Hochregulation des Inhibin beta E Gens durch Nelfinavir-Zugabe. Die Regulation von Inhibin beta E ist also auf diese drei Leukämiezelllinien übertragbar, auch wenn die Regulation nicht so stark ist, wie bei epithelialen Zelllinien. Die Inhibin beta E-Expression und -Regulation bei leukämischen Zelllinien ist eine erstmalige Erkenntnis.

4.2.2.2 Andere Inhibin-Untereinheiten

Die Ergebnisse für die Untereinheit-Expression und -Regulation waren auch bei den leukämischen Zelllinien inkonsistent.

Das Inhibin beta C- und Inhibin beta B Gen wird bei den Zelllinien IM9 und Jurkat exprimiert, jedoch wird die Transkription nicht durch Nelfinavir reguliert. Die Inhibin beta A Einheit wird andererseits, sowohl bei der Zelllinie Jurkat, wie auch bei der Zelllinie HL60, durch Nelfinavir hochreguliert. Andererseits kommt es bei den IM9 Zellen nur zu einer schwachen Expression und keiner Regulation der beta-A-Einheit. Inhibin alpha wird von Zellen aller getesteten Zelllinien exprimiert, jedoch findet nur bei Zellen der Zelllinie HL60 eine Hochregulation statt. Insgesamt werden alle Inhibin-Untereinheiten bei der Zelllinie HL60 durch Nelfinavir hochreguliert.

4.2.2.3 Endothelin 2

Das Endothelin 2-Gen wird in den untersuchten leukämischen Zelllinien insgesamt schwach oder zum Teil auch nicht exprimiert. Die Zelllinie HL60 zeigt eine Endothelin 2-Repression nach Nelfinavir Zugabe.

4.2.2.4 HIVEP3

HIVEP3 wird bei den IM9- und HL60-Zellen runter reguliert, bei den Jurkat-Zellen hochreguliert. Die Regulation ist also auch hier inkonsistent.

4.2.2.5 XBP 1

Bei den leukämischen Zelllinien kommt es, im Gegensatz zu den epithelialen Zelllinien, nicht zum Spleißen des XBP 1-Gens unter Nelfinavir-Inkubation.

4.3 Weitere durch Nelfinavir regulierte Gene

Die Zelllinien HEK293, MCF7 und HeLa wurden auch bezüglich der Expression und Regulation weiterer Gene unter Nelfinavir untersucht. Eine Regulation konnte allerdings nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse der Versuche wurden zur Dokumentation in Abbildung 13 zusammengefasst. Da die Bestätigung der Microarray Ergebnisse nicht möglich war, fanden auch keine weiteren Untersuchungen an diesen Genen statt.

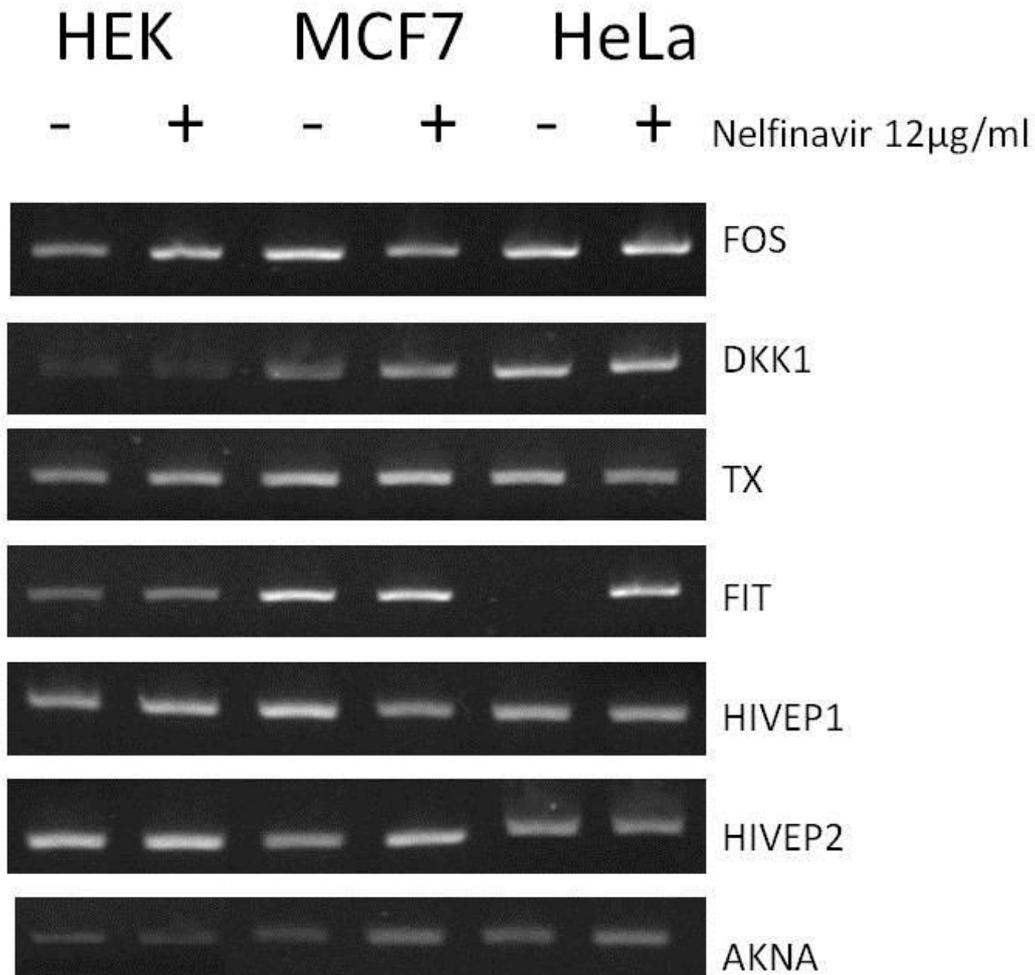


Abbildung 13: Screening der Zelllinien HEK293, MCF7 und HeLa für ausgewählte Gentranskripte (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese).

Die meisten dieser Gene spielen eine Rolle im Zellzyklus, bei anderen ist die Funktion bis heute nicht vollständig geklärt. Die Gene werden in Tabelle 7 (s. S. 90) kurz erläutert.

4.4 Konzentrationsabhängigkeit

Die Konzentration 2,2 µg/ml Nelfinavir ist die maximal nachgewiesene Nelfinavir-Konzentration im Blut HIV-positiver Patienten, die mit Nelfinavir behandelt werden. Die Konzentration kann in Einzelfällen auf 4 µg/ml steigen (c_{max}). Die Konzentration 12 µg/ml kann für die Tumorthherapie angestrebt werden. Die Zellen, die nicht mit Nelfinavir inkubiert worden sind, stellen eine Negativkontrolle dar.

Um festzustellen, ob eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration von Nelfinavir und der Genexpression besteht, wurden verschiedene Zellen mit Nelfinavir in steigenden Konzentrationen inkubiert. Die Gene, die eine Hochregulation oder Repression der Transkription unter Nelfinavir-Einwirkung in Vorexperimenten zeigten, wurden an den Zelllinien HeLa und MCF7 in weiteren Experimenten untersucht (s. Abbildung 14, S. 56).

Bei den epithelialen Zelllinien HeLa und MCF7 wurde Nelfinavir in den Konzentrationen 0 µg/ml, 2,2 µg/ml, 4 µg/ml und 12 µg/ml angewendet. Die Zellen wurden über 6 Stunden mit Nelfinavir in diesen Konzentrationen inkubiert. Es wurden alle bekannten Inhibin Untereinheiten (Inhibin alpha, -beta E, -beta C, -beta B, -beta A) sowie Endothelin 2 und XBP 1 untersucht.

Bei der beta E Untereinheit des Inhibins konnte sowohl bei der Zelllinie HeLa, wie auch bei MCF7 eine Hochregulation der beta E Transkription mit steigender Nelfinavir Konzentration nachgewiesen werden. Dies gilt auch für Inhibin beta C bei der Zelllinie MCF7. Die Ergebnisse für die restlichen Inhibin-Untereinheiten sind inkonsistent.

Bei Endothelin 2 kommt es zu einer Hochregulation bei den Zellen, die mit 2,2 und 4 µg/ml Nelfinavir inkubiert worden sind. Bei den Zellen der Negativkontrolle (0 µg/ml Nelfinavir) und der maximalen Nelfinavir-Konzentration (12 µg/ml Nelfinavir) kommt es nur zu einer schwachen Genexpression.

Das XBP 1-Spleißen, das aus Vorexperimenten bekannt war, zeigte in dieser Experimentreihe eine Konzentrationsabhängigkeit. Mit steigender Nelfinavir Konzentration und dann erst ab 12 µg/ml Nelfinavir kann das XBP 1-Spleißen durch eine kleinere Bande sichtbar gemacht werden. Diese Beobachtung gilt für beide Zelllinien.

- Ergebnisse -

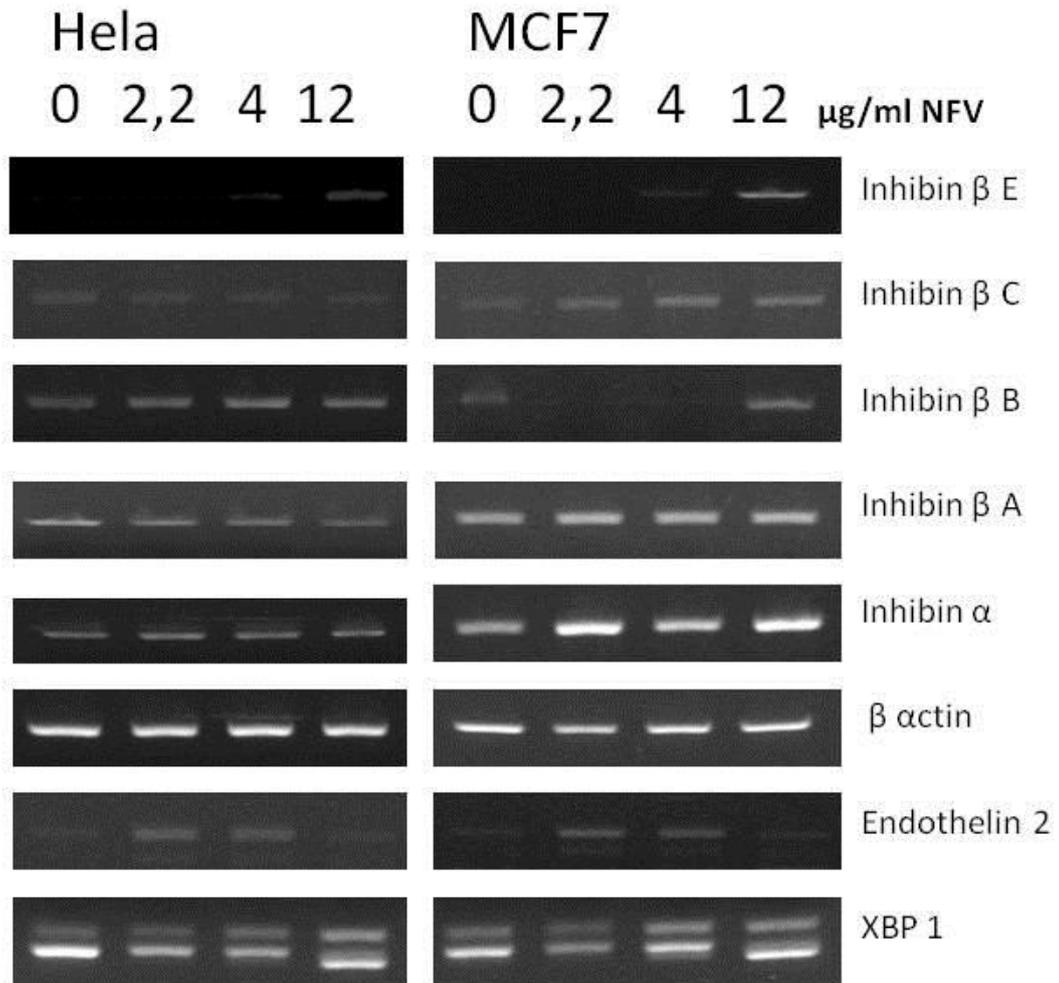


Abbildung 14: Konzentrationsreihen der Zelllinien HeLa und MCF7 für ausgewählte Gentranskripte (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese).

4.5 Untersuchungen an Endometriumkarzinomzelllinien

In den bisherigen Experimenten war das Ziel die Ergebnisse des Microarrays zu verifizieren und die Selektion der am stärksten regulierten, wie auch interessantesten Gene durchzuführen. Aus der Gesamtheit der Gene wurde versucht Gene zu selektieren, deren Regulation unter Nelfinavir bei den meisten, wenn nicht bei allen Zelllinien, gleichsinnig ist. So wurde festgestellt, dass sowohl epitheliale (HEK293, MCF7, HeLa), wie auch Leukämiezelllinien eine Hochregulation der Inhibin beta E Einheit-Transkription nach sechsstündiger Inkubation mit Nelfinavir (12 µg/ml) zeigten. Weitere Gene, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zeigten eine variable Regulation. Deshalb wurde die Inhibin beta E Einheit, sowie auch weitere Inhibin Untereinheiten, schwerpunktmäßig in weiteren Experimenten untersucht. Die Notwendigkeit neben Inhibin beta E auch weitere Untereinheiten zu untersuchen, entsteht dadurch, dass die Untereinheiten untereinander besser verglichen werden können.

Endometriumkarzinomzelllinien wurden schon in früheren experimentalen Ansätzen bei anderen Fragestellungen von der Forschungsgruppe der Frauenklinik Maistraße angewendet. Durch Voruntersuchungen (Mylonas *et al.*, 2009) war bekannt, dass Endometriumkarzinomzellen und hyperplastisches endometriales Gewebe eine Expression von Inhibin -alpha, -βA und -βB Untereinheiten zeigten und dass diese Tatsache eine prognostische Relevanz für Patientinnen mit Endometriumkarzinom hat. Zu Beginn wurde eine Testung der Expression von allen bekannten Inhibin Untereinheiten an etablierten Endometriumkarzinomzelllinien vorgenommen. Die Endometriumkarzinomzelllinien, die angewendet worden sind, sind Ishikawa plus und -minus, Hec1A und Hec1B sowie RL95-2. Es wurde zusätzlich, unabhängig davon, auch die Ovarialkarzinomlinie OVCAR3 bezüglich ihrer Inhibin-Expression untersucht. Um einen Überblick auf die Expression von Inhibin Untereinheiten auf normales Gewebe zu bekommen wurde auch Endometriumgewebe getestet. Bei allen Zelllinien wurde vor Durchführung der PCR die Präparation der RNA mit Hilfe des TRIzol® Reagenzes durchgeführt.

In Abbildung 15 (S. 58) werden die Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese der Inhibin-Untereinheiten bei Endometriumkarzinomzelllinien zusammengefasst.

- Ergebnisse -

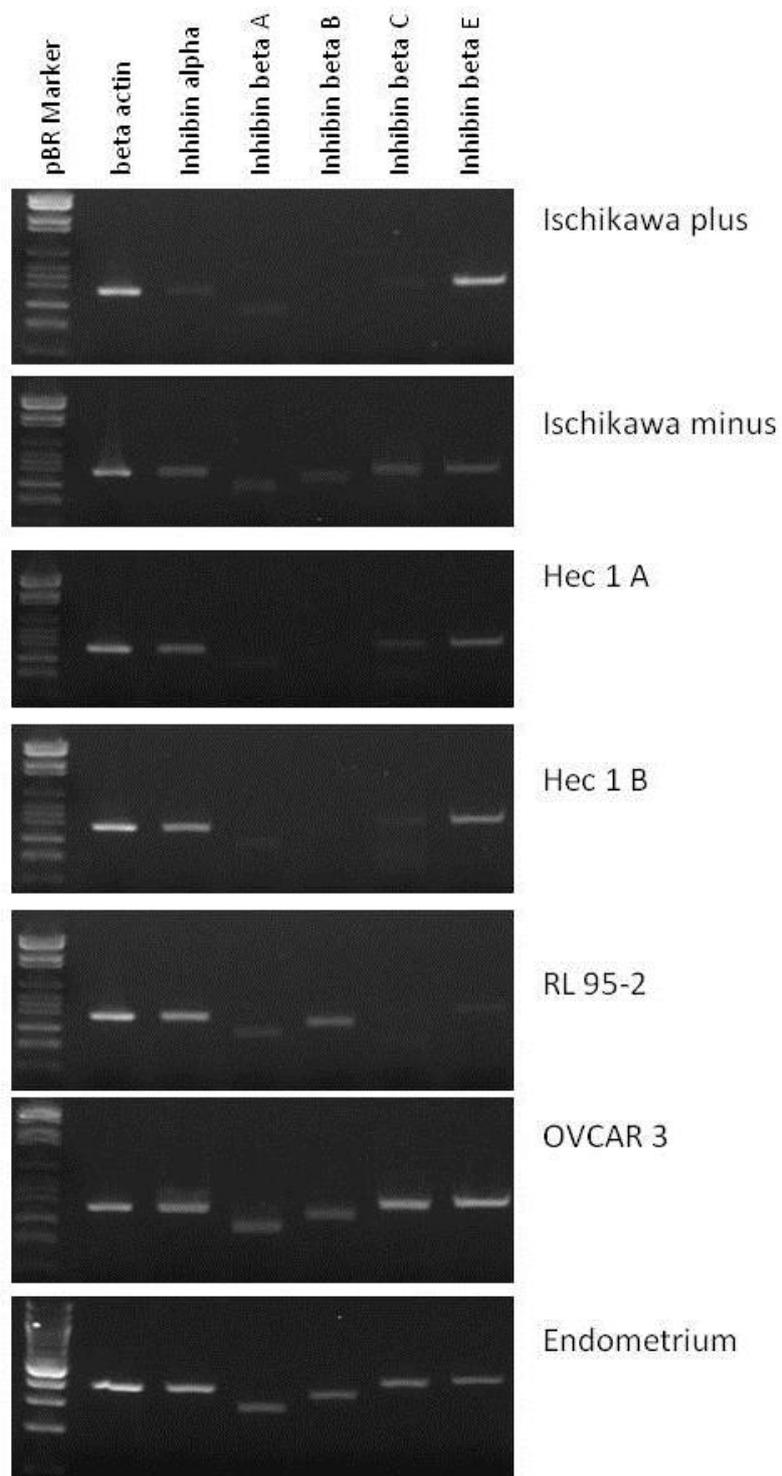


Abbildung 15: Expression der Inhibin-Untereinheiten in Endometriumkarzinomzelllinien (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese).

- Ergebnisse -

Bei Betrachtung der Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese (s. Abbildung 15) fällt folgendes auf:

- 1) Die Inhibin Expression variiert innerhalb der Zelllinien. Das bedeutet, dass nicht alle Inhibin-Untereinheiten innerhalb einer Zelllinie gleich stark exprimiert werden.
- 2) Die Expression der gleichen Inhibin Untereinheit ist unterschiedlich unter den Zelllinien.

Bei den untersuchten Zelllinien wird die Inhibin beta E Einheit immer exprimiert. Bei der Zelllinie Ishikawa plus und OVCAR ist die Expression am stärksten. Inhibin alpha und -beta A werden ebenfalls von allen Zelllinien exprimiert, wobei Inhibin alpha am Endometrium am stärksten und an Ishikawa plus Zellen am schwächsten exprimiert wird. Die Expression der anderen Inhibin-Untereinheiten ist nicht so stark und im Allgemeinen inhomogen.

In Abbildung 16 werden die Endometriumkarzinomzelllinien zusammengefasst um zu verdeutlichen, wie stark Inhibin beta E an Ishikawa plus Zellen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu zeigt die Ishikawa minus Zelllinie, welche die malignere Östrogen Rezeptor negative Variante der Ishikawa plus Zelllinie darstellt, eine sehr schwache Inhibin beta E Expression. Welche Bedeutung diese Tatsache hat, ist jedoch nicht von diesen Zelllinien ableitbar.

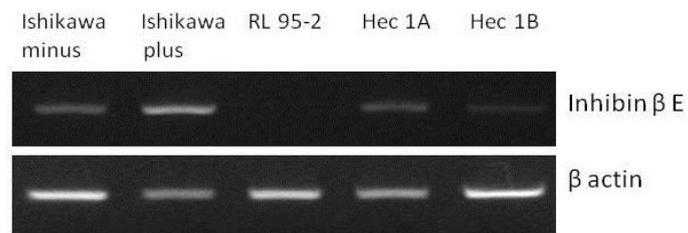


Abbildung 16: Expression der Inhibin β E Untereinheit in Endometriumkarzinomzelllinien (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese).

4.6 Die Inhibin beta E Klonierung

Aus den Untersuchungen an Endometriumkarzinomzelllinien kam hervor, dass Ishikawa plus Zellen im Vergleich zu anderen malignen endometrialen Zelllinien eine sehr starke Inhibin Expression zeigen. Die Inhibin beta E Expression war auch in Versuchen mit epithelialen und leukämischen Zelllinien (s. 4.2, S. 49-53) eine der am stärksten, wenn nicht die am stärksten regulierte Expression unter den getesteten Genen. Der Vergleich mit anderen Inhibin-Untereinheiten hat ergeben, dass die Inhibin beta E-Einheit unter allen bekannten Inhibin-Untereinheiten im größten Ausmaß durch Nelfinavir beeinflusst wird. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich die Inhibin beta Expression proportional zur Nelfinavir Konzentration verändert.

Diese Beobachtungen geben uns Hinweise dafür, dass Inhibin beta E möglicherweise eine Rolle in der Physiologie, aber auch in der Pathologie der Zellen spielen könnte. Welche aber nun konkret die Aufgaben von Inhibin beta E in der Koordination der zellulären Funktionen oder sogar in anderen Vorgängen wie die Apoptose-Induktion oder die ER-Stress-Antwort der Zelle sind, ist bis heute nicht geklärt. Die Identifizierung der Rolle von Inhibin beta E in gynäkologischen Krebszellen ist demnach auch weitgehend unbekannt. Eine Ursache dafür ist, dass es kein etabliertes experimentelles Modell für funktionelle Untersuchungen an gynäkologischen Krebszellen gibt.

4.6.1 Klonierung und Screening

Im Versuch ein erstes Modell für die Untersuchung der Alterationen an gynäkologischen Zellen durch übermäßige Produktion von Inhibin beta E zu schaffen, entstand die Notwendigkeit die cDNA des Inhibin beta E Gens zu klonieren. Die Idee dahinter ist es Zellen, die eigentlich kein Inhibin beta E exprimieren, zu einer Überexpression von Inhibin beta E zu bringen. Die Inhibin beta E cDNA wird zu diesem Zweck aus Zellen entnommen, die bekanntlich eine hohe Inhibin beta E Expression zeigen. Ishikawa plus Zellen zeigten eine sehr hohe basale Inhibin beta E Expression (Abbildung 16, s. S. 59) und wurden deshalb als cDNA-Donatoren für die Klonierung angewendet. Zellen, die keine hohe basale Inhibin beta E Expression zeigten sind z.B. HeLa Zellen. Diese Zellen wurden zur Bildung überexprimierender Inhibin beta E Klone eingesetzt.

4.6.1.1 Klonierung der cDNA aus Ishikawa plus Zellen

Um die Inhibin beta E cDNA zu klonieren wurde zu Beginn eine PCR mit bestimmten Inhibin beta E Primern und cDNA der Zelllinie Ishikawa plus durchgeführt, um die Inhibin beta E cDNA in ihrer gesamten Länge zu amplifizieren. Zu diesem Zweck wurde der sogenannte „Inhibin beta E full length Primer“ eingesetzt. Somit entstand das PCR Produkt, welches das interessierende Gen enthielt. Das PCR Produkt wurde in einem weiteren Schritt in Vektoren (pcDNA3.1/V5-His© TOPO©) integriert und

kompetenten *E. coli* Bakterien zugeführt. Die Methodik der Klonierung wurde im Abschnitt 3.5 (S. 28-35) ausführlich geschildert.

Da die Plasmide ein Resistenzgen gegen Ampicillin besitzen wuchsen in der Bakterienkultur - auf ampicillinhaltigem Agar - nur Bakterien, welche ein Plasmid aufgenommen hatten (s. auch 3.5.3.1, S. 32). Zum Screenen wurden acht Kolonien gepickt, die sich in separaten flüssigen Wachstumsmedien vermehrten.

In den Kolonien, die ausgewählt worden sind, wurden die Resistenzplasmide mit großer Sicherheit aufgenommen. Dennoch gibt es verschiedene Möglichkeiten für die Insertion der PCR-Produkte in die Plasmide:

- 1) Es kann eine korrekte Insertion stattgefunden haben. In diesem Fall hat sich das PCR-Produkt in 3'→5' Richtung in den Vektor integriert. Das bedeutet, dass das Gen welches in die Plasmide integriert worden ist, richtig abgelesen und eventuell exprimiert werden kann.
- 2) Es kann eine inkorrekte, umgekehrte Insertion und Ligation des PCR- Produktes stattgefunden haben. Das PCR-Produkt wird in 5'→3' Orientierung integriert und das beinhaltete Gen kann weder korrekt abgelesen, noch exprimiert werden.
- 3) Das PCR-Produkt kann sich nur teilweise integrieren. In diesem Fall bleibt das Plasmid offen und verliert seine „Ringform“.
- 4) Zuletzt ist es auch möglich, dass das PCR-Produkt nicht inseriert wird. Plasmide können sich spontan wieder verschließen und ohne das untersuchte Gen aufzunehmen in die Bakterien gelangen.

In Abbildung 17 (S. 62) werden die verschiedenen Möglichkeiten der cDNA-Integration in Plasmide aufgezeigt. Dabei stellt die ringförmige Struktur (blau) den Vektor dar, das PCR-Produkt (rot) wird mit seiner Orientierung (5'→3' oder 3'→5') angegeben.

Insertion von PCR Produkten in Plasmide (pcDNA3.1/V5-His³ TOPO³ Vektoren)

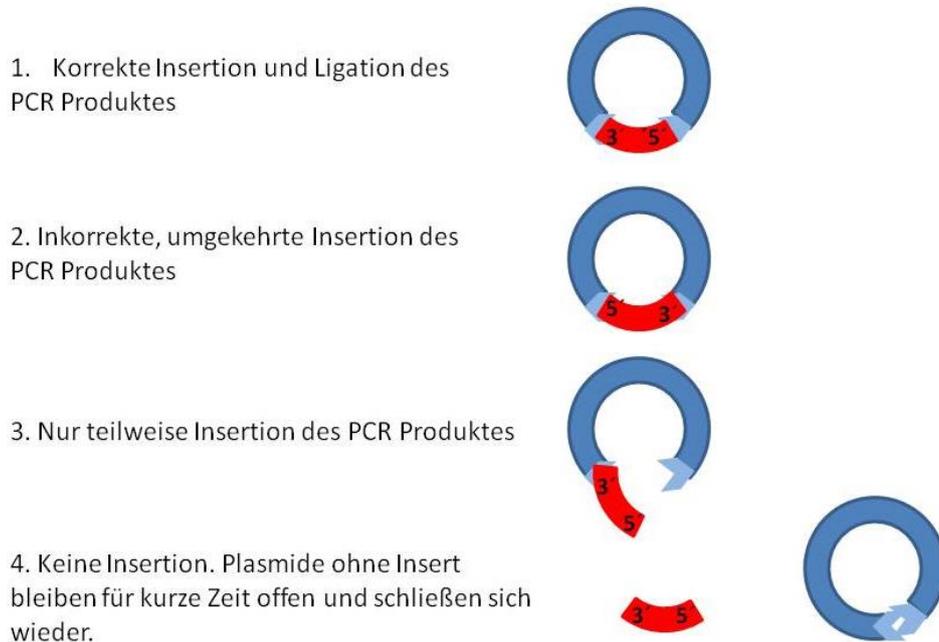


Abbildung 17: Möglichkeiten der cDNA-Integration in Plasmide während der PCR-Klonierung.

Somit wird auch klar, dass nach der willkürlichen Auswahl der Kolonien eine gezieltere Auswahl von Klonen stattfinden muss, die das Plasmid erstmals überhaupt aufgenommen haben. Aus diesem Grund wird eine PCR mit dem T7-BGH Primer durchgeführt um zu bestimmen welche Kolonien das interessante Plasmid intakt aufgenommen haben und welche nicht. Die PCR diente im ersten Schritt der Vorselektion von Klonen. Deshalb wurden Bakteriensuspensionen angewendet, bevor es zur Plasmidpräparation kam.

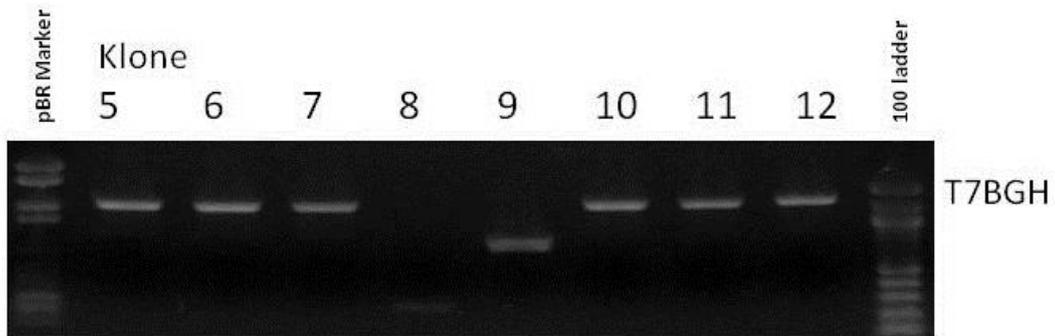
In Abbildung 18 A. (S. 63) wird die erste Selektion von Inhibin beta E Klonen mit PCR Inserts durchgeführt. Von allen untersuchten Klonen wurde bei Klon 8 kein PCR Insert detektiert. Klon 9 zeigt ein abweichendes Molekulargewicht. Es handelt sich hierbei um eine inkorrekte Insertion, wie sich aus weiterführenden Untersuchungen ergab. Die übrigen untersuchten Klone haben alle ein PCR Insert. Aus diesem Grund konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die restlichen Klone.

Bei den selektierten Plasmiden ist jetzt noch fraglich ob die Inserts auch eine richtige Orientierung haben. Deshalb wird desweiteren eine PCR mit dem „T7-Inhibin beta E rückwärts“- Primer durchgeführt, um zu bestimmen welche Plasmide das zu klo-

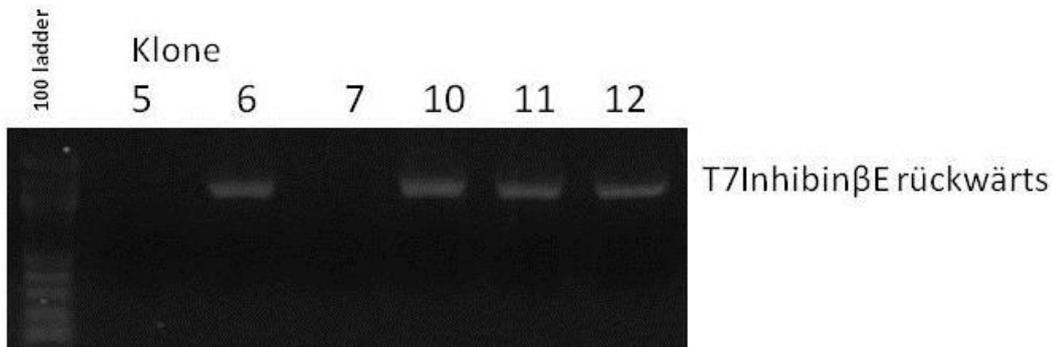
nierende Gen in der 3'→5'Orientierung enthalten. In Abbildung 18 B. sieht man, dass nur die Klone 6, 10, 11, 12 das zu klonierende Gen korrekt inseriert haben.

Selektion der Inhibin β E Klone (5-12) aus der Zelllinie Ishikawa mit Nelfinavir-Behandlung

A. T7BGH PCR



B. T7 Inhibin β E rückwärts PCR



C. Ergebnisse der Plasmidpräparation der ausgewählten Klone

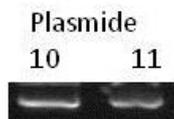


Abbildung 18: Ergebnisse der Selektion aus der Zelllinie Ishikawa.

In Abbildung 18 wird folgendes gezeigt: die Selektion der Plasmide mit Inserts (A.) und das Screening auf richtige Orientierung der Inserts (B.) wurde mit Hilfe der PCR

mit Primern durchgeführt, die bestimmte Gene (T7BGH) in den Vektoren erkennen. Die Plasmide der Klone 10 und 11 wurden separat nochmal aufgetragen (C.) um festzustellen welches Plasmid besser präpariert wurde (hier also Plasmid 10, welches ein sehr starkes Signal zeigt).

Nach Durchführung der Vorselektion wurden die Plasmide gezielt aus den Klonen 10 und 11 isoliert (s. Methodik unter 3.5.4, S. 33-34). Plasmide haben ein hochmolekulares Gewicht und laufen deshalb in der PCR relativ hoch, wie in Abbildung 18 (C.) (S. 63) dargestellt.

Klon 9 stellt eine unerwartete Bande beim allgemeinen PCR Screening (s. Abbildung 18 A., Bande 9, S. 63) dar. Durch Wiederholung des Versuches konnte festgestellt werden, dass es sich um eine inkorrekte Insertion handelt.

4.6.2 Sequenzierung

Plasmid 10 wurde als potenzieller Kandidat für den Einsatz in die Klonierung selektiert. Es wurde dem Institut für Biologie III der Universität Freiburg (Research Group G.L. Igloi) zur Sequenzierung ausgehändigt.

Die Ergebnisse der Chromatographie wurden mit dem Programm „Chromas“ dargestellt. Dem T7-Primer (in umgekehrter Leserichtung) folgten der Startprimer und das Startkodon ATG. Daraufhin folgten die Sequenzen der jeweiligen Plasmide. Die Plasmidsequenzen wurden markiert und anschließend mit der Sequenz des Inhibin beta E Exons verglichen.

4.6.2.1 Die Inhibin beta E Sequenz

Zur besseren Übersicht wurde die bereits bekannte Inhibin beta E Sequenz (National Center for Biotechnology Information) mit einem Farbcode markiert. Das Start- und Stoppkodon ist **rot** und das Intron **blau** unterlegt. Der Inhibin beta E full length (Inhibin beta E TOPO) Primer wurde unterstrichen, während das Exon **grau** markiert wurde.

```
CCGAGGCTCCTGAACCAGGGCCATTCACCAGGAGCATGCGGCTCCCTGATGTCCAGC  
TCTGGCTGGTGCTGCTGTGGGCACTGGTGCGAGCACAGGGGACAGGGTCTGTGTGTC  
CCTCCTGTGGGGCTCCAAACTGGCACCCCAAGCAGAACGAGCTCTGGTGCTGGAGC  
TAGCCAAGCAGCAAATCCTGGATGGGTTGCACCTGACCAGTCGTCCCAGAATAACTC  
ATCCTCCACCCAGGCAGCGCTGACCAGAGCCCTCCGGAGACTACAGCCAGGGAGTG  
TGGCTCCAGGGAATGGGGAGGAGGTCATCAGCTTTGCTACTGTCACAGGTGGGTGAG  
GGAGAGAGCAACAGGCAAAGAGCAGACAGGGAAAGGGAGGCAGAAGGGGAGCCTGGC  
AGGAGCAGCAGAGGGAGTGGGGTGTGGCAGGAGAAGGAGGAGCTGGGGCAGGGACTG  
GTTGCAGAGGACACAAAGCAGTCTCTACTTTTCTAGAGGTAGGTTGAGGGAGAGCA  
GGAGTGGGGTGTGGCAGGAGAAGGAGGAGCTGGGGCAGGGACTGGTTGCAGAGGACA
```

```
CAAAGCAGTCTCTACTTTTCTAGAGGTAGGTTTCGAGGGAGAGCAGTGGGCAGGGCTT
GGGGAGTCTCAGAGGAGAGCTTCATCTCTACTCACATTTTCTTTCCCTTTTCTGTCT
TTCGGGCAGACTCCACTTCAGCCTACAGCTCCCTGCTCACTTTTCACCTGTCCACTC
CTCGGTCCCACCACCTGTACCATGCCCGCCTGTGGCTGCACGTGCTCCCCACCCTTC
CTGGCACTCTTTGCTTGAGGATCTTCCGATGGGGACCAAGGAGGAGGCGCCAAGGGT
CCCGCACTCTCCTGGCTGAGCACCACATCACCAACCTGGGCTGGCATACTTAACTC
TGCCCTCTAGTGGCTTGAGGGGTGAGAAGTCTGGTGTCTGAAACTGCAACTAGACT
GCAGACCCCTAGAAGGCAACAGCACAGTTACTGGACAACCGAGGCGGCTCTTGACA
CAGCAGGACACCAGCAGCCCTTCTAGAGCTTAAGATCCGAGCCAATGAGCCTGGAG
CAGGCCGGGCCAGGAGGAGGACCCCACTGTGAGCCTGCGACCCCTTATGTTGCA
GGCGAGACCATTACGTAGACTTCCAGGAACTGGGATGGCGGGACTGGATACTGCAGC
CCGAGGGGTACCAGCTGAATTAAGTGCAGTGGGCAGTGCCCTCCCCACCTGGCTGGCA
GCCCAGGCATTGCTGCCTCTTTCCATTCTGCCGTCTTCAGCCTCCTCAAAGCCAACA
ATCCTTGCCCTGCCAGTACCTCCTGTTGTGTCCCTACTGCCCGAAGGCCCTCTCTC
TCCTCTACCTGGATCATAATGGCAATGTGGTCAAGACGGATGTGCCAGATATGGTGG
TGGAGGCCTGTGGCTGCAGCTAGCAAGAGGACCTGGGGCTTTGGAGTG
```

4.6.2.2 Die Sequenz von „Plasmid 10“

Hier wurde die Plasmidsequenz ebenfalls mit einem Farbcode markiert. Das Startkodon ist **rot** unterlegt. Der Inhibin beta E full length Primer wurde auch hier unterstrichen, während das Exon **grau** markiert wurde. Der Querstrich zeigt die Unterbrechungsstelle des Exons im Inhibin beta E Gen an. Die **grün** unterlegte Sequenz befindet sich im Vektor kurz vor dem PCR-Produkt (s. Abbildung 19, S. 66)

```
...CGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATGGCCCTTACCAGGAGCATGCCG
GCTCCCTGATGTCCAGCTCTGGCTGGTGTCTGTGTGGGCACTGGTTCGAGCACAGGG
GACAGGGTCTGTGTGTCCCTCCTGTGGGGCTCCAAACTGGCACCCCAAGCAGAACG
AGCTCTGGTGTGGAGCTAGCCAAGCAGCAAATCCTGGATGGGTTGCACCTGACCAG
TCGTCCCAGAATAACTCATCCTCCACCCCAGGCAGCGCTGACCAGAGCCCTCCGGAG
ACTACAGCCAGGGAGTGTGGCTCCAGGGAATGGGGAGGAGGTCATCAGCTTTGCTAC
TGTCACAG/ACTCCACTTCAGCCTACA...
```

- Ergebnisse -

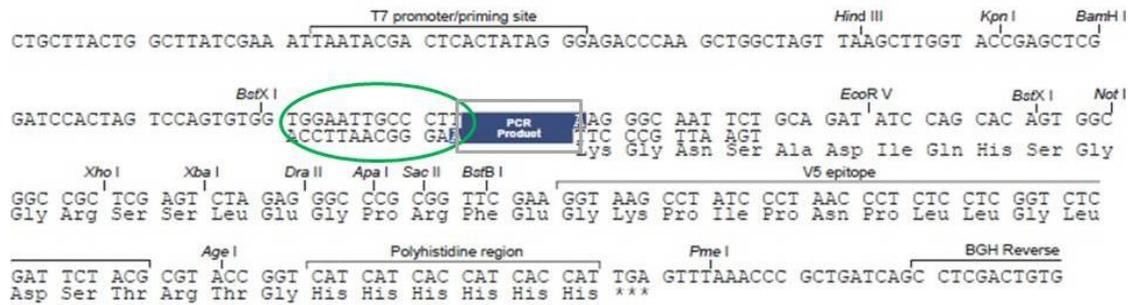


Abbildung 19: Ausschnitt aus der Sequenz des Vektors. TOPO® TA Cloning® Site (Life Technologies Corporation and invitrogen, 2009, p. 3). Copyright © 2012 Life Technologies Corporation. Used under permission.

Zum Vergleich auch die Sequenz in der Chromatographie-Auswertung des Programms „Chromas“ (Abbildung 20):

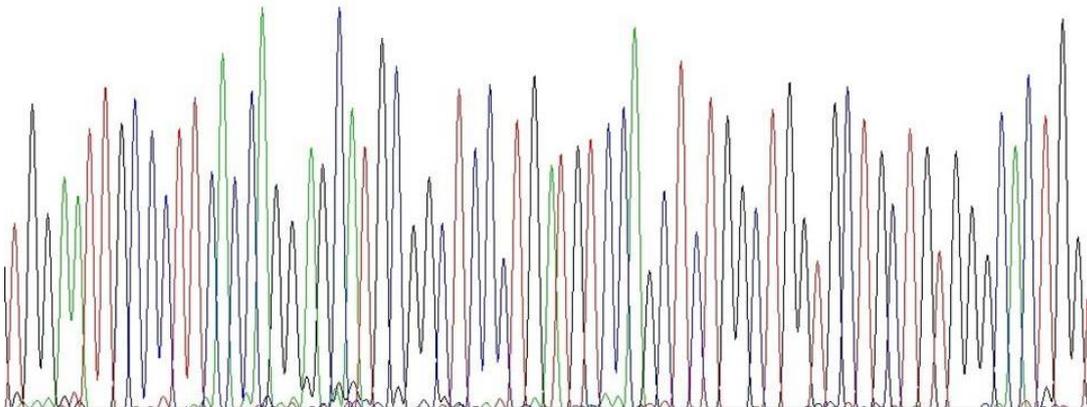
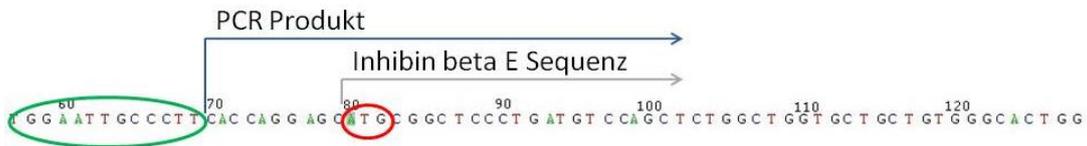


Abbildung 20: Insertion des PCR Produktes. Chromatographische Auswertung des Programms „Chromas“.

Auch der Übergang ACAG/ACTCCACTT war beim Exon/Intron korrekt. In Abbildung 21 (s. S. 67) wird dieser Ausschnitt als Sequenz in der Chromatographie-Auswertung des Programms „Chromas“ nochmal verdeutlicht.

- Ergebnisse -

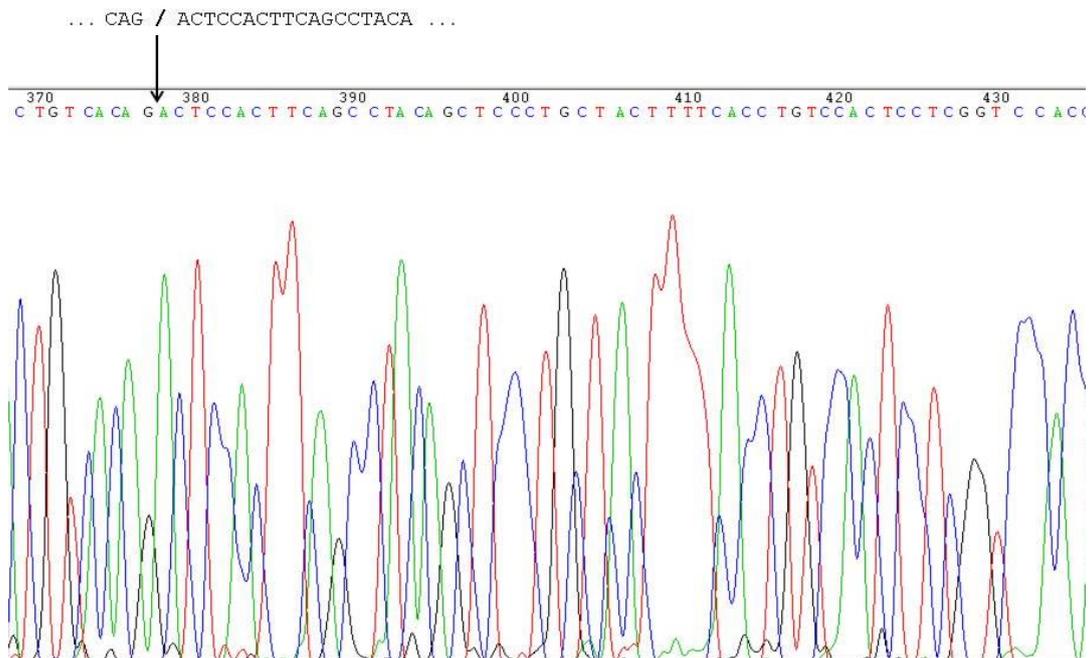


Abbildung 21: Der Übergang ACAG/ACTCCA. Chromatographische Auswertung des Programms „Chromas“.

Durch die Sequenzierung wurde das Plasmid 10 als korrekt identifiziert. Das Plasmid 10 wurde im weiteren Schritt zur Transfektion in HeLa Zellen eingesetzt.

4.6.3 Transfektion: Western Blot- und Immunfluoreszenz Ergebnis

Im letzten Schritt der Inhibin beta E cDNA Klonierung, wurde das selektierte Plasmid (Plasmid 10) in HeLa Zellen transfiziert (s. 3.5.6 Transfektion, S. 35). Die Transfektion ermöglichte eine temporäre Überexpression von Inhibin beta E. Es wurde ein Western Blot durchgeführt um die erhöhte Inhibin beta E Produktion nachzuweisen.

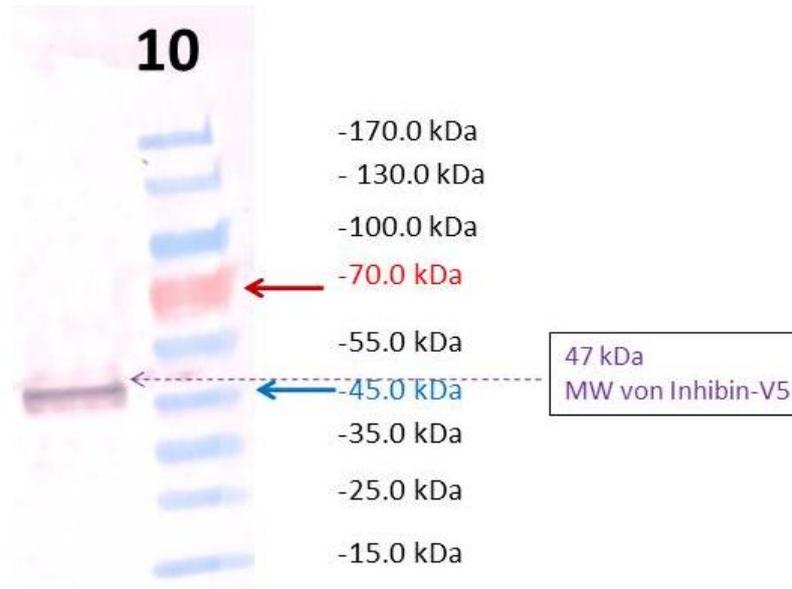


Abbildung 22: Ergebnisse des Western Blots.

Bei den HeLa Zellen, die mit Plasmid 10 transfiziert wurden, entstand eine Bande bei ungefähr 47 kDa (s. Abbildung 22). Dieses Molekulargewicht entspricht dem apparenten Gewicht des Inhibins (mit ungefähr 35 kDa) plus V5 Tag (ca. 10 kDa). HeLa Zellen haben im Regelfall sehr niedrige basale Inhibin beta E Expressionsraten. Die Menge des Inhibin-V5 ist proportional der Inhibin beta E Menge. Also konnte durch die entstandene Bande (der Inhibin V5 Bande) gezeigt werden, dass es bei den transfizierten HeLa Zellen zu einer erhöhten Inhibin beta E Expression kam.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibin beta E cDNA Klonierung erfolgreich war. Die transfizierten HeLa Zellen sind gute Modelle für weitere Untersuchung der Effekte der Inhibin beta E Überexpression. Sie wurden der Forschungsgruppe der Frauenklinik der Universität München für zukünftige Experimente zur Verfügung gestellt.

Der Erfolg der Transfektion kann auch in den Bildern der Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (Abbildung 23, S. 69). Es wurden zusätzlich MCF7 Zellen transfiziert.

Inhibin beta E in überexprimierenden MCF 7 und HeLa Zellen

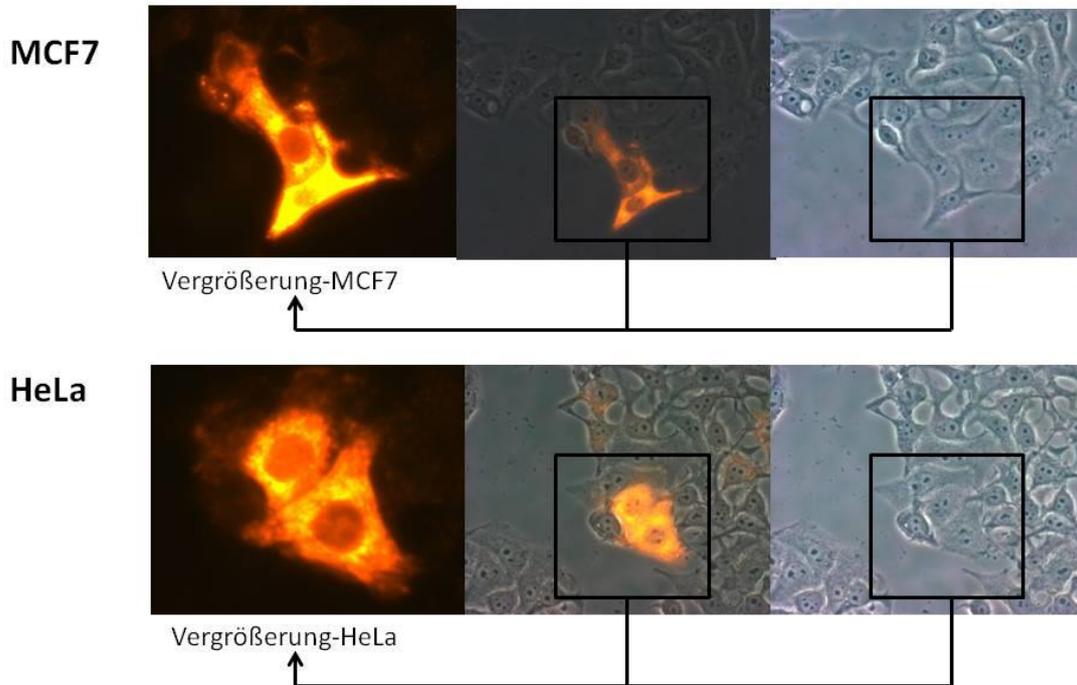


Abbildung 23: Immunfluoreszenzmikroskopie.

Die überexprimierenden Zellen der Zelllinien MCF7 und HeLa zeigen eine erhöhte Fluoreszenz (also eine erhöhte Inhibin beta E Produktion). Das Immunfluoreszenz-Muster ist vorwiegend „Endomembran-ähnlich“. Es entspricht somit einer Lokalisation im ER/Golgi, wie es für die sekretierten Proteine zu erwarten wäre.

4.7 Die Inhibin beta E Expression unter ER-Stress

Die letzte Reihe von Untersuchungen war auf die Wirkung des endoplasmatischen Stresses auf die Inhibin beta E Expression fokussiert. Nelfinavir ist bekanntlich ein ER-Stress auslösendes Medikament. Während der Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Inhibin beta E Expressionsrate unter Nelfinavir erhöht wird. Daraus kam die Frage hervor, ob diese zwei Phänomene gekoppelt sind. Wenn das der Fall wäre, würde die Erhöhung der Inhibin beta E Expression ursächlich mit der Entstehung des ER-Stresses in Zusammenhang stehen.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Zellen der Zelllinie MCF7 für 6 Stunden mit verschiedenen ER-Stress-induzierenden und indifferenten Substanzen inkubiert und auf Veränderungen in der Expression verschiedener Gene (ATF3, Inhibin beta E, XBP 1) untersucht. Zum Vergleich wurde auch eine PCR mit Kontroll-Zellen durchgeführt, welche ohne Medikamentengabe wuchsen (s. Abbildung 24).

Die Expression von Inhibin beta E ist
auf Stress im Endoplasmatischen Retikulum begrenzt

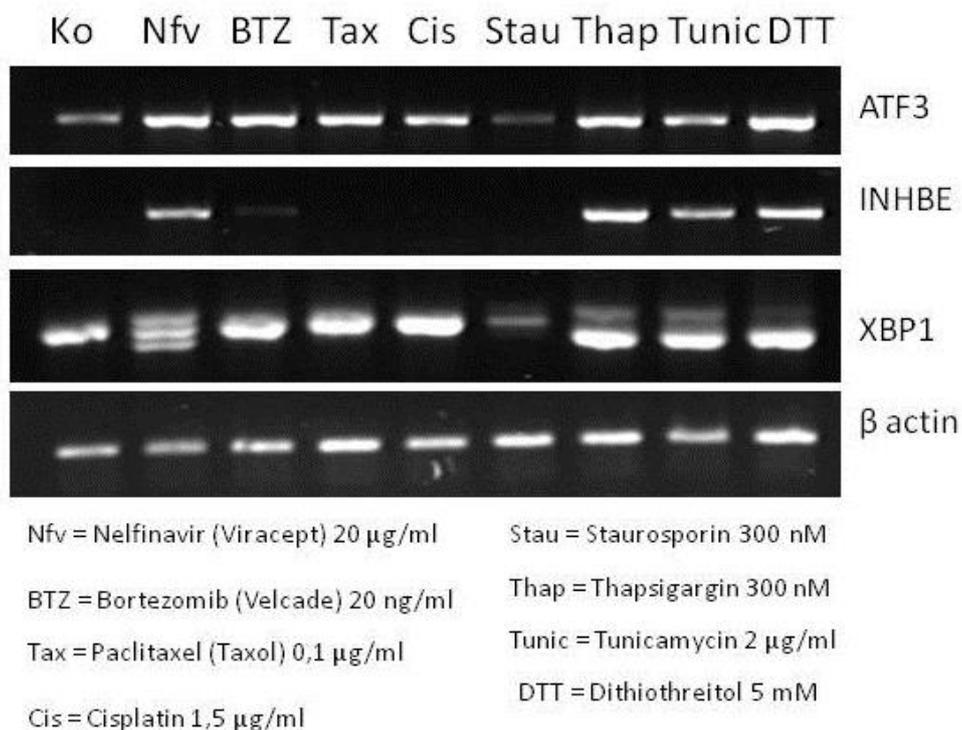


Abbildung 24: Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese. Vergleich der Gentranskripte bei Inkubation mit verschiedenen Substanzen (Ko=Kontrolle).

- Ergebnisse -

Inhibin beta E wird eindeutig bei Inkubation der Zellen mit ER-Stress-induzierenden Stoffen hochreguliert, wie man in Abbildung 24 sehen kann. Unter den ER-Stress-induzierenden Substanzen bewirkt Thapsigargin (ein SERCA Inhibitor) und DTT die stärkste Inhibin beta E Hochregulation, während Nelfinavir und Tunicamycin (ein Antibiotikum) etwa denselben Regulationseffekt aufweisen. Bortezomib bewirkt nur eine milde Inhibin beta E Hochregulation.

Bei Zellen, die mit den zuvor erwähnten Substanzen inkubiert worden sind, entstand eine XBP-1 Spleißvariante. Diese ist indikativ für ER-Stress.

Das ATF3 Gen wurde zusätzlich bei den Chemotherapeutika Paclitaxel und Cisplatin sowie dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin hochreguliert.

Es wurde abschließend eine immunhistochemische Untersuchung der Zellen der Zelllinie MCF7 durchgeführt, um die Hochregulation auch auf Proteinebene darzustellen (s. Abbildung 25, S. 72). Die Zellen wurden 24 Stunden mit den jeweiligen Wirkstoffen inkubiert. Die Konzentrationen der Substanzen sind identisch mit denen, die in der PCR eingesetzt worden sind.

Im Vergleich zur Kontrolle haben die Zellen, welche mit Tunicamycin, DTT und Nelfinavir behandelt worden sind, eine erhöhte Inhibin beta E Expression und leuchten in der Immunfluoreszenz dadurch stärker auf.

INHBE in MCF7-Zellen

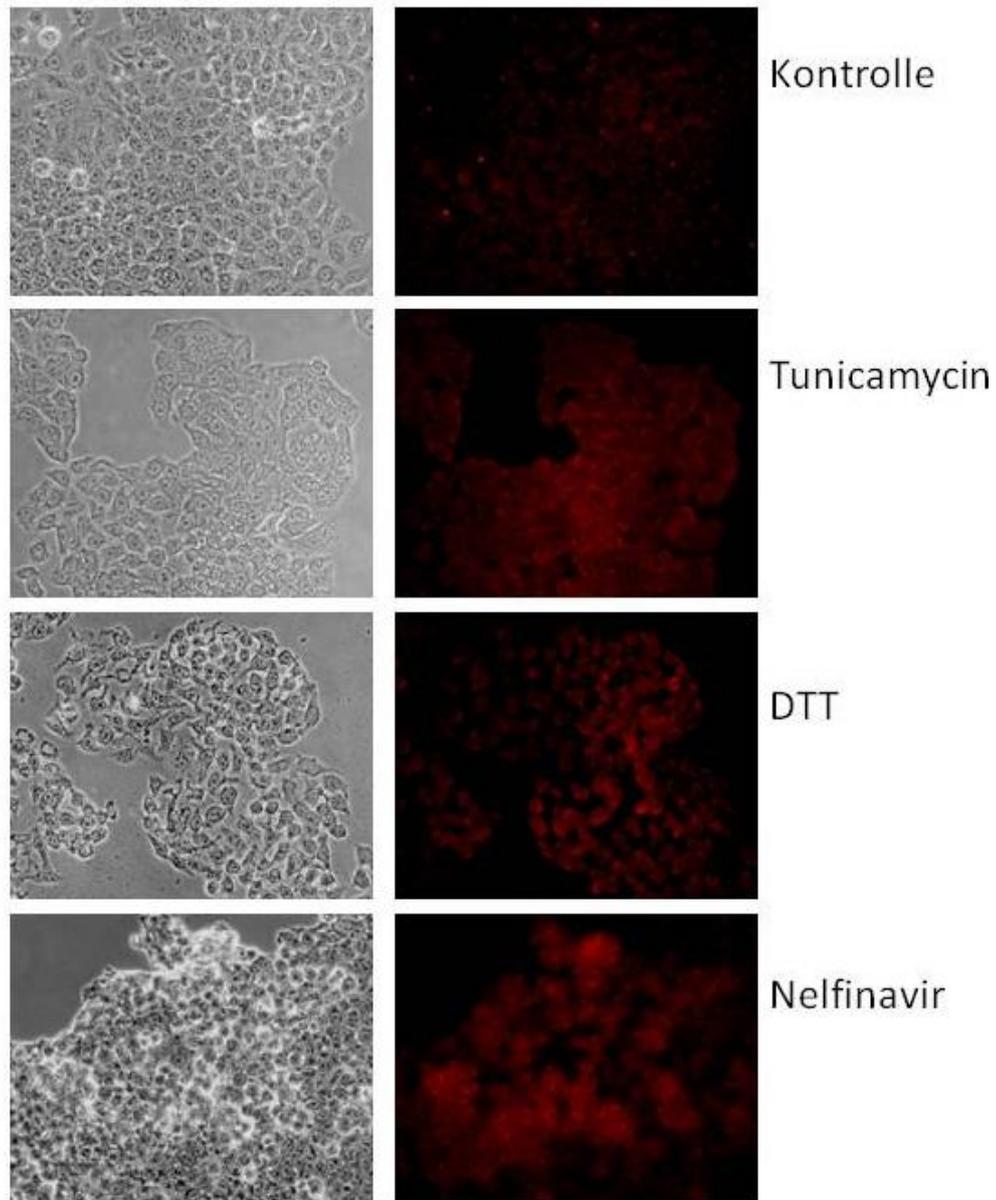


Abbildung 25: Immunfluoreszenzmikroskopie. MCF7-Zellen mit Tunicamycin, DTT und Nelfinavir.

Die in Abbildung 25 mit Tunicamycin, DTT und Nelfinavir behandelten Zellen der Zelllinien MCF7 zeigen eine erhöhte Fluoreszenz (also eine erhöhte Inhibin beta E Produktion) im Vergleich zur Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Inhibin beta E: ein neuer ER-Stress Marker

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Induktion der Inhibin beta E Untereinheit durch Nelfinavir nachgewiesen. In Vorarbeiten konnte die Inhibin beta E Induktion durch weitere pharmakologische Substanzen nachgewiesen werden (Sawada *et al.*, 2005b; Atienzar *et al.*, 2007b), wurde jedoch nicht als spezifisch ER-Stress-gebunden gezeigt bzw. analysiert.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse eines durch Sawada et al. durchgeführten toxikogenomischen Microarrays der Zelllinie Hep G2 (Sawada *et al.*, 2005a).

Compound	Phospholipidotic Pathology Scores	Fold Change Values of Candidate Phospholipidosis Markers																
		ASAH1	MGC4171	LSS	NR0B2	PHYH	FABP1	INHBE	P8	HPN	SERPINA3	ASNS	C10orf10	FLJ10055	FRCP1	API51	SLC2A3	TAGLN
→ amitriptyline	+++	3.10	2.22	1.79	1.64	1.53	2.39	4.19	2.82	2.20	3.01	1.84	5.08	2.11	1.80	0.88	0.22	0.23
chlorethylazine	+++	3.23	2.43	2.98	2.46	0.67	2.61	1.68	1.85	2.97	2.23	1.41	3.24	2.47	2.96	0.74	0.20	0.30
→ fluoxetine	+++	6.55	1.34	3.51	2.70	1.37	2.86	3.61	2.40	2.39	1.73	1.68	3.08	1.93	2.15	0.39	0.09	0.20
amiodarone	++	1.69	1.32	1.82	1.35	0.93	2.01	1.92	1.88	2.15	1.17	1.16	1.12	1.56	1.07	0.64	0.35	0.56
AY-9944	++	4.71	1.63	4.78	2.71	0.73	3.16	0.89	1.22	2.68	1.97	1.05	3.32	1.68	1.45	0.63	0.22	0.21
chlorpromazine	++	1.29	1.74	1.99	1.20	1.69	2.56	2.72	2.51	1.70	1.94	1.39	2.95	1.90	1.70	1.19	0.43	0.65
imipramine	++	4.52	1.81	2.69	3.41	1.37	2.43	1.87	2.00	2.32	2.12	1.57	3.36	2.11	1.80	0.56	0.15	0.15
perhexiline	++	3.12	1.93	3.10	2.09	0.60	2.49	1.17	1.42	2.22	2.50	1.46	2.55	1.98	3.42	0.65	0.22	0.26
tamoxifen	++	4.50	1.60	3.01	2.56	0.52	1.96	0.81	1.21	2.19	2.12	1.36	2.02	1.85	1.53	0.66	0.24	0.27
→ clozapine	++	2.75	1.88	2.69	1.97	0.87	3.89	5.25	3.39	2.35	1.96	2.45	5.15	3.34	1.92	0.71	0.24	0.24
→ sertraline	++	3.08	1.94	3.91	1.79	2.62	4.18	5.19	3.88	3.07	2.69	2.56	4.44	2.38	3.49	1.01	0.14	0.37
clomipramine	+	0.82	1.41	1.52	0.98	1.63	2.36	2.75	2.63	2.39	2.03	1.25	2.08	3.83	1.46	0.61	0.63	0.78
→ thioridazine	+	1.36	1.32	2.03	0.77	1.64	5.03	3.48	3.14	2.85	2.46	0.91	2.02	5.79	1.57	0.63	0.38	0.46
zimeclidine	+	2.91	1.12	1.05	1.33	1.14	1.41	1.77	1.52	1.74	1.95	1.58	2.67	2.24	1.71	1.05	0.70	0.59
→ ketoconazole	+	1.47	1.53	4.33	2.36	1.45	5.36	3.09	2.59	2.71	2.37	3.40	2.29	2.24	1.95	1.04	0.48	0.71
loratadine	+	1.23	1.57	1.54	1.63	1.20	1.58	2.21	1.81	1.52	1.83	2.23	0.79	1.42	1.12	1.11	0.46	0.44
→ pentamidine	+	0.93	0.73	0.52	1.83	0.94	0.13	10.7	4.89	2.50	2.12	7.72	2.88	1.82	2.49	0.93	0.50	0.68
acetaminophen	-	1.18	0.75	0.91	0.69	0.55	1.11	1.19	0.91	1.10	0.99	1.14	0.94	1.13	1.02	0.90	1.50	0.93
clarithromycin	-	1.55	1.18	0.65	0.78	0.59	0.91	1.51	1.10	0.96	1.39	1.02	0.93	1.48	1.00	0.79	0.86	0.86
disopyramide	-	1.85	1.21	1.14	0.63	1.04	1.01	1.18	1.39	1.12	0.99	0.83	0.90	0.94	0.98	1.08	1.03	0.99
erythromycin	-	0.90	0.86	0.87	0.90	0.77	0.71	0.86	0.84	0.87	0.85	1.10	0.71	0.78	0.92	1.03	0.73	0.85
flecainide	-	2.42	1.57	1.22	1.02	1.04	1.50	2.25	1.82	1.26	1.60	2.54	1.73	2.10	1.65	1.13	0.46	0.86
haloperidol	-	0.77	1.24	1.52	1.49	0.92	1.50	1.01	1.50	1.43	1.31	1.25	1.38	1.32	0.93	0.95	0.44	0.52
levofloxacin	-	1.10	0.79	0.75	0.79	0.46	0.88	0.99	0.80	0.83	0.92	0.80	0.83	0.70	0.83	0.80	1.07	0.90
ofloxacin	-	1.17	0.77	0.78	0.81	0.75	0.73	0.79	0.74	0.72	0.82	0.67	0.79	0.86	0.68	0.79	0.94	0.74
procainamide	-	0.86	1.08	0.90	0.74	0.67	1.00	0.89	0.91	1.08	0.96	0.89	0.98	1.78	0.73	0.87	0.88	0.85
quinidine	-	1.43	1.20	1.30	1.03	0.77	1.38	1.73	1.20	1.21	1.22	2.01	1.06	1.27	1.26	0.96	0.37	0.63
sotalol	-	1.39	0.72	0.88	0.63	0.54	0.98	1.12	0.84	0.79	0.78	0.67	0.80	0.84	0.85	0.78	1.53	0.80
sulfamethoxazole	-	1.26	0.78	0.82	0.82	0.52	0.83	0.95	0.87	0.89	0.98	0.95	0.70	0.84	0.87	0.92	1.11	0.99
sumatriptan	-	1.35	0.99	1.23	0.63	0.84	1.01	1.12	1.05	1.16	0.95	0.97	1.05	1.34	1.26	1.22	0.99	1.06

Abbildung 26: Ergebnisse des Microarrays der Arbeitsgruppe Sawada et al. (Sawada *et al.*, 2005a). Mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press (copyright © 2005 Oxford University Press). Die für die Arbeit relevanten Daten zu Inhibin beta E wurden zur besseren Übersicht markiert.

Im Microarray dieser Arbeitsgruppe wurden Gene identifiziert, welche bei der Entstehung der medikamentös induzierten Phospholipidose von Bedeutung sind. Unter den Kandidatengenen befand sich auch Inhibin beta E. Die Substanzen Amitriptylin,

Fluoxetin, Clozapin, Sertalin, Thioridazin, Ketoconazol und Pentamidine führen zu einer signifikanten Inhibin beta E Hochregulation (in Abbildung 26 rot markiert). Im Gegensatz dazu, scheinen Substanzen wie Erythromycin, Tamoxifen und Procainamid keinen Effekt auf die Inhibin beta E Expression zu haben.

Im Jahr 2007 untersuchte Atienzar et al. erneut mit Hilfe der Genexpressionsanalyse potentielle Marker für die Auslösung von Phospholipidose bei Hep G2-Zellen (Atienzar *et al.*, 2007b). Unter den Markern befand sich ebenfalls Inhibin beta E. Die Untersuchungen bestätigten die Befunde von Sawada et al. und wiesen zusätzlich Amiodaron, Clorpromazin, Perhexidin und Zimelidin als INHBE-hochregulierende Substanzen auf. Im Gegensatz zu den Befunden von Sawada et al., zeigt die Microarrayanalyse von Atienzar et al. dennoch eine relevante INHBE Hochregulation durch Tamoxifen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die pharmakologische Hochregulation von Inhibin beta E durch Nelfinavir nachgewiesen werden. Es konnte zusätzlich erstmals gezeigt werden, dass die Nelfinavir-induzierte INHBE Hochregulation durch ER-Stress ausgelöst wird. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe nach Abschluss der vorliegenden Arbeit konnten ATF4 als potenziellen Regulator der Inhibin beta E Expression aufweisen. Inhibin beta E wurde somit als ein neuer ER-Stress Marker in gynäkologischen Krebszelllinien identifiziert.

Die oben genannten und in Vorarbeiten getesteten Substanzen werden in Verbindung mit der Phospholipidose und INHBE-Hochregulation gebracht. Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass die INHBE-Hochregulation ER-Stressbedingt ist. Ein interessanter Ansatz wäre, diese Substanzen auch auf die Auslösung von ER-Stress zu testen. So könnte man feststellen, ob sie ebenfalls ER-Stress-Auslöser sind und dadurch zu einer INHBE-Hochregulation führen. Dieses würde zudem auch einige der Nebenwirkungen dieser Medikamente verständlich machen. Die Wechselwirkungen zwischen Phospholipidosen bzw. diese auslösende Medikamente wären auf jeden Fall weitere Untersuchungen wert.

5.2 Nelfinavir und die Auslösung von ER-Stress

Schon in Vorarbeiten wurden zelluläre Reaktionen von diversen Tumorzelllinien in Verbindung mit Nelfinavir untersucht (Pore *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Pyrko *et al.*, 2007; Gills *et al.*, 2007; Gills *et al.*, 2008). Nelfinavir induzierte in Voruntersuchungen eine Wachstumshemmung in Melanomzellen (Jiang *et al.*, 2007), sowie eine Hemmung der Neoangiogenese (Pore *et al.*, 2006) und des Zellwachstums in malignen ZNS Tumoren, wie dem Glioblastom (Pyrko *et al.*, 2007).

Gills *et al.* untersuchte 2007 die Wirkungen von HIV-Protease-Inhibitoren (darunter auch Nelfinavir) auf NSCLC-Zellen (non-small cell lung carcinoma-Zellen) und auf allen Zelllinien der NCI-60 (National Cancer Institute - 60) Zelllinien-Sammlung (ca. 60 Zelllinien von Lungen-, Colon-, Mamma-, Nieren-, Prostata-, ZNS- und ovariellen Gewebe, sowie von Leukämie- und Melanomzellen) *in vitro* und in weiteren Experimenten mit Hilfe von Xenografts auch *in vivo* (Gills *et al.*, 2007; Gills *et al.*, 2008). Drei der getesteten Proteaseinhibitoren, darunter auch Nelfinavir, führten zum Zelltod und zwar sowohl durch Caspase-Induktion als auch mittels ER-Stress-Induktion und Autophagie. Gills *et al.* demonstrierte somit die antikanzerogene *in vitro* und *in vivo* Wirkung von Nelfinavir. Aufgrund seiner Ergebnisse schlägt er die Substanz als potentes Adjuvanz in der Chemotherapie vor.

Die antikanzerogene Potenz von Nelfinavir war auch Forschungsobjekt der Gruppe von Yang *et al.*, welche ein Jahr zuvor über die Blockade des Akt-Signalweges durch Nelfinavir publizierte (Yang *et al.*, 2006). Außerdem wurde in derselben Publikation auf die Rolle von Nelfinavir in der Chemosensitivierung von malignen Zellen (Docetaxel-Sensitivierung) hingewiesen.

Die antitumorale Wirkung von Nelfinavir wurde parallel von der Forschungsgruppe der Frauenklinik Maistraße unter besonderer Berücksichtigung gynäkologischer Tumoren untersucht. In diversen ovariellen Krebszelllinien wurden die chemosensitivierenden Eigenschaften von Nelfinavir bei Anwendung in der Therapie mit TRAIL-Rezeptor-Antikörpern (TNF-related apoptosis-inducing ligand-Rezeptor-Antikörpern) gezeigt (Bruning *et al.*, 2008). Nelfinavir hat zudem diverse Effekte auf die Regulation des ER-Stresses und der Apoptoseinduktion, wie sich bei weiteren *in vitro* Experimenten bei ovariellen Krebszelllinien zeigte (Bruning *et al.*, 2009a). Die Chemosensitivierung wurde auch in Zusammenhang mit Brustkrebszelllinien (MCF7, T47D, MDA-MB-453, MDA-MB-435) und dem Chemotherapeutikum Tamoxifen aufgegriffen. Die zytotoxische Nelfinavir-Wirkung wird somit durch Tamoxifen unterstützt und führt zu einer erhöhten Zellsterberate (Bruning *et al.*, 2010a).

Desweiteren wurde der Effekt von Nelfinavir und insbesondere die ER-Stress-Induktion bei malignen ZNS-Zellen von Tian *et al.* untersucht (Tian *et al.*, 2011). Nel-

finavir löst diesen Untersuchungen nach die Apoptose und den Zellzyklusarrest bei Glioblastoma multiforma Zellen aus. Der dahinter liegende Mechanismus ist eine CHOP (C/EBP homologous protein)-abhängige DR5 (death receptor 5)-Modulation durch Nelfinavir.

Aus den zitierten Publikationen geht hervor, dass Nelfinavir zellbiologisch insbesondere in Bezug auf die ER-Stress-Auslösung gut untersucht ist. Die Effekte von Nelfinavir auf molekularbiologischer Ebene sind dennoch nur unzureichend geklärt.

Durch die Microarrayanalyse konnten wir feststellen, dass viele ER-Stress-relevante Gene durch Nelfinavir hochreguliert wurden. Dies bestätigte die Befunde früherer Studien (Pyrko *et al.*, 2007; Gills *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Bruning *et al.*, 2008; Brüning *et al.*, 2010), welche die Wichtigkeit des Proteaseinhibitors in der Entstehung von ER-Stress hervorhoben. Durch diese Arbeit konnte diese Erkenntnis in einer epithelialen Krebszelllinie, der Brustkrebszelllinie MCF7, molekularbiologisch bestätigt werden.

Der Proteaseinhibitor Nelfinavir führt, unserer Microarray Analyse nach, nachweislich zur Erhöhung der transkriptionellen Rate ER-Stress-relevanter Gene wie DDIT3/4, ATF3, GADD4A, ERN1, HERPUD1 und XBP 1 (Abkürzungen und Funktionen der wichtigsten Gene s. Abkürzungsverzeichnis und Tabelle 7, S. 90). Außer dieser Bestätigung der Rolle von Nelfinavir im ER-Stress, stellten wir auch eine relevante (13,9fache) Hochregulation der Expression der Inhibin beta E Einheit fest. Diese „Nelfinavir induzierte INHBE-Hochregulation“ und die Erforschung des Mechanismus hinter diesem Phänomen waren Schwerpunkt dieser Arbeit.

5.3 Nelfinavir als chemotherapeutisches Adjuvanz in klinischen Studien

Was den Einsatz von Nelfinavir in der Therapie von Malignomen angeht, bestehen schon erste klinische Studien, die seinen Nutzen als chemotherapeutisches Adjuvanz belegen. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen zeigte die Kombination „Nelfinavir und Radiochemotherapie“¹ gute Ergebnisse bezüglich der Toxizität und der Tumorregression (Brunner *et al.*, 2008). Die Kohorte war in dieser Studie dennoch sehr klein (12 Patienten). Dies macht es schwierig allgemeine Empfehlungen für den Einsatz von Nelfinavir in Chemotherapie-Regimen zu machen.

Im Jahr 2009 wurde bei HIV-positiven Patienten, welche bezüglich des Auftretens von Malignitäten überwacht wurden², der antitumoröse Effekt von Nelfinavir überprüft (Crum-Cianflone *et al.*, 2009). Patienten mit Nelfinavireinnahme im Rahmen ihrer antiretroviralen Medikation wurden bezüglich des Risikos für Malignitäten mit Patienten ohne Nelfinavir-Schemata verglichen. Die Studie stellte keinen signifikanten protektiven Effekt von Nelfinavir bei der Entstehung von Malignomen fest. Dies ist jedoch nicht überraschend. Nelfinavir wurde hier eher in einer präventiven und nicht in seiner radiochemosensitivierenden/therapeutischen Effektivität untersucht. Die Prüfung der antitumorösen Eigenschaften erfolgte weiterhin bei HIV-positiven Tumorkranken und nicht bei infektiologisch Gesunden. Das ist wichtig, denn bei HIV-positiven-Patienten würde Nelfinavir nicht nur in seiner vermuteten antitumorösen, sondern auch in seiner konventionellen-retroviralen Eigenschaft eingesetzt werden.

Im Gegensatz dazu, unterstreicht ein Fallbericht aus dem Jahr 2009 den stark radiosensitivierenden Effekt von Nelfinavir (Chapman *et al.*, 2009). Es wird von einem HIV-positiven Patienten berichtet, welcher an Lungenkarzinom litt und parallel mit Nelfinavir antiretroviral behandelt wurde. Der radiosensitivierende Effekt von Nelfinavir führte zu einer rapiden Tumorregression unter Bestrahlung. Die Gefäßarrosion im Tumorbett verursachte eine nicht zu stillende, fatale, Hämoptyse.

¹ 2 x 1,250 mg Nelfinavir p.o. 3 d vor und durchgehend während der Radiochemotherapie; Strahlendosis 50.4-59.4 Gy; Chemotherapie mit Gemcitabin (200 mg/m² und 300 mg/m²) und Cisplatin (30 mg/m²) an Tag 1, 8, 22, and 29

² 108 Krebserkrankungen in der Kohorte während eines Follow-ups von 13,421 Personenjahren

Nelfinavir wurde zuletzt in einer Kohorte von Patienten mit NSC-(non-small cell) Lungenkarzinom im Stadium IIIA/IIIB bezüglich der Radiochemosensitivierung untersucht (Rengan *et al.*, 2012). Die Untersuchung zeigte gute Ergebnisse bezüglich der Tumorregression und eine akzeptable Therapietoxizität. Auch hier war die Kohorte relativ klein (16 Patienten), so dass keine allgemeinen Aussagen über den Einsatz von Nelfinavir in der Therapie gemacht werden können. Nelfinavir radiosensitiviert auch Adenomzellen der Hypophyse und führt bei Bestrahlung zu deren verstärkten Apoptose in vivo (Zeng *et al.*, 2011).

5.4 Stress im endoplasmatischen Retikulum

5.4.1 Aktivierung von Stress im endoplasmatischen Retikulum in physiologischen Prozessen

Die Auslösung von ER-Stress ist Teil vieler physiologischer Prozesse. Eine gute Übersicht für die physiologischen Vorgänge, in denen ER-Stress und der UPR beteiligt sind, gibt Abbildung 27.

Process	UPR marker
Ageing	Chaperone induction defective, CHOP \uparrow , caspase-12 \uparrow
B cell differentiation into plasma cells	XBP-1 ^s \uparrow , BiP \uparrow , GRP94 \uparrow
Liver development	XBP-1
Sleep deprivation	BiP, PERK PO_4^{3-} \uparrow , eIF2 α PO_4^{3-} \uparrow

Abbildung 27: Physiologischer ER-Stress in verschiedenen biologischen Vorgängen (Abbildung aus Schroder and Kaufman, 2006). Mit freundlicher Genehmigung der Bentham Science Publishers (copyright © 2006 Bentham Science Publishers).

Ein physiologischer Prozess, in dem ER-Stress und UPR (Unfolded Protein Response) involviert sind, ist das Altern (Schroder and Kaufman, 2006). Altern wird mit der verminderten Expression und Funktion von molekularen Chaperonen in Verbindung gebracht, was zu einer Dysfunktion der Proteinfaltung führt (Brown and Naidoo, 2012).

ER-Stress spielt auch in der Differenzierung von B-Lymphozyten in antikörperbildende Plasmazellen eine weitere interessante Rolle (Ma *et al.*, 2010). Als Schlüsselregulator der Produktion von IgM wurde im Jahr 2005 das X-box Binding protein-1, ein ER-Stress-relevantes Protein identifiziert (Tirosh *et al.*, 2005). Welche die genauen ER-Stress-Signalwege sind, welche die Antikörperproduktion aufrechterhalten – ob also der PERK, ATF6 oder IRE1 Signalweg ausschlaggebend ist – wird kontrovers diskutiert (Gass *et al.*, 2008; Aragon *et al.*, 2012).

Die Rolle von ER-Stress in der Bekämpfung von viralen Infektionen ist ebenfalls gut erforscht (He, 2006; Yu *et al.*, 2006; Hassan *et al.*, 2012; Leung *et al.*, 2012). Es konnte nachgewiesen werden, dass manche Viren durch Suppression des UPR in infizierten Zellen besser überleben können (Zambrano *et al.*, 2011; Burnett *et al.*, 2012). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der ER-Stress-Auslösung in der effektiven Bekämpfung von viralen Infektionen. Die Viruselimination gelingt hauptsächlich durch Apoptoseinduktion in infizierten Zellen. Viren können somit den Zellapparat der Wirtszelle nicht mehr für ihre Vermehrung einsetzen. Der ER-Stress wird in vielen Fällen durch die Interferon-Produktion verstärkt und prolongiert (Numajiri Haruki *et*

al., 2011). Auch bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen konnte z.B. bei der Elimination von *Listeria monocytogenes* die Relevanz der ER-Stress Antwort gezeigt werden (Pillich *et al.*, 2012).

Die ER-Stress-Antwort moduliert auch die Differenzierung weiterer Zellen außer der B-Lymphozyten, sowohl wie die De-differenzierung verschiedener Zellen. In der embryonalen Entwicklung wurde z.B. anhand von Tiermodellen die Rolle des Transkriptionsfaktors IRE1 in der Mesoderm-Formation beschrieben (Yuan *et al.*, 2008). Auch bei der Umwandlung von epithelialen in mesenchymale Zellen (epithelial-to-mesenchymal transition) scheint ER-Stress beizutragen. Diese ER-Stress induzierte De-differenzierung von Zellen wurde bei Thyreozyten (Ulianich *et al.*, 2008) und Alveolarzellen (Zhong *et al.*, 2011) gut untersucht.

5.4.2 ER-Stress: relevante Erkrankungen und andere pathologische Prozesse

5.4.2.1 ER-Stress relevante Erkrankungen

Eine Fehlkoordination der ER-Stress-Signalwege ist in verschiedenen Erkrankungen und pathologischen Prozessen zu finden. Es gibt es eine große Gruppe von Erkrankungen, deren Pathogenese eng mit der Akkumulation falsch gefalteter Proteine bzw. dem Stress im endoplasmatischen Retikulum verbunden ist. Zu der Gruppe der sogenannten „ER-Stress-related diseases“, also ER-Stress-verbundenen Erkrankungen, gehören viele neurologische Krankheitsbilder. Zu den bekanntesten in diesem Zusammenhang erforschten Vertretern gehören:

- neurodegenerative Erkrankungen u.a.: die Parkinson-Erkrankung (Morbus Parkinson) (Colla *et al.*, 2012; Cali *et al.*, 2011), die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (eine Erkrankung aus den Formenkreis der Prionenerkrankungen) (Torres *et al.*, 2010; Hetz *et al.*, 2003) und die Alzheimer-Erkrankung (Morbus Alzheimer) (Unterberger *et al.*, 2006)
- neuromuskuläre Erkrankungen u.a.: die Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS) (Soo *et al.*, 2012) und das Kennedy Syndrom (Thomas *et al.*, 2005).

Auch in der Pathogenese vieler internistischer Krankheitsbilder wie Diabetes mellitus Typ I (Zhong *et al.*, 2012) und II (Leem and Koh, 2012), Atherosklerose (Gao *et al.*, 2012b; Beriault and Werstuck, 2012) und Herzinsuffizienz (Park *et al.*, 2012; Takada *et al.*, 2012) ist der Zusammenhang der Pathogenese mit der ER-Stress-Entstehung gut untersucht.

Die Entstehung von ER-Stress ist auch in der Pathophysiologie der inflammatorischen Reaktion (Hasnain *et al.*, 2012), der Autoimmunität und der Hypoxie (nach Minderperfusion und Reperfusion im normalen Gewebe, aber auch in hypoxischen Tumorarealen) involviert. Biologische Grundlage vieler der genannten Erkrankungen

wie z.B. Diabetes mellitus Typ I (Zhong *et al.*, 2012) sind u.a. ER-Stress ausgelöste Phänomene, wie die autoimmunologische Reaktion.

Die Rolle von ER-Stress in der Kanzerogenese ist ebenfalls von großer Bedeutung und wird aus diesem Grund ausführlicher in Abschnitt 5.4.2.2 besprochen.

5.4.2.2 Kanzerogenese und ER-Stress

Das Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf den Zusammenhang der Entstehung des ER-Stresses mit der Kanzerogenese gerichtet. Die Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass die Hochregulation von Inhibin beta E mit der Entstehung von ER-Stress bei gynäkologischen Krebszelllinien in Zusammenhang steht. Weitere Untersuchungen erklären auch den Mechanismus der Hochregulation, wie in Abschnitt 5.5.2 (S. 84) aufgeführt.

Bevor die Rolle von Inhibin beta E in der ER-Stress Entstehung besprochen wird, ist es wichtig zu untersuchen, welche Rolle der ER-Stress in Malignomen spielt. Es ist also notwendig zu betrachten, welche Bedeutung der ER-Stress in der Entstehung von Malignomen (Kanzerogenese) und im biologischen Verhalten dieser Tumore (Wachstumsrate, Aggressivität, Metastasierung) hat.

Die Entstehung von ER-Stress und der Zusammenhang mit Krebs wurden insbesondere bei Pathologien und Malignitäten der Leber gut erforscht. Dies ist nicht wunderbarlich, da die Hepatozyten durch die verschiedensten metabolischen Vorgänge in ihnen viel ER-Stress ausgesetzt sind. Der exzessive ER-Stress in Hepatozyten führt zum zirrhotischen Umbau der Hepatozyten und zur Apoptoseinduktion. Der ER-Stress spielt sowohl bei der Entstehung der nichtalkoholischen (Pagliassotti, 2012) als auch bei der Entwicklung der alkoholischen (Longato *et al.*, 2012) Leberzirrhose eine wichtige Rolle. Der diskutierte Mechanismus dahinter ist die Veränderung der Lipidhomöostase mittels ER-Stress abhängigen Regulationsvorgängen (Malhi and Kaufman, 2011).

Auch in der Entstehung von hepatischen Malignomen ist die Rolle von ER-Stress nicht zu vernachlässigen. Die Vorgänge bei Induktion des Zelltodes bei hepatozellulären Karzinomlinien werden durch die Kommunikation der PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt)- und MEK/ERK (Mitogene-aktivierte Proteinkinase/extrazelluläre Signal-regulierte Kinase)-Signalwege bei den Zelllinien initiiert (Dai *et al.*, 2009). Es kann somit vermutet werden, dass ein enger Zusammenhang der Dysregulation des ER-Stresses und der Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen besteht.

Die Relevanz von ER-Stress in der Kanzerogenese ist auch bei gynäkologischen Malignitäten gut belegt. Beim squamösen Zervixkarzinom hat die Arbeitsgruppe Chu et

al. im Jahr 2012 die Überexpression von CHOP - einem ER-Stress-relevanten Protein - gezeigt. Die Assoziation von CHOP mit p53 und high risk HPV und seine somit potentielle Rolle in der Kanzerogenese wurde von derselben Gruppe untersucht (Chu *et al.*, 2012). Die Expression vom endoplasmatischen Retikulum Protein 29, einem weiteren Protein im ER, ohne direkte Relevanz zum ER-Stress, scheint auch eine regulatorische Rolle beim Wachstum von Mammakarzinomzellen zu haben (Bambang *et al.*, 2009).

5.4.2.3 Malignitätserhöhung bei Tumoren in Verbindung mit ER-Stress und Hypoxie

ER-Stress entsteht häufig auch als Antwort auf Hypoxie (Koumenis *et al.*, 2002). Bei soliden Tumoren gehen das schnelle Wachstum der malignen Zellen und die Entwicklung von qualitativ minderwertigen Gefäßen zur Tumorversorgung, oft mit einer Minderperfusion des Tumorzentrums einher. Somit ist die Entstehung von ER-Stress in hypoxischen Tumorebenen und insbesondere die Entwicklung einer Hypoxie-Resistenz (z.B. durch Mitwirkung von ATF4, Ye and Koumenis, 2009) ein interessanter Kofaktor der Malignität und Aggressivität verschiedener Tumore.

Um das Überleben von Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu ermöglichen, wechseln Zellen zur sogenannten integrierten ER-Stress-Antwort, um den ER-Stress zu regulieren (Liu *et al.*, 2008). Die erhöhte Aktivierung von Überlebensmechanismen in Tumorzellen führt zur gesteigerten Malignität dieser Zellen (Bi *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass eine Überfunktion des PERK-eIF2alpha-ATF4-Signalweges zur Hypoxietoleranz und erhöhten Aggressivität von Tumorzellen führt (Fels and Koumenis, 2006).

Eine in CLL (chronisch lymphatische Leukämie)-Lymphozyten durchgeführte Studie machte auch bekannt, dass TLC1 (Telomerase Component 1), ein Bestandteil des Telomerase-Ribonukleoprotein-Komplexes, ER-Stress auslösend wirkt (Kriss *et al.*, 2012). Somit besteht auch bei nicht soliden Tumoren eine - Hypoxie-unabhängige - Verbindung zwischen ER-Stress (IRE-1/XBP-1-Signalweg) und der erhöhten Malignität der entarteten Zellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Inhibin beta E als ein neuer Spieler in der Koordination von ER-Stress zu betrachten ist. In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die ATF4-Überproduktion mit einer Steigerung der Inhibin beta E Expression in Zusammenhang steht. Wie schon oben erwähnt, spielt ATF4 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Hypoxietoleranz und somit in der Malignität von Tumoren (Fels and Koumenis, 2006). So entsteht die Frage, ob Inhibin beta E eine Rolle in der Entstehung von Hypoxietoleranz im malignen Gewebe spielt.

5.5 Die Inhibin beta E Regulation unter ER-Stress

Um die möglichen Funktionen von Inhibin beta E bei Auslösung von ER-Stress ausführlicher zu behandeln, ist zu Beginn die Betrachtung des involvierten Mechanismus notwendig. Die Rolle von Inhibinen/Aktivinen in Malignitäten, aber auch bei weiteren pathologischen Vorgängen, ist hierbei auch von Bedeutung.

5.5.1 Die Überexpression der INHBE-Untereinheit unter ER-Stress

Unter den am stärksten regulierten Gentranskripten (13,9fache Hochregulation) der Zelllinie MCF7 unter Nelfinavir fand sich Inhibin beta E (s. Tabelle 4, S. 44). Der „Nelfinavir-Effekt“ konnte auch auf weitere Zelllinien, wie die transformierte Zelllinie HEK293 und die Krebszelllinie HeLa durch die quantitative PCR bestätigt werden (s. Abschnitt 4.2.1, S. 49).

Durch weitere Experimente konnte festgestellt werden, dass die Erhöhung der Inhibin beta E Expression mit der Entstehung und Stärke des ER-Stresses in der Zelle korreliert. Die Erhöhung der transkriptionellen Rate der Inhibin beta E Untereinheit durch Nelfinavir in gynäkologischen Krebszelllinien ist eine erstmalige Erkenntnis dieser Arbeit. Die Hochregulation konnte bei den restlichen bekannten Inhibin/Aktivin-Untereinheiten nicht bestätigt werden (s. Abbildung 28).

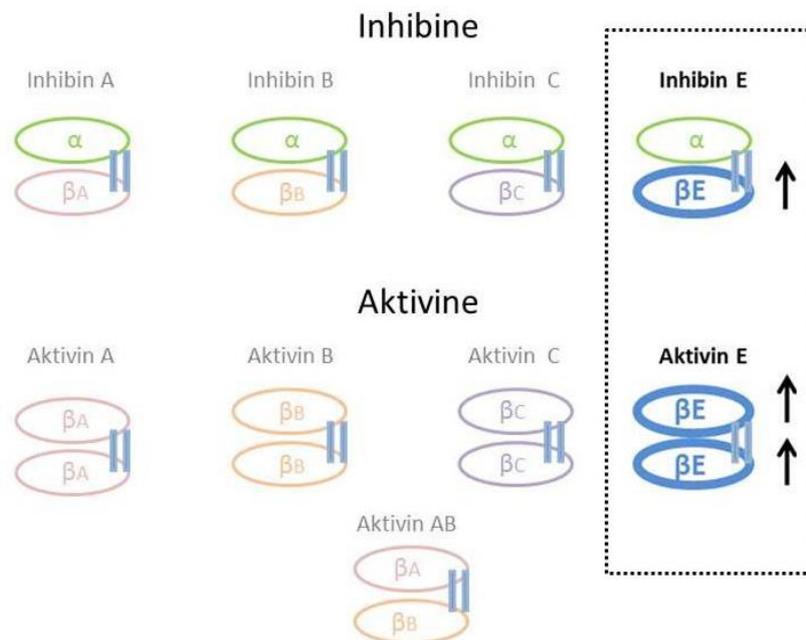


Abbildung 28: Inhibine/Aktivine und ER-Stress. Aus der Gesamtheit der Inhibin-/Aktivin-Untereinheiten scheint nur die Inhibin beta E Untereinheit durch ER-Stress hochreguliert zu werden.

Es handelt sich hierbei um einen Effekt, der für die Inhibin beta E-Untereinheit spezifisch zu sein scheint. Eine Vorarbeit aus dem Jahr 2010 bestätigte diesen Effekt bei B-Lymphozyten, primären Fibroblasten und Keratinozyten (Dombroski *et al.*, 2010). In dieser Vorarbeit (Dombroski *et al.*, 2010) war die erhöhte Expression von Inhibin beta E unter ER-Stress auslösenden Substanzen eher eine überraschende Nebenerkenntnis. Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Regulation der Inhibin beta E-Untereinheit durch ER-Stress auf weitere Zelllinien und unter Anwendung von Nelfinavir bestätigt werden. Die Zellen stammen hier zum größten Teil aus etablierten gynäkologischen Krebszelllinien.

5.5.2 Modelle für die Erklärung der Überexpression der INHBE-Untereinheit unter ER-Stress

Die allgemeinen Mechanismen der ER-Stress-Induktion wurden auf molekularbiologischer Basis schon in der Einleitung erläutert (s. Abschnitt 2.3.1, S. 11-13).

Frühere theoretische Modelle unterstützen die Entstehung eines aktiven Transkriptionsfaktors durch das Spleißen des XBP 1 (Yoshida *et al.*, 2001). Das gespleißte XBP 1 hat die Möglichkeit den UPR zu aktivieren. Da in unseren Versuchen die XBP 1-Regulation sehr eng mit der Erhöhung der Inhibin beta E Expression korreliert, könnte dieser Transkriptionsfaktor eventuell eine Rolle in der Expression der beta E Untereinheit spielen.

In Bezug zu Inhibin beta E könnte der PERK-Signalweg ein wichtiger Regulationsmechanismus sein. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von eIF2a zu p-eIF2a durch PERK zu einer Hochregulation von ATF4 (einem Transkriptionsfaktor der Leuzin Zipper Familie) führt. Die ATF4-Hochregulation löst weiterhin eine Hochregulation von GADD45, ATF3 und CHOP/GADD153 aus.

Durch vorliegende Arbeit konnte die Inhibin beta E Hochregulation durch ER-Stress gezeigt werden. ATF4 ist bekanntlich ein wichtiger Transkriptionsfaktor in den UPR-Signalwegen. So wurde die Vermutung aufgestellt, dass Inhibin beta E durch ATF4 hochreguliert werden könnte. Hiermit wurde also als Mechanismus der INHBE Regulation die „ER-stressbedingte, ATF4 ausgelöste Inhibin beta E Hochregulation“ vorgeschlagen (s. Abbildung 29, S. 85). Die Erkenntnis, dass Inhibin beta E, wie in Abbildung 29 (S. 85) gezeigt, ein neuer, bislang unbekannter Mitspieler bei der ER-Stress Kaskade ist, war entsprechend auch der Schlusspunkt dieser Arbeit.

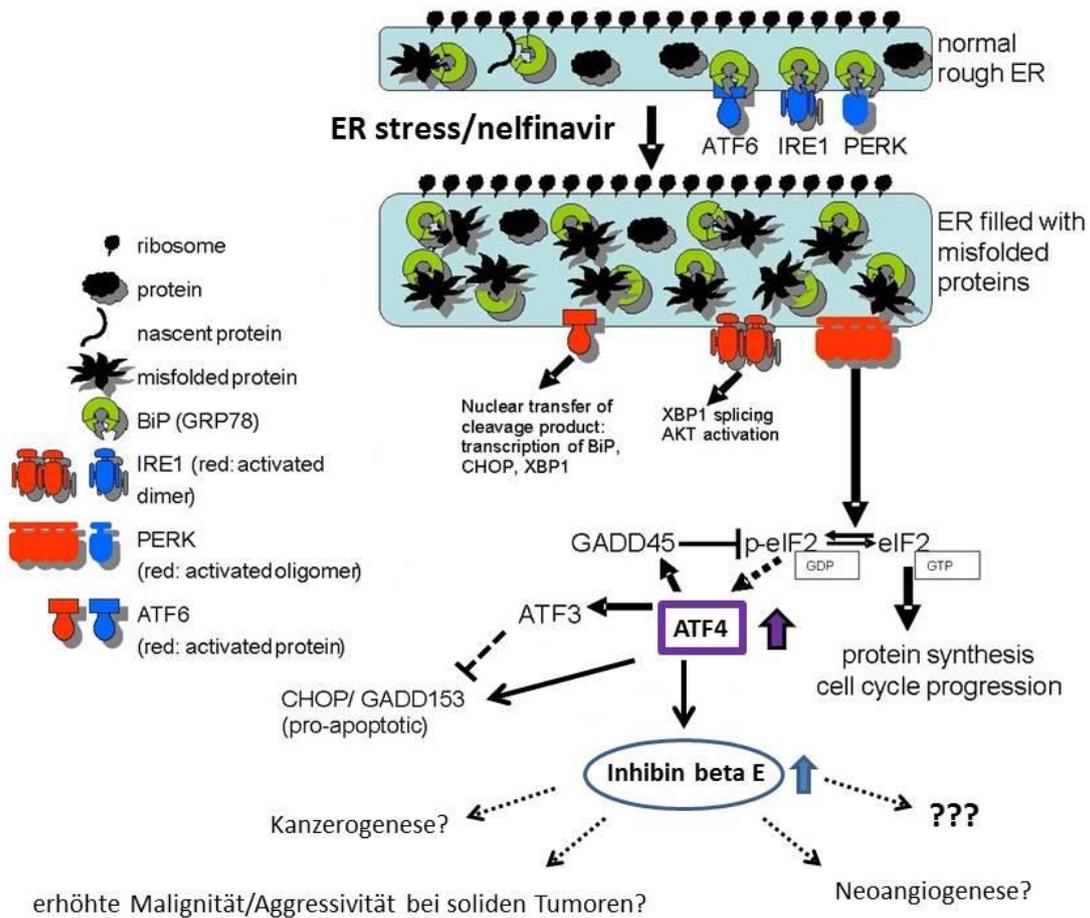


Abbildung 29: ATF4 und die Hochregulation der Inhibin beta E Untereinheit. Graphik aus (Bruning *et al.*, 2009b). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Ansgar Brüning (copyright © 2009 Ansgar Brüning). Die vorliegende Abbildung wurde durch die Einzeichnung von Inhibin beta E in den PERK-Signalweg ergänzt.

Die Hypothese der „ATF4-bedingten Inhibin beta E Hochregulation“ konnte in weiteren Experimenten der Forschungsgruppe der Frauenklinik Maistraße bestätigt werden. In diesen Experimenten wurden Zellen der Krebszelllinie HeLa mit ATF4-tragenden Plasmiden transfiziert. In den ATF4-überproduzierenden Zellen ist eine eindeutige Hochregulation der INHBE-Einheit-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen zu sehen (s. Abbildung 30, S. 86). Der Signalweg mit dem Inhibin beta E verknüpft sein könnte, ist der PERK-Signalweg, über den es zu einer ATF4-Hochregulation kommt. In diesem Sinne könnte INHBE den Zellzyklusarrest mittels dieses Signalweges beeinflussen.

Hela-ATF4-Transfektion

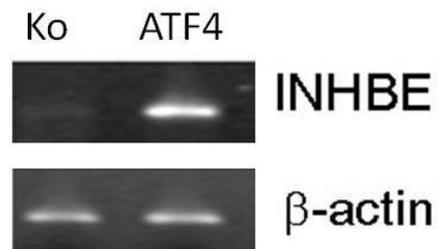


Abbildung 30: Inhibin beta E Expression in ATF4 überexprimierenden (ATF4-transfizierten) Zellen der Zelllinie Hela (Ergebnisse der PCR-Gelelektrophorese). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Ansgar Brüning.

Die Daten zur Vervollständigung von Abbildung 30 wurden von Dr. rer. nat. Ansgar Brüning (Forschungslabor der Frauenklinik Maistraße der Ludwig-Maximilians-Universität) zur Verfügung gestellt.

5.6 Die Inhibin beta E Überexpression

5.6.1 Physiologische Rolle der INHBE-Untereinheit-Überexpression

Sowohl Aktivin E, also ein Homodimer aus zwei Inhibin beta E Untereinheiten (s. Abbildung 28, S. 83), als auch Aktivin C, werden hauptsächlich in Hepatozyten exprimiert (Vejda *et al.*, 2003). Die erhöhte INHBE-Untereinheit-Expression in diesen Zellen könnte mit den physiologischen Prozessen in den Leberzellen (z.B. Entgiftung verschiedener toxischer Stoffe) zusammenhängen, da Hepatozyten metabolisch hochaktive Zellen sind. Sie sind somit reich an endoplasmatischem Retikulum und sind in einem erhöhten Ausmaß ER-Stress-exponiert (Ji and Kaplowitz, 2006).

5.6.2 Pathologien hinter der INHBE-Untereinheit-Überexpression

Aktivine/Inhibine sind Mitglieder der TGF β (tumor growth factor β) Superfamilie (in Vejda *et al.*, 2003, zitiert Kingsley, 1994) der Wachstumsfaktoren. TGF beta Mitglieder wirken bekanntlich wachstumshemmend, weshalb der Verlust bei Karzinomen antiapoptotisch und somit kanzerogen ist (Matise *et al.*, 2012). Eine Hochregulation der TGF beta-Mitglieder wirkt nach ER-Stress dort eventuell auch kurzfristig, bis Bewältigung des Stressimpulses, wachstumshemmend.

TGF β ist bezüglich seiner Funktion in der Kanzerogenese dennoch ein zweischneidiges Schwert. Es wird in vielen Tumoren zunächst runter reguliert und danach wieder hochreguliert und wurde dort auch als tumorfördernder Faktor identifiziert (Hawinkels *et al.*, 2012).

Bezüglich der Inhibin-/Aktivin-Involvierung in der Kanzerogenese ist z.B. bekannt, dass Aktivin A mittels dem Aktivin-verwandten Protein TGF β 1 in Hepatozyten die DNA-Synthese inhibiert und die Apoptose induziert (Tanaka *et al.*, 2004; Kanamaru *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass eine Runterregulation kanzerogene Effekte haben könnte. Hier hat eine frühere Studie zeigen können, dass Aktivin beta E apoptoseinduzierend in hepatozellulären-Karzinom-Zelllinien wirkt und dass eine Runterregulation von Aktivin beta E mit einer gesteigerten Aggressivität der Karzinomzellen korreliert (Vejda *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde unter anderen untersucht, ob ein bestimmtes Aktivin-/Inhibin-Expressionsmuster und eine Korrelation mit der Malignität verschiedener Endometriumkarzinomzelllinien besteht (Abschnitt 4.5, S. 57-59). Es konnte gezeigt werden, dass Endometriumkarzinomzelllinien mit einer niedrigeren Differenzierung (und somit einer höheren Malignität) eine INHBE-Untereinheit-Runterregulation aufweisen. Dies könnte dafür sprechen, dass die Inhibin beta E Untereinheit eine bis jetzt nicht genau beschriebene Rolle in der malignen Transformation von Zellen und deren Aggressivität spielt. Mit den molekularbiologischen Ergebnissen dieser Arbeit

und mit Hilfe von weiterführenden statistischen Untersuchungen konnte dennoch keine Korrelation mit dem Überleben von Patientinnen mit Endometriumkarzinom gezeigt werden (Mylonas *et al.*, 2011).

Die Zugehörigkeit von Inhibin/Aktivin E zur TGF- β Familie ist also bezüglich deren Rolle in der Kanzerogenese besonders interessant. Als Hormone haben Inhibine/Aktivine zusätzlich andere Rezeptoren und Signalwege als die herkömmlichen TGF β Mitglieder. Dies lässt vermuten, dass Inhibine mit der Einschaltung von parakrinen oder apokrinen Effekte in die Vorgänge der Apoptoseinduktion eingreifen.

Inhibine und Aktivine sind durch die unterschiedliche Regulation ihrer Rezeptoren in Malignomen von besonderer Bedeutung in der Kanzerogenese und Tumorprogression. Seit Jahren ist die mögliche Regulation des Zellzyklus durch unterschiedliche Expression von Inhibin/Aktivin-Rezeptoren im Tiermodell bekannt (Hashimoto *et al.*, 1998). Bei Tumoren des Ovars wurde ebenfalls die Expression von Inhibin/Aktivin-Rezeptoren in Bezug zur Kanzerogenese untersucht. Es wird vermutet, dass diese Rezeptoren mit der malignen Entartung von Granulosazellen in Zusammenhang stehen (Fuller *et al.*, 2002). Die Inhibin beta E Untereinheit, welche Fokus dieser Arbeit ist, wurde dennoch bezüglich der Zellzyklusregulation durch die Inhibin/Aktivin-Rezeptoren noch nicht untersucht. Dies wäre insbesondere bei Malignomen der Leber, in der Inhibin beta E vermehrt vorkommt, von besonderem Interesse.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen ER-Stress-Induktion und der Inhibin beta E Expression in Krebszelllinien besteht. Durch die Hochregulation von Inhibin beta E durch ATF4 lässt sich vermuten, dass Inhibin beta E wohl eher wachstumsinhibierend, falls autokrin wirkt. Als ein möglicherweise parakriner Faktor wäre seine Funktion eher das umliegende Gewebe auf den ER-Stress „hinzuweisen“ bzw. „vorbereiten“. Es kommt also zu einem lokalen Wachstumsarrest bis die effektive Stressregulation erreicht wird. Somit könnte Inhibin/Aktivin beta E nicht nur intrazellulär eine Rolle als ER-Stress-Modulator, sondern auch transzellulär eine Rolle als „ER-Stress-vorbereitender-Botenstoff“ bieten.

Die exakte Rolle von Inhibin beta E in der Physiologie der Zelle und in der Kanzerogenese ist bis heute unklar. Durch die nachgewiesene Hochregulation der Inhibin beta E Untereinheit unter ER-Stress, ist diese Frage aktueller denn je. Denn ER-Stress ist bekannter Weise Auslöser für das Einsetzen des Zellzyklusarrestes und der Apoptose und ein wichtiger Teil/Angriffspunkt in der Kanzerogenese.

Bezüglich des Themenkomplexes „ER-Stress, Inhibin beta E Hochregulation und Kanzerogenese“ entstehen viele interessante Fragen:

- Ist die Inhibin beta E Expression - und die damit verbundene ER-Stress-Auslösung in den Krebszellen - ein allgemeines Merkmal der Malignität der Zellen oder eher eine Reaktion auf die pathologischen Vorgänge in der Zelle?
- Ist die damit verbundene ER-Stress-Reaktion ein Versuch die pathologischen Vorgänge effektiv zu kontrollieren bzw. bei Krebszellen die Apoptose zu induzieren?

Weiterführende Fragen sind:

- Hat das Ausmaß von ER-Stress - gemessen an der Inhibin beta E Expression - einen Effekt auf das Überleben von Patientinnen mit gynäkologischen Malignitäten (außer beim Endometriumkarzinom, wo es nicht prognosebestimmend zu sein scheint)?
- Gibt es therapeutische Ansätze, welche sich die Inhibin beta E Expression zunutze machen könnten (insbesondere in Hinsicht darauf, dass die Auslösung von ER-Stress oder Teile der ER-Signalwege als Angriffspunkt für Therapien schon langsam Verwendung finden, Schonthal, 2012; Thomas *et al.*, 2012)?

Weitere Untersuchungen von Inhibin/Aktivin beta E in physiologischen und pathologischen Vorgängen der Zelle sind notwendig, um adäquate Antworten auf die oben genannten offenen Fragen zu finden. Die Vielfältigkeit der Funktionen und die potentiellen Angriffspunkte dieser Hormone werden uns mit Sicherheit in Zukunft stark beschäftigen.

6 Anhang

6.1 Genfunktionstabellen und Tabellen zu untersuchten Zelllinien

Im letzten Abschnitt werden die Gene, die in dieser Arbeit untersucht worden sind und deren Funktion in tabellarischer Form dargestellt. Bei den Tabellen zu den untersuchten Zelllinien werden die Zelllinien, die für die Experimente eingesetzt worden sind vorgestellt.

Ziel dieser Auflistung ist es, einen kurzen Einblick in die Bedeutung vieler gebräuchlicher Abkürzungen für Gene und Zelllinien zu geben. Für die Listen ist kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben, es wurden lediglich nur die wichtigsten Informationen beibehalten um eine präzise und umfassende aber auch nicht unnötig langwierige Darstellung zu gewähren.

6.1.1 Genfunktionen

Tabelle 7: Genfunktionstabelle.

GEN	BEDEUTUNG DER ABKÜRZUNG UND GENFUNKTION
AKNA	AT-hook transcription factor AKNA ist ein Transkriptionsfaktor. Er aktiviert die Expression des CD40-Rezeptors der Lymphozyten und dessen Liganden CD40L/CD154 (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).
Beta actin	Das beta actin Gen kodiert sechs unterschiedliche Aktin Proteine. Aktine sind Proteine, die in Zellmotilität, -struktur und -integrität eine wichtige Rolle spielen. Aktin ist ein grundlegendes Protein des kontraktiven Zellapparats und ein Grundbaustein des Zytoskeletts. Sie werden ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimiert.“ (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex)
DKK1	dickkopf related protein-1 Die Proteine der DKK- Familie inhibieren den WNT- Signalweg und spielen dadurch, unter anderen, eine Rolle in der embryonalen Entwicklung. Bei Patienten mit multiplen Myelom werden erhöhte DKK- Spiegel im Knochenmark oder im peripheren Blut mit osteolytischen Knochenläsionen in Verbindung gebracht (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).

Endothelin 2	Dieses Gen kodiert ein Mitglied der Endothelin-Protein Familie der sekretorischen vasokonstriktiven Peptide. Das Präproprotein wird in eine kurze reife Form prozessiert, welche als Ligand des Endothelin-Rezeptors fungiert. Dieses Genprodukt ist in viele biologische Prozesse wie Ovulation und Blutdrucksteuerung involviert. Endotheline haben auch eine mitogene Wirkung, welche die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren wie PDGF potenziert (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).
FIT	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 Über dieses Gen sind unsere Kenntnisse momentan eingeschränkt. Experimentell ist belegt, dass die Einwirkung von Interferon eine Überexpression dieses Gens induziert (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).
FOS	FBJ osteosarcoma oncogene Die Gene der FOS-Familie kodieren Leuzin-Zipper-Proteine, die mit Proteinen der JUN Familie dimerisieren. Dadurch entsteht der Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 (JUN/FOS). FOS-Proteine sind an der Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und –transformation beteiligt. In manchen Fällen wurde die FOS- Expression mit Apoptose in Verbindung gebracht (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).
HIVEP 1, 2 und 3	human immunodeficiency virus type 1,2 and 3 enhancer binding protein Diese Proteine binden spezifische DNA- Sequenzen, wie z.B. das NF-kappa-B-Motiv (GGGACTTCC). Solche Sequenzen befinden sich in Promotern und Promoterverstärkerregionen von bestimmten Genen und Viren, wie auch beim human immunodeficiency virus (HIV) (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).
TX	thioredoxin interacting protein Das Thioredoxin interagierende Protein kann durch Inhibition der Thioredoxin Aktivität oxidativen Stress auslösen. Es interagiert mit COP5 und hebt die Suppression der CDKN1B Stabilität auf. TX stellt einen transkriptionellen Repressor dar, dessen Überexpression den Zellzyklus in der G0/G1-Phase blockiert. Es ist ebenfalls ein notwendiger Faktor für die Reifung von natürlichen Killerzellen (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex)

XBP 1	<p>x-box-binding protein</p> <p>Das XBP 1 Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, welcher die MHC Klasse II Genexpression durch Bindung an ein Promoterelement (X box) reguliert. Da Genprodukt ist ein bZIP Protein, welches als zellulärer Transkriptionsfaktor identifiziert worden ist. Der Transkriptionsfaktor ist essenziell für das Hepatozytenwachstum, die Plasmazelldifferenzierung, die Immunglobulinsekretion und die „unfolded protein response“ (vgl. Weizmann Institute of Science and Xenex).</p>
--------------	---

Alle Informationen zu den Genen wurden über die Datenbank Gene Cards® (Weizmann Institute of Science and Xenex) gewonnen.

6.1.2 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien.

ART DER ZELLINIE	GEBRÄUCHLICHE ABKÜRZUNG DER ZELLINIE	BESCHREIBUNG
Epithelzellen	Hec	„Hec“ ist ein Akronym für „human endometrial cancer cell line“.
	Hec 1A ATCC® Nummer: HTB-112™	Hec 1A ist eine Untergruppe der Hec-Zelllinien. Sie wurde aus Zellen eines Endometriumkarzinoms im Stadium 1A entwickelt (American Type Culture Collection and LGC Standards, 2011a).
	Hec 1B ATCC® Nummer:HTB-113™	Die Zelllinie Hec 1B hat ein anderes Wachstumsverhalten in der Zellkultur als Zelllinie Hec 1A und wird deshalb als Hec 1„B“ gekennzeichnet (American Type Culture Collection and LGC Standards, 2011b).
	HeLa ATCC® Nummer: CCL-2™	HeLa ist eine Abkürzung aus den Anfangsbuchstaben der Patientin „Henrietta Lacks“, aus der diese Zelllinie gewonnen wurde. Die Zelllinie ist eine etablierte Zervixkarzinomzelllinie (SCHERER <i>et al.</i> , 1953).

- Anhang -

Epithelzellen	Ishikawa minus	Die Zelllinie Ishikawa-minus ist eine Östrogenrezeptor-negative (minus) Endometriumkarzinom Zelllinie.
	Ishikawa plus Kat. Nr. 99040201, Sigma-Aldrich	Die Zelllinie Ishikawa plus ist eine Östrogenrezeptor-positive Endometriumkarzinom-Zelllinie.
	MCF7 ATCC® Nummer: HTB-22™	MCF7 (Michigan Cancer Foundation 7) ist eine Mammakarzinomzelllinie. Sie wurde erstmals 1970 von Zellen des malignen Pleuraerguss einer Patientin mit Adenokarzinom der Mamma abgeleitet (Soule <i>et al.</i> , 1973).
	RL-95-2 ATCC® Nummer: CRL-1671™	RL-95-2, eine Endometriumkarzinomzelllinie, wurde von Zellen eines mäßig differenzierten adenosquamösen Endometriumkarzinoms abgeleitet (Way <i>et al.</i> , 1983).
Leukämische Zelllinien	HL60 ATCC® Nummer: CCL-240™	HL 60 ist eine promyeloische Zelllinie. „HL 60“ steht für „human promyelocytic leukemia cell line“.
	IM9 ATCC® Nummer: CCL-159™	Die lymphoblastoide B-Zelllinie IM9 ist eine EBV transformierte Zelllinie aus dem peripheren Blut eines an multiplen Myelom erkrankten Patienten.
	Jurkat ATCC® Nummer:TIB-152™	Die Zelllinie Jurkat ist eine maligne T-Zelllinie. Sie wurde aus Zellen eines an akuter T-Zell-Leukämie Erkrankten etabliert.

6.2 Primerliste

In der Primerliste sind alle Primer aufgeführt, die in dieser Arbeit interessierende Gene flankierten. Die Gene, die untersucht wurden, wurden unter 4.1.2.1 (S. 44-45), 4.1.2.2 (S. 46-47) und 6.1.1 (S. 90-92) genannt und ausführlich beschrieben.

Aus der großen Zahl der verwendeten Primer wurden in den ersten Versuchen diese selektiert, die Gene amplifizierten, die stark reguliert wurden. Alle anderen Primer, die keinen Hinweis auf eine mögliche Regulation des amplifizierten Gens lieferten, oder nach mehrmaligen Versuchen nicht etabliert werden konnten, wurden nicht weiter eingesetzt. Diese werden in Tabelle 9 aus Gründen der Vollständigkeit mit aufgeführt.

Tabelle 9: Primerliste.

PRIMER		
NAME DES GENS	VORWÄRTSPRIMER-SEQUENZ (5' → 3')	RÜCKWÄRTSPRIMER-SEQUENZ (5' → 3')
AKNA	GGGCAGAGAAGGCCACCACGAG	GGTCGCCCCAGGTCGAGCTGGATG
beta actin	GGAGAAGCTGTGCTACGTCG	GGCTCAGGAGGAGCAATGAT
COX 2	CCTTTCCTAACACTCACAAC	TATAGGGTAAATACGGGCC
COX 4	ATGTTGGCTACCAGGGTATT	TAAACTGGTCATTTATTAGC
DKK1	GGAATATGTGTGTCTTCTGATC	GTGTCTCTGACAAGTGTGAAGCCTAG
Endothelin 1	CAGTCTTAGGCGCTGAGCTCAG	CCAATGTGCTCGGTTGTGGGTAC
Endothelin 2	GGAAGGGCCAGGCTGCTGCCAC	CCGCATGGCCTCCTGTTGT
Endothelin 3	GGATGCTGGCAGGCGCGGCG	GGCAGGTAGATGGAGCGAGGGCG
FGF21	AGCCCCGAAAGTCTCCTGCAGCTG	GCTGGGGCTTCGGCCCTGGGA
FOS	GATGACCTGGGCTTCCCAGAAGAG	GGCCAGCAGCGTGGGTGAGCT
HIVEP1	GATGCACAGGGAGCTCCAG	GGTTGCTATCACAAGCCTGTCC
HIVEP2	CGGCTGTTGATGAAACAGAGC	AGTCCAAGTCTTGTCTATCCACAC
HIVEP3	CAGAAGGCCGAGTCCCGAAGTC	CCCTGTCCTCAGGCTGATG
IFIT2	CCTGCATTGCCAATTGGGTGCTG	GCAGTAGCCTAGTGGGCACCATC
Inhibin alpha	CCGGCCATCCCAGCATAACGCGC	GAGTTGAGCGTCGGGCTCTC
Inhibin βA	TGCCCTTGCTTTGGCTGAGA	ACTTTGCCACATGAAGCTTT
Inhibin βB	GGCGAGCGGCGACTCAACCTAGA	CGTGTGGAAGGAGGAGGCGAGGC

- Anhang -

Inhibin β C	GCAGCCCGGGTGAGAGTTGG	ACTGCACCCACAGGCCTC
Inhibin β E	AGCCCTTCCTAGAGCTTAAG	GCTGCAGCCACAGGCCTCC
Inhibin β E intronspan	GCTACTGTACAGACTCCACTTC	GCTGCAGCCACAGGCCTCC
Inhibin β E TOPO	CACCAGGAGCATGCGGCTCCCTGATG	GCTGCAGCCACAGGCCTCC
Inhibin β E vor intron	CCAGGGAATGGGGAGGAGGTCATCAG	GCTGCAGCCACAGGCCTCC
KLHDC7B (kelch)	CCTCGTGGCGAGGAGCCTCC	GAGTGAGGTCTGCAGCCGGT
LDOC	CGCAATGGTGGATGAGTTGG	ATAATCATCCTCCTTCTTCGTCG
SREB	GGTGCGCACCAGCCTGTGGC	GCTGGAAGTGACAGTGGTCC
TUSC1	GGTTGGGATGGGACCGATGT	CAGCCAGGGCCCAGAGGGCTCC
TX	GTGATGAGATTTCCATCCATG	CTTCTGGGGTATCAGGGATG
XBP 1 xbp splice	GAAGGCTCGAATGAGTGAGC	TGGGAGCTCCTCCAGGCTGG

Vorabpublikationen

Ergebnisse der Promotionsarbeit wurden teilweise in folgenden Publikationen und Postervorstellung aufgenommen:

- 08/2012 **Inhibin beta E is upregulated by drug-induced endoplasmic reticulum stress as a transcriptional target gene of ATF4**
Ansgar Bruening, Christina Matsingou, German J Brem, Martina Rahmeh, Ioannis Mylonas
Toxicology and Applied Pharmacology. 2012 Oct 15;264(2):300-4. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.011. Epub 2012 Aug 23.
- 10/2011 **Selective Induction of Inhibin beta E by the ER-Stress reaction**
Christina Matsingou, Ansgar Brüning, Klaus Friese, Ioannis Mylonas
Postervorstellung im 53. Symposium der Gesellschaft für Histochemie in München.
- 04/2011 **Inhibin/activin betaE-subunit in uterine endometrioid adenocarcinoma and endometrial cancer cell lines: From immunohistochemistry to clinical testing?**
Ioannis Mylonas, Christina Matsingou, Stefanie D. Käufl, Ansgar Brüning
Gynecologic Oncology. 2011 Jul;122(1):132-40. Epub 2011 Apr 20.
- 09/2010 **Expression and regulation of inhibin-betaC and betaE in endometrial cancer cells**
Christina Matsingou, Ansgar Brüning, Klaus Friese, Ioannis Mylonas
Postervorstellung im 52. Symposium der Gesellschaft für Histochemie in Prag.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Inhibin/Aktivin Expression in gynäkologischen Krebszellen und selektive Expression der Inhibin beta E Untereinheit unter ER-Stressinduktion

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 06.03.2013

Christina Matsingou

Danksagung

Mein herzlicher Dank an meinen Doktorvater, Prof. Dr. med. Ioannis Mylonas, welcher mir den wissenschaftlichen Anstoß für diese Arbeit gab. Er hat mir die Möglichkeit gegeben bei sehr interessanten Forschungsprojekten der Frauenklinik mitzuarbeiten und den Grundstein für die vorliegende Arbeit gelegt.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Ansgar Brüning, der während der ganzen Arbeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mich bei den Untersuchungen im Forschungslabor einarbeitete und lückenlos betreute. Seine Geduld und Begabung in der Erklärung komplexer Zusammenhänge haben mir ermöglicht, die molekularbiologischen und weiteren theoretischen Grundlagen für die Durchführung der Forschungsarbeit zu erlangen.

Ich bedanke mich auch bei den medizinisch technischen Assistentinnen des Forschungslabors der Frauenklinik des Klinikums Großhadern und insbesondere bei Frau Martina Rahmeh. Mit ihrer Hilfe konnte ich verschiedene molekularbiologische Methoden erlernen, ohne deren Beherrschung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich wäre.

Literaturverzeichnis

- Aleman-Muench, G.R. and Soldevila, G. (2011), "When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity", *Immunology and cell biology*.
- American Type Culture Collection and LGC Standards (2011a), "ATCC IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS. HEC-1-A (ATCC® HTB-112™)", available at: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-112.aspx> (accessed 24 February 2013).
- American Type Culture Collection and LGC Standards (2011b), "ATCC IN PARTNERSHIP WITH LGC STANDARDS. HEC-1-B (ATCC® HTB-113™)", available at: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-113.aspx> (accessed 24 February 2013).
- Ameri, K. and Harris, A.L. (2008), "Activating transcription factor 4", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 40 No. 1, pp. 14–21.
- Anawalt, B.D., Bebb, R.A., Matsumoto, A.M., Groome, N.P., Illingworth, P.J., McNeilly, A.S. and Bremner, W.J. (1996), "Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Vol. 81 No. 9, pp. 3341–3345.
- Aragon, I.V., Barrington, R.A., Jackowski, S., Mori, K. and Brewer, J.W. (2012), "The specialized unfolded protein response of B lymphocytes: ATF6alpha-independent development of antibody-secreting B cells", *Molecular immunology*, Vol. 51 3-4, pp. 347–355.
- Atienzar, F., Gerets, H., Dufrane, S., Tilmant, K., Cornet, M., Dhalluin, S., Ruty, B., Rose, G. and Canning, M. (2007a), "Determination of phospholipidosis potential based on gene expression analysis in HepG2 cells", *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, Vol. 96 No. 1, pp. 101–114.
- Atienzar, F., Gerets, H., Dufrane, S., Tilmant, K., Cornet, M., Dhalluin, S., Ruty, B., Rose, G. and Canning, M. (2007b), "Determination of phospholipidosis potential based on gene expression analysis in HepG2 cells", *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, Vol. 96 No. 1, pp. 101–114.
- Balanathan, P., Williams, E.D., Wang, H., Pedersen, J.S., Horvath, L.G., Achen, M.G., Stacker, S.A. and Risbridger, G.P. (2009), "Elevated level of inhibin-alpha subunit is pro-tumourigenic and pro-metastatic and associated with extracapsular spread in advanced prostate cancer", *British journal of cancer*, Vol. 100 No. 11, pp. 1784–1793.
- Bambang, I.F., Xu, S., Zhou, J., Salto-Tellez, M., Sethi, S.K. and Zhang, D. (2009), "Overexpression of endoplasmic reticulum protein 29 regulates mesenchymal-epithelial transition and suppresses xenograft tumor growth of invasive breast cancer cells", *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, Vol. 89 No. 11, pp. 1229–1242.

- Bamberger, C., Scharer, A., Antsiferova, M., Tychsen, B., Pankow, S., Muller, M., Rulicke, T., Paus, R. and Werner, S. (2005), "Activin controls skin morphogenesis and wound repair predominantly via stromal cells and in a concentration-dependent manner via keratinocytes", *The American journal of pathology*, Vol. 167 No. 3, pp. 733–747.
- Berault, D.R. and Werstuck, G.H. (2012), "The role of glucosamine-induced ER stress in diabetic atherogenesis", *Experimental diabetes research*, Vol. 2012, p. 187018.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000), "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response", *Nature cell biology*, Vol. 2 No. 6, pp. 326–332.
- Bi, M., Naczki, C., Koritzinsky, M., Fels, D., Blais, J., Hu, N., Harding, H., Novoa, I., Varia, M., Raleigh, J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Bell, J., Ron, D., Wouters, B.G. and Koumenis, C. (2005), "ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth", *The EMBO journal*, Vol. 24 No. 19, pp. 3470–3481.
- Brown, M.K. and Naidoo, N. (2012), "The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases", *Frontiers in physiology*, Vol. 3, p. 263.
- Bruning, A. (2011), "Analysis of nelfinavir-induced endoplasmic reticulum stress", *Methods in enzymology*, Vol. 491, pp. 127–142.
- Bruning, A., Burger, P., Vogel, M., Rahmeh, M., Gengelmaiers, A., Friese, K., Lenhard, M. and Burges, A. (2009a), "Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis", *Cancer biology & therapy*, Vol. 8 No. 3, pp. 226–232.
- Bruning, A., Burger, P., Vogel, M., Rahmeh, M., Gengelmaiers, A., Friese, K., Lenhard, M. and Burges, A. (2009b), "Nelfinavir induces the unfolded protein response in ovarian cancer cells, resulting in ER vacuolization, cell cycle retardation and apoptosis", *Cancer biology & therapy*, Vol. 8 No. 3, pp. 226–232.
- Bruning, A., Friese, K., Burges, A. and Mylonas, I. (2010a), "Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells", *Breast cancer research BCR*, Vol. 12 No. 4, pp. R45.
- Bruning, A., Rahmeh, M., Gengelmaier, A. and Friese, K. (2010b), "The mitochondria-independent cytotoxic effect of nelfinavir on leukemia cells can be enhanced by sorafenib-mediated mcl-1 downregulation and mitochondrial membrane destabilization", *Molecular Cancer*, Vol. 9, p. 19.
- Brüning, A., Rahmeh, M., Gengelmaier, A. and Friese, K. (2010), "The mitochondria-independent cytotoxic effect of nelfinavir on leukemia cells can be enhanced by sorafenib-mediated mcl-1 downregulation and mitochondrial membrane destabilization", *Molecular Cancer*, Vol. 9 No. 1, p. 19.
- Bruning, A., Vogel, M., Burger, P., Rahmeh, M., Gengelmaier, A., Friese, K., Lenhard, M. and Burges, A. (2008), "Nelfinavir induces TRAIL receptor upregulation in

- ovarian cancer cells", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 377 No. 4, pp. 1309–1314.
- Brunner, T.B., Geiger, M., Grabenbauer, G.G., Lang-Welzenbach, M., Mantoni, T.S., Cavallaro, A., Sauer, R., Hohenberger, W. and McKenna, W.G. (2008), "Phase I trial of the human immunodeficiency virus protease inhibitor nelfinavir and chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer", *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Vol. 26 No. 16, pp. 2699–2706.
- Burnett, H.F., Audas, T.E., Liang, G. and Lu, R.R. (2012), "Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection", *Cell stress & chaperones*, Vol. 17 No. 4, pp. 473–483.
- Cali, T., Ottolini, D. and Brini, M. (2011), "Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease", *BioFactors (Oxford, England)*, Vol. 37 No. 3, pp. 228–240.
- Chand, A.L., Harrison, C.A. and Shelling, A.N. (2010), "Inhibin and premature ovarian failure", *Human reproduction update*, Vol. 16 No. 1, pp. 39–50.
- Chapman, C.H., Shen, J., Fillion, E.J., Tran, P.T., Hara, W., Asuncion, A., Marko, D., Wakelee, H., Berry, G.J., Dimmick, K.W., Loo, B.W., JR and Green, J. (2009), "Marked tumor response and fatal hemoptysis during radiation for lung cancer in a human immunodeficiency virus-positive patient taking nelfinavir", *Journal of thoracic oncology official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, Vol. 4 No. 12, pp. 1587–1589.
- Cho, H.-Y., Thomas, S., Golden, E., Gaffney, K., Hofman, F., Chen, T., Louie, S., Patsis, N. and Schonthal, A. (2009), "Enhanced killing of chemo-resistant breast cancer cells via controlled aggravation of ER stress", *Cancer letters*, Vol. 282 No. 1, pp. 87–97.
- Chu, H.H., Bae, J.S., Kim, K.M., Park, H.S., Cho, D.H., Jang, K.Y., Moon, W.S., Kang, M.J., Lee, D.G. and Chung, M.J. (2012), "Expression of CHOP in Squamous Tumor of the Uterine Cervix", *Korean journal of pathology*, Vol. 46 No. 5, pp. 463–469.
- Codner, E., Iniguez, G., Hernandez, I., Lopez, P., Rhumie, H., Villarroel, C. and Rey, R. (2011), "Elevated anti-Mullerian hormone (AMH) and inhibin B levels in prepubertal girls with type 1 diabetes mellitus", *Clinical endocrinology*, Vol. 74 No. 1, pp. 73–78.
- Cohen, J. (2007), "Biomedicine. HIV drug shows promise as potential cancer treatment", *Science (New York, N)*, Vol. 317 No. 5843, p. 1305.
- Colla, E., Coune, P., Liu, Y., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Iwatsubo, T., Schneider, B.L. and Lee, M.K. (2012), "Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 32 No. 10, pp. 3306–3320.

- Crum-Cianflone, N.F., Hullsiek, K.H., Marconi, V., Weintrob, A., Ganesan, A., Barthel, R.V., Fraser, S., Roediger, M.P., Agan, B. and Wegner, S. (2009), "The impact of nelfinavir exposure on cancer development among a large cohort of HIV-infected patients", *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, Vol. 51 No. 3, pp. 305–309.
- Dai, R., Chen, R. and Li, H. (2009), "Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells", *International journal of oncology*, Vol. 34 No. 6, pp. 1749–1757.
- Davidson W. Michael (2004), "Molecular Expressions™ The Endoplasmatic Reticulum", available at:
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/endoplasmicreticulum/endoplasmicreticulum.html> (accessed 21 July 2011).
- Deborah W. Vaughan (2002), "Histology Learning System Portal - Ultrastructure of the Cell. plasma cell, rough endoplasmatic reticulum", available at:
<http://www.bu.edu/histology/p/2100400a.htm> (accessed 15 February 2013).
- Dombroski, B.A., Nayak, R.R., Ewens, K.G., Ankener, W., Cheung, V.G. and Spielman, R.S. (2010), "Gene expression and genetic variation in response to endoplasmic reticulum stress in human cells", *American journal of human genetics*, Vol. 86 No. 5, pp. 719–729.
- Dr Phyllis McAlpine, "HUGO Gene Nomenclature Comittee", available at:
<http://www.genenames.org/>.
- El-Gharib, M. and Morad, M. (2011), "Maternal serum inhibin-A for predicting preeclampsia", *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine the official journal of the*, Vol. 24 No. 4, pp. 595–599.
- Estler, C.-J. and Allendorfer, J. (2007), *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis; 281 Tabellen*, 6., vollst. überarb. und erw. Schattauer, Stuttgart [u.a.].
- Feldman, D.E., Chauhan, V. and Koong, A.C. (2005), "The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors", *Molecular cancer research MCR*, Vol. 3 No. 11, pp. 597–605.
- Fels, D.R. and Koumenis, C. (2006), "The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth", *Cancer biology & therapy*, Vol. 5 No. 7, pp. 723–728.
- Firma SIGMA-AIDRICH, "Tunicamycin from Streptomyces sp.", available at:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=93755|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.
- Fitzgerald, B., Levytska, K., Kingdom, J., Walker, M., Baczyk, D. and Keating, S. (2011), "Villous trophoblast abnormalities in extremely preterm deliveries with elevated second trimester maternal serum hCG or inhibin-A", *Placenta*, Vol. 32 No. 4, pp. 339–345.

- Fuller, P.J., Zumpe, E.T., Chu, S., Mamers, P. and Burger, H.G. (2002), "Inhibin-activin receptor subunit gene expression in ovarian tumors", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Vol. 87 No. 3, pp. 1395–1401.
- Gao, H.-J., Zhu, Y.-M., He, W.-H., Liu, A.-X., Dong, M.-Y., Jin, M., Sheng, J.-Z. and Huang, H.-F. (2012a), "Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss", *Molecular biology reports*, Vol. 39 No. 9, pp. 9179–9186.
- Gao, Q., Jiang, Y., Dai, S., Wang, B., Gao, F., Guo, C., Zhu, F., Wang, Q., Wang, X., Wang, J., Shi, Y., Zhang, Y., Chen, W. and Zhang, L. (2012b), "Interleukin 17A Exacerbates Atherosclerosis by Promoting Fatty Acid-Binding Protein 4-Mediated ER Stress in Macrophages", *Circulation research*.
- Gass, J.N., Jiang, H.-Y., Wek, R.C. and Brewer, J.W. (2008), "The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells", *Molecular immunology*, Vol. 45 No. 4, pp. 1035–1043.
- Gills, J.J., Lopiccio, J. and Dennis, P.A. (2008), "Nelfinavir, a new anti-cancer drug with pleiotropic effects and many paths to autophagy", *Autophagy*, Vol. 4 No. 1, pp. 107–109.
- Gills, J., Lopiccio, J., Tsurutani, J., Shoemaker, R., Best, C., Abu-Asab, M., Borojerdi, J., Warfel, N., Gardner, E., Danish, M., Hollander, M., Kawabata, S., Tsokos, M., Figg, W., Steeg, P. and Dennis, P. (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", *Clinical cancer research an official journal of the American Association for*, Vol. 13 No. 17, pp. 5183–5194.
- Groome, N. and O'Brien, M. (1993), "Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach", *Journal of immunological methods*, Vol. 165 No. 2, pp. 167–176.
- Harding, H.P., Zhang, Y. and Ron, D. (1999), "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase", *Nature*, Vol. 397 No. 6716, pp. 271–274.
- Hartl, F.U. (1991), "Heat shock proteins in protein folding and membrane translocation", *Seminars in immunology*, Vol. 3 No. 1, pp. 5–16.
- Hartl, F.U., Hlodan, R. and Langer, T. (1994), "Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations", *Trends in biochemical sciences*, Vol. 19 No. 1, pp. 20–25.
- Hashimoto, O., Sekiyama, K., Matsuo, T. and Hasegawa, Y. (2009), "Implication of activin E in glucose metabolism: transcriptional regulation of the inhibin/activin betaE subunit gene in the liver", *Life sciences*, Vol. 85 13-14, pp. 534–540.
- Hashimoto, O., Yamato, K., Koseki, T., Ohguchi, M., Ishisaki, A., Shoji, H., Nakamura, T., Hayashi, Y., Sugino, H. and Nishihara, T. (1998), "The role of activin type I receptors in activin A-induced growth arrest and apoptosis in mouse B-cell hybridoma cells", *Cellular signalling*, Vol. 10 No. 10, pp. 743–749.

- Hasnain, S.Z., Lourie, R., Das, I., Chen, A.C.-H. and McGuckin, M.A. (2012), "The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation", *Immunology and cell biology*, Vol. 90 No. 3, pp. 260–270.
- Hassan, I.H., Zhang, M.S., Powers, L.S., Shao, J.Q., Baltrusaitis, J., Rutkowski, D.T., Legge, K. and Monick, M.M. (2012), "Influenza A viral replication is blocked by inhibition of the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) stress pathway", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 287 No. 7, pp. 4679–4689.
- Hawinkels, L.J.A.C., Paauwe, M., Verspaget, H.W., Wiercinska, E., van der Zon, J.M., van der Ploeg, K., Koelink, P.J., Lindeman, J.H.N., Mesker, W., Dijke, P. ten and Sier, C.F.M. (2012), "Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF-beta signaling in cancer-associated fibroblasts", *Oncogene*.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1999), "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress", *Molecular biology of the cell*, Vol. 10 No. 11, pp. 3787–3799.
- He, B. (2006), "Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses", *Cell death and differentiation*, Vol. 13 No. 3, pp. 393–403.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. and Soto, C. (2003), "Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein", *The EMBO journal*, Vol. 22 No. 20, pp. 5435–5445.
- Hu, M.-C., Gong, H.-Y., Lin, G.-H., Hu, S.-Y., Chen, M.H.-C., Huang, S.-J., Liao, C.-F. and Wu, J.-L. (2007), "XBP-1, a key regulator of unfolded protein response, activates transcription of IGF1 and Akt phosphorylation in zebrafish embryonic cell line", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 359 No. 3, pp. 778–783.
- Jiang, W., Mikochik, P.J., Ra, J.H., Lei, H., Flaherty, K.T., Winkler, J.D. and Spitz, F.R. (2007), "HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits growth of human melanoma cells by induction of cell cycle arrest", *Cancer research*, Vol. 67 No. 3, pp. 1221–1227.
- Ji, C. and Kaplowitz, N. (2004), "Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury", *World journal of gastroenterology WJG*, Vol. 10 No. 12, pp. 1699–1708.
- Ji, C. and Kaplowitz, N. (2006), "ER stress: can the liver cope?", *Journal of hepatology*, Vol. 45 No. 2, pp. 321–333.
- Kanamaru, C., Yasuda, H. and Fujita, T. (2002), "Involvement of Smad proteins in TGF-beta and activin A-induced apoptosis and growth inhibition of liver cells", *Hepatology research the official journal of the Japan Society of Hepatology*, Vol. 23 No. 3, pp. 211–219.
- Karow, T. (2010), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, (Keine Angabe)*, Karow, Pulheim.

- Kaufmann, M., Costa, S.D. and Scharl, A. (2006), *Die Gynäkologie*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Kiechle, M. (2007), *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Elsevier, Urban und Fischer, München ;, Jena.
- Kingsley, D.M. (1994), "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms", *Genes & development*, Vol. 8 No. 2, pp. 133–146.
- Kleine, B. and Rossmanith, W.G. (2010), *Hormone und Hormonsystem: Lehrbuch der Endokrinologie*, [Online-Ausg. der] 2., erw. [gedr.] Aufl., Springer, Berlin [u.a.].
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A. and Wouters, B.G. (2002), "Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha", *Molecular and cellular biology*, Vol. 22 No. 21, pp. 7405–7416.
- Kriss, C.L., Pinilla-Ibarz, J.A., Mailloux, A.W., Powers, J.J., Tang, C.-H.A., Kang, C.W., Zanesi, N., Epling-Burnette, P.K., Sotomayor, E.M., Croce, C.M., Del Valle, J.R. and Hu, C.-C.A. (2012), "Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: a novel mechanism of leukemic progression in mice", *Blood*, Vol. 120 No. 5, pp. 1027–1038.
- Leem, J. and Koh, E. (2012), "Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus", *Experimental diabetes research*, Vol. 2012, p. 242984.
- Leung, H.J., Duran, E.M., Kurtoglu, M., Andreansky, S., Lampidis, T.J. and Mesri, E.A. (2012), "Activation of the unfolded protein response by 2-deoxy-D-glucose inhibits kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication and gene expression", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 56 No. 11, pp. 5794–5803.
- Life Technologies Corporation and 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", Catalog nos. K4800-01, K4800-40, Rev. Date: 10 April 2009, available at: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1topota_man.pdf (accessed 15 February 2013).
- Liu, L., Wise, D.R., Diehl, J.A. and Simon, M.C. (2008), "Hypoxic reactive oxygen species regulate the integrated stress response and cell survival", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 283 No. 45, pp. 31153–31162.
- Löffler, G. (Ed.) (2007), *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*, Springer-Lehrbuch, 8., vollst. neu bearb, Springer, Heidelberg.
- Longato, L., Ripp, K., Setshedi, M., Dostalek, M., Akhlaghi, F., Branda, M., Wands, J.R. and La Monte, S.M. de (2012), "Insulin resistance, ceramide accumulation, and endoplasmic reticulum stress in human chronic alcohol-related liver disease", *Oxidative medicine and cellular longevity*, Vol. 2012, p. 479348.

- Malhi, H. and Kaufman, R.J. (2011), "Endoplasmic reticulum stress in liver disease", *Journal of hepatology*, Vol. 54 No. 4, pp. 795–809.
- Matise, L.A., Palmer, T.D., Ashby, W.J., Nashabi, A., Chytil, A., Aakre, M., Pickup, M.W., Gorska, A.E., Zijlstra, A. and Moses, H.L. (2012), "Lack of transforming growth factor-beta signaling promotes collective cancer cell invasion through tumor-stromal crosstalk", *Breast cancer research BCR*, Vol. 14 No. 4, pp. R98.
- Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M.J., Jin, Y. and Hendershot, L.M. (2010), "Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response", *Cell stress & chaperones*, Vol. 15 No. 3, pp. 281–293.
- Mohammad, M.K., Avila, D., Zhang, J., Barve, S., Arteel, G., McClain, C. and Joshi-Barve, S. (2012), "Acrolein cytotoxicity in hepatocytes involves endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction and oxidative stress", *Toxicology and applied pharmacology*, Vol. 265 No. 1, pp. 73–82.
- Mylonas, I. and Dian, D. (2011), "Inhibin-alpha subunit in normal and malignant human cervical tissue and cervical cancer cell lines", *Oncology reports*, Vol. 26 No. 4, pp. 887–891.
- Mylonas, I., Matsingou, C., Kaufl, S. and Bruning, A. (2011), "Inhibin/activin betaE-subunit in uterine endometrioid adenocarcinoma and endometrial cancer cell lines: from immunohistochemistry to clinical testing?", *Gynecologic oncology*, Vol. 122 No. 1, pp. 132–140.
- Mylonas, I., Worbs, S., Shabani, N., Kuhn, C., Kunze, S., Schulze, S., Dian, D., Gingelmaier, A., Schindlbeck, C., Bruning, A., Sommer, H., Jeschke, U. and Friese, K. (2009), "Inhibin-alpha subunit is an independent prognostic parameter in human endometrial carcinomas: analysis of inhibin/activin-alpha, -betaA and -betaB subunits in 302 cases", *European journal of cancer (Oxford, England 1990)*, Vol. 45 No. 7, pp. 1304–1314.
- National Center for Biotechnology Information, U.N.L.o.M., "Nucleotide. The Nucleotide database is a collection of sequences from several sources, including GenBank, RefSeq, TPA and PDB. Genome, gene and transcript sequence data provide the foundation for biomedical research and discovery.", available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> (accessed 22 January 2013).
- Naylor, D.J. and Hartl, F.U. (2001), "Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells", *Biochemical Society symposium No. 68*, pp. 45–68.
- Numajiri Haruki, A., Naito, T., Nishie, T., Saito, S. and Nagata, K. (2011), "Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress", *Journal of interferon & cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, Vol. 31 No. 11, pp. 847–856.

- Pagliassotti, M.J. (2012), "Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease", *Annual review of nutrition*, Vol. 32, pp. 17–33.
- Park, C.S., Cha, H., Kwon, E.J., Sreenivasaiah, P.K. and Kim, D.H. (2012), "The chemical chaperone 4-phenylbutyric acid attenuates pressure-overload cardiac hypertrophy by alleviating endoplasmic reticulum stress", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 421 No. 3, pp. 578–584.
- Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K.-P. and Chakraborty, T. (2012), "Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*", *Cellular microbiology*, Vol. 14 No. 6, pp. 949–964.
- Pore, N., Gupta, A.K., Cerniglia, G.J. and Maity, A. (2006), "HIV protease inhibitors decrease VEGF/HIF-1 α expression and angiogenesis in glioblastoma cells", *Neoplasia (New York, N)*, Vol. 8 No. 11, pp. 889–895.
- Pyrko, P., Kardosh, A., Wang, W., Xiong, W., Schonthal, A. and Chen, T. (2007), "HIV-1 protease inhibitors nelfinavir and atazanavir induce malignant glioma death by triggering endoplasmic reticulum stress", *Cancer research*, Vol. 67 No. 22, pp. 10920–10928.
- Rengan, R., Mick, R., Pryma, D., Rosen, M.A., Lin, L.L., Maity, A.M., Evans, T.L., Stevenson, J.P., Langer, C.J., Kucharczuk, J., Friedberg, J., Prendergast, S., Sharkoski, T. and Hahn, S.M. (2012), "A phase I trial of the HIV protease inhibitor nelfinavir with concurrent chemoradiotherapy for unresectable stage IIIA/IIIB non-small cell lung cancer: a report of toxicities and clinical response", *Journal of thoracic oncology official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, Vol. 7 No. 4, pp. 709–715.
- Rogers, T.B., Inesi, G., Wade, R. and Lederer, W.J. (1995), "Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells", *Bioscience reports*, Vol. 15 No. 5, pp. 341–349.
- ROTE LISTE (2011), "ROTE LISTE® Online. Internet-Version für die Fachkreise (nach Registrierung)", available at: <http://www.rote-liste.de/>.
- Rzymski, T., Milani, M., Singleton, D.C. and Harris, A.L. (2009), "Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia", *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, Vol. 8 No. 23, pp. 3838–3847.
- Sawada, H., Takami, K. and Asahi, S. (2005a), "A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system", *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, Vol. 83 No. 2, pp. 282–292.
- Sawada, H., Takami, K. and Asahi, S. (2005b), "A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system", *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, Vol. 83 No. 2, pp. 282–292.
- SCHERER, W.F., SYVERTON, J.T. and GEY, G.O. (1953), "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human

- malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 97 No. 5, pp. 695–710.
- Schmidt-Matthiesen, H. and Fournier, D. von (2005), *Gynäkologie und Geburtshilfe: Lehrbuch für Studium und Praxis mit 80 Tabellen*, 10., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl., Schattauer, Stuttgart [u.a.].
- Schonthal, A.H. (2012), "Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer", *Biochemical pharmacology*.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J. (2006), "Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response", *Current molecular medicine*, Vol. 6 No. 1, pp. 5–36.
- See, A., Zeng, J., Tran, P. and Lim, M. (2011), "Acute toxicity of second generation HIV protease-inhibitors in combination with radiotherapy: a retrospective case series", *Radiation oncology (London, England)*, Vol. 6, p. 25.
- Sehested, A., Juul, A.A., Andersson, A.M., Petersen, J.H., Jensen, T.K., Muller, J. and Skakkebaek, N.E. (2000), "Serum inhibin A and inhibin B in healthy prepubertal, pubertal, and adolescent girls and adult women: relation to age, stage of puberty, menstrual cycle, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol levels", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Vol. 85 No. 4, pp. 1634–1640.
- Shav-Tal, Y. and Zipori, D. (2002), "The role of activin a in regulation of hemopoiesis", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 20 No. 6, pp. 493–500.
- Shen, Z., Cai, L.Y., Suprpto, I.S., Shenoy, P. and Zhou, X. (2011), "Placental and maternal serum inhibin A in patients with preeclampsia and small-for-gestational-age", *The journal of obstetrics and gynaecology research*.
- Soo, K.Y., Atkin, J.D., Farg, M., Walker, A.K., Horne, M.K. and Nagley, P. (2012), "Bim links ER stress and apoptosis in cells expressing mutant SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis", *PLoS one*, Vol. 7 No. 4, pp. e35413.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973), "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma", *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 51 No. 5, pp. 1409–1416.
- Stolz, A. and Wolf, D.H. (2010), "Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell", *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1803 No. 6, pp. 694–705.
- Takada, A., Miki, T., Kuno, A., Kouzu, H., Sunaga, D., Itoh, T., Tanno, M., Yano, T., Sato, T., Ishikawa, S. and Miura, T. (2012), "Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes", *PLoS one*, Vol. 7 No. 6, pp. e39893.
- Tanaka, T., Toujima, S. and Umesaki, N. (2004), "Activin A inhibits growth-inhibitory signals by TGF-beta1 in differentiated human endometrial adenocarcinoma cells", *Oncology reports*, Vol. 11 No. 4, pp. 875–879.
- Teske, B.F., Wek, S.A., Bunpo, P., Cundiff, J.K., McClintick, J.N., Anthony, T.G. and Wek, R.C. (2011), "The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facil-

- itate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress”, *Molecular biology of the cell*, Vol. 22 No. 22, pp. 4390–4405.
- Thomas, M., Yu, Z., Dadgar, N., Varambally, S., Yu, J., Chinnaiyan, A.M. and Lieberman, A.P. (2005), “The unfolded protein response modulates toxicity of the expanded glutamine androgen receptor”, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 280 No. 22, pp. 21264–21271.
- Thomas, S., Sharma, N., Golden, E.B., Cho, H., Agarwal, P., Gaffney, K.J., Petasis, N.A., Chen, T.C., Hofman, F.M., Louie, S.G. and Schonthal, A.H. (2012), “Preferential killing of triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo when pharmacological aggravators of endoplasmic reticulum stress are combined with autophagy inhibitors”, *Cancer letters*, Vol. 325 No. 1, pp. 63–71.
- Tian, X., Ye, J., Alonso-Basanta, M., Hahn, S.M., Koumenis, C. and Dorsey, J.F. (2011), “Modulation of chop-dependent DR5 expression by nelfinavir sensitizes glioblastoma multiforme cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)”, *The Journal of biological chemistry*.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A. and Kaufman, R.J. (1998), “A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells”, *Genes & development*, Vol. 12 No. 12, pp. 1812–1824.
- Tirosh, B., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H. and Ploegh, H.L. (2005), “XBP-1 specifically promotes IgM synthesis and secretion, but is dispensable for degradation of glycoproteins in primary B cells”, *The Journal of experimental medicine*, Vol. 202 No. 4, pp. 505–516.
- Torres, M., Castillo, K., Armisen, R., Stutzin, A., Soto, C. and Hetz, C. (2010), “Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress”, *PloS one*, Vol. 5 No. 12, pp. e15658.
- Ulianich, L., Garbi, C., Treglia, A.S., Punzi, D., Miele, C., Raciti, G.A., Beguinot, F., Consiglio, E. and Di Jeso, B. (2008), “ER stress is associated with dedifferentiation and an epithelial-to-mesenchymal transition-like phenotype in PC Cl3 thyroid cells”, *Journal of cell science*, Vol. 121 Pt 4, pp. 477–486.
- Unterberger, U., Hoftberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H. and Voigtlander, T. (2006), “Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo”, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Vol. 65 No. 4, pp. 348–357.
- Varki, A. (1999), *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Vejda, S., Erlach, N., Peter, B., Drucker, C., Rossmannith, W., Pohl, J., Schulte-Hermann, R. and Grusch, M. (2003), “Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells”, *Carcinogenesis*, Vol. 24 No. 11, pp. 1801–1809.

- Walton, K., Makanji, Y., Robertson, D. and Harrison, C. (2011), "The synthesis and secretion of inhibins", *Vitamins and hormones*, Vol. 85, pp. 149–184.
- Way, D.L., Grosso, D.S., Davis, J.R., Surwit, E.A. and Christian, C.D. (1983), "Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture", *In vitro*, Vol. 19 3 Pt 1, pp. 147–158.
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. ACTB Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTB&search=Beta+actin> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. HIVEP1 Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HIVEP1&search=HIVEP> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. TXNIP Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TXNIP&search=TX> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. IFIT2 Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFIT2&search=IFIT> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. FOS Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOS&search=FOS> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. DKK1 Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DKK1&search=DKK1> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. XBP1 Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=XBP1&search=XBP+1> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. EDN2 Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EDN2&search=Endothelin+2> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium", available at: <http://www.genecards.org/> (accessed 24 February 2013).
- Weizmann Institute of Science and Xenex, I., "GeneCards® The Human Gene Compendium. AKNA Gene", available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKNA&search=AKNA> (accessed 24 February 2013).
- Welsch, U. (2006), *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen, 2., völlig überarb*, Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].
- Wikipedia (2011a), "Endoplasmatisches Retikulum", available at: http://de.wikipedia.org/wiki/Endoplasmatisches_Retikulum (accessed 21 July 2011).

- Wikipedia (2011b), "Dithiothreitol", available at:
<http://de.wikipedia.org/wiki/Dithiothreitol> (accessed 29 July 2011).
- Yang, Y., Ikezoe, T., Nishioka, C., Bandobashi, K., Takeuchi, T., Adachi, Y., Kobayashi, M., Takeuchi, S., Koeffler, H.P. and Taguchi, H. (2006), "NFV, an HIV-1 protease inhibitor, induces growth arrest, reduced Akt signalling, apoptosis and docetaxel sensitisation in NSCLC cell lines", *British journal of cancer*, Vol. 95 No. 12, pp. 1653–1662.
- Ye, J. and Koumenis, C. (2009), "ATF4, an ER stress and hypoxia-inducible transcription factor and its potential role in hypoxia tolerance and tumorigenesis", *Current molecular medicine*, Vol. 9 No. 4, pp. 411–416.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. (2001), "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor", *Cell*, Vol. 107 No. 7, pp. 881–891.
- Yuan, L., Cao, Y., Oswald, F. and Knochel, W. (2008), "IRE1beta is required for mesoderm formation in *Xenopus* embryos", *Mechanisms of development*, Vol. 125 3-4, pp. 207–222.
- Yu, C.-Y., Hsu, Y.-W., Liao, C.-L. and Lin, Y.-L. (2006), "Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress", *Journal of virology*, Vol. 80 No. 23, pp. 11868–11880.
- Zambrano, J.L., Ettayebi, K., Maaty, W.S., Faunce, N.R., Bothner, B. and Hardy, M.E. (2011), "Rotavirus infection activates the UPR but modulates its activity", *Virology journal*, Vol. 8, p. 359.
- Zeng, J., See, A.P., Aziz, K., Thiyagarajan, S., Salih, T., Gajula, R.P., Armour, M., Phallen, J., Terezakis, S., Kleinberg, L., Redmond, K., Hales, R.K., Salvatori, R., Quinones-Hinojosa, A., Tran, P.T. and Lim, M. (2011), "Nelfinavir induces radiation sensitization in pituitary adenoma cells", *Cancer biology & therapy*, Vol. 12 No. 7, pp. 657–663.
- Zhao, L. and Ackerman, S. (2006), "Endoplasmic reticulum stress in health and disease", *Current opinion in cell biology*, Vol. 18 No. 4, pp. 444–452.
- Zhong, J., Rao, X., Xu, J.-F., Yang, P. and Wang, C.-Y. (2012), "The role of endoplasmic reticulum stress in autoimmune-mediated beta-cell destruction in type 1 diabetes", *Experimental diabetes research*, Vol. 2012, p. 238980.
- Zhong, Q., Zhou, B., Ann, D.K., Minoo, P., Liu, Y., Banfalvi, A., Krishnaveni, M.S., Dubourd, M., Demaio, L., Willis, B.C., Kim, K.-J., duBois, R.M., Crandall, E.D., Beers, M.F. and Borok, Z. (2011), "Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, Vol. 45 No. 3, pp. 498–509.