

Das Thioredoxinsystem in Brustkrebs und Seneszenz - Relation zur Expression des Onkogens ERBB2-

Der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität Dortmund

eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Dennis Franckenstein, M. Sc. in Chemischer Biologie

geboren am 17.06.1985 in Plettenberg

Dekan: Prof. Dr. R. Winter

Gutachter: Prof. Dr. med. J. G. Hengstler (TU Dortmund)
Prof. Dr. F. Wehner (MPI Dortmund)

Datum der Einreichung: 05.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	- 1 -
1.1.1 Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms	- 2 -
1.2 Die ERBB Familie.....	- 5 -
1.2.1 Die Rolle der ERBB-Rezeptoren bei der Tumorentstehung und –..... entwicklung	- 5 -
1.2.2 Die Rezeptortyrosinkinase ERBB2	- 7 -
1.2.3 ERBB2-induzierte Signalwege	- 8 -
1.2.4 Der RAS/MAPK Signalweg	- 9 -
1.2.5 Der PI3K/AKT Signalweg	- 9 -
1.3 Onkogen-induzierte Seneszenz	- 11 -
1.3.1 Die Rolle der Seneszenz in der Tumorgenese.....	- 12 -
1.3.2 Das MCF-7/NeuT Zellsystem als Modell für onkogen-induzierte..... Seneszenz	- 14 -
1.4 Oxidativer Stress	- 15 -
1.4.1 Oxidativer Stress in Krebs.....	- 17 -
1.4.2 Das Thioredoxinsystem als antioxidativer Schutzmechanismus vor..... oxidativen Stress.....	- 19 -
1.5 Zelluläre Degradationsprozesse.....	- 24 -
1.5.1 Autophagie.....	- 24 -
1.5.2 Ubiquitin-vermittelte, proteasomale Proteindegradation	- 26 -

1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	- 29 -
2	Material und Methoden.....	- 30 -
2.1	Material	- 30 -
2.1.1	Chemikalien	- 30 -
2.1.1.1	Allgemeine Laborchemikalien.....	- 30 -
2.1.1.2	Kits	- 31 -
2.1.1.3	Antikörper.....	- 32 -
2.1.1.3.1	Primärantikörper.....	- 33 -
2.1.1.3.2	Sekundärantikörper.....	- 34 -
2.1.1.4	Primer + Probes	- 34 -
2.1.1.5	Silencer Select siRNA	- 34 -
2.1.1.6	Inhibitoren.....	- 35 -
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	- 35 -
2.1.3	Lösungen	- 36 -
2.1.3.1	Fertiglösungen.....	- 36 -
2.1.3.2	Selbst hergestellte Lösungen	- 36 -
2.1.4	Zusammensetzung der Gele.....	- 39 -
2.1.5	Geräte.....	- 40 -
2.1.6	Zellen	- 41 -
2.1.6.1	MCF-7 Zelllinie	- 41 -
2.1.6.2	MCF-7/NeuT TetOn Zellsystem	- 42 -
2.2	Methoden	- 43 -
2.2.1	<i>In vitro</i> Experimente	- 43 -
2.2.1.1	MCF-7 Zellen.....	- 43 -
2.2.1.2	MCF-7/NeuT Zellen	- 43 -

2.2.2	Zellkulturtechniken	- 43 -
2.2.2.1	Kultivierung von Säugerzellen	- 43 -
2.2.2.2	Subkultivierung von Säugerzellen	- 44 -
2.2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	- 44 -
2.2.3	RNA Analytik	- 44 -
2.2.3.1	RNA-Isolation	- 44 -
2.2.3.2	RNA-Konzentrationsbestimmung und cDNA Synthese	- 45 -
2.2.3.3	Affymetrix Gene Array	- 46 -
2.2.3.4	Quantitative real time PCR	- 47 -
2.2.4	Proteinanalytik	- 50 -
2.2.4.1	Präparation der Protein Proben (Gesamtzelllysat)	- 50 -
2.2.4.2	Präparation redox-sensitiver Protein Proben.....	- 50 -
2.2.4.3	Proteinbestimmung mittels BCA-Test	- 51 -
2.2.4.4	Proteinfällung mittels Methanol/Chloroform.....	- 52 -
2.2.4.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 52 -
2.2.4.6	Western Blot.....	- 53 -
2.2.4.7	Absorptions-basierter Aktivitätsassay mit Protein Proben	
	aus Gesamtzelllysat	- 55 -
2.2.4.8	Fluoreszenz-basierter Aktivitätsassay mit Protein Proben.....	
	aus Gesamtzelllysat	- 57 -
2.2.5	Absorptions-basierte Bestimmung von oxidativen Stress in Zellen.....	
	mittels TBARS-Assay.....	- 59 -
2.2.6	Fluoreszenz-basierte Bestimmung von oxidativem Stress in Zellen.....	
	mittels DCF-Assay	- 60 -
2.2.7	Gen Knockout mittels siRNA.....	- 62 -
2.2.8	Neutralrotassay zur Bestimmung der Zellvitalität.....	- 63 -
2.2.9	Statistik	- 64 -
2.2.9.1	Affymetrix Gene Array Daten von Brustkrebspatienten	- 64 -
2.2.9.2	<i>In vitro</i> generierte Daten	- 65 -

3	Ergebnisse	- 66 -
3.1	Expression des Onkogens ERBB2/HER2 (NeuT) führt zu	
	vorzeitiger zellulärer Seneszenz in MCF-7 Zellen	- 66 -
3.1.1	Expression des Onkogens ERBB2/NeuT in MCF-7 Zellen	- 66 -
3.1.2	Onkogen ERBB2/NeuT induzierte vorzeitige Seneszenz korreliert mit.....	
	Veränderung der Zellmorphologie in MCF-7 Zellen	- 67 -
3.2	Der HER2/ERBB2 Status zeigt ein verändertes Expressionsmuster	
	in Brustkrebspatienten und im MCF-7/NeuT Zellmodell	- 68 -
3.3	TrxR und TXNIP sind mit Prognose bei Brustkrebspatienten verknüpft .	- 73 -
3.3.1	ERBB2/HER2 Überexpression verändert den Expressionsstatus von.....	
	TrxR und TXNIP in metastasefreien Brustkrebspatienten	- 73 -
3.3.2	Die TrxR Expression ist mit dem ERBB2 Status in Brustkrebspatienten...	
	verknüpft	- 75 -
3.4	Der Expressionsstatus von ERBB2/NeuT steht in Zusammenhang mit	
	dem Expressionsmuster von TrxR und TXNIP in MCF-7/NeuT Zellen ...	- 77 -
3.4.1	TrxR und TXNIP zeigen ein verändertes Expressionsmuster infolge.....	
	der ERBB2/NeuT Onkogen transformation in MCF-7/NeuT Zellen	- 77 -
3.5	ERBB2/NeuT onkogen-vermittelte Aktivierung von Signalwegen.....	
	in seneszenten MCF-7 Zellen.....	- 81 -
3.5.1	NeuT beeinflusst die Expression von TrxR nur indirekt.....	- 82 -
3.5.2	Der MEK/ERK Signalweg zeigt eine mögliche Beteiligung an der.....	
	Regulation von TrxR	- 85 -
3.5.2.1	Die Regulierung von TrxR ist MEK5/ERK5 unabhängig	- 88 -
3.5.2.2	Knockdown von MEK1/2 und ERK1/2 mittels siRNA zeigt	
	keinen Einfluss auf die Regulation von TrxR	- 89 -
3.5.3	Der AKT/PI3K Signalweg zeigt eine Beteiligung an der.....	
	Unterdrückung der TrxR Expression	- 97 -

3.5.4	Die Hemmung des p38 Signalweges steigert die Expression von..... TrxR.....	- 99 -
3.5.5	TrxR wird unabhängig vom SAPK/JNK Signalweg reguliert.....	- 101 -
3.6	Untersuchung der Rolle des Thioredoxinsystems in der NeuT-ver-..... mittelten Seneszenz.....	- 101 -
3.6.1	ERBB2/NeuT induziert oxidativen Stress in MCF-7 Zellen	- 103 -
3.6.2	Die Aktivität der TrxR bleibt konstant während der NeuT-vermit-..... telten Seneszenz	- 101 -
3.6.3	Der Redox Status von Trx verändert sich zugunsten des reduzierten..... Zustandes durch Einleiten der Seneszenz.....	- 106 -
3.6.4	Hyperoxidierung von Peroxiredoxinen als Folge von oxidativem..... Stress in seneszenten MCF-7/NeuT Zellen	- 108 -
3.7	Bedeutung des Thioredoxinsystems für das zelluläre Überleben.....	- 109 -
3.7.1	Die Hemmung von TrxR fördert die Akkumulation von Autophago- somen und verändert die Aktivität der Autophagie	- 110 -
4	Diskussion.....	- 122 -
4.1	TrxR und TXNIP sind mit schlechter Prognose in Brustkrebspa- tienten assoziiert und zeigen einen Zusammenhang mit einem positiven ERBB2 Status	- 122 -
4.2	Das Expressionsmuster von TrxR und TXNIP ist abhängig von der ERBB2 Expression in MCF-7/NeuT Zellen.....	- 124 -
4.3	Die Regulation von TrxR erfolgt nicht über die MEK1/2, p38/MAPK,..... PI3K/AKT und JNK/SAPK Signalwege.....	- 127 -
4.4	Die ERBB2-vermittelte Onkogen transformation führt zur Änderung..... des Redoxgleichgewichts im MCF-7/NeuT Zellsystem.....	- 128 -
4.5	Trx spielt keine entscheidende Rolle bei der ERBB2-induzierten Steigerung zellulärer Degradationsprozesse.....	- 133 -
5	Zusammenfassung.....	- 137 -
6	Literatur.....	- 139 -

7	Anhang.....	- 167 -
7.1	Wissenschaftliche Publikationen	- 167 -
7.2	Selbstständigkeitserklärung	- 168 -
7.3	Danksagung	- 169 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des ERBB Signaltransduktion Netzwerkes	- 6 -
Abbildung 1.2: Zusammenfassung der wichtigsten ERBB2-vermittelten Signalkaskaden	- 8 -
Abbildung 1.3: Zusammenfassung des RAS-MAPK Signalweges.....	- 9 -
Abbildung 1.4: Zusammenfassung des PI3K/AKT Signalweges.....	- 10 -
Abbildung 1.5: Mechanismen zur Induktion onkogen-induzierter Seneszenz.....	- 12 -
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung für Quellen reaktiver Sauerstoff- spezies	- 16 -
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen regulatorischen Aufgaben des Thioredoxinsystems	- 20 -
Abbildung 1.8: Wechselwirkung katalytisch aktiver Thiolgruppen von Trx mit oxidierten Proteinen	- 20 -
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Trx und Prx	- 23 -
Abbildung 1.10: Grundlegende molekulare Mechanismen der Autophagie in Eukaryoten.....	- 27 -
Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Proteindegradation	- 27 -
Abbildung 2.1: MCF-7 Transfektionskonstrukte	- 42 -
Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der qRT-PCR.....	- 48 -
Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Western Blots	- 54 -
Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des proteasomalen Multienzymkom- plexes	- 57 -
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des fluoreszenzbasierten DCF-Assays zur Detektion intrazellulärer ROS Konzentrationen	- 61 -
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz	- 62 -
Abbildung 3.1: ERBB2/NeuT RNA Expression in MCF-7/NeuT Zellen	- 67 -
Abbildung 3.2: ERBB2/NeuT Protein Expression in MCF-7/NeuT Zellen	- 67 -
Abbildung 3.3: Morphologische Veränderungen während NeuT-induzierter Onkogen transformation und darauf folgender Seneszenz.....	- 68 -
Abbildung 3.4: Häufigkeitsverteilung der Estrogen- und HER2-Rezeptor RNA Expression zur Charakterisierung des Rezeptor-Status von Brustkrebspatienten in der Gesamtkohorte (n=788)	- 69 -
Abbildung 3.5: HER2/ERBB2 induzierte Veränderung der Genexpression in Brustkrebspatienten.....	- 70 -
Abbildung 3.6: Zusammenhang zwischen TrxR und TXNIP mit metastasefreier Überlebenszeit.....	- 75 -
Abbildung 3.7: Zusammenhang zwischen ERBB2 Status und TrxR bzw. TXNIP RNA Expression	- 76 -

Abbildung 3.8: ERBB2/NeuT vermittelte Veränderung der Expression von TXNIP, TrxR und Trx in MCF-7/NeuT Zellen	- 78 -
Abbildung 3.9: ERBB2/NeuT-vermittelte Veränderung der RNA Expression von TXNIP, TrxR und Trx in MCF-7/NeuT Zellen	- 79 -
Abbildung 3.10: ERBB2/NeuT-vermittelte Protein Expression von TXNIP, TrxR und Trx in MCF-7/NeuT Zellen	- 81 -
Abbildung 3.11: Einfluss der Hemmung der NeuT Kinaseaktivität durch Lapatinib auf die Vitalität von MCF-7/NeuT Zellen	- 83 -
Abbildung 3.12: Einfluss der Hemmung der NeuT Kinaseaktivität durch Lapatinib auf die TrxR Expression von MCF-7/NeuT Zellen	- 84 -
Abbildung 3.13: Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR	- 86 -
Abbildung 3.14: Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA Expression von TrxR mittels U0126	- 87 -
Abbildung 3.15: Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA Expression von TrxR	- 89 -
Abbildung 3.16: MEK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen	- 90 -
Abbildung 3.17: ERK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen	- 91 -
Abbildung 3.18: Einfluss des MEK1/2 Knockdown auf die TrxR Expression in MCF-7/NeuT Zellen	- 92 -
Abbildung 3.19: Einfluss des ERK1/2 Knockdown auf die TrxR Expression in MCF-7/NeuT Zellen	- 93 -
Abbildung 3.20: MEK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen	- 94 -
Abbildung 3.21: ERK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen	- 95 -
Abbildung 3.22: Einfluss des Mek1/2 und ERK1/2 Knockdown auf die TrxR Expression in MCF-7/NeuT Zellen	- 96 -
Abbildung 3.23: Einfluss der Hemmung von PI3K auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR	- 98 -
Abbildung 3.24: Einfluss der Hemmung von P38 MAPK auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR	- 100 -
Abbildung 3.25: Einfluss der Hemmung von JNK auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR	- 102 -
Abbildung 3.26: ERBB2-vermittelter Anstieg von oxidativen Stress in MCF-7/NeuT Zellen	- 103 -
Abbildung 3.27: Möglicher Einfluss der gesteigerten TrxR Expression auf dessen Gesamtaktivität in MCF-7/NeuT Zellen	- 105 -
Abbildung 3.28: Redox Western Blot in MCF-7/NeuT Zellen nach Behandlung mit H ₂ O ₂	- 107 -
Abbildung 3.29: Redox Western Blot in MCF-7/NeuT Zellen nach Behandlung mit Doxyzyklin	- 107 -
Abbildung 3.30: Hyperoxidierung von Peroxiredoxinen in MCF-7/NeuT Zellen	- 109 -
Abbildung 3.31: Einfluss der Hemmung von TrxR auf den Redox Status von Trx	- 110 -
Abbildung 3.32: Einfluss der Hemmung von TrxR auf die Autophagie	- 111 -

Abbildung 3.33: Einfluss des TrxR Knockdown auf den Autophagiemarker..... LC3-I und LC3-II	- 112 -
Abbildung 3.34: Einfluss des Trx Knockdown auf den Autophagiemarker LC3. -	113 -
Abbildung 3.35: Einfluss des TrxR Knockdown auf den Redox Status von Trx -	113 -
Abbildung 3.36: Einfluss des TrxR Knockdown unter Bedingungen von..... oxidativen Stress auf den Autophagiemarker LC3-I und LC3-II	- 114 -
Abbildung 3.37: Einfluss des Trx Knockdown unter Bedingungen von oxidativen..... Stress auf den Autophagiemarker LC3-I und LC3-II	- 115 -
Abbildung 3.38: Einfluss des Trx Knockdown auf essentielle zelluläre Signal-..... wege in MCF-7 Zellen.....	- 117 -
Abbildung 3.39: Einfluss des Trx Knockdown in der prä-Seneszenz (3d) und..... Seneszenz (7d) auf LC3-I und LC3-II in MCF-7/NeuT Zellen	- 118 -
Abbildung 3.40: Einfluss des Trx/TrxR Knockdown in der prä-Seneszenz (3d)..... und Seneszenz (7d) auf die Vitalität der MCF-7/NeuT Zellen.....	- 119 -
Abbildung 3.41: Bestimmung der Proteasomaktivität im Zuge der zellulären..... Seneszenz in MCF-7/NeuT Zellen.....	- 121 -
Abbildung 4.1: ERBB2-vermittelte Expression von TrxR und TXNIP und die..... Assoziation mit Prognose	- 126 -
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des antioxidativ wirkenden..... Schutzmechanismus in der Homöostase und unter Bedingungen von oxidativen..... Stress in MCF-7/NeuT Zellen	- 130 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms.....	- 4 -
Tabelle 2.1: Parameter zur Antikörperdetektion für Western Blot.....	- 32 -
Tabelle 2.2: Probenzusammensetzung zur Messung der TrxR Aktivität	- 56 -
Tabelle 2.3: Probenzusammensetzung zur Messung der Proteasom Aktivität.....	- 58 -
Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Reagenzien für RNA Interferenz	- 63 -
Tabelle 3.1: Korrelation von TrxR und TXNIP RNA Expression mit metastase..	
freiem Überleben	- 74 -
Tabelle 3.2: Korrelation von TrxR und TXNIP RNA Expression mit krankheits-	
freien und Gesamtüberleben	- 75 -

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure Assay
bP	Basenpaare
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
Cys	Cystein
d	Days
DCF	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
DCFH	2',7'-Dichlorodihydrofluorescin
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescin diacetate
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dox	Doxyzyklin
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FCS	Fetal Calf Serum
GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
IAA	Iodo Acetic Acid
kDa	Kilo Dalton
Lap	Lapatinib
Lys	Lysin
MDA	Malondialdehyd
Min	Minute
mL	Milliliter
mU	Milli Unit
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIP ₁	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PRDX2	Peroxiredoxin 2
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
mRNA	messenger Ribonukelinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rounds per minute
RRM2	Untereinheit M2 der Ribonukleotid Reduktase
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek	Sekunde
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNB	2-nitro-5-thiobenzoic acid
TRE	Tetrazyklin responsive element
Trp	Tryptophan
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein 2
µL	Microliter
UNG	Uracil-N-glycosylase
ü/N	über Nacht
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Weltweit gehört Brustkrebs mit 22,9% zu den häufigsten invasiven Krebsarten bei Frauen und weist mit 16% einen hohen Anteil aller Krebsarten bei Frauen auf. Im Jahr 2011 starben weltweit ca. 508000 Patienten an Brustkrebs, wobei dies beispielsweise in Ostafrika nur einen Anteil von 19,3 Menschen pro 100000 Einwohner ausmachte, während der Anteil in Westeuropa mit 89,7 Patienten pro 100000 Einwohner 4,5-fach darüber lag. Ein starker weltweiter Anstieg der Neuerkrankungen (>1 Million) ist seit den 1970er Jahren zu verzeichnen und ist in Zusammenhang mit veränderten Lebensbedingungen und Wohlstand zu bringen, der besonders in westlichen Ländern zu einer starken Zunahme der Neuerkrankungen führte (GLOBOCAN 2008) und mit 95% hauptsächlich bei Frauen über 40 Jahren auftritt. Die Mortalitätsrate der Krebserkrankungen bei Frauen in den westlichen Nationen wird ebenfalls vom Mammakarzinom angeführt, ist dank deutlich verbesserter medizinischer Versorgung und vor allem durch Prävention seit den 90er Jahren rückläufig [6]. In Deutschland stellt das Mammakarzinom mit 31% aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen einen sehr hohen Anteil dar. Dies entspricht einer Gesamtzahl von ca. 70000 Frauen pro Jahr oder einem Anteil von 171 Frauen pro 100000 Einwohner. Seit 1970 haben sich die Zahlen der Neuerkrankungen verdoppelt, während die Mortalitätsrate bei einer 5-Jahres Überlebensrate von 86-90% allerdings rückläufig ist (Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland 2010). Gründe für den Ausbruch einer Brustkrebserkrankung sind neben sich verändernden Umweltfaktoren, Lebensqualität, steigendem Alter sowie endokrinen Faktoren auch in der genetischen Prädisposition zu suchen. So führen Mutationen in essentiellen Genen wie p53, PTEN („*Phosphatase and Tensin homolog*“) oder BRCA1/2 zu einer Fehlregulation des Zellzyklus, welcher das Zellwachstum steuert [7, 8].

1.1.1 Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms

Die Früherkennung von Brustkrebs durch regelmäßige Prävention und Untersuchung der Brust führt bei den meisten Patienten zu einer vollständigen Heilung der Erkrankung und gleichzeitig auch zu einem Erhalt der Brust. Das metastasierende Mammakarzinom bedingt in den meisten Fällen nur eine Verlängerung der Lebenszeit und im späten Stadium lediglich eine Behandlung der Beschwerden zum Erhalt der Lebensqualität. Eine Behandlung der Krebserkrankung besteht oftmals aus einer Kombination verschiedener Therapien. In einigen Fällen erfolgt vor der operativen Entfernung des Tumors eine sogenannte neoadjuvante Therapie, die auf einer chemischen oder hormonellen Behandlung beruht und dazu dient, den Tumor zu verkleinern und damit eine vollständige operative Entfernung des bösartigen Gewebes zu ermöglichen. Gleichzeitig steigt auch die Chance auf den Erhalt der Brust. Eine erfolgreiche chemische oder hormonelle Vorbehandlung kann außerdem dazu führen, eine Prognose hinsichtlich des Erfolges einer operativen Nachbehandlung (adjuvant) abzugeben. Diese unterstützende Behandlung soll ein erneutes Ausbrechen des Krebses minimieren bzw. verhindern und verbleibende Tumorzellen vernichten. Die Therapiemöglichkeiten einer Brustkrebserkrankung sind sehr vielseitig und hängen sehr stark von der Klassifizierung des Hormonrezeptorstatus eines Tumors ab. Aufgrund der Überexpression des HER2-Rezeptors bzw. einem Verlust des Estrogen-Rezeptors wird beispielsweise zwischen einem positiven oder negativen Estrogen-Rezeptor oder HER2-Rezeptor Status unterschieden. Besonders aggressive Tumore zeichnen sich durch einen Verlust des Estrogen-Rezeptors aus und erschweren eine speziell gegen den Estrogen-Rezeptor gerichtete Therapie. Vor diesem Hintergrund spielt die Klassifizierung des Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle, da diese die Therapie maßgeblich bestimmt.

Eine gängige Möglichkeit der Therapie von Estrogen-Rezeptor positiven Brustkrebspatientinnen stellt die Behandlung mit Tamoxifen dar [9, 10], welches als Antagonist des Estrogen-Rezeptors wirkt. Bei Patientinnen mit einem positiven HER2-Rezeptor Status kann eine Behandlung gegen diesen angewendet werden. Bei negativen Estrogen- und HER2-Rezeptor Status bildet die Chemotherapie die einzige mögliche Alternative. Eine Überexpression des HER2/Neu-Rezeptors, welche bei ca. 30% aller

Brustkrebspatienten auftritt, ist maßgeblich an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt [7, 8]. HER2/Neu spielt bei verschiedenen Arten von Krebs eine Rolle und ist beispielsweise bei Magen-, Brust-, Ovarial- und Lungenkrebs überexprimiert [11]. Zusätzlich zur Problematik der Nebenwirkungen (Toxizität) von Tamoxifen, zeigen HER2/Neu- und Estrogen-Rezeptor positive Patienten oftmals eine Resistenz gegenüber dem Medikament. Aus diesem Grund beschränkt sich die Therapie nicht nur auf eine hormonelle Behandlung. Zusätzlich erfolgt eine Behandlung mit dem rekombinanten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]), welcher gegen den HER2/Neu-Rezeptor gerichtet ist [12] und besonders erfolgreich bei Patienten mit metastasierendem Mammakarzinom eingesetzt wird. Trastuzumab kann dabei allein oder in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt werden. Allerdings muss auch bei der Verwendung von Trastuzumab beachtet werden, dass nur etwa 30% der HER2/Neu positiven metastasierenden Brustkrebspatientinnen auf die Behandlung ansprechen, während die verbleibenden 70% eine primäre Resistenz gegenüber dem Medikament aufweisen [13]. Selbst Patienten, die einen positiven, initialen Effekt hinsichtlich der Trastuzumab Therapie zeigen, entwickeln im Zeitraum von ein bis zwei Jahren nach der Behandlung eine sekundäre Resistenz gegenüber Trastuzumab [14]. Aufgrund dieser häufig auftretenden Resistenz bei Estrogen- und HER2-Rezeptor positiven Patienten erfolgt oftmals eine Kombinationstherapie von Trastuzumab und Tamoxifen, um gleichzeitig den Estrogen- und HER2/Neu-Rezeptor zu blockieren [15, 16]. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass die Kombination von Trastuzumab und Fulvestrant (Faslodex[®]) eine wirkungsvolle Therapiemöglichkeit zum Blockieren von Estrogen- und HER2/Neu-Rezeptor darstellen [17, 18]. Fulvestrant wirkt als Antagonist des Estrogen-Rezeptors und bildet mit diesem einen instabilen Komplex, der in der vorzeitigen Degradation des Estrogen-Rezeptors resultiert [19]. Weitere Möglichkeiten zur Behandlung richten sich an „Downstream-Targets“ von HER2/Neu- und Estrogen-Rezeptor und betreffen Proteine, die von den genannten Rezeptoren aktiviert werden. Dazu gehören Mitglieder der MAPK-Familie wie MEK und ERK sowie der p38/MAPK Signalweg, welche bei vorliegender Tamoxifen Resistenz aktiviert werden und gezielt inhibiert werden sollen [20]. Auch der PI3K/AKT Signalweg ist als Interaktionspartner des Estrogen-Rezeptors in Tumoren identifiziert [21]. Das Ziel besteht in der Inaktivierung signalübertragender und wachstumsfördernder Moleküle innerhalb der Signaltransduktion. Dazu zählt beispielsweise das Protein mTOR („*mammalian Target of Rapamycin*“), welches

durch Rapamycin aktiviert wird und durch die Behandlung mit Rapamycin Analoga blockiert werden soll. In der Literatur finden sich dazu Hinweise, dass die Verwendung eines Analoga (CCI-779) in präklinischen Studien eine signifikante anti-Tumor Effizienz aufweist, indem es als Antagonist zu Rapamycin wirkt, die Aktivierung von mTOR allerdings verhindert [22], so dass ein proliferationsförderndes Signal ausbleibt. Des Weiteren soll die Verwendung von Rapamycin Analoga in Kombination mit Aromatase Inhibitoren zur Behandlung von Estrogen-Rezeptor negativen Patienten eingesetzt werden. Aromatase Inhibitoren (3. Generation) blockieren das Enzym Aromatase, welches Androgene in Östrogene überführt. Dadurch erfolgt die Hemmung zur Bildung von Östrogenen, so dass ein proliferationsfördernder Reiz für Krebszellen unterdrückt wird [23]. Studien haben gezeigt, dass Aromatase Inhibitoren eine hohe anti-Tumor Effizienz gegenüber Estrogen-Rezeptor negativen Patienten aufweisen [24, 25] und sich durch geringe Toxizität auszeichnen. Eine Zusammenfassung der beschriebenen Wirkstoffe ist Tabelle 1.1 zu entnehmen.

Tabelle 1.1: Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms

Therapieanwendung	ER/HER2 Status der Patientinnen	Wirkungsweise der Substanz
Tamoxifen	ER ⁺	Antagonist des Estrogen-Rezeptors, Inhibition der Proliferation
Trastuzumab (Herceptin [®])	HER2 ⁺	Hemmung des HER2-Rezeptors, Inhibition der Proliferation
Fulvestrant (Faslodex [®])	ER ⁺	Antagonist des Estrogen-Rezeptors, resultiert in Degradation
Aromatasehemmer (Arimidex [®] , Aromasin [®])	ER ⁻ , ER ⁺	Blockade der Östrogenproduktion, Inhibition der Proliferation
Rapamycin Analoga (CCI-779)	ER ⁺	Blockade von mTOR, Inhibition der Proliferation

Die Rolle von Steroidhormonen und deren Rezeptoren spielt für die Behandlung des Mammakarzinoms weiterhin eine enorm wichtige Rolle. Tamoxifen, als traditionelles anti-Estrogen-Rezeptor Medikament, wird weiterhin eine bedeutende Rolle zur Behandlung des Mammakarzinoms spielen, solange Medikamente mit verminderter Toxizität fehlen. Die Ausbildung von Resistenzen vieler Patienten gegen solche Medikamente spielt dabei ebenfalls eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund stellt die Suche nach Substanzen und Zielmolekülen mit erhöhter Sensitivität und vermin-

dernten Nebeneffekten sowie dem Umgehen der Hormonresistenz ein wichtiges Ziel der Forschung dar („*cutting edge*“).

1.2 Die ERBB Familie

Die Kommunikation innerhalb vieler Organismen wird durch ein kompliziertes Signaltransduktionsnetzwerk gewährleistet, welches essentielle Prozesse wie Proliferation, Metabolismus und Differenzierung steuert. Diese Vielzahl an Prozessen muss perfekt aufeinander abgestimmt sein und wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen sowohl intra- als auch extrazellulären Molekülen und Liganden reguliert. Einen wichtigen Kommunikationszweig bilden Membranrezeptormoleküle, die durch Bindung extrazellulärer Moleküle aktiviert werden und diesen Stimulus in die Zelle weiterleiten, welcher letztendlich in der Expression bestimmter Zielgene resultiert [26].

Die Membranrezeptoren der ERBB-Familie sind der Oberfamilie der Tyrosinkinase zugeordnet und sind maßgeblich für die Kommunikation, die zur Entwicklung der Zelle beiträgt, verantwortlich. Dadurch dass Zellen ständig sich ändernden Umweltfaktoren ausgesetzt sind, muss eine Selektion der eintreffenden Signale erfolgen. Aus diesem Grund entwickelte sich in höheren Organismen ein komplexes Netzwerk von Membranrezeptoren, die sich innerhalb der ERBB-Familie in vier Mitglieder unterteilen lassen. Die Rezeptoren ERBB1/HER1, ERBB2/Neu/HER2, ERBB3/HER3 und ERBB4/HER4 erfüllen unter physiologischen Bedingungen Aufgaben, die innerhalb der Zelle mit Proliferation und Differenzierung assoziiert sind und nehmen zudem Einfluss auf die Migration von Zellen sowie der Apoptose [27-29]. Besonderes Interesse erregt der ERBB2/Neu/HER2-Rezeptor, da eine Fehlregulation dessen mit Tumorgenese in Brustgewebe assoziiert ist [30].

1.2.1 Die Rolle der ERBB-Rezeptoren bei der Tumorentstehung und -entwicklung

Für die Entstehung und Entwicklung von Tumoren müssen im Normalfall gewisse Charakteristika erfüllt sein. Eine grundsätzliche Bedingung stellt die Entartung einer Zelle dar, die sich fast ausschließlich in einer Veränderung des Zellzyklus zu Gunsten

der Proliferation sowie der Resistenz gegenüber wachstumsinhibierenden Substanzen widerspiegelt. Gleichzeitig werden Mechanismen aktiviert, die einerseits Apoptose umgehen und andererseits die Angiogenese aktivieren, um Metastasierung und Invasion in umliegendes Gewebe zu gewährleisten [31]. Einen wichtigen Faktor spiegelt ebenfalls die Fehlregulation von Proto-Onkogenen wieder, die das Wachstum von Zellen steuern und fördern. Dazu zählen die Mitglieder der ERBB-Familie, die durch Mutation und Überexpression und damit verbundener Fehlregulation maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt sind. Dabei wurde zuerst eine Variante des ERBB1-Rezeptors entdeckt. Das tumor-induzierende Virus „avian erythroblastosis virus“ enthielt einen ERBB1-Rezeptor, der eine strukturell veränderte Domäne aufwies und durch unkontrollierte Signalübertragung zur Degeneration von Zellen beitrug [32]. Spätere Studien haben allerdings gezeigt, dass alle Mitglieder der ERBB-Familie zu den Proto-Onkogenen zählen, da die Fehlregulation jedes einzelnen Mitgliedes in Zusammenhang mit Krebs gebracht werden kann [4]. Die Komplexität des ERBB-Signal-Netzwerkes ist in Abb. 1.1 dargestellt.

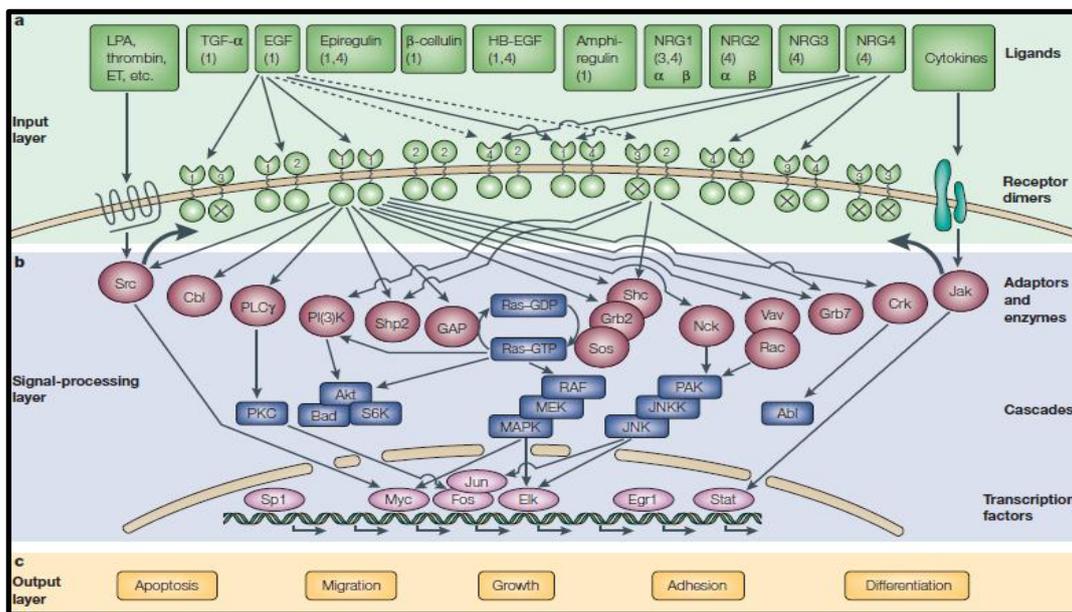


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des ERBB Signaltransduktion Netzwerkes [4]

Eine Vielzahl von Liganden sind in der Lage verschiedene Mitglieder der ERBB-Familie mit unterschiedlicher Affinität zu binden und zu aktivieren. Lediglich für ERBB2 ist nach wie vor kein spezifischer Ligand zur Aktivierung bekannt. Die Interaktion mit den jeweiligen Rezeptoren führt zur Vielzahl von Dimerisierungsmöglichkeiten untereinander (input layer). Dies führt zur intrazellulären Signalübertragung über verschiedene Adapterproteine, was in der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege und der Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren resultiert (Signal processing layer). Die Konsequenz ist ein Einfluss auf essentielle zelluläre Mechanismen wie Apoptose, Migration, Proliferation oder Differenzierung (Output layer)

Eine Überexpression des ERBB1-Rezeptors konnte beispielsweise in Zusammenhang mit Haut-, Brust-, Lungen-, Blasen- und Prostatakrebs gebracht werden.

Mutationen des Rezeptors dagegen wurden mit Glioma-, Lungen- und Brustkrebs in Verbindung gebracht, wobei das Ergebnis stets mit schlechter Prognose und einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert war [33-36]. Eine Überexpression von ERBB2 konnte in verschiedenen Geweben wie Lunge, Pankreas, Darm und Brust ebenfalls in Verbindung mit Tumorgenese gebracht werden und war meist mit schlechter Prognose im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten sowie einem hohen Maß an Grading assoziiert [37]. Der Fokus dieser Arbeit soll auf den Untersuchungen zur Überexpression der onkogenen Variante von ERBB2 liegen.

1.2.2 Die Rezeptortyrosinkinase ERBB2

Das ERBB2 Gen ist beim Menschen auf dem Chromosomen 17q21 lokalisiert und kodiert für ein Transmembranprotein, welches dem EGF-Rezeptor mit einer Homologie von etwa 50% stark ähnelt. Eine Fehlregulation des ERBB2-Gens wird entweder durch eine gesteigerte Amplifikation oder durch das Auftreten einer Punktmutation erreicht. Mutationen des ERBB2-Gens können in einer großen Vielzahl auftreten und daher unterschiedliche Effekte bedingen.

Der Effekt der gesteigerten Aktivität und induzierten Signaltransduktion des ERBB2-Rezeptors, wie er häufig in Brustkrebspatientinnen auftritt, kann auch durch genomische Amplifikation des ERBB2-Lokus in *in vitro* Zellmodellen erzielt werden, wodurch die damit verbundene Überexpression von ERBB2 die Signalweiterleitung steigert. Dieser Befund spielt eine wesentliche Rolle bei der Umbildung von humanen Brustdrüsen. Dieses Gewebe repräsentiert eines der wenigen Gewebe, welches sich hormonell bedingt auch nach der Geburt morphologisch noch stark verändert. Dies gilt für den Zeitraum beginnend mit der Geburt bis zur Vorbereitung der Brust auf die Stillzeit. Der gesamte Zeitraum unterliegt einer strengen und kontrollierten Expression des ERBB2-Rezeptors [38]. Mutationen des ERBB2-Proto-Onkogens führen in nicht wenigen Fällen zur Fehlregulierung der ERBB2-Expression und resultieren in der Tumorgenese und der Entstehung von Brustkrebs.

Eine erste onkogene Variante von ERBB2 wurde aus Ratten isoliert und mit *NeuT* bezeichnet [39]. NeuT ist durch eine Punktmutation in der Transmembrandomäne des Rezeptors charakterisiert, wobei ein Aminosäureaustausch von Valin zu Glu-

taminsäure in der Position 664 stattgefunden hat. Dies resultiert in einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, so dass dies eine ligandenunabhängige Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der ERBB-Familie zur Folge hat [40].

1.2.3 ERBB2-induzierte Signalwege

Die Aktivierung des ERBB2-Signalweges resultiert aus der Heterodimerisierung des ERBB2-Rezeptors mit einem weiteren Vertreter der EGFR-Familie und führt zur Auto-phosphorylierung bestimmter Aminosäuren an der intrazellulären Domäne des ERBB2-Rezeptors. Dadurch werden Adaptorproteine (z.B. GRB2) rekrutiert, die eine SH2 („*Src homology 2*“) oder PTB („*Phosphotyrosine binding*“) Domäne aufweisen [41]. ERBB2-assoziierte Heterodimere aktivieren hauptsächlich drei Signalwege (Abb: 1.2), dazu gehören der PI3K/AKT Signalweg [41-43], die RAS/MAPK Kaskade [41, 42, 44] sowie die Aktivierung von Phospholipase Cγ [45]. In dieser Arbeit wurden sowohl der RAS/MAPK als auch der PI3K/AKT Signalweg näher untersucht, daher sollen diese nachfolgend näher betrachtet werden.

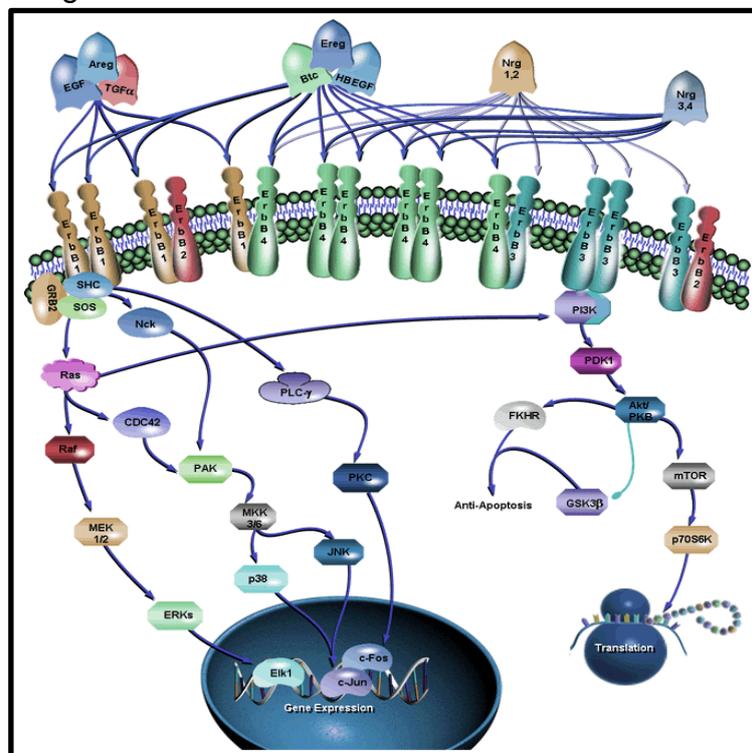


Abbildung 1.2: Zusammenfassung der wichtigsten ERBB2-vermittelten Signalkaskaden

Quelle: www.SABiosciences.com; letzter Zugriff: 20.03.2014

1.2.4 Der RAS/MAPK Signalweg

Die Aktivierung des RAS/MAPK Signalweges (Abb. 1.3) erfolgt über die Interaktion von aktiviertem ERBB2 und dem Adaptorprotein GRB2 [46], wobei GRB2 mit SOS („son of sevenless“) assoziiert und das G-Protein RAS durch Austausch von GDP zu GTP aktiviert [47]. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade erfolgt die Rekrutierung des Proteins RAF zur Zellmembran, welches dort aktiviert wird [48].

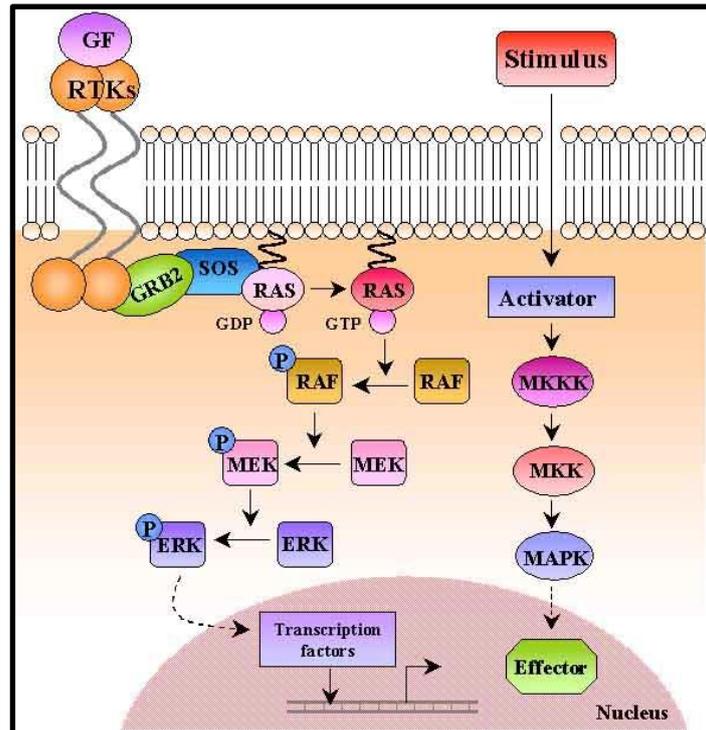


Abbildung 1.3: Zusammenfassung des RAS-MAPK Signalweges [1]

Aktiviertes RAF wiederum phosphoryliert und aktiviert MEK (MAP/ERK Kinase), welches sich durch die Fähigkeit auszeichnet, sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosin Domänen zu phosphorylieren [49, 50]. Durch weitere Phosphorylierung der Aminosäuren Thr202 und Tyr204 des Proteins ERK („extracellular signal-regulated kinase“) setzt sich die Signalkaskade fort. Durch die dadurch induzierte Dimerisierung von ERK, wird dieses in den Zellkern transloziert [51] und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren wie c-MYC oder c-JUN [52, 53], welche die Progression des Zellzyklus vermitteln, eines der Hauptaufgaben des aktivierten RAS/MAPK Signalweges.

1.2.5 Der PI3K/AKT Signalweg

Eine weitere durch ERBB2 aktivierte Signalkaskade stellt der PI3K/AKT Signalweg dar (Abb. 1.4), wobei aktiviertes ERBB2 an der intrazellulären Domäne von der

katalytischen Untereinheit p85 der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) gebunden wird, wodurch es zur allosterischen Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110 der PI3K kommt [28, 41]. Aktiviertes PI3K führt zur Phosphorylierung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). Dieser Prozess induziert die Akkumulation von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) [46, 54]. Eine weitere wichtige Aufgabe von PI3K besteht in der Vermittlung der Translokation der PDK-1 (Phosphatidyl-inositol-dependent kinase) und der PKB/AKT zur Zellmembran.

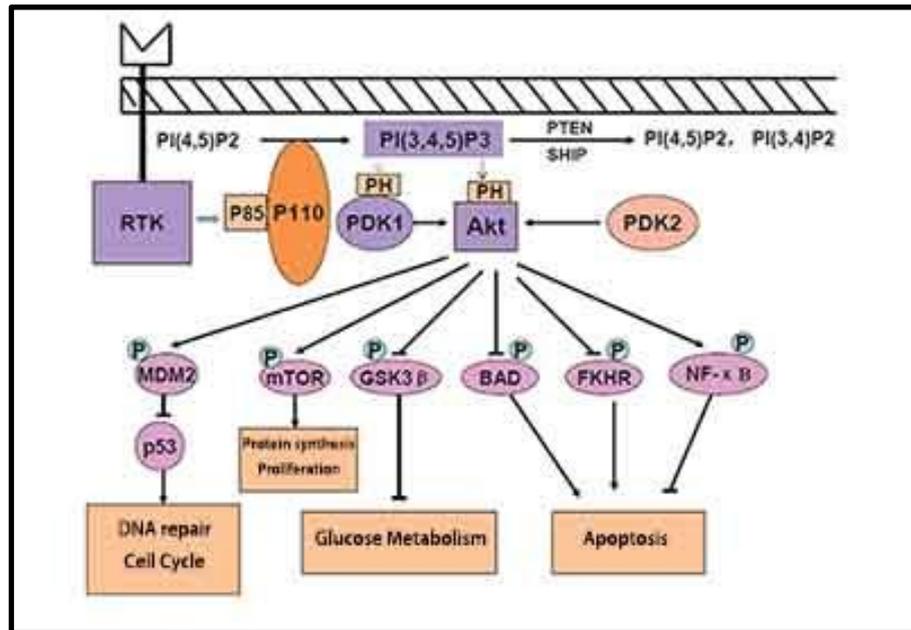


Abbildung 1.4: Zusammenfassung des PI3K/AKT Signalweges

Quelle: <http://www.assay-protocol.com/cell-biology/PI3KAkt>

letzter Zugriff: 22.03.2014

Dort kommt es zur zweifachen Phosphorylierung von AKT an den Aminosäuren Thr308 durch die katalytische Domäne der PDK-1 sowie Ser473 durch eine weitere PDK. Beide Phosphorylierungsschritte resultieren in der Aktivierung von AKT [54]. Die vollständige PI3K/AKT Aktivierung führt zur Vermittlung eines anti-apoptischen Signals in der Zelle, welches durch die Aktivierung des IKK-Komplexes (I κ B-Kinase) und der Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B („*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“) verstärkt werden kann, da NF- κ B Apoptose blockiert [55]. Vor diesem Hintergrund ist zu beachten, dass die Aktivierungsstärke des PI3K-aktivierten AKT-Signalweges über verschiedene Phosphorylierungsstellen moduliert werden kann. Während ERBB3 multiple Bindungsstellen für die katalytisch aktive Untereinheit p85 der PI3K aufweist und die AKT Kaskade höchst effizient aktivieren kann, gilt dies nicht für ERBB2 [56, 57].

1.3 Onkogen-induzierte Seneszenz

Nicht nur die gezielte Suche nach neuen Therapeutika und Zielmolekülen allein spielen eine bedeutende Rolle in der Tumorforschung. Auch das Phänomen der zellulären Seneszenz muss in Zusammenhang mit der Tumorgenese gebracht werden und soll daher näher erläutert werden.

Die zelluläre Seneszenz wurde erstmals durch die Forscher Hayflick und Moorhead im Jahre 1961 beschrieben. Untersuchungen mit primären humanen Fibroblasten zeigten, dass diese die Eigenschaft von unendlicher Zellteilung verloren haben [58]. Viele weitere Studien haben aufgezeigt, dass der der Seneszenz zu Grunde liegende Mechanismus in der Verkürzung der Telomere zu finden sei. Dieser Typ der Seneszenz wurde als replikative Seneszenz beschrieben und von Campisi *et al.* (2007) als ein „fail-safe“ Mechanismus interpretiert, der die weitere Replikation von alternden Zellen verhindert [59].

Studien von Serrano *et al.* (1997) zeigten erstmals in normalen Fibroblasten, dass die Expression des Onkogens H-RASG12V ebenfalls Seneszenz auslöste [60]. Dieser Prozess wurde zwei Jahre später durch Untersuchungen in humanen Fibroblasten von Wei *et al.* (1999) als telomer-unabhängiges Ereignis beschrieben [61]. Viele Studien haben derweil gezeigt, dass onkogen-induzierte Seneszenz durch eine Vielzahl von Onkogenen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (z.B. TGF β , c-MYC, N-RASG12D) und Tumorsuppressoren (z.B. p53, p16, p27) induziert werden kann [62]. Durch die Beteiligung der verschiedenen Onkogene an der Induktion zellulärer Seneszenz sind verschiedenste essentielle Signalwege der Zelle involviert. Dazu zählen neben DNA-Reparaturmechanismen und Zellzyklusregulation auch Immunantworten und metabolische Prozesse [62]. Grundsätzlich wird onkogen-induzierte Seneszenz allerdings als anti-Tumor Barriere interpretiert, die verhindern soll, dass entartete Zellen weiterhin repliziert werden und die Tumorprogression fördern. Einen Überblick über Mechanismen zur Induktion von onkogen-induzierter Seneszenz soll Abbildung 1.5 geben.

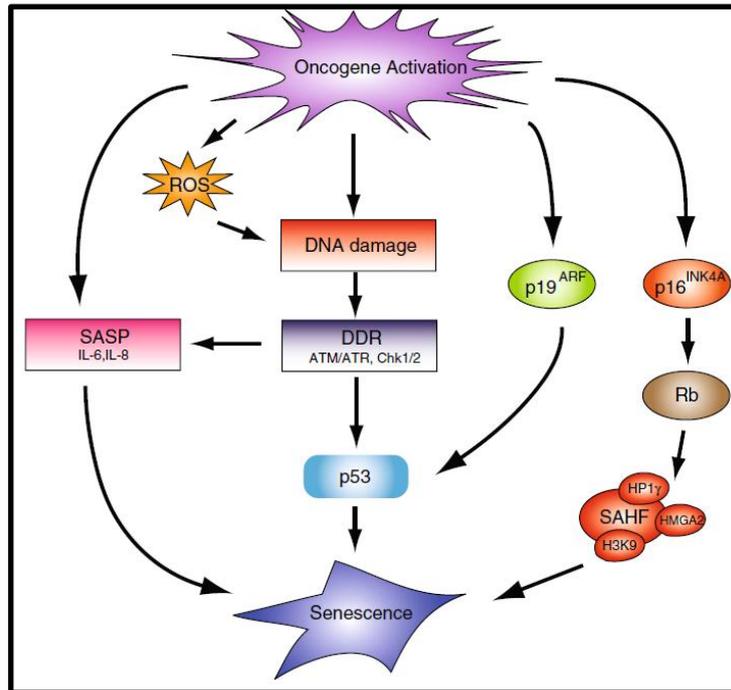


Abbildung 1.5: Mechanismen zur Induktion onkogen-induzierter Seneszenz [5]

Onkogener Stress resultiert in der Aktivierung vieler zellulärer Signalwege. Die durch onkogenen Stress ausgelöste Hyperreplikation führt zur Akkumulation von DNA Schäden, die seinerseits die „DNA damage response“ (DDR) aktiviert, welche in der Rekrutierung des Tumorsuppressors p53 resultiert und Seneszenz vermittelt. Dieser kann gleichzeitig durch p19^{ARF} aktiviert werden. Onkogener Stress führt zusätzlich zur Akkumulation von ROS, welche wiederum einen Beitrag zur gesteigerten Menge an DNA Schäden leisten und die DDR steigern können. Die Aktivierung des p16^{INK4A}-Rb Tumorsuppressors induziert die Bildung der seneszenz-assoziierten Heterochromatinzentren (SAHF), welche zum einen als Seneszenzmarker fungieren und andererseits die Expression Zellzyklus-assoziiierter Gene verringern. Die Sekretierung von Zytokinen (IL-6, IL-8), die ihrerseits Seneszenz induzieren können, beschreiben einen weiteren Mechanismus der onkogen-induzierten Seneszenz.

In der Literatur sind viele Charakteristika von Seneszenz beschrieben. Dazu zählen vor allem morphologische Veränderungen der Zellen, die durch eine Vergrößerung und einer Abflachung der zellulären Struktur charakterisiert sind [59]. Dazu zählt beispielsweise die Seneszenz-assoziierte Expression des Enzyms β -Galaktosidase [63], die zum ersten Mal von Dimitri *et al.* (1995) beschrieben wurde.

1.3.1 Die Rolle der Seneszenz in der Tumorgenese

Tumorgenese beschreibt einen mehrstufigen Prozess, der eine Vielzahl von Mutationen in Onkogenen beinhaltet, die nicht mehr durch zelluläre Reparaturmechanismen (DNA Reparatur) oder Apoptose kompensiert werden können. Die Initiation der Tumorgenese impliziert das Vorhandensein vieler Mutationen von Genen, die mit der Regulation von Zellzyklus und Zellproliferation assoziiert sind [31]. Seneszenz beschreibt dagegen einen Tumorsuppressionsmechanismus, der durch Akkumulation

von DNA Schädigung, oxidativen Stress (ROS) oder die Aktivierung von Onkogenen initiiert wird und die Zelle vor Proliferation und einer damit verbundenen malignen Transformation schützt. Vor diesem Hintergrund wird Seneszenz als „fail-safe“ Mechanismus beschrieben, der vor unkontrollierter Zellteilung und der Entartung sowie Progression von Tumoren schützt [64-67]. Nach den Pionierarbeiten von Hayflick und Moorhead auf dem Gebiet der Seneszenz haben viele Studien gezeigt, dass nicht nur vereinzelte Onkogene Seneszenz induzieren können, sondern ganze Signalwege als Initiator von Seneszenz gelten können. Ein prominentes Beispiel bildet der RAS/RAB/MEK Signalweg, der in vielen Publikationen als Auslöser von vorzeitiger Seneszenz beschrieben ist [68-71]. Maus Modelle, in denen onkogenes RAS exprimiert wurde, haben gezeigt, dass seneszente Zellen in verschiedenen Organen aufzufinden sind. Dazu gehören neben der Brust [72], der Milz [73], der Lunge [74] auch die Bauchspeicheldrüse [75]. Das Auffinden von seneszenten Zellen in prä-malignen Läsionen und benignen Geweben konnte daher in einer Vielzahl von Studien zum einen durch Aktivierung von Onkogenen und zum anderen durch Inaktivierung von Tumorsuppressoren sowohl in humanen Zellen als auch im Maus Modell bestätigt werden. Das gleichzeitige Fehlen seneszenter Zellen in malignen Tumoren bekräftigt die Bedeutung der onkogen-induzierten Seneszenz als Tumorsuppressionsmechanismus zur Verhinderung der Proliferation von Zellen mit onkogenen Mutationen. Das Versagen des Mechanismus in malignen Tumoren wird durch die Deletion bzw. Inaktivierung von Seneszenzregulatoren (Kapitel 1.3) erklärt und bestätigt den kausalen Zusammenhang zwischen dem Verlust des Seneszenzmechanismus und maligner Transformation [76-78].

Paradoxerweise dient Seneszenz nicht allein dem Schutz vor Tumorgenese, sondern kann diese sogar selbst *in vivo* und *in vitro* über sekretorische Signalwege durch Ausschüttung von Zytokinen (z.B. IL-6 und IL-8) fördern. Dieser Effekt wird als „*Senescence-associated secretory phenotype*“ (SASP) bezeichnet. Durch Ausschüttung von Zytokinen werden Nachbarzellen beeinflusst, die ihrerseits durch Proliferation die Tumorprogression steigern können. Unter diesem Gesichtspunkt muss das Phänomen der Seneszenz stets kritisch betrachtet werden. Zum einen kann Tumorgenese durch den Eintritt in die Seneszenz zwar verhindert werden, zum anderen werden diese Zellen jedoch nicht durch Apoptose degradiert und zeichnen sich daher

durch einen veränderten (sekretorischen) Phänotyp aus. Ziel sollte es daher sein, gezielt seneszente Zellen durch Stimulation von Apoptose zu beseitigen.

Dennoch bietet die Seneszenz als Mechanismus der Tumorsuppression ein attraktives Ziel für therapeutische Anwendungen im Zusammenhang mit Krebs, zumal bereits gezeigt werden konnte, dass chemische Therapeutika sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Seneszenz induzieren konnten [68, 69, 79-81]. Gleichzeitig zeigten Biopsien von Patienten mit Brust-, Lungen- und Prostatakrebs nach Erhalt der Chemotherapie signifikante Anzeichen von seneszenten Zellen innerhalb der Tumoren [80, 82, 83]. Diese Befunde sollten Grund genug sein, die Entwicklung von neuartigen, effizienteren Therapeutika zur Bekämpfung von Tumoren voranzutreiben und bilden daher die Grundlage der sogenannten „*Therapy-Induced senescence*“ (TIS).

1.3.2 Das MCF-7/NeuT Zellsystem als Modell für onkogen-induzierte Seneszenz

Das Proto-Onkogen HER2/Neu (HER2: „*Human epidermal growth factor receptor 2*“) gehört zur Familie der EGF-Rezeptoren und wird in 15-30% aller Brustkrebstumoren überexprimiert [30]. Die gesteigerte Expression von ERBB2 („*Epidermal growth factor receptor 2*“) ist bei Brustkrebspatienten mit schlechter Prognose und einer frühen Metastasierungsrate und verminderter Gesamtüberlebensdauer assoziiert. Die Verwendung des Tetrazyklin-basierten Expressionssystems, das eine durch Doxyzyklin induzierbare Expression von ERBB2/NeuT erlaubt, konnte bereits zeigen, dass diese in MCF-7 Zellen zum Zellzyklusarrest führt. Gleichzeitig erfolgte die Rekrutierung und Aktivierung des Zyklin-abhängigen Inhibitors p21, der einen wichtigen Mediator zellulärer Seneszenz darstellt [3, 84, 85]. Die MCF-7/NeuT Zelllinie wurde bereits von Trost [84],[86] generiert. Die verwendeten Vektoren sind in Abb. 2.1 beschrieben, die genaue Beschreibung der Vorgehensweise zur Generierung findet sich unter [3] und [86]. Aus diesem Grund kann das MCF-7/NeuT Zellmodell idealerweise zur Untersuchung von Seneszenz und ERBB2-vermittelter Onkogen transformation verwendet werden, da ca. 90% der Zellen nach Doxyzyklin Behandlung den Übergang in die Seneszenz vollziehen.

1.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt eine Stoffwechselsituation, bei der das Gleichgewicht von Pro- und Antioxidantien zu Gunsten der Prooxidantien verschoben ist. Dabei wird eine erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoff bzw. Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS) gebildet und die Homöostase eines Lebewesens durch fehlende Detoxifizierung negativ beeinflusst. Normale Zellen eines Organismus besitzen die Fähigkeit sowohl oxidierende als auch reduzierende Moleküle durch eine Vielzahl von Mechanismen zu detoxifizieren und neutralisieren. Sind Reparatur- und Entgiftungsmechanismen nicht mehr in der Lage eine gesteigerte Menge von Prooxidantien zu detoxifizieren, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet.

Oxidativer Stress spielt bei der Modulation vieler physiologischer Prozesse aerober Lebewesen eine essentielle Rolle, kann aber bei exzessiver Generierung von ROS bzw. RNS zu Veränderungen führen, die mit einer Vielzahl an Krankheiten assoziiert sind. Das Interesse an der Erforschung reaktiver Sauerstoffspezies stieg zu Beginn des 20. Jahrhunderts, nachdem McCord und Fridovich das erste ROS-detoxifizierende Enzym, die Superoxiddismutase, entdeckt hatten. Viele Untersuchungen und Studien brachten ROS anschließend in Zusammenhang mit der Induktion von Signaltransduktionswegen, Inflammation, Apoptose, Proliferation, Angiogenese sowie dem natürlichen Prozess des Alterns [87]. Gleichzeitig zeigten viele Publikationen, dass oxidativer Stress mit einer Vielzahl physiologischer Veränderungen verknüpft ist. Dazu zählt der Pathomechanismus neurodegenerativer Krankheiten wie Parkinson, Epilepsie und Schlaganfall [88-91]. Die Akkumulation von ROS spielt auch in der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck [92, 93] sowie Diabetes mellitus [94] eine bedeutende Rolle. Oxidativer Stress kann grundsätzlich sowohl durch exo- als auch endogene Stimuli ausgelöst werden. Abbildung 1.6 liefert eine Zusammenfassung für Quellen reaktiver Sauerstoffspezies.

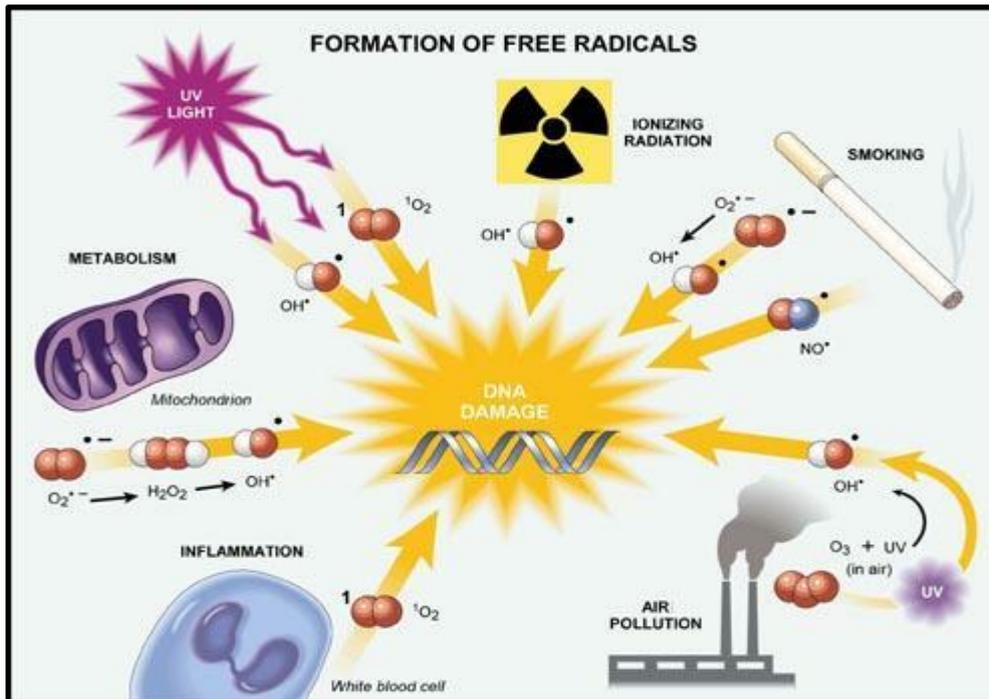


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung für Quellen reaktiver Sauerstoffspezies
 Quelle: <http://www.vet.cornell.edu/news/radicals.cfm>, letzter Zugriff: 24.03.2014

Zu exogenen Stimuli zählen neben ionisierender und UV-Strahlung auch einige Medikamente, Herbizide oder Insektizide und sind daher mit Umweltfaktoren verknüpft, denen wir permanent ausgesetzt sind. Bei aeroben Lebewesen stellt die Gewinnung von Energie einen permanenten, endogenen Induktor von oxidativen Stress dar. Durch mitochondrialen Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung zur zellulären Energiegewinnung werden permanent ROS generiert, allerdings durch antioxidative Mechanismen größtenteils wieder neutralisiert. Gleichzeitig können auch Onkogene eine bedeutende Rolle bei der Generierung von ROS spielen. Häufig führt dabei die Aktivierung von Onkogenen wie z.B. RAS zur Akkumulation von ROS [95, 96].

Im Falle einer Störung der sogenannten Redox-Homöostase zu Gunsten der Prooxidantien können unter Bedingungen von oxidativen Stress eine Vielzahl zellulärer Makromoleküle durch die Akkumulation von ROS geschädigt werden. Dazu zählen neben DNA und RNA auch Proteine und Lipide. Freie Radikale sind in der Lage, mehrfach ungesättigte Fettsäuren von Membranstrukturen direkt anzugreifen, wodurch es zur Lipidperoxidation kommt. Dies hat eine Veränderung der Membranstruktur zur Folge, welche zu einer Verringerung der Membranfluidität führt und gleichzeitig die Funktion membrangebundener Proteine und Transporter einschrän-

ken kann [97]. Gleichzeitig werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren aufgrund oxidativer Schädigung zu einer Vielzahl von Produkten degradiert. Eines dieser Produkte stellt die Molekülgruppe der Aldehyde dar, die einerseits eine hohe Halbwertszeit aufweisen und andererseits sehr reaktiv sind und daher Proteine weit entfernt vom eigentlichen Entstehungsort schädigen können (sekundäre Toxizität) [97]. Einen weiteren Effekt von ROS stellt die Modifikation von DNA Basen sowie deren Zuckerresten dar. Einzel- und Doppelstrangbrüche im DNA-Rückgrat führen zur Ausbildung von DNA Basen- und Zuckeraddukten mit anderen Molekülen („cross-linking“) und verhindern die Replikation der DNA [98, 99]. Besonders die Oxidation von redox-sensitiven Proteinen zeigt große Auswirkungen auf die Zelle, da Proteine an einer Vielzahl metabolischer, signalübertragender und transkriptioneller Prozesse beteiligt sind. Proteine können durch Oxidation von Sulfhydrylgruppen (Thiole), oxidative Addition von Aminosäureresten neben Bindestellen von Metallionen im katalytischen Zentrum, Reaktionen mit reaktiven Aldehyden und „cross-linking“ mit anderen Proteinen, modifiziert werden. Dadurch kann ihre Funktionalität eingeschränkt oder vollständig aufgehoben werden. Besonders Thiolgruppen cystein-haltiger Proteine werden bevorzugt oxidiert.

Zelluläre Schädigungen durch oxidativen Stress wären ohne entsprechende Entgiftungs- und Reparaturmechanismen letal für einen Organismus, da sowohl fehlerhafte Zellmembranen, fehlregulierte Proteine als auch die Blockade der DNA Replikation zur Generierung von Mutationen und damit zum Untergang des Organismus führen [100]. Aus diesem Grund sind zelluläre, antioxidative Schutzmechanismen essentiell und von besonderer Bedeutung.

1.4.1 Oxidativer Stress in Krebs

Viele Studien haben gezeigt, dass ROS eine bedeutende Rolle in der Tumorentwicklung spielen können [101, 102], indem sie zur Schädigung von DNA, Lipiden und Proteinen führen können. Diese stehen wiederum im Zusammenhang mit Chromosomen Instabilität, genetischer Mutation und Modulation des zellulären Wachstums. Weitere Studien haben außerdem gezeigt, dass eine Akkumulation von ROS zur Steigerung der Signaltransduktion und Überexpression von Schlüssel-Transkriptionsfaktoren wie NRF-2 und NF- κ B führen kann [103, 104], welche die

Zellproliferation als bedeutenden Faktor der Tumorgenese steigern [105]. Bei der Entstehung von ROS muss allerdings zwischen exo- und endogenen Stimuli unterschieden werden. Die endogene Produktion von ROS erfolgt hauptsächlich in Mitochondrien und Peroxisomen. Durch den Elektronentransport innerhalb der Mitochondrien zur Generierung eines Protonengradienten und letztendlich zur Produktion von ATP, werden sowohl an Komplex 1 als auch Komplex 3 eine große Menge Superoxidanionen produziert [106]. Superoxidanionen sind kurzlebige Radikale, die Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α modulieren. HIF-1 α steuert eine Vielzahl zellulärer Prozesse, inklusive Angiogenese und Proliferation, die auch bei der Tumorentstehung- und -entwicklung von enormer Bedeutung sind [107]. Hinweise in der Literatur haben einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen ROS Produktion und der Entstehung von Tumoren beschrieben [108, 109], ohne dabei jedoch einen Mechanismus aufzuklären. Dies ist womöglich damit zu erklären, dass die ROS Produktion in Mitochondrien sowohl spezies- als auch gewebeabhängig ist [110, 111]. Allerdings konnte mehrfach gezeigt werden, dass die ROS Generierung in Tumoren deutlich über der von gesunden Zellen liegt [112]. Eine weitere Quelle zur Generierung von ROS bilden Peroxisomen in eukaryotischen Zellen. Durch den Abbau von Ethanol und die β -Oxidation von Fettsäuren verbrauchen Peroxisomen einen großen Anteil an Sauerstoff und tragen zum Anstieg von ROS bei. Obwohl Peroxisomen antioxidative Enzyme (Katalase, Glutathion Oxidase, Peroxiredoxin 1) besitzen [113, 114], übersteigt die ROS Produktion in Form von Wasserstoffperoxid und Superoxidanion die der erzeugten Menge durch Acetyl-CoA Oxidase und Xantinoxidase [115]. Vor diesem Hintergrund konnte in der Rattenleber ein kausaler Zusammenhang zwischen der proliferations-induzierten ROS Akkumulation in Peroxisomen und der Entstehung von Tumoren durch halogenierte Lösungsmittel bzw. Phthalate aufgezeigt werden [116-118]. Ein weiteres Beispiel für ein humanes Kanzerogen stellt ionisierende Strahlung dar und kann sowohl bei der Entstehung, Förderung als auch Entwicklung der Tumorgenese beteiligt sein. Dies gilt sowohl für verschiedene Spezies als auch für sämtliche Organe [119-121]. Das Spektrum der zellulären Schädigung durch ionisierende Strahlung reicht dabei von DNA-Schäden, Induktion der Apoptose, Genmutation bis zur Entstehung von Krebs [122] und geht mit einer Akkumulation und Vermittlung durch ROS einher [122-124]. Letztendlich haben Mutationsstudien gezeigt, dass meist die chronische Exposition von oxidativen Stress aufgrund einer chronischen Immunantwort mit Karzinogenese assoziiert ist

[125]. Während oxidative DNA Schäden durch Aflatoxin B-induzierte p53 und RAS Mutation Leberkarzinogenese induzierte [126], zeigte DNA Oxidation durch UV-Exposition bei Mäusen und Menschen die Entstehung von Hautkrebs auf [127]. Zusätzlich konnte in Ratten gezeigt werden, dass die Tumorsuppressorgene p15^{INK4B} und p16^{INK4A} durch ROS moduliert werden und es dadurch zur Entstehung eines renalen Karzinoms kommt [128]. Die genannten Beispiele unterstreichen die bedeutende Rolle von oxidativen Stress bei der Entstehung, Förderung und Entwicklung der Karzinogenese. Aus diesem Grund spielen antioxidativ wirkende Schutzmechanismen einerseits eine bedeutende Rolle für das Überleben der Zelle, andererseits bieten sie im Zusammenhang mit der Tumorgenese einen interessanten Angriffspunkt zur Therapie. Insbesondere das Auftreten von Resistenzen hinsichtlich Estrogen- und HER2-Rezeptor gerichteter Medikamente erfordert neue Angriffspunkte zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten. Dazu zählen auch antioxidativ wirkende Mechanismen wie das Thioredoxinsystem, die zur Aufrechterhaltung des reduzierenden Milieus in der Tumormikroumgebung beitragen und Tumoren einen Überlebensvorteil bieten.

1.4.2 Das Thioredoxinsystem als antioxidativer Schutzmechanismus vor oxidativen Stress

Das Thioredoxinsystem, welches sich aus Thioredoxin Reduktase, Thioredoxin und TXNIP (Thioredoxin-Interacting Protein) zusammensetzt, bildet einen Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung des reduzierenden Milieus innerhalb einer Zelle sowie der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zum Schutz der Zelle. Thioredoxin existiert in zwei unterschiedlichen Isoformen, Trx1 und Trx2, welche einerseits im Zytoplasma und Nukleus (Trx1) und andererseits in Mitochondrien (Trx2) exprimiert werden [129]. Thioredoxine gehören zur Familie der Proteine, die ein konserviertes Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys Motiv aufweisen und besitzen ein Molekulargewicht von 10–12 kDa. Ihre katalytische Aktivität besteht in der Wechselwirkung mit Disulfidbrücken und freien Thiolen weiterer Proteine, wobei diese dadurch reduziert werden und Thioredoxin selbst oxidiert wird [130-132]. Die Existenz zweier Isoformen lässt darauf schließen, dass das ubiquitär exprimierte Trx1 andere Aufgaben übernimmt als das in Mitochondrien lokalisierte Trx2. Grundsätzlich konnte allerdings gezeigt werden, dass ein homozygoter Knockout von entweder

Trx1 oder Trx2 letal bei Mäusen ist [132, 133] und beide Isoformen daher essentielle Proteine für das Überleben darstellen [134-136]. Für die Funktionalität des Thio-redoxinsystems spielt die Interaktion mit TrxR und TXNIP eine wesentliche Rolle. Durch die antioxidative Wirkung von Trx wird dieses selbst oxidiert, kann aber von TrxR unter Verbrauch von NADPH als Elektronendonator wieder in den reduzierten Zustand überführt werden. Dabei fungiert das selen-abhängige Enzym TrxR als Elektronentransporter, indem es katalytisch aktive Thiole von Trx reduziert, das aktive Selenzentrum von TrxR aber gleichzeitig oxidiert wird. TXNIP dagegen fungiert als endogener Trx Inhibitor, indem es reduziertes Trx bindet und ein gemischtes Disulfid bildet. Der inhibitorische Effekt von TXNIP auf Trx konnte bereits in vielen Zelltypen *in vitro* bestätigt werden [137-139], jedoch nicht ausnahmslos bei *in vivo* Experimenten [140, 141]. Eine Übersicht hinsichtlich der Aufgaben des Thioredoxinsystems ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

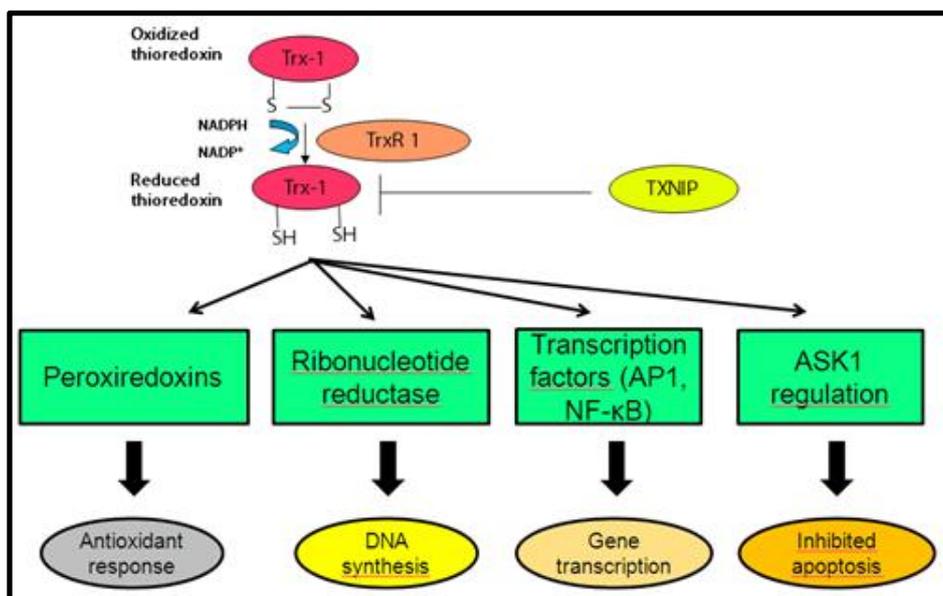


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der unterschiedlichen regulatorischen Aufgaben des Thioredoxinsystems

Die Fähigkeit von Trx mit anderen katalytisch aktiven Thiolen zu interagieren (Abb. 1.8) und diese in Folge von Oxidation durch Sauerstoff- und Stickstoffradikale wieder zu reduzieren, zeigt die besondere und wichtige Bedeutung des Thioredoxinsystems für die Zelle zum Schutz vor oxidativen Stress [142].

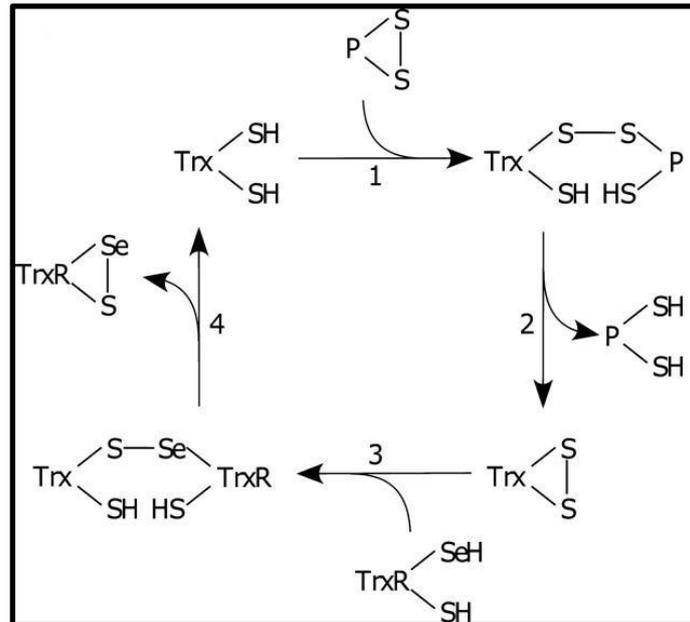


Abbildung 1.8: Wechselwirkung katalytisch aktiver Thiolgruppen von Trx mit oxidierten Proteinen [2]

Katalytisch aktives (reduziertes) Trx interagiert mit oxidierten Proteinen, indem es durch Elektronentransfer deren Disulfidbrücke aufbricht und eine eigene Disulfidbrücke mit dem Protein ausbildet (1). Im zweiten Schritt erfolgt ein weiterer Elektronentransfer, der zur vollständigen Oxidation des Trx und zur Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke führt, während beide Thiolgruppen des Interaktionspartners vollständig reduziert vorliegen (2). Durch die kovalente Bindung an das katalytisch aktive Selenzentrum von TrxR (3) erfolgt abschließend die Reduktion von Trx in den katalytisch aktiven Zustand und die Oxidation von TrxR (4).

Neben antioxidativen Eigenschaften zeigt das Thioredoxinsystem ein weitreichendes Funktionsspektrum auf (Abb. 1.7). TrxR und Trx wirken beispielsweise bei der DNA Synthese als Elektronendonator und dadurch als Kofaktor zur Deoxyribonukleotidsynthese, die für die DNA Synthese und Zellproliferation essentiell ist [143]. Gleichzeitig spielt es bei der Stimulation der zellulären Angiogenese eine wichtige Rolle. Studien haben dabei gezeigt, dass die Transfektion verschiedener Zelllinien, darunter humane MCF-7 Brustkrebszellen und HT29 Darmkrebszellen sowie WEH17.2 Lymphomzellen aus der Maus, mit humanen Thioredoxin einen signifikanten Anstieg des VEGF („*Vascular endothelial growth factor*“) zur Folge hatte [130]. Der Thioredoxin induzierte Anstieg der VEGF Expression wurde außerdem mit einer gesteigerten Tumorangio-genese in Zusammenhang gebracht, so dass Trx auch mit der Entstehung von Krebs assoziiert ist [130]. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Exposition mit Trx das Wachstum von Lymphozyten, Fibroblasten und einer Vielzahl von Leukämie- und stabilen Tumorzelllinien förderte [144, 145], während eine inaktive Trx Mutante (Cys^{32, 35} -> Ser^{32, 35}) keinen Einfluss auf das Wachstum zeigte. Der Mechanismus des wachstumsfördernden Effekts von

Trx ist zwar weiterhin unklar, scheint aber in Zusammenhang mit einer gesteigerten Produktion von Zytokinen (IL-1, IL-2, TNF α) zu stehen [144].

Weitere Aufgaben des Thioredoxinsystems sind in der Stimulation von Transkriptionsfaktoren und der Interaktion mit anderen Proteinen zu finden. Trx erhöht unter anderem die Affinität einiger Transkriptionsfaktoren zur DNA und steigert damit die Expression verschiedener Gene. Bekannte, durch Trx aktivierte Transkriptionsfaktoren sind AP-1, AP-2, NF- κ B sowie nukleäre Rezeptoren und der Estrogen-Rezeptor [146]. Am Beispiel von NF- κ B erfolgt die Aktivierung durch die Reduktion des Cysteins an der Position 62 der p50 Untereinheit, welche eine anschließende Bindung an die DNA erlaubt und dadurch die Genexpression beeinflusst [147].

Durch die Fähigkeit, zelluläre Proteine zu binden, ist Trx in der Lage, deren biologische Aktivität zu modulieren bzw. Signalwege zu regulieren. Neben NF- κ B bindet Trx auch ASK1 („*Apoptosis signal-regulating kinase 1*“; s. Abb. 1.7), verschiedene Isoformen von Protein kinase C und p40 Phagozyt-Oxidase. ASK1 ist als Aktivator des JNK und p38/MAPK Signalweges charakterisiert und ist essentiell für die TNF α -vermittelte Apoptose [148]. Durch die Bindung von Trx an die N-terminale Domäne von ASK1 wird diese inhibiert, so dass die ASK1-vermittelte Apoptose blockiert wird. Unter Bedingungen von oxidativen Stress führt die Akkumulation von ROS zur Oxidation von Trx, so dass die Interaktion mit ASK1 aufgehoben wird und Apoptose bzw. die Aktivierung der JNK und p38/MAPK Signalwege vermittelt wird [149]. Letztendlich zeigt das Thioredoxinsystem ein vielseitiges Spektrum zum Schutz und der Aufrechterhaltung des Redox-Status der Zelle auf, wird allerdings immer häufiger mit der Entstehung und Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht.

Mögliche Gründe für die gesteigerte Trx Expression können durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Krebszellen sind in der Lage, sich an das hypoxische Milieu in der Mikroumgebung des Tumors anzupassen [150]. Die sauerstoffarme Umgebung führt zur Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, unter anderem HIF1 α , einem Molekül, welches an der Entwicklung von Krebsphänotypen involviert ist, indem es die Expression von VEGF zur Unterstützung der Angiogenese, Transportern des Metabolismus (z.B. GLUT-Transporter, Hexokinase) und Genen zur Aktivierung der Proliferation induziert [150, 151]. Dabei konnte

gezeigt werden, dass eine gesteigerte Trx Expression mit der von HIF1 α korreliert, dies gilt sowohl unter Hypoxie als auch Normoxie [130]. Die Expression von HIF1 α steht im Verdacht Tumoren durch Expression von glykolytischen Enzymen wie Hexokinase einen Überlebensvorteil durch metabolische Adaption in Form einer gesteigerten Glykolyse als Primärenergiequelle zu gewähren [151, 152]. Eine Korrelation der HIF1 α Expression mit der Expression von Hexokinase sowie deren Kolo-kalisation mit nekrotischen, sauerstoffarmen Tumorgewebe erhärten diesen Verdacht. Anhand der gezeigten Beispiele scheint klar, dass Thioredoxin neben der protektiven Aufgabe auch eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese spielt und gilt daher nach wie vor als wichtiger Angriffspunkt für Therapeutika in aggressiv wachsenden Tumoren.

Peroxiredoxine gehören, ebenfalls wie Thioredoxin und Glutathion, zu den essentiellen Proteinen, die zur Aufrechterhaltung der Redox Homöostase innerhalb der Zelle unabdingbar sind. Sie besitzen eine Thioredoxinperoxidase Aktivität und spielen eine wichtige Rolle zum Schutz gegen oxidativen Stress, Altern und Krebs [153, 154]. Studien haben gezeigt, dass Mitglieder der Peroxiredoxinfamilie als sogenannte Auffangmoleküle („Scavenger“) hinsichtlich ROS wirken, dabei selbst oxidiert und von Trx im Rahmen des Recyclingprozesses wieder reduziert werden. Diese Wechselwirkung ist in nachfolgender Abbildung (Abb. 1.9) schematisch dargestellt.

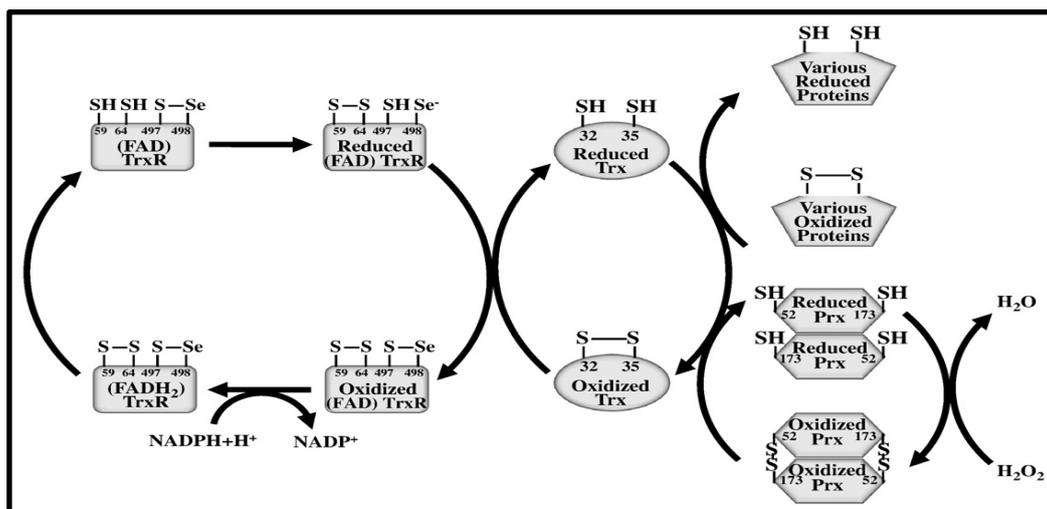


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Trx und Prx
 Quelle: (Day et al., 2012)

Peroxiredoxine stellen damit ein funktional wichtiges Substrat von Trx dar und können infolge von oxidativen Stress hyperoxidiert werden, so dass eine Interaktion

mit Trx nicht mehr möglich ist und das Peroxiredoxinsystem vom Thioredoxinsystem entkoppelt wird. Infolgedessen konzentriert sich die Hauptaufgabe von Trx in der Reparatur durch Oxidation beschädigter Proteine [155-157].

1.5 Zelluläre Degradationsprozesse

Die Gesamtmenge an Proteinen innerhalb einer Zelle wird nicht allein durch die Synthese, sondern auch durch deren Degradation reguliert. Die Lebensdauer von Proteinen kann dabei, abhängig von ihrer Funktion, von einigen Sekunden bis hin zu mehreren Tagen und Wochen stark variieren. Sowohl die rasche Synthese als auch die Degradation spielen für die Zellregulation eine enorm wichtige Rolle, vor allem um rasch auf sich ändernde Umweltbedingungen und äußere Stimuli reagieren zu können. Viele rasch degradierte und kurzlebige Proteine spielen eine übergeordnete Rolle in der Signalübertragung und fungieren als regulatorische Moleküle, wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Gleichzeitig werden fehlerhafte oder beschädigte Proteine erkannt und infolge der fehlerbehafteten Synthese unmittelbar degradiert. Bedingungen von oxidativen Stress resultieren in der Oxidation und Schädigung von Proteinen. Durch antioxidative Schutzmechanismen erfolgen unter Bedingungen von mildem oxidativen Stress die Reduktion und damit die Reparatur geschädigter Proteine. Übersteigt die Schädigung von Proteinen infolge der ROS Akkumulation, wie sie z.B. in der Tumorgenese auftritt, die Kapazität antioxidativ wirkender Schutzmechanismen zur Proteinreparatur, werden Mechanismen aktiviert, die zur Degradation beschädigter Proteine oder Zellbestandteile führen [158, 159]. In eukaryotischen Zellen vermitteln zwei Prozesse, Autophagie (lysosomale Proteolyse) und Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradation, den Abbau von Makromolekülen.

1.5.1 Autophagie

Autophagie beschreibt einen hochgradig konservierten zellulären Degradationsmechanismus, bei dem zytosolische Produkte oder beschädigte Organellen in aus einer Lipiddoppelmembran bestehende Autophagosomen transloziert und anschließend durch Fusion mit dem Lysosomen entweder recycelt oder degradiert werden. Dieser Prozess spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase einer Zelle und schützt sie

gleichzeitig vor Stress, indem schädigende oder beschädigte Makromoleküle entfernt werden. Autophagie spielt daher eine kritische Rolle während der zellulären Entwicklung und Differenzierung und übernimmt außerdem wichtige Funktionen während der Tumorsuppression [151]. Autophagie tritt ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen auf [160] und degradiert nicht nur langlebige Proteine und beschädigte Organellen, sondern wird auch als zelluläre Antwort auf diverse Stressstimuli wie Nährstoffmangel, Hitze oder oxidativer Stress aktiviert [161]. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass oxidativer Stress und die Akkumulation von ROS für die Autophagosomenbildung und damit für den reibungslosen Ablauf der Autophagie verantwortlich sein können, indem essentielle Proteine (Atg4) oxidiert und inaktiviert werden [162]. Atg4 scheint das bisher einzige redox-sensitive Protein innerhalb der Autophagie zu sein und steht daher im Verdacht von katalytischen Proteinen wie Trx reduziert und aktiviert zu werden. Gleichzeitig interagiert Trx mit Proteinen wie ASK1 und PTEN, welche maßgeblich an der Aktivierung essentieller Signalwege zur Induktion von Autophagie (PI3K/AKT) [163] und zur Reifung und Fusion von Autophagosomen mit den Lysosomen (p38 MAPK) [164, 165] beteiligt sind. Eine weitere Aufgabe spielt Autophagie im Prozess der adaptiven Immunantwort und der Eliminierung von invasiven Pathogenen wie Viren, Bakterien oder Parasiten [166]. Autophagie spiegelt einen streng kontrollierten und essentiellen zellulären Prozess wider und ist daher in Folge von Fehlregulationen mit einer Vielzahl von Krankheiten wie Krebs und neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington assoziiert [167-169]. In eukaryotischen Zellen lässt sich Autophagie in drei unterschiedliche Typen unterteilen, dazu gehören Makro- und Mikroautophagie sowie Chaperon-vermittelte Autophagie (Abb. 1.10), wobei sich letztere mechanistisch von den beiden anderen unterscheidet [170, 171]. Makro- und Mikroautophagie implizieren dynamische Membranbewegungen und Neu-Anordnungen, um große Makromoleküle wie beschädigte Organellen zu verschlingen. Während dies bei der Mikroautophagie direkt an der Oberfläche des Lysosoms durch Ausstülpung der Membran geschieht, werden zu degradierende Makromoleküle bei der Makroautophagie komplett von Vesikeln umschlungen. Diese sogenannten Autophagosomen fusionieren nach dem Transport zum Lysosomen mit diesem, so dass der Inhalt des Autophagosomes ins Lysosomen übergeben wird. Die Chaperon-vermittelte Autophagie unterliegt dem direkten Transport von löslichen und

ungefalteten Proteinen in das Lysosomen und ist daher unabhängig von der Ausbildung zusätzlicher Vesikel [172].

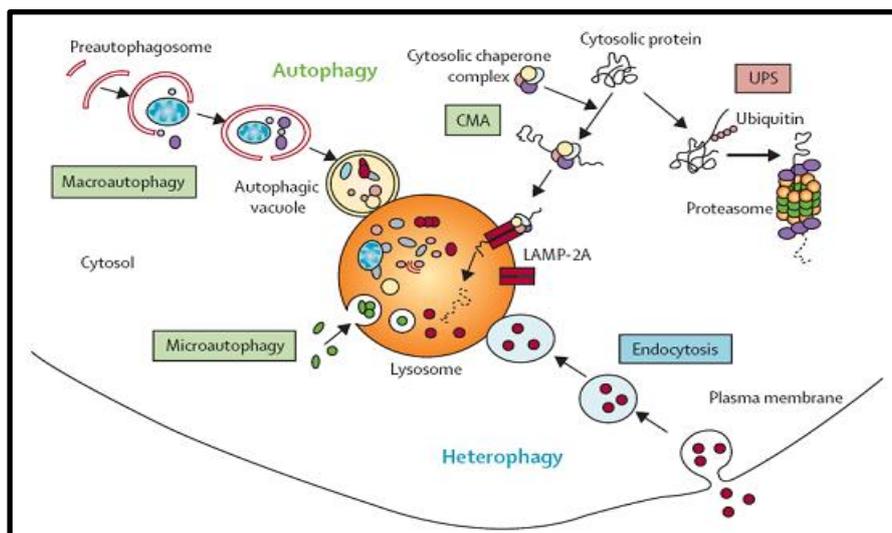


Abbildung 1.10: Grundlegende molekulare Mechanismen der Autophagie in Eukaryoten

Autophagie lässt sich in drei Typen unterteilen; Makro- und Mikroautophagie sowie Chaperon-vermittelte Autophagie. Während Makro- und Mikroautophagie über die Neuordnung von Lipidmembranen im Zytoplasma oder direkt am Lysosomen verläuft, erfolgt Chaperon-vermittelte Autophagie über direkten Transport des zu degradierenden Makromoleküls zum Lysosomen.

Quelle: https://www.mdcb Berlin.de/10987285/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/research/research2, letzter Zugriff: 26.03.2014

Für die zielgerichtete Regulation der Autophagie wurden bisher 31 ATG („*Autophagy-related genes*“) identifiziert, die hinsichtlich ihrer Aufgaben in verschiedene Klassen unterteilt wurden [167, 173]. Dabei sind die bisher bekannten ATG Gene mit der Induktion der Autophagie, der Bildung, Reifung und dem Beladen der Autophagosomen sowie der Fusion mit dem Lysosomen und der Vesikelentleerung verknüpft [167]. Studien in höheren Eukaryoten wie Würmern, Insekten, Pflanzen, Hefe und Säugern haben gezeigt, dass der molekulare Mechanismus der Autophagie und deren Gene nahezu identisch ist [174]. Schlussendlich beschreibt Autophagie einen streng regulierten zellulären Mechanismus zur Degradation beschädigter und langlebiger Proteine, wobei sowohl eine defizitäre als auch exzessive Induktion der Autophagie letal [175, 176] ist und damit eine enorme Bedeutung für das Überleben der Zelle bedingt.

1.5.2 Ubiquitin-vermittelte, proteasomale Proteindegradation

Der Ubiquitin-Proteasom Signalweg stellt in allen Geweben den vorrangigen Degradationsweg intrazellulärer Proteine dar [177]. Beim Proteasom handelt es sich um

einen Multienzymkomplex, der sich in Eukaryoten aus einer 20S und zwei 19S Einheiten zusammensetzt, ein Gesamtmolekulargewicht von ca. 1700 kDa aufweist und sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert ist. Das Proteasom zählt zu den Peptidasen, deren Aufgabe in der Degradation kurz- und langlebiger Proteine sowie in der Qualitätskontrolle prozessierter Proteine besteht. Die 20S Untereinheit weist die Struktur eines hohlen Zylinders auf und ist aus jeweils sieben α (α 1- α 7) und β (β 1- β 7) Einheiten aufgebaut, die insgesamt vier Ringe bilden, wobei die β -Einheiten die beiden inneren und die α -Einheiten die äußeren Ringe bilden. Die 20S Untereinheit fungiert als multikatalytische Protease, wobei die β -Ringe katalytische Aktivität aufweisen und zwischen Kaspase-ähnlicher (Spaltung nach sauren Aminosäuren), Trypsin-ähnlicher (Spaltung nach basischen Aminosäuren) und Chymotrypsin-ähnlicher (Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren) Aktivität unterschieden wird. Die äußeren α -Ringe koordinieren die Substraterkennung und den Substratzugang, da nur entfaltete Proteine die 20S Untereinheit passieren können. Die 19S Untereinheit, welche bei Prokaryoten nicht vorhanden ist, wirken als Deckel über der 20S Untereinheit und sind aus RPN und RPT Proteinen aufgebaut, Während RPN Proteine Ubiquitin-markierte Makromoleküle erkennen und binden, hydrolisieren RPT Proteine ATP zur Energiegewinnung, da proteasomale Degradation einen ATP-abhängigen Prozess darstellt. Metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Cycline und CDK-Inhibitoren stellen dabei Substrate des Proteasoms dar [178-182]. Eine schematische Darstellung der proteasomalen Proteindegradation ist Abb. 1.11 zu entnehmen.

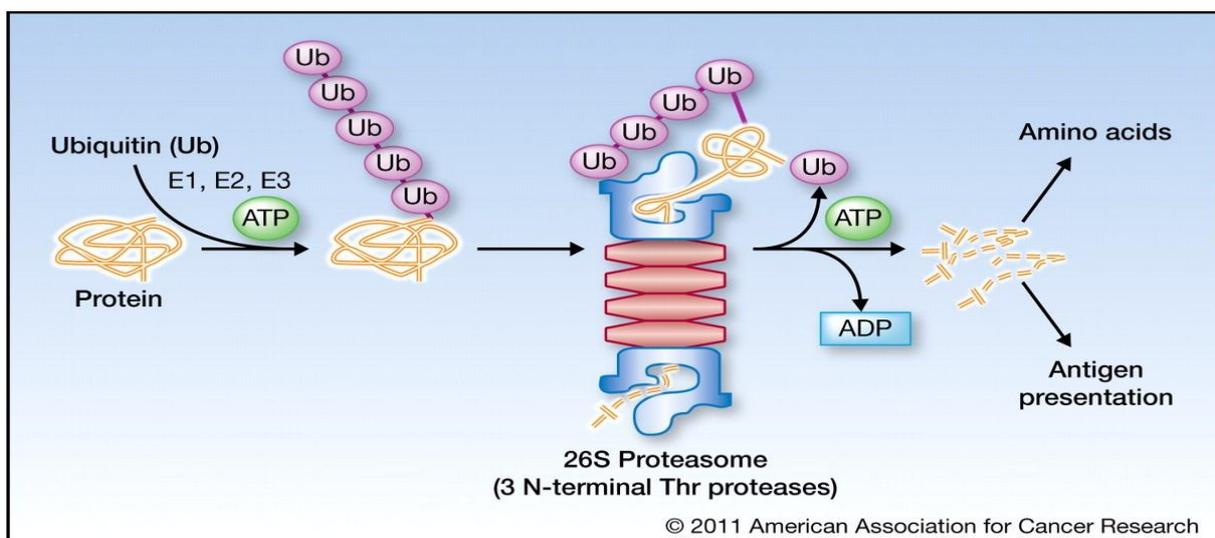


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Proteindegradation [183]

Neben der Autophagie gehört auch der proteasomale Degradationsweg zu den redox-regulierten Recyclingprozessen der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass der Redox Status des 20S Proteasoms eine wichtige Rolle hinsichtlich der Chymotrypsin Aktivität spielt und auch durch Trx reguliert wird. Eine Oxidation des Proteasoms minderte die Aktivität erheblich, während die Zugabe von reduziertem Trx diese annähernd auf das Ausgangsniveau der Kontrollsituation an hob [184]. Diese neuen Erkenntnisse zeigen, dass sowohl Autophagie als auch proteasomale Degradation durch ROS induziert werden können und gleichzeitig redox-sensitive Prozesse sind. Darum sollte ein möglicher Link zwischen antioxidativen Systemen, wie beispielsweise dem Thioredoxinsystem, und Autophagie erforscht werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Relevanz von Redox-Systemen, speziell die des Thioredoxinsystems, im Mammakarzinom zu untersuchen. Antioxidative Systeme liegen bei vielen Krebsarten fehlreguliert vor und liefern einen Beitrag zur Tumorprogression. Daher sind sie als neue Angriffspunkte für Therapeutika zunehmend in den Fokus gerückt.

Es sollte daher in einem ersten Schritt ein Datensatz von Patienten mit nodal-negativem Mammakarzinom untersucht werden, der unter Verwendung eines Affymetrix Gene Arrays generiert wurde. Dabei wurden insgesamt n=788 Patienten, bestehend aus den drei Kohorten Mainz, Rotterdam und Transbig, betrachtet. Das Ziel bestand darin, redox-assoziierte Gene bei HER2-Rezeptor positiven Brustkrebspatienten zu identifizieren, die hoch- bzw. herunterreguliert sind und zudem prognostischen Einfluss im Mammakarzinom besitzen. Der HER2-Rezeptor wird in etwa 25-30% aller Brustkrebspatienten überexprimiert und spielt daher eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Genen und der Tumorprogression. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Mitglieder des antioxidativ wirkenden Thioredoxinsystems gerichtet werden, da die Kontrolle von oxidativen Stress in Tumoren von enormer Bedeutung ist.

Im zweiten Schritt sollte die Relevanz der veränderten antioxidativen Systeme in Brustkrebspatienten unter Verwendung der MCF-7/NeuT Mammakarzinomzelllinie untersucht werden. Dieses Konstrukt erlaubt die induzierbare Expression einer onkogenen Variante des HER2-Rezeptors, welche als NeuT beschrieben ist. Vor diesem Hintergrund sollte der Redox Status der Zellen charakterisiert werden. Ziel war es, den Gesamtlevel an oxidativen Stress sowie dessen Einfluss auf Mitglieder des Thioredoxinsystems zu untersuchen. Gleichzeitig sollte ein möglicher Link zwischen der Veränderung des Redox Status der Zelle und dessen Einfluss auf zelluläre Degradationsprozesse wie Autophagie geknüpft werden. Außerdem sollte mittels Genknock-out Experimenten versucht werden, einen Beitrag zur mechanistischen Aufklärung fehlregulierter Mitglieder des Thioredoxinsystems zu liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2.1.1.1 Allgemeine Laborchemikalien

(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat)	Sigma
1,9-Pyrazoloanthrone	Sigma
2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma
2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-on hydrochlorid	Sigma
Albumin	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	Carl Roth
Arsentrioxid	Sigma
Bafilomycin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Dimethylsulfoxid	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
DMEM, High Glucose, Kulturmedium	PAN Biotech
Doxyzyklin	Sigma
DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)	Sigma
Ethanol	Capitol Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth
Fetal calf serum	PAN Biotech
Fetal calf serum, tetrazyklinfrei	PAN Biotech
Gentamycin	Invitrogen
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth
Insulin	Sigma
Iodessigsäure	Sigma
Isopropanol	Capitol Scientific
Kaliumchlorid	Carl Roth

Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Katalase	Sigma
Lipofectamine RNAiMAX Reagenz	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Carl Roth
MEM NEAA (100x)	Invitrogen
Methanol	Capitol Scientific
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumflourid	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat	Carl Roth
Natriumorthovanadat	Carl Roth
Natriumpyruvat	Sigma
N-Ethylmaleinimid	Sigma
OptiMem (1x)	Life Technologies
Penicilin/Streptomycin	PAN Biotech
Rotenon	Sigma
Succrose	Sigma
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth
trans-1-(4-Hydroxycyclohexyl)-4-(4-fluorophenyl)-5-(2-methoxypyridimidin-4-yl)imidazol	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma
Triton X-100	Carl Roth
Trypsin/EDTA (1x)	PAN Biotech
Tween20	Sigma
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth
Zinkchlorid	Carl Roth

2.1.1.2 Kits

Pierce BCA Assay Kit	Thermo Scientific
Thioredoxin Reduktase Assay Kit	Abcam
TBARS Assay Kit	Cayman Chemical
InnuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena

High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit
Chemicon 20S Proteasom Aktivitäts Assay Kit

Life Technologies
Millipore

2.1.1.3 Antikörper

Tabelle 2.1: Parameter zur Antikörperdetektion für Western Blot

Primär Antikörper	Inkubation	Verdünnung	Sekundär Antikörper	Inkubation	Verdünnung
α-Tubulin	4°C ü/N	1:500 in 5% BSA	Mouse	RT, 60 min	1:5000 in 5% BSA
β-Aktin	RT, 30 min	1:5000 in 5% BSA	Mouse	RT, 20 min	1:5000 in 5% BSA
LC3-II	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p38 MAPK	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p44/42 MAPK	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
AKT	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
Peroxiredoxin 1	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
Peroxiredoxin 2	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
Peroxiredoxin 3	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Mouse	RT, 60 min	1:5000 in 5% BSA
PeroxiredoxinSO ₃	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p-AKT (Ser473)	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
Trx	4°C ü/N	1:500 in 5% BSA	Goat	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA

TrxR	4°C ü/N	1:500 in 5% BSA	Goat	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
TXNIP/VDUP-1	4°C ü/N	1:500 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p-ERK5 (Thr218/Tyr220)	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
ERK5	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
p-MEK1/2 (Thr286)	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
MEK1/2	4°C ü/N	1:1000 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA
Neu	4°C ü/N	1:500 in 5% BSA	Rabbit	RT, 60 min	1:1000 in 5% BSA

2.1.1.3.1 Primärantikörper

α -Tubulin	(sc-8035)	Santa Cruz
β -Aktin	(A5316)	Sigma Aldrich
LC3-II	(2775)	Cell Signaling
p38 MAPK	(9212)	Cell Signaling
p-44/42 MAPK	(4695)	Cell Signaling
AKT	(9272)	Cell Signaling
Peroxiredoxin 1	(8499)	Cell Signaling
Peroxiredoxin 2	(ab59539)	Abcam
Peroxiredoxin 3	(sc-130336)	Santa Cruz
PeroxiredoxinSO ₃	(ab16830)	Abcam
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	(9215)	Cell Signaling
p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	(4377)	Cell Signaling
p-AKT (Ser473)	(9271)	Cell Signaling
p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	(4668)	Cell Signaling
Trx	(ATRX-03)	IMCO
TrxR	(sc-31056)	Santa Cruz
TXNIP/VDUP-1	(403700)	Invitrogen
p-ERK5 (Thr218/Tyr220)	(3371)	Cell Signaling
ERK5	(3372)	Cell Signaling

p-MEK1/2 (Thr286)	(9127)	Cell Signaling
MEK1/2	(9122)	Cell Signaling
Neu	(sc-284)	Santa Cruz

2.1.1.3.2 Sekundärantikörper

Anti-Rabbit IgG1, HRP-linked	(7074)	Cell signaling
Anti-Mouse IgG1, HRP-linked	(7076)	Cell Signaling
Rabbit Anti-Goat IgG, HRP-linked	(sc-2020)	Santa Cruz

2.1.1.4 Primer + Probes

β-Aktin	(QT01680476)	Qiagen
TBP	(QT00000721)	Qiagen
NeuT	(QT00193466)	Qiagen
Thioredoxin 1	(Hs00828652_m1)	Life Technologies
Thioredoxin Reduktase 1	(Hs00917067_m1)	Life Technologies
TXNIP	(Hs00197750_m1)	Life Technologies
UBC	(Hs00824723_m1)	Life Technologies
MAPK1	(Hs01046830_m1)	Life Technologies
MAPK3	(Hs00946872_m1)	Life Technologies
MAP2K1	(Hs01548810_m1)	Life Technologies
MAP2K2	(Hs00360961_m1)	Life Technologies

2.1.1.5 Silencer Select siRNA

Thioredoxin 1 A	(S1)	Life Technologies
Thioredoxin 1 B	(S2)	Life Technologies
Thioredoxin 1 C	(S3)	Life Technologies
Thioredoxin Reduktase 1 A	(S755)	Life Technologies
Thioredoxin Reduktase 1 B	(S756)	Life Technologies
Thioredoxin Reduktase 1 C	(S757)	Life Technologies
MAPK1 A	(S11137)	Life Technologies

MAPK1 B	(S11138)	Life Technologies
MAPK3 A	(S11141)	Life Technologies
MAPK3 B	(S230179)	Life Technologies
MAP2K1 A	(S11169)	Life Technologies
MAP2K1 B	(S11167)	Life Technologies
MAP2K2 A	(S11170)	Life Technologies
MAP2K2 B	(S11171)	Life Technologies
Negative Kontrolle 1 A	(No 1)	Life Technologies
Negative Kontrolle 2 B	(No 2)	Life Technologies
β-Aktin Positivkontrolle	(12935-141)	Life Technologies

2.1.1.6 Inhibitoren

PD98059		Sigma Aldrich
SB202190		Sigma Aldrich
SP600125		Sigma Aldrich
LY294002		Sigma Aldrich
BIX02189		Santa Cruz
U0126		Sigma Aldrich
Lapatinib		GlaxoSmithKline

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Poly Screen PVDF Transfer Membran		NEN LifeScience
Eppendorf Gefäße	0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße	Falcon 15mL, 50 mL	Sarstedt
Serum Pipetten	5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt
Kultivierungsplatten	6-Well, 12-Well, 24-Well	Sarstedt
Zellkultivierungsflaschen	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt
NuPAGE® 4-12% Bis Tris Gel 1,5 mm		Life Technologies
Mini-PROTEAN® TGX Precast Gele	4-20%	BioRad
Zellschaber		Sarstedt
Illustra MicroSpin G-25 Columns		GE Healthcare

Microplatten	96-Well	Greiner Bio One
--------------	---------	-----------------

2.1.3 Lösungen

2.1.3.1 Fertiglösungen

Hank´s Balanced Salt Solution (HBBS)	Life Technologies
MagicMark™ XP Western Standard	Invitrogen
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	Sigma
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	BioRad
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Roti-Blot Anode+Kathode	Carl Roth
Rotiphorese Gel30	Carl Roth
Western Lightning Chemiluminescence ReagentPlus	Perkin Elmer
Nativer Probenpuffer	BioRad
Neutralrot 0,33%	Sigma Aldrich

2.1.3.2 Selbst hergestellte Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer	0,47 M Tris in H ₂ O dest. pH 6,7 mit HCl
Trenngelpuffer	3 M Tris in H ₂ O dest. pH 8,8 mit HCl
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS in H ₂ O dest.
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O dest.
Probenpuffer (5-fach)	2,25 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8 5 mL Glycerin 0,5 g SDS

	2,5 mL 1 M DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Laufpuffer (5-fach)	15 g Tris 144 g Glycin 50 mL 10% SDS-Lösung ad 1000 mL H ₂ O dest.
Anodenpuffer	10% (v/v) Roti [®] Blot A 70% (v/v) H ₂ O dest. 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	10% (v/v) Roti [®] Blot B 70% (v/v) H ₂ O dest. 20% (v/v) Methanol
Lösung	Zusammensetzung
PBS (10-fach)	2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ 9,2 Na ₂ HPO ₄ 80 g NaCl ad 1000 mL H ₂ O dest. pH 7,4 einstellen
TBS (10-fach)	12 g Tris 53 g NaCl ad 1000 mL H ₂ O dest. pH 7,4 einstellen
TBS-T	250 mL TBS (10-fach) 2,5 mL Tween20 ad 2250 mL H ₂ O dest.
Blocklösung	5% (w/v) BSA in TBS-T
Hypertonischer Lysepuffer	40 mM HEPES 3 mM MgCl ₂ 20 mM KCl

	2 mM EDTA
am Versuchstag frisch zusetzen	0,5% (v/v) Proteaseinhibitor
	1% (v/v) 100 mM PMSF
	1% (v/v) Phosphataseinhibitor
	1% (v/v) 100 mM DTT
Isotonischer Succrosepuffer	250 mM Succrose
	6 mM MgCl ₂
	10 mM Tris-HCl, pH 7,4
	0,5% Triton X-100
High Salt Puffer	40 mM HEPES
	3 mM MgCl ₂
	520 mM KCl
	20% Glycerol
NP-40 Stamm-Lösung	10% (w/v) NP-40
	in H ₂ O dest.
RIPA-Puffer	1% NP-40
	150 mM NaCl
	20 mM Tris-HCl pH 7,4
	1 mM EDTA
	10 mM NaF
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1 mM MgCl ₂
	1 mM ZnCl ₂
	10% Glycerin
am Versuchstag frisch zusetzen	1 mM DTT
	1 mM Proteaseinhibitor Cocktail
HEPES-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA
	1% Triton-X-100
Guanidin-HCl Lyse Puffer	6 mM Guanidinhydrochlorid
	3 mM EDTA
	50 mM Tris-HCl
	0,5% Triton X-100

am Versuchstag frisch zusetzen	50 mM Iodessigsäure pH 8,3 einstellen
Nativer Laufpuffer (10-fach)	60 g Tris 288 g Glycin ad 2000 mL H ₂ O dest.
Peroxiredoxin-Lysepuffer	40 mM HEPES pH 7,4 50 mM NaCl 100 mM N-Ethylmaleinimid 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM PMSF 10 µg/mL Katalase
Stripping Puffer	15 g Glycin 1 g SDS 10 mL Tween20 pH 2,2 einstellen

2.1.4 Zusammensetzung der Gele

Gel	Zusammensetzung
Sammelgel	9,7 mL H ₂ O dest. 2,0 mL Rotiphorese Gel 30 1,7 mL Sammelgelpuffer 135 µL 10%-ige SDS-Lösung 10 µL TEMED 200 µL 10%-ige APS Lösung
10%-iges Trenngel	12,8 mL H ₂ O dest. 10,56 mL Rotiphorese Gel 30 8 mL Trenngelpuffer 320 µL 10%-ige SDS-Lösung 12,8 µL TEMED 320 µL 10%-ige APS Lösung
12%-iges Trenngel	10,56 mL H ₂ O dest.

	12,8 mL Rotiphorese Gel 30
	8 mL Trenngelpuffer
	320 µL 10%-ige SDS-Lösung
	12,8 µL TEMED
	320 µL 10%-ige APS Lösung
14,5%-iges Trenngel	12,8 mL H ₂ O dest.
	19,2 mL Rotiphorese Gel 30
	8 mL Trenngelpuffer
	320 µL 10%-ige SDS-Lösung
	12,8 µL TEMED
	320 µL 10%-ige APS Lösung
Natives Sammelgel	4,72 mL H ₂ O dest.
	2 mL Rotiphorese Gel 30
	2 mL Trenngelpuffer
	10 µL TEMED
	180 µL 10%-ige APS Lösung
Natives 15%-iges Trenngel	6,16 mL H ₂ O dest.
	8 mL Rotiphorese Gel 30
	1,6 mL Trenngelpuffer
	10 µL TEMED
	120 µL 10%-ige APS Lösung

2.1.5 Geräte

Inkubator		Binder
Laminar Flow Sterilbank	HeraSafe	KS12 Thermo Scientific
Wasserbad	GFL 1086	Haeberle
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TS100	Nikon
Plate Reader	Infinite M2 Pro	Tecan
Tiefkühlschrank (-80°C)	HFU 686 Basic	Heraeus
Fast Real Time PCR	7500	Life Technologies
Casy Cell Counter	Model DT	Schärfe System
Thermocycler	T3000	Biometra

Vortexer	MS2	IKA
Heizblock	HTM130	HCL
NanoDrop	ND2000	Thermo Scientific
pH Meter	CG 842	Schott
pH Elektrode	blueline 14pH	Schott
Schüttler	KS260	IKA
Waage	ABS	Kern
	EW3000-2M	Kern
Gelelektrophorese-Apparatur		BioRad
		GE Healthcare
Netzgerät	Power Pack P25 T	Biometra
Blot-Apparatur	FastBlot B44	Biometra
Imager-System	Fusion FX7	Vilber Lourmat
Pipetten	ResearchPlus	Eppendorf
Magnet-Heizrührer	RCT Basic	IKA
Zentrifuge	MiniSpin Plus	Eppendorf
	Centrifuge 5418 R	Eppendorf
	Megafuge 1.0R	Heraeus

2.1.6 Zellen

2.1.6.1 MCF-7 Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete epitheliale Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde aus einer 69-jährigen kaukasischen Frau isoliert und eignet sich aufgrund ihrer bereits sehr guten Charakterisierung besonders für die Krebsforschung. Durch ihre Eigenschaft, nur ein sehr moderates Level an endogenem Estrogenrezeptor *ErbB2* zu exprimieren, unterscheidet sich die MCF-7 Zelllinie stark von anderen Mammakarzinomzelllinien, welche häufig durch eine Überexpression des Estrogen-Rezeptors charakterisiert sind [185].

2.1.6.2 MCF-7/NeuT TetOn Zellsystem

Da in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung und Analyse der Überexpression des ERBB2 Rezeptors liegt, wurde zusätzlich eine Zelllinie generiert, die eine konditional-induzierbare Expression einer ERBB2-Rezeptor Variante (NeuT) erlaubt. Der als Ausgangsmaterial verwendete pBI-EGFP Vektor der Firma Clontech verfügt über einen bidirektionalen CMV-Minimalpromotor, in dem ein „*Tetrazyklin responsive Element*“ (TRE) integriert ist, welches aus sieben Kopien der 42 bp Tetrazyklin-Operator (TeTO)-Sequenz besteht (Abb. 2.1). In Anwesenheit von Tetrazyklin oder einem Derivat (z.B. Doxyzyklin) bindet ein reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator (rtTA) an das Tetrazyklin responsive Element (TRE) und initiiert dadurch die Transkription des entsprechenden Zielgens, welches als cDNA in das Plasmid eingebracht wurde. Durch die Verwendung eines bidirektionalen Promotors erfolgt neben der eigentlichen Expression des Zielgens eine Ko-Expression eines Induktionsmarkers, dem fluoreszierenden „*enhanced green fluorescent protein*“ (EGFP), welches eine fluoreszenzmikroskopische Kontrolle über die Effektivität der Genexpression erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ratten-Protoonkogen NeuT, welches durch eine Punktmutation in der Transmembrandomäne des NeuT-Rezeptors charakterisiert und dadurch konstitutiv aktiv ist, als cDNA in das Plasmid eingebracht. Dieser Umstand liefert eine erhebliche Erleichterung zur Erforschung der ERBB2 Signaltransduktionswege und wurde daher schon vielfach für Studien der onkogenen ERBB2 Signaltransduktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt [186], [187], [188].

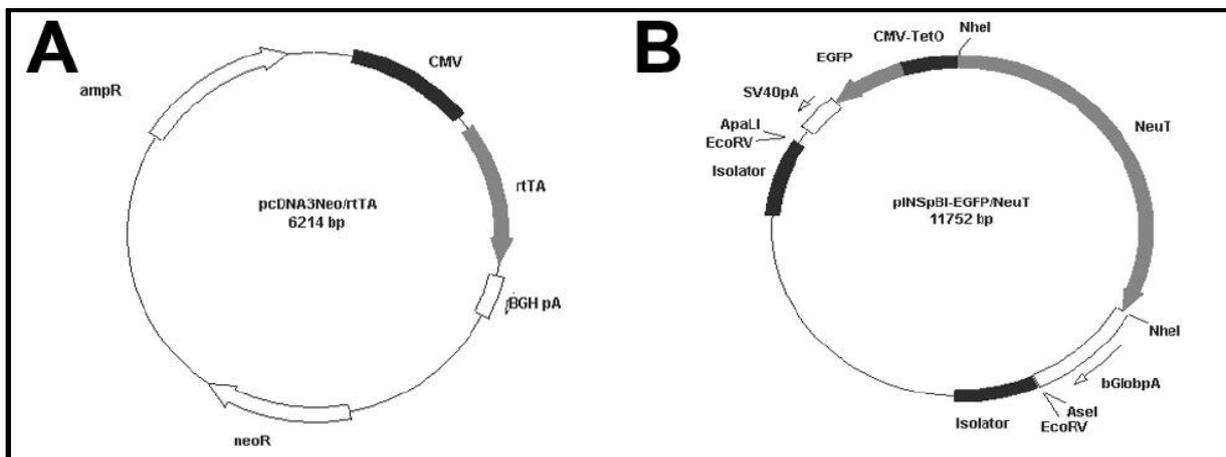


Abbildung 2.1: MCF-7 Transfektionskonstrukte

A: Expressionsplasmid pcDNA3Neo/rtTA;

B: Expressionsplasmid pINSpBI-EGFP/NeuT aus [86]

2.2 Methoden

2.2.1 *In vitro* Experimente

2.2.1.1 MCF-7 Zellen

Parentale MCF-7 Zellen wurden in erster Linie als Kontrollzellen eingesetzt, in der viele Versuche und Methoden unter physiologischen, stressfreien Bedingungen etabliert und durchgeführt wurden.

2.2.1.2 MCF-7/NeuT Zellen

Die MCF-7/NeuT Zelllinie wurde für *in vitro* Experimente eingesetzt, um einerseits die mit Hilfe des Affymetrix Gene Array generierten Daten zu validieren und andererseits einen Zusammenhang zwischen diesen Daten und der Überexpression des ERBB2-Rezeptors zu untersuchen. Infolge der Doxyzyklin induzierten Überexpression des ERBB2-Rezeptors wurden zusätzlich Versuche durchgeführt, um den Zustand der Zellen infolge der Onkogen transformation zu charakterisieren. Dazu wurden der Redox Zustand der Zelle, Aktivitätsassays, Knockdown- und Inhibitorversuche durchgeführt.

2.2.2 Zellkulturtechniken

2.2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle durchgeführten Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Für die Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurden beschichtete Zellkulturplatten (6-Well und 24-Well) und Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm²) eingesetzt. Das verwendete DMEM Kulturmedium für die MCF-7/NeuT Zelllinie wurde vor Gebrauch mit tetrazyklinfreiem FCS (10% (v/v)) und Penicillin/Streptomycin-Lösung (1% (v/v)) supplementiert und bei 4°C gelagert. DMEM Kulturmedium für die parentale Zelllinie wurde zusätzlich durch Insulin (0,1% (v/v)), Gentamycin (0,1% (v/v)), Natriumpyruvat (1% (v/v)) und MEM-Lösung (0,1% (v/v)) ergänzt. Die adhärent wachsenden MCF-7 Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Kulturflaschen bzw. Kulturplatten kultiviert. Für die Umsetzung und Vermehrung der Zellen wurden alle benötigten Lösungen auf 37°C temperiert.

2.2.2.2 Subkultivierung von Säugerzellen

Sobald die Zellen in den unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten, wurden diese zur weiteren Vermehrung passagiert oder anderweitig weiter verarbeitet. Dazu wurde der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen mit einigen mL sterilem PBS gewaschen. Nach Zugabe von ca. 1-4 mL Trypsin/EDTA-Lösung (je nach Größe des Kultivierungsgefäßes) und anschließender kurzer Inkubationszeit bei 37°C wurden einige mL DMEM hinzugegeben, um Trypsin zu inaktivieren. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen suspensiert und anschließend (je nach Versuchsaufbau) 1/2 bis 1/10 auf weitere Kultivierungsgefäße mit frischem Medium verteilt.

2.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Vor jedem neuen Zellkulturexperiment wurde mit Hilfe des Casy Cell Counters die Zellzahl ermittelt. Dazu wurden 100 µL der Zellsuspension in 10 mL Casyton Lösung gegeben und anschließend vom Gerät vermessen.

2.2.3 RNA Analytik

2.2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA Isolation erfolgte mit dem InnuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena) und erlaubte eine maximale Zellzahl von 5×10^6 Zellen. Diese wurden wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben trypsinisiert, allerdings mit dem Unterschied, dass keine weitere Ausplattierung der Zellen, sondern ein Zentrifugationsschritt (700 x g, 5 min) erfolgte. Der Überstand wurde entfernt, 400 µL Lysepuffer zum Zellpellet gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde auf ein spezielles Zentrifugationsröhrchen (blau) geladen, welches im Anschluss daran bei 12000 rpm für 2 min zentrifugiert wurde und dadurch zur Abtrennung der unerwünschten genomischen DNA führte. Das Eluat wurde mit einer äquivalenten Menge an 70%-igen Ethanol versetzt, gemischt und auf ein weiteres Zentrifugationsröhrchen (rosa), welches die Bindung von RNA erlaubt, geladen und abermals bei 12000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule mit 450 µL Waschpuffer (HS) beladen und für 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nachdem das Eluat

abermals verworfen wurde, erfolgte ein letzter Waschschrift mit 750 μL Waschpuffer (LS) bei identischen Zentrifugationsbedingungen. Um Flüssigkeitsreste vollständig zu entfernen, wurden die Zentrifugationsröhrchen für weitere 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert, bevor die Säule in einem abschließenden Schritt mit 50 μL RNase-freiem Wasser beladen und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert wurde. Die eluierte RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder für Genexpressionsstudien direkt weiter verarbeitet.

2.2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung und cDNA Synthese

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgte mit einem Spektrophotometer des Typs ND-2000 von Nanodrop (Thermo Scientific). Zur Messung wurden 1,2 μL der isolierten RNA auf den Messfuß des Gerätes gegeben und vermessen. Neben der RNA Konzentration erlaubte der Quotient der Absorption von 260 und 280 nm, der bei ungefähr 2,0 liegen sollte, eine Aussage über die Qualität und Reinheit der gewonnenen RNA. Zur weiteren Qualitätskontrolle wird die RNA-Lösung direkt vom Messfuß des Spektrophotometers in den Laufpuffer des Agarosegels gegeben und anschließend visuell die Qualität der RNA kontrolliert. Das Agarosegel sollte zwei voneinander scharf getrennte Banden aufweisen (18S- und 28S-Bande). Eine Degradation der RNA würde sich in Form von verwaschenen Laufspuren widerspiegeln. Die genannten Schritte der Qualitätssicherung sind von enormer Bedeutung, da die isolierte RNA für die cDNA Synthese eingesetzt wird und eine Qualitätskontrolle zu weiteren Zeitpunkten nicht mehr möglich ist. Zur weiteren Analytik mittels realtime-PCR wurde die RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dieser Schritt erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ der Firma Life Technologies. Nach dem Zusammenführen der einzelnen Komponenten auf Eis, bestehend aus RNase-freiem Wasser, dNTPs, Reaktionspuffer, Primern und dem Enzym Reverse Transkriptase sowie der isolierten RNA, wurde das anschließend aufgeführte PCR-Programm ausgeführt:

- 1.) 10 Minuten bei 25°C (Enzymaktivierung)
- 2.) 120 min bei 37°C (cDNA Synthese)
- 3.) 5 min bei 85°C (Enzyminaktivierung)
- 4.) 4°C zur Stabilisierung der Proben (bis zur Probenentnahme)

Durch nur einen einzigen Syntheseschritt und dem damit verhinderten Aufschmelzen der PCR-Produkte wurde sichergestellt, dass die eingesetzte RNA (1-2 µg pro Reaktion) 1:1 in cDNA umgeschrieben wird. Dies ist von enormer Bedeutung, da der Gehalt nach der Umschreibung nicht mehr bestimmt werden kann. Abschließend wird die cDNA 1:50 mit DEPC Wasser verdünnt, so dass sich eine Konzentration von 2 ng/µL einstellt.

2.2.3.3 Affymetrix Gene Array

Der Gene Array wurde durchgeführt, um Änderungen der Genexpression von MCF-7/NeuT Zellen nach Anschalten der ERBB2 Expression durch Doxyzyklin zu untersuchen. Dazu wurde RNA, wie in Kapitel 2.2.3.1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Anschalten der ERBB2 Expression isoliert und die Konzentration unter Verwendung des Spektrophotometer des Typs ND-2000 von Nanodrop (Thermo Scientific) (Kapitel 2.2.3.2) bestimmt. Diese Schritte wurden in unserem Labor durchgeführt, anschließend wurden die Proben an die Zentrale Gene Array Facility (Universität Leipzig) übergeben, welche die weiteren Schritte anhand des Affymetrix Protokolls (www.affymetrix.com) übernahmen. Zunächst wurden die Proben in cDNA umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zum Hybridisieren wurden sowohl die cDNA als auch der Mikrochip auf Raumtemperatur äquilibriert. Der Hybridisierungsmix wurde für 5 Minuten bei 99°C erhitzt. In der Zwischenzeit wurde der Chip mit Hybridisierungspuffer befeuchtet. Der befeuchtete Chip wurde anschließend rotierend für 10 Minuten bei 45°C inkubiert. Der Hybridisierungsmix wurde nach dem Erhitzen auf 45°C heruntergekühlt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Danach wurde für 5 Minuten mittels Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Chip wurde geleert und im Anschluss daran mit dem zentrifugierten Hybridisierungsmix gefüllt und für einen Gesamtzeitraum von 16 Stunden bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungssofen inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten mehrere Waschschrte. Im Anschluss daran wurde mittels Streptavidin/Phycoerythrin gefärbt. Nach einem abschließenden Waschschrte wurde der Chip in einem Scanner ausgelesen und die Daten ausgewertet. Diese Versuche wurden am Institut für Biochemie und im Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) an der Universität Leipzig durchgeführt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikrochips handelte es sich einerseits um den Affymetrix Gene Array

HG-U133A zur Untersuchung des Genexpressionsmusters von Brustkrebspatienten und andererseits um den Affymetrix Gene Array HG-U133A Plus 2 zur Analyse des veränderten Expressionsmusters in MCF-7/NeuT Zellen nach Anschalten der ERBB2 Expression. Die Rohdaten wurden anschließend mittels MAS 5.0 (TGT 500) normalisiert. Die transformierten log₂-Werte wurden anschließend in Abhängigkeit der Zeit graphisch aufgetragen. Positive Werte beschreiben eine gesteigerte Expression, während Werte <0 eine Verminderung der Genexpression aufzeigen.

2.2.3.4 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time PCR stellt eine Methode zur Vervielfältigung mit gleichzeitiger Quantifizierung der gewonnenen Menge an Nukleinsäuren dar und basiert auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR-Methode, welche durch das Auftrennen des DNA Doppelstranges, dem Anlagern spezifischer Primer und der Elongation durch das thermostabile Enzym Taq-Polymerase charakterisiert ist. Der Unterschied zur herkömmlichen PCR besteht in der eigentlichen Quantifizierung, welche bei der real time PCR in Form von Fluoreszenzmessungen erfolgt, dessen Intensität mit der Menge des entstehenden DNA Produkts korreliert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien basieren auf der Methode von TaqMan[®]-Sonden. Das Prinzip dieser beruht darauf, dass es neben den genspezifischen Primern auch eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und einem Quencher gekoppelte Sonde gibt, die im Bereich zwischen den Primern bindet. Durch die räumliche Nähe zwischen Fluorophor und Quencher wird die Fluoreszenz zunächst unterdrückt. Die verwendete DNA-Polymerase besitzt jedoch außerdem eine 5'-Exonuklease-Aktivität, so dass die Sonde bei jedem Elongationsschritt abgebaut wird und Fluorophor und Quencher räumlich voneinander getrennt werden, so dass es mit einer zunehmenden Anzahl an PCR Zyklen zum Anstieg der Fluoreszenzintensität kommt. Die Signalstärke korreliert dabei mit der Menge des gebildeten Produktes. Das Funktionsprinzip der TaqMan[®]-Sonden ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt.

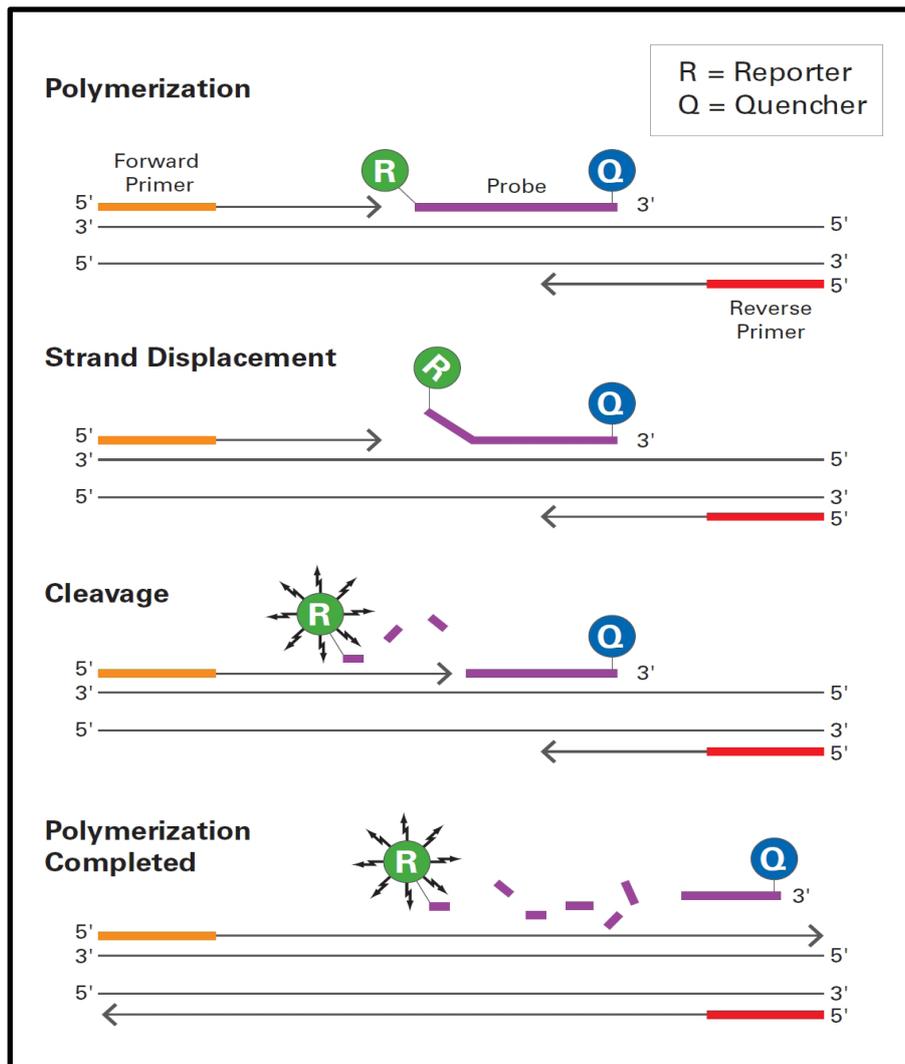


Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der qRT-PCR

Das Funktionsprinzip der TaqMan[®] Sonden beruht auf der 5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase unter Verwendung eines Fluorophors und eines Quenchers.

Quelle: www.lifetechnologies.com, letzter Zugriff: 20.04.2014

Um die in Kapitel 2.2.3.2 hergestellte cDNA zu vermessen, wurde das Protokoll der Firma Life Technologies angewendet. Dazu wurden pro Reaktion folgende Komponenten in den aufgeführten Mengen zusammengefügt:

- 1,25 µL TaqMan[®] Genexpressions-Assay (genspezifisch)
- 12,5 µL TaqMan[®] Universal Mastermix
- 6,25 µL RNase-freies Wasser
- 5 µL cDNA (Gesamtmenge: 10 ng)

Für die real time PCR wurde folgendes Standard Thermocycler Programm verwendet:

- 2 Minute bei 50°C (UNG-Inkubation, entfernt Produkte aus vorherigen PCRs)
- 10 Minuten bei 95°C (Aktivierung der DNA-Polymerase)
- 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung des DNA Doppelstranges)
- 1 Minute bei 60°C (Primeranlagerung und Elongation)

Die DNA Denaturierung, die daran anschließende Anlagerung der genspezifischen Primer sowie die Strangsynthese (Elongation) bilden die eigentlichen Schritte der PCR, die insgesamt 40 Mal (Zyklen) wiederholt wurden.

Die Grundlage für die Auswertung der mittels qRT-PCR generierten Ergebnisse bildet die $2^{-\Delta\Delta cT}$ Methode. Der ermittelte cT-Wert stellt den Zyklus dar, bei dem die Fluoreszenzintensität des exprimierten Gens das Hintergrundrauschen durchbricht. Je höher der cT-Wert ist, desto schwächer wird das entsprechende Gen exprimiert, je niedriger der cT-Wert desto stärker ist die Genexpression. Dabei stellt ein um den Wert 1 verminderter cT-Wert eine um den Faktor 2 erhöhte Expression dar. Die $2^{-\Delta\Delta cT}$ Methode erlaubt nur eine relative Quantifizierung, so dass alle ermittelten cT-Werte zu einer bestimmten Versuchsbedingung in Relation gesetzt werden müssen. Die cT-Werte dieser Bedingung werden als Kalibrator bezeichnet. Zusätzlich muss zu dem gemessenen Gen immer eine endogene Kontrolle („*House keeping gene*“) mitgeführt werden, deren cT-Werte unter allen Bedingungen konstant bleiben. Auf diese cT-Werte werden schließlich alle ermittelten cT-Werte des untersuchten Gens bezogen. In dieser Arbeit wurde das Gen UBC (Ubiquitin C) als endogene Kontrolle verwendet. Zur Auswertung nach der $2^{-\Delta\Delta cT}$ Methode wurden daher die cT-Werte der endogenen Kontrolle (cT_{EK}), des Kalibrators (cT_{Kal}) und der Versuchsbedingung (cT_{Gen}) herangezogen. Zunächst wurde der ΔcT -Wert berechnet, welcher sich aus der Differenz der cT-Werte der endogenen Kontrolle und den cT-Werten aller Proben inklusive des Kalibrators ergab.

$$\Delta cT = (cT_{Kal/Gen}) - (cT_{EK}) \quad (1)$$

Der zweite Schritt beinhaltet die Berechnung des $\Delta\Delta\text{cT}$ -Wertes, der sich aus der Differenz der ΔcT -Werte der Versuchsbedingung und des Kalibrators errechnet.

$$\Delta\Delta\text{cT} = (\Delta\text{cT}_{\text{Gen}}) - (\Delta\text{cT}_{\text{Kal}}) \quad (2)$$

Im letzten Schritt wurde für die errechneten cT-Werte die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{cT}}$ angewendet, so dass sich für die Kalibrator-Proben ein Wert von 1 ergab. Errechnete sich für die untersuchten Proben ein Wert größer 1, so bedeutet das eine erhöhte Genexpression in Bezug auf die Kontrollbedingung (Kalibrator). Werte, die zwischen 0 und 1 lagen, zeigten eine herunterregulierte Genexpression auf.

2.2.4 Proteinanalytik

2.2.4.1 Präparation der Protein Proben (Gesamtzelllysate)

Zuerst wurde der Überstand des Kultivierungsgefäßes vollständig entfernt, anschließend wurde zweimal kurz mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Zur Zellyse erfolgte die Zugabe von 0,1 – 0,5 mL (je nach Kultivierungsgefäß) RIPA-Puffer (inkl. Phosphatase- und Proteaseinhibitoren), gefolgt von einer kurzen Inkubationszeit auf Eis. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber vom Boden abgeschabt und in ein vorgekühltes 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Durch die folgende Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 10 min) konnten die Proteine (Überstand) von den festen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Die Überstände wurden abschließend in neue Reaktionsgefäße pipettiert und der BCA-Proteinbestimmung unterzogen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Zelllysate bei -20°C.

2.2.4.2 Präparation redox-sensitiver Protein Proben [189]

Die kultivierten Zellen wurden, nachdem das Kulturmedium vollständig entfernt wurde, dreimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 mL G-Lysepuffer (+50 mM IAA, pH 8,3). Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden des Kultivierungsgefäßes abgeschabt und in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Das zähflüssige Lysat wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert und für 30 min bei 37°C und

Lichtausschluss inkubiert. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellysate auf G-25 Mikrosphin-Säulen (GE Healthcare) geladen, welche im Anschluss für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert wurden. Das Eluat, welches die gewünschten Proteine enthielt, wurde in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Durch die Derivatisierung (IAA) der Thiolgruppen von Proteinen mit hohem Cysteingehalt lässt sich der Redoxstatus dieser genau bestimmen, indem mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese zwischen einer oxidierten und reduzierten Proteinbande unterschieden werden kann. Freie Thiogruppen (reduziert) werden durch IAA alkyliert und erhalten durch das verwendete Reagenz eine zusätzliche negative Ladung, was sich bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einer gesteigerten Wanderungsgeschwindigkeit niederschlägt. Oxidierte Thiole dagegen bleiben von IAA unberührt und wandern daher langsamer als reduzierte Proben. Zur Kontrolle wurden zusätzlich zu den untersuchten Proben eine vollständig oxidierte sowie reduzierte Positivkontrolle generiert. Dazu wurden für 30 min entweder 5 mM DTT (Reduktion) oder 5 mM Wasserstoffperoxid (Oxidation) zum Kulturmedium gegeben. Die Präparation erfolgte unter exakt den zuvor beschriebenen Bedingungen.

2.2.4.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Test

Mit Hilfe der BCA-Methode wurde die Proteinkonzentration in den jeweiligen Proben bestimmt. Die Methode basiert darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung in einer Biuret-Reaktion einen Komplex bilden. Innerhalb des Komplexes werden die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert, welche mit Bicinchoninsäure (BCA) einen intensiven violetten Farbkomplex bilden. Mit Hilfe eines Spektrophotometers (ND-2000, Nanodrop) wird die Absorption des Farbkomplexes bei 562 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben musste zunächst eine Kalibriergerade generiert werden. Dazu wurde eine BSA-Stamm-Lösung (2 mg/mL) in verschiedene Konzentrationen (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/mL) mit Wasser verdünnt. Von der jeweiligen Konzentration wurden 5 μL in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß vorgelegt und mit 100 μL BCA-Lösung (49 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) aufgefüllt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 105 μL ergab. Die Proben wurden im Anschluss daran für 30 min bei 60°C unter ständigem Schütteln im Heizblock inkubiert, bevor sie abschließend am Spektrophotometer

vermessen wurden. Alle in der Zellkultur generierten Proteinlysate wurden vor der Messung 1:10 mit 1x PBS verdünnt, so dass die Proteinkonzentration im linearen Bereich der Kalibriergeraden von 0 bis 1 mL/mg lag.

2.2.4.4 Proteinfällung mittels Methanol/Chloroform [190]

In einigen Fällen war die Proteinausbeute zu gering, um sie direkt auf ein Polyacrylamidgel zu laden, so dass das gewonnene Proteinlysate zunächst aufkonzentriert werden musste. Dazu wurde das notwendige Volumen für 60 µg Gesamtprotein der Proteinlösung in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und bis zu einem Gesamtvolumen von 300 µL mit 1x PBS aufgefüllt. Zusätzlich wurden 600 µL Methanol zugegeben und gut vermischt. Außerdem erfolgte die Zugabe von jeweils 200 µL Chloroform und destilliertem Wasser. Die zweiphasige Suspension wurde zunächst für 1 min auf dem Vortexer gemischt und danach für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen ohne dabei das Proteinpellet in der Interphase zu berühren. Nach Zugabe von 1 mL Methanol wurde die Lösung abermals für 1 min auf dem Vortexer gemischt und für weitere 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen ohne dabei das Proteinpellet zu berühren. Das restliche Methanol wurde entfernt, indem die Eppendorf-Gefäße mit geöffnetem Deckel für wenige Sekunden bei 60°C im Heizblock inkubiert wurden. Zuletzt wurde das Pellet mit 25 µL Probenpuffer aufgenommen, resuspendiert und für die anschließende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese beschreibt ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen, bei der elektrisch geladene Teilchen in einem flüssigen homogenen Medium wandern und nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dies wird durch die Verwendung des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht, welches als negative Ladung an die Proteine bindet, so dass deren Eigenladung überdeckt wird und alle Proteine ein gleiches Masse/Ladungsverhältnis aufweisen. Dies führt dazu, dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nur noch

vom jeweiligen Molekulargewicht abhängt. Die Bindung der lipophilen Kette des SDS an hydrophobe bzw. lipophile Seitenketten der Proteine bewirkt den Verlust der Tertiär- bzw. Quartärstruktur, so dass die Protein/SDS-Komplexe eine gestreckte Form annehmen und dadurch die Gelmatrix passieren können. Die Auftrennung erfolgt in einer Gelmatrix, die durch das Mischen und dem anschließenden Polymerisieren der Komponenten Acrylamid (N,N-Methylenbisacrylamid), TEMED und dem Radikalstarter APS hergestellt wird. Die SDS-PAGE setzt sich aus einem 5%-igen Sammelgel (pH 6,8) und einem zwischen 8 und 17,5%-igen Trenngel (pH 8,8) zusammen, wobei es bei der Wahl des geeigneten Trenngels auf das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins ankommt. Für sehr kleine Proteine (10-40 kDa) werden 14-17,5%-ige Trenngele verwendet, während für große Proteine (70-100 kDa) 8%-ige Trenngele notwendig sind. Nach dem vollständigen Polymerisieren des Gels wurden die vorbereiteten Proben mittels Kapillarspitzen in die jeweiligen Geltaschen pipettiert, nachdem sie mit 5x Probenpuffer für 10 min bei 95°C zur Denaturierung der Proteine inkubiert wurden. In der Regel wurden für die SDS-PAGE zwischen 30 und 60 µg Gesamtprotein verwendet und auf die Gelmatrix aufgetragen. Um bei der Auswertung die zu untersuchenden Proteine anhand ihres Molekulargewichts identifizieren zu können wurde zusätzlich ein Proteingrößenstandard aufgetragen. Für das Durchlaufen des Sammelgels wurde pro Gel eine Stromstärke von 20 mA eingestellt, welche auf 30 mA pro Gel erhöht wurde, nachdem die Proben das Trenngel erreicht haben. Die SDS-PAGE wurde beendet wenn der Probenpuffer das komplette Trenngel durchlaufen hat. Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde bis auf wenige Abweichungen genauso verfahren wie bei der beschriebenen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Unterschiede ergeben sich lediglich in der Zusammensetzung der Gele, welche kein SDS enthielten, um ein Denaturieren der Proteine zu verhindern. Diesbezüglich wurde auch ein nativer Probenpuffer ohne DTT-Zusatz verwendet, auf eine Inkubation der Proben bei 95°C wurde ebenfalls verzichtet.

2.2.4.6 Western Blot

Nach dem Beenden der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran elektrophoretisch transferiert. Dazu wurde ausschließlich das Semi-Dry-Blot Verfahren [191] unter Verwendung der Blot Apparatur der Firma

Biometra benutzt. Vor dem eigentlichen Transfer wurden Sammel- und Trenngel vorsichtig voneinander getrennt, wobei das Trenngel anschließend für einige Minuten im Kathodenpuffer äquilibriert wurde. Währenddessen wurden insgesamt 16 Whatman-Papiere und eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, wobei 4 Whatman-Papiere im Kathodenpuffer und 12 im Anodenpuffer äquilibriert wurden. Die Membran wurde zunächst durch Zugabe einiger mL Methanol aktiviert, dies bewirkte eine erhöhte Bindungseffizienz der Proteine, bevor sie ebenfalls im Anodenpuffer äquilibriert wurde. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten wie in Abbildung 2.3 dargestellt zusammengefügt.

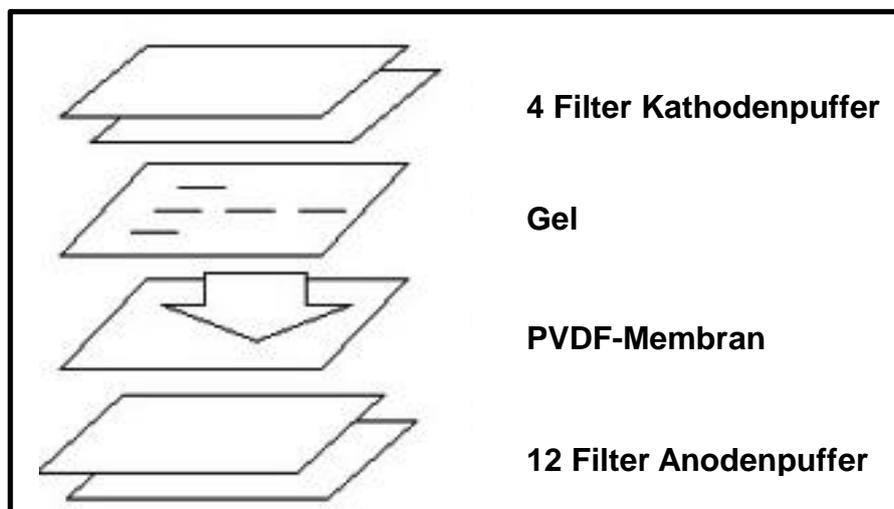


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Western Blots

Quelle: www.medizin.uni-greifswald.de; letzter Zugriff: 19.12.2012

Durch das abschließende Walzen des Western Blot „Sandwiches“ wurden Lufteinschlüsse beseitigt. Der Transfer erfolgte bei 5 mA/cm^2 Gel und je nach Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 25 und 40 min, wobei größere Proteine mehr Zeit für den Transfer benötigten. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und für 1-2 min mit Ponceau S inkubiert und kurz mit T-BST gewaschen, um einen vorläufigen und einheitlichen Transfererfolg zu überprüfen, da ausschließlich Proteinbanden rot angefärbt wurden. Durch weiteres Waschen mit TBS/Tween 20 (TBS-T) wurde die Membran wieder entfärbt und anschließend mit einer 5%-igen BSA/TBS-T Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler geblockt. Dieser Schritt verhinderte unspezifische Wechselwirkungen zwischen den verwendeten Antikörpern und der PVDF-Membran. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper variierte je nach Hersteller und ist Tabelle 2.1 zu entnehmen. Die Membran wurde danach 3x für

jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit dem jeweiligen Sekundärantikörper bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nach wiederholten Waschschritten mit TBS-T (3x für je 10 min) erfolgte die Detektion mittels ECL-System (Perkin Elmer). Die Substratlösungen (Enhanced Luminol und Oxidizing Reagent) wurden zu gleichen Teilen auf die Membran gegeben. Nach kurzer Inkubationszeit wurde die Membran mittels Imager-System der Firma Vilber Lourmat belichtet und ausgewertet.

2.2.4.7 Absorptions-basierter Aktivitätsassay mit Protein Proben aus Gesamtzellysat

Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Möglichkeiten wie Proteine in der Zelle reguliert werden können. Die Genexpression, welche in Transkription und Translation gegliedert ist, stellt einen wesentlichen Regulationspunkt für Proteine dar. Dies allein ermöglicht allerdings keine genaue Aussage über die eigentliche Aktivität eines Proteins, da eine erhöhte Genexpression und der damit verbundene Anstieg der Gesamtmenge des Proteins nicht automatisch mit einer gesteigerten Aktivität korreliert. Aus diesem Grund stellt die Messung der Proteinaktivität einen wichtigen Bestandteil der Analyse dar, um Aussagen bezüglich gesteigerter oder verminderter Genexpression qualitativ bewerten zu können. Der in dieser Arbeit angewendete kolorimetrische Aktivitätsassay, welcher auf der Grundlage einer enzymatischen Umsetzung zu einem farbigen Produkt basiert, gliederte sich in die Schritte der Probenvorbereitung, der Erstellung einer Standardkurve, der Präparation des Reaktionsgemisches sowie der abschließenden Absorptionsmessung.

Dazu wurde zunächst das Gesamtzellysat (s. Kapitel 2.2.4.1) unter Verwendung des im Assay Kit inkludierten Assay-Puffers zur Zellyse hergestellt und die Proteinkonzentration vermessen. Gleichzeitig wurde eine Standardkurve mit dem farbigen Produkt der enzymatischen Reaktion (TNB; 2-nitro-5-thiobenzoat) hergestellt. Die Lösungen mit den Konzentrationen von 0, 10, 20, 30, 40 und 50 nM wurden anschließend vermessen, wobei die gemessene Absorption (412 nm) gegen die jeweilige Konzentration graphisch aufgetragen wurde. Für die Vermessung der zu untersuchenden Proben wurde pro Reaktion (100 µL) folgender Versuchsansatz vorbereitet:

Tabelle 2.2: Probenzusammensetzung zur Messung der TrxR Aktivität

Probe	Reaktionspuffer	DTNB	NADPH	Zelllysate	Inhibitor	Dest. Wasser	Gesamt-volumen
Puffer Blank	30 µL	8 µL	2 µL	-	-	60 µL	100 µL
Lysat Blank	-	-	-	x µL	-	100-x µL	100 µL
Probe A	30 µL	8 µL	2 µL	x µL	-	60-x µL	100 µL
Probe B	30 µL	8 µL	2 µL	x µL	10 µL	50-x µL	100 µL

Dabei stellten DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) und NADPH wichtige Komponenten für die Enzymreaktion dar. NADPH ist ein notwendiger Kofaktor, DTNB stellt das Enzymsubstrat dar. Der verwendete Inhibitor ist enzymespezifisch und dient zur Bestimmung der Hintergrundaktivität bei gleichzeitiger Inhibition des zu untersuchenden Proteins. Schematisch lässt sich die Reaktion wie folgt beschreiben:



Die Messung der spezifischen Proteinaktivität beinhaltete zwei Schritte. Zum einen wurde die Gesamtabsorption der Probe (A) und damit von allen Proteinen, die sich im Zelllysate befinden und in der Lage sind DTNB zu TNB umzusetzen, gemessen. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe des spezifischen Inhibitors, so dass nur noch die Absorption aller Proteine im Gesamtzelllysate außer der des zu untersuchenden Proteins gemessen wurde (Probe B). Durch die Differenz der Absorptionen von Probe (A) und Probe (B) ließ sich letztendlich die gesuchte spezifische Proteinaktivität errechnen. Bei der experimentellen Durchführung wurde stets darauf geachtet, dass zuerst die Lösung aus Reaktionspuffer, Zelllysate, Inhibitor und NADPH vorbereitet, gemischt und anschließend auf die verwendete 96-Well Platte vorgelegt wurden. Die Zugabe von DTNB als Reaktionsstarter erfolgte zum Schluss, um den Zeitraum zwischen Reaktions- und Messbeginn zu minimieren. Anschließend wurde die Absorption bei 412 nm mittels Plate Reader (Firma Tecan) für einen Gesamtzeitraum von 15 min und einem kinetischen Messintervall von 1 min gemessen. Um die Funktionalität des Assays zu überprüfen wurden zusätzlich Lösungen von rekombinantem Protein mit definierter Aktivität hergestellt. Die Proteinaktivität betrug dabei 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 und 2,0 mU. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden gegen die gemessene Zeit aufgetragen.

2.2.4.8 Fluoreszenz-basierter Aktivitätsassay mit Protein Proben aus Gesamtzell-lysat

Das Ubiquitin-abhängige proteasomale System ist eines der Hauptmechanismen zur Degradation von Proteinen im Zytosol einer eukaryotischen Zelle. Es katalysiert den selektiven Abbau kurzlebiger regulatorischer oder beschädigter Proteine [192]. Der proteasomale Multienzymkomplex lässt sich dabei in zwei funktionale Einheiten unterteilen (Abb. 2.4). Zum einen reguliert das Ubiquitin- und ATP-abhängige 26S Proteasom (1700 kDa), welches sich durch Assoziation der 20S Kerneinheit (700 kDa) und zwei 19S regulatorischen Einheiten (700 kDa) zusammensetzt, den Abbau langlebiger und Ubiquitin-markierter Proteine. Die 19S Einheiten sitzen bei Eukaryoten als Deckel auf der 20S Einheit und regulieren den Zugang sowie das Entfalten markierter Proteine zum 20S Komplex. Zum anderen katalysiert die 20S Kerneinheit die Degradation von Schlüsselproteinen, die an zellulären Prozessen wie Apoptose, DNA-Reparatur, Endozytose und Zellzykluskontrolle beteiligt sind [193, 194]. Die 20S Einheit besitzt die Form eines hohlen Zylinders, welcher durch verschiedene α und β Ringe aufgebaut ist und unterschiedliche proteolytische Aktivität aufweist (Caspase-, Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) [178].

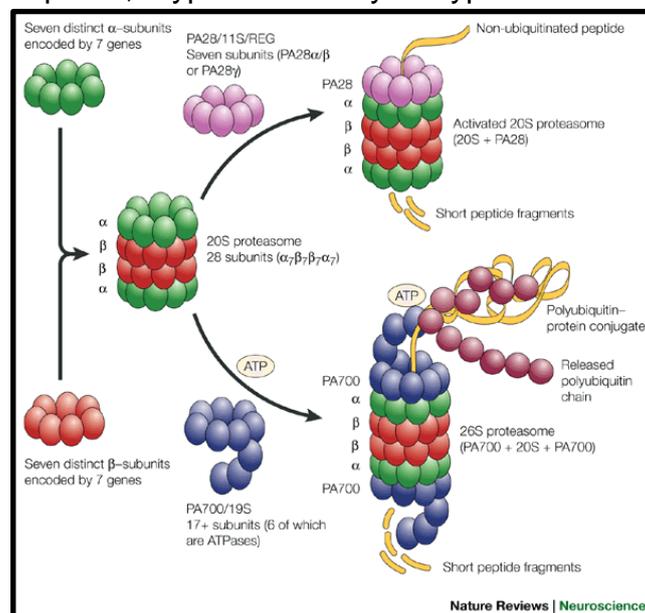


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des proteasomalen Multienzymkomplexes [195]

Zur Herstellung des Gesamtzelllysates wurden die Zellen zweimal mit 5 mL eiskaltem PBS gewaschen, der Überstand wurde verworfen. Nach abermaliger PBS Zugabe erfolgte das Abschaben der Zellen mittels Zellschaber und das Überführen in ein 15 mL Falcon Röhrchen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm bei Raumtemp-

eratur wurde der Überstand entfernt und das verbleibende Zellpellet in 500 μL Lysapuffer (HEPES-Puffer) aufgenommen und resuspendiert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, wobei die Falcon Röhrchen in Abständen von 10 Minuten gevortext wurden. Nach erfolgter Inkubationszeit wurde die Suspension in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und für 15 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Proteinkonzentration ermittelt, während das Zellpellet verworfen wurde. Gleichzeitig wurde eine Standardkurve mit dem fluoreszierenden Produkt der enzymatischen Reaktion (AMC; 7-amino-4-methyl-cumarin) hergestellt. Die Lösungen mit den Konzentrationen von 0, 0,04, 0,12, 1,08, 3,24, 9,72 und 29,16 μM wurden anschließend vermessen (Excitation: 380 nm), wobei die gemessene Fluoreszenzemission (Emissionswellenlänge: 460 nm) gegen die jeweilige Konzentration graphisch aufgetragen wurde. Für die Vermessung der zu untersuchenden Proben wurde pro Reaktion folgender Versuchsansatz vorbereitet:

Tabelle 2.3: Probenzusammensetzung zur Messung der Proteasom Aktivität

	10x Assay Puffer	Substrat	Zellysat	Inhibitor	Dest. Wasser	Gesamt-volumen
Puffer Blank	10 μL	10 μL	-	-	80 μL	100 μL
Lysat Blank	-	-	x μL	-	100-x μL	100 μL
Probe A	10 μL	10 μL	x μL	-	80-x μL	100 μL
Probe B	10 μL	10 μL	x μL	10 μL	70-x μL	100 μL

Das in diesem Aktivitätsassay verwendete Substrat N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC ist ein aus vier Aminosäuren bestehendes kurzes Peptid, an das der Fluoreszenzfarbstoff AMC gekoppelt ist. Das Prinzip des Assays basiert auf der proteolytischen Abspaltung des Fluorophors AMC, wodurch die Fluoreszenz induziert und gemessen wird. Zur spezifischen Ermittlung der proteolytischen Aktivität wird zunächst die Gesamtaktivität des Zellysates gemessen. Durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors, der die Proteolyseaktivität unterdrückt, wird die Hintergrundaktivität des Lysates ermittelt. Aus der Differenz der Gesamt- und Hintergrundaktivität lässt sich die spezifische proteolytische Aktivität ermitteln. Bei der experimentellen Durchführung wurden zunächst das Zellysat, Assay Puffer und Wasser vorgelegt. Nach Zugabe des Inhibitors in ausgewählte Proben erfolgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten

bei Raumtemperatur. Zuletzt erfolgte die Zugabe des Substrates, um den Zeitraum zwischen Reaktions- und Messbeginn zu minimieren. Die Aktivitätsmessung (Excitation: 380 nm, Emission: 460 nm) erfolgte mittels Plate Reader (Firma Tecan) über einem Gesamtzeitraum von zwei Stunden bei 37°C und einem kinetischen Messintervall von 3 Minuten. Um die Funktionalität des Assays zu überprüfen wurden zusätzlich Verdünnungsreihen von rekombinantem 20S Proteasom hergestellt, wobei die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten gegen die gemessene Zeit aufgetragen wurden.

2.2.5 Absorptions-basierte Bestimmung von oxidativen Stress in Zellen mittels TBARS-Assay

In zellulären Systemen herrscht ein unter physiologischen Bedingungen ständiges Fließgleichgewicht vor, welches durch innere und äußere Einflüsse gestört werden kann. Eine wichtige Komponente stellt der oxidative Stress dar, welcher ein Ungleichgewicht zwischen der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugunsten deren Produktion beschreibt. Bei diesem Vorgang können freie Radikale und Peroxide gebildet werden, die die Zelle entweder im Ganzen oder auf molekularer Ebene (Proteine, Lipide und DNA) schädigen. Ein erhöhter Level an oxidativem Stress ist beim Menschen nachweislich mit einigen chronischen Krankheiten assoziiert [196, 197]. Ein möglicher Indikator für oxidativen Stress ist die Lipidperoxidation, bei der, ausgehend von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, durch Oxidation instabile und sehr reaktive Carbonyl-Komponenten entstehen. Eine der am häufigsten auftretenden Komponenten ist Malondialdehyd (MDA), welches in der Lage ist, Addukte mit freien Aminogruppen, Proteinen und anderen Biomolekülen zu bilden [198]. Durch die Fähigkeit mutagene [199] und cancerogene [200] Addukte mit DNA Basen zu bilden, wird MDA in hohen Konzentrationen als gefährliches Produkt der Lipidperoxidation eingestuft.

In dieser Arbeit wurde das Ausmaß an Lipidperoxidation infolge von oxidativen Stress durch Thiobarbitursäure-Reaktive-Substanzen (TBARS) gemessen, welche eine weit verbreitete Methode zur Bestimmung von Malondialdehyd darstellt [201]. Durch Absorptionsmessungen werden TBARS-Addukte gemessen, die einen pinkfarbenen Chromophor mit dem Farbstoff 1,3-Diethyl-2-thiobarbitursäure (DETBA) bilden. Zur

Messung des MDA-Gehaltes wurden 2×10^7 Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Zellschaber in 1 mL PBS gesammelt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Um die Zellen aufzuschließen erfolgte eine Ultraschallbehandlung von 3x 15 Sekunden bei 40 V auf Eis. Das Homogenat wurde bis zur Messung auf Eis gelagert. Für die Messung wurden 15 mL Falcon Röhrchen vorbereitet und jeweils 100 μ L des Zellhomogenats bzw. eines MDA Standards in unterschiedlichen Konzentrationen in die Röhrchen pipettiert. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von 100 μ L SDS und 4 mL Farbreagenz, bestehend aus Thiobarbitursäure, Natriumhydroxid und Essigsäure. Anschließend wurden die Proben zwischen 90 und 100°C für 60 Minuten inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden alle Proben für 10 Minuten auf Eis gegeben, anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 1600 x g zentrifugiert. Jeweils 150 μ L des Überstandes wurden auf eine 96-Well Platte pipettiert und die Absorption bei 535 nm mittels Plate Reader (Firma Tecan) gemessen. Die Berechnung der MDA Konzentration erfolgte anhand einer generierten Eichgeraden.

2.2.6 Fluoreszenz-basierte Bestimmung von oxidativem Stress in Zellen mittels DCF-Assay

Eine weitere Methode zur Untersuchung von ROS liefert der fluoreszenz-basierte DCF-Assay zur Detektion intrazellulärer Hydroxyl-, Peroxyl- und anderer reaktiver Sauerstoffspezies. Die Basis des Assays liefert die zellpermeable, nicht-fluoreszierende Substanz DCFH-DA, welche infolge zellulärer Esterasen deacetyliert (DCFH) und in Anwesenheit von ROS unmittelbar in das stark fluoreszierende Produkt DCF oxidiert wird. Die generierte Fluoreszenzintensität wird mittels Plate Reader (Firma Tecan) bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen (Excitation: 480 nm) und ist proportional zur Menge an ROS im Zytosol. Das Funktionsprinzip des fluoreszenzbasierten DCF-Assays zur Detektion intrazellulärer ROS Konzentrationen ist schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt.

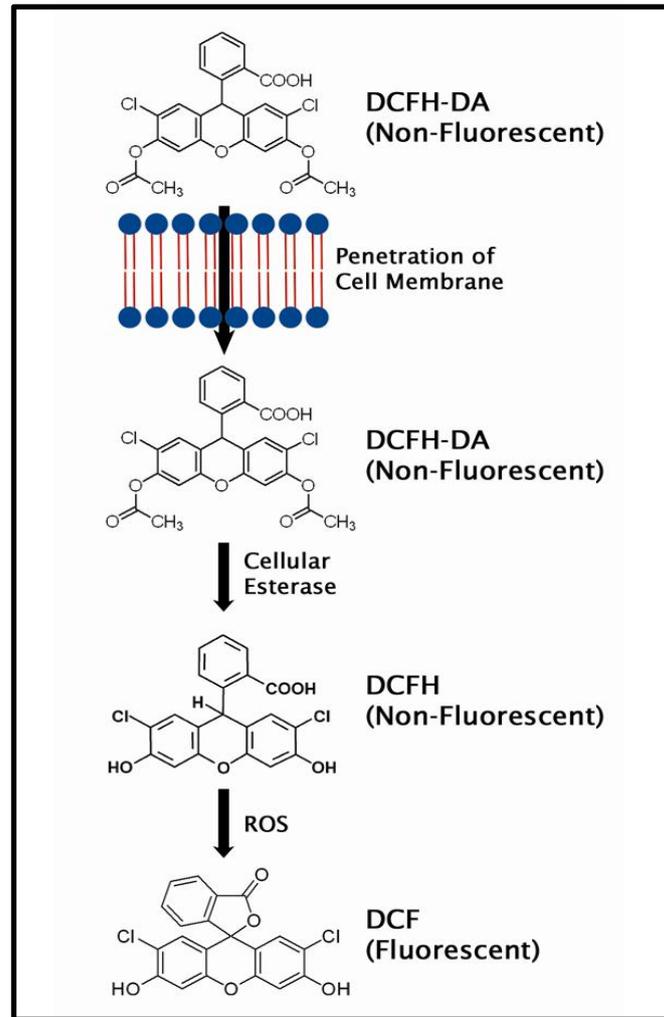


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des fluoreszenzbasierten DCF-Assays zur Detektion intrazellulärer ROS Konzentrationen

Quelle: Cell Biolabs, INC., letzter Zugriff: 20.04.2014

Zur Messung der intrazellulären ROS Konzentration wurden Zellen 3x vorsichtig mit HBSS gewaschen und anschließend mit jeweils 100 μL 1x DCFH-DA in DMEM für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden alle Proben abermals 3x mit HBSS gewaschen und abschließend mit je 100 μL DMEM und 100 μL 2x Lysepuffer beladen und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Zur Messung der ROS Konzentration wurden 150 μL der Suspension auf eine 96-Well Plate transferiert und die Fluoreszenz bei 480 nm (Exitation) und 530 nm (Emission) gemessen. Zur Generierung von Positivkontrollen wurden Zellen zusätzlich nach dem ersten Waschschrift für einen Zeitraum von 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen Wasserstoffperoxid behandelt, die weitere Behandlung war deckungsgleich mit denen der anderen Proben. Die ROS Konzentration wurde anschließend anhand einer generierten Eichgeraden berechnet und auf die Gesamtzellzahl normiert.

2.2.7 Gen Knockout mittels siRNA

Um den Einfluss bestimmter Gene auf den zellulären Phänotyp zu untersuchen, wird seit einigen Jahren das Verfahren der RNA-Interferenz, entdeckt durch die Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello, angewandt. Dieser teils natürlich vorkommende Mechanismus zur Abwehr und Verteidigung gegen Fremd RNA (z.B. von Viren und Bakterien) spielt bei vielen Organismen, insbesondere bei Pflanzen, eine wichtige Rolle [202, 203]. Der Mechanismus der RNA-Interferenz lässt sich grundsätzlich in drei Phasen unterteilen. Mittels Ribonukleaseenzymen wie *Dicer* und *Drosha* werden zunächst doppelsträngige RNA Moleküle fragmentiert. Diese kurzen Doppelstrang Fragmente werden im nächsten Schritt in Einzelstränge aufgespalten. Dabei wird der sogenannte Leitstrang vom RISC-Enzymkomplex („*RNA-induced silencing complex*“) aufgenommen, so dass der gesamte RNA-Enzymkomplex aktiviert wird und eine RNA, die in ihrer Basensequenz komplementär zu der des Leitstranges ist, spalten kann. Eine Alternative zur Stilllegung eines Gens besteht in der spaltlosen Blockade der Ziel RNA durch den RNA-RISC-Enzymkomplex. Beide Mechanismen resultieren letztendlich in einer Unterdrückung der Weiterleitung der genetischen Information (keine Translation) und führen zu einem veränderten Phänotyp. Diese Methode erlaubt daher die gezielte Manipulation eines Organismus [204] und ist schematisch in Abb. 2.6 dargestellt.

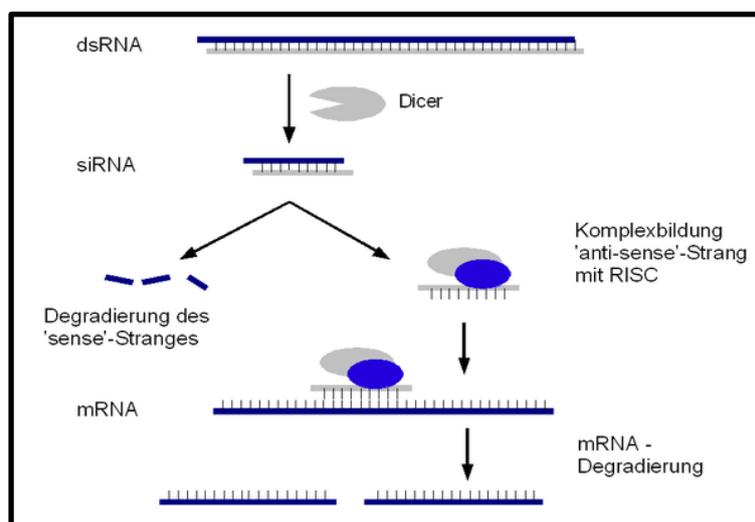


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz

Quelle: <http://www.xonk.de/bilder/evolution/epigenetik/rnai.png>,
 letzter Zugriff: 25.11.2013

Zur Umsetzung der gezielten Stilllegung bestimmter Gene wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt, welche inklusive der gewählten Menge und Konzentration von Chemikalien in nachstehender Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Reagenzien für RNA-Interferenz

Kulturgefäß	Opti-Mem [μL]	siRNA (10 μM) [μL]	RNAiMAX [μL]	Zellzahl	DMEM [mL]
6-Well Platte	500	6	5	200000	2,5
15 cm Platte	4000	48	40	1000000	20

Zu Beginn wurde die entsprechende Menge an Opti-Mem in das Kulturgefäß vorgelegt, anschließend erfolgte die Zugabe der siRNA. Durch vorsichtiges Schwenken des Kulturgefäßes wurde ein Durchmischen gewährleistet. Anschließend wurde das Transfektionsreagenz RNAiMAX dazu pipettiert, das Kulturgefäß vorsichtig geschwenkt und dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wird die Bildung des siRNA/Transfektionsreagenz-Komplexes gewährleistet, welcher dann in der Lage ist, die zelluläre Membran zu passieren. Zuletzt wurde die entsprechende Menge an Zellen in einem Gesamtvolumen von 2,5 bzw. 20 mL Antibiotika-freien DMEM-Medium dazugegeben. Das Kulturgefäß wurde abermals vorsichtig geschwenkt und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um zu gewährleisten, dass sowohl das Transfektionsreagenz als auch die siRNA selbst keinen Effekt auf die Zelle hat, wurden stets Proben als Negativkontrollen mitgeführt, welche entweder nur Transfektionsreagenz oder unspezifische „Stealth“ siRNA enthielten, die gegen keine intrazelluläre RNA gerichtet ist. Als Positivkontrolle wurde eine etablierte siRNA verwendet, die sich gegen den Abbau des Aktin Zytoskelettes richtet. Schematisch lässt sich der Versuch folgendermaßen darstellen:

Kontrollbedingung	Negativkontrolle 1	Negativkontrolle 2
Positivkontrolle (Aktin)	Transfektionsreagenz RNAiMAX	siRNA Probe

Nach erfolgter Inkubationszeit wurden RNA isoliert und Proteinlysate hergestellt. Mit Hilfe der qRT-PCR und Immunoblot Technik wurden zunächst die Effizienz der Gen Stilllegung auf RNA und Proteinebene kontrolliert. Anschließend konnten die gesammelten Proben je nach Fragestellung weiterverwendet werden.

2.2.8 Neutralrotassay zur Bestimmung der Zellvitalität

Der Neutralrot-Test dient zum Nachweis der Zellvitalität in *in vitro* Systemen und zählt damit zum Standard der Zytotoxizitätstests. Der Test basiert auf der Aufnahme des Farbstoffes Neutralrot in die Lysosomen vitaler Zellen. Neutralrot zeichnet sich durch

eine leicht kationische Eigenschaft aus und ist in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren oder durch Endozytose von Zellen aufgenommen zu werden. Dort bindet es an anionische Reste der lysosomalen Membran. Dadurch, dass Lysosomen ein saures Milieu aufweisen ($\text{pH} < 5$) und Neutralrot dadurch als kationisches Ion vorliegt, ist es nicht mehr in der Lage das Lysosomen zu verlassen, welches dadurch als Ionenfalle fungiert und durch den Farbstoff spezifisch gefärbt wird. In geschädigten Zellen kann es durch Veränderung der lysosomalen Membran durch Schadstoffexposition und durch eine damit verbundene Änderung des pH Wertes zur verminderten Aufnahmefähigkeit des Farbstoffes kommen. Bei toten Zellen liegen keine funktionalen Lysosomen mehr vor, so dass diese Zellen nicht angefärbt werden. Durch diese Eigenschaften kann zwischen vitalen, geschädigten und toten Zellen in Folge von Schadstoffexpositionen differenziert werden. Die Quantifizierung der aufgenommenen Menge an Neutralrot erfolgt durch Messung der Absorption bei 540 nm [205-207]. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die Zellen nach entsprechender Inkubationszeit mit 17 μL Neutralrot-Lösung pro mL DMEM versehen und für weitere 3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen 2x mit warmen PBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung, bestehend aus 50% Ethanol, 5% Essigsäure und 45% destilliertem Wasser bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (600 rpm/min) für 20 Minuten inkubiert, um den in den Zellen integrierten Farbstoff zu lösen. Abschließend wurde die Absorption mittels Plate Reader (Infinite M2 Pro, Tecan) bei 540 nm gemessen.

2.2.9 Statistik

2.2.9.1 Affymetrix Gene Array Daten von Brustkrebspatienten

Zur Bestimmung einer möglichen Assoziation zwischen der RNA Expression (\log_2 transformiert) von TXNIP und TrxR und Prognose wurde das univariate und multivariate COX-Modell angewandt. Als krankheitsfreies Überleben wurde die Zeitspanne zwischen der Diagnose und der Rückkehr der Krankheit bzw. der entfernten Metastasierung oder dem Tod des Patienten bezeichnet. Als metastasefreies Überleben wurde die Zeitspanne zwischen Diagnose des Brustkrebs und der Identifizierung von Metastasen beschrieben. Um die Überlebenszeiten miteinander vergleichen zu können, wurden sowohl Kaplan-Meier Kurven als auch der Log-rank Test verwendet. Da die Häufigkeitsverteilung von TXNIP und TrxR nicht eindeutig

einer Normalverteilung entsprach, wurden nichtparametrische Tests zum Vergleich von Gruppen, wie dem Mann-Whitney Test für ungepaarte Daten, angewandt. Zur Bestimmung des Esrogen- und HER2-Rezeptor Status der Patienten erfolgte die Dichotomisation. Es wurden „Cut-Off“ Punkte gesetzt, die zwischen hoher und niedriger RNA Expression der genannten Rezeptoren in der Gesamtkohorte differenzierten. Zur Bestimmung von Korrelationen wurde der Spearman-Korrelationstest angewandt. Alle p-Werte werden dabei als zweiseitig betrachtet. Insofern keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt wurde, sollten die Werte als beschreibende Messungen betrachtet werden. Alle Analysen wurden mit der Software SPSS17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

2.2.9.2 *In vitro* generierte Daten

Für die in dieser Arbeit verwendeten messbaren Größen wie Gesamtzellzahl, Gesamtprotein, RNA-Konzentration, Assays usw. wurden zur Validierung stets mehrere Replikate verwendet. Der arithmetische Mittelwert der Messgrößen und dessen Abweichung wurden mittels folgender Formel berechnet:

$$MW = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

MW: Mittelwert über n Messungen des Wertes x

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - MW)^2}{n-1}} \quad (2)$$

SD. Experimentelle Standardabweichung

x_i : i-ter Einzelwert

n: Anzahl der Messungen

3 Ergebnisse

3.1 Expression des Onkogens ERBB2/HER2 (NeuT) führt zu vorzeitiger zellulärer Seneszenz in MCF-7 Zellen

Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Brustkrebs und anderen epithelialen Tumoren, indem sie Zellen durch eine gesteigerte ERBB2 Aktivität, welche in der Ausschüttung von wachstumsfördernden und anti-apoptotischen Signalen resultiert, transformiert. Die gezielte Überexpression von ERBB2 stimuliert in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zwar nicht die Proliferation, stattdessen ist dies mit dem Einleiten der vorzeitigen Seneszenz verknüpft, die sich sowohl durch eine morphologische Veränderung als auch dem Zellzyklusarrest kennzeichnet, welches durch die Expression verschiedener Markerproteine wie p21(WAF1/CIP1), assoziiert ist [84]. Dieser Befund bildet die Basis für Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

3.1.1 Expression des Onkogens ERBB2/NeuT in MCF-7 Zellen

Das MCF-7/NeuT Zellsystem basiert auf der Tet-On-induzierbaren Überexpression des Onkogens ERBB2/NeuT und wurde von Trost *et al.* (2005) generiert, um den Zusammenhang der onkogen-induzierten Transformation und dem Mechanismus zellulärer Seneszenz genauer zu verstehen. Weitere Charakterisierungen dieses Zellsystems erfolgten durch Spangenberg *et al.* (2006) und Cadenas *et al.* (2010, 2012). Um die in Kapitel 2.1.6.2 beschriebene Funktionalität des MCF-7/NeuT Zellsystems zu bestätigen und zu gewährleisten, musste zunächst die Überexpression der onkogenen Variante NeuT, die sich durch eine liganden-unabhängige, konstitutive Aktivität kennzeichnet, auf RNA und Proteinbasis nachgewiesen werden. Durch die Verwendung eines bidirektionalen Promotors wird die gleichzeitige Expression von sowohl NeuT als auch EGFP als Reporter erlaubt. Das EGFP erlaubt die indirekte Kontrolle zur Funktionalität des MCF-7/NeuT Zellsystems durch fluoreszenzmikroskopische Analyse. Die Überexpression von NeuT wurde mittels quantitativer realtime PCR und Immunoblottings nachgewiesen. Sowohl die RNA als auch

die Protein Daten belegen, dass die durch Doxyzyklin induzierbare NeuT Expression bereits nach 6 Stunden visualisierbar ist (Abb. 3.1 und 3.2).

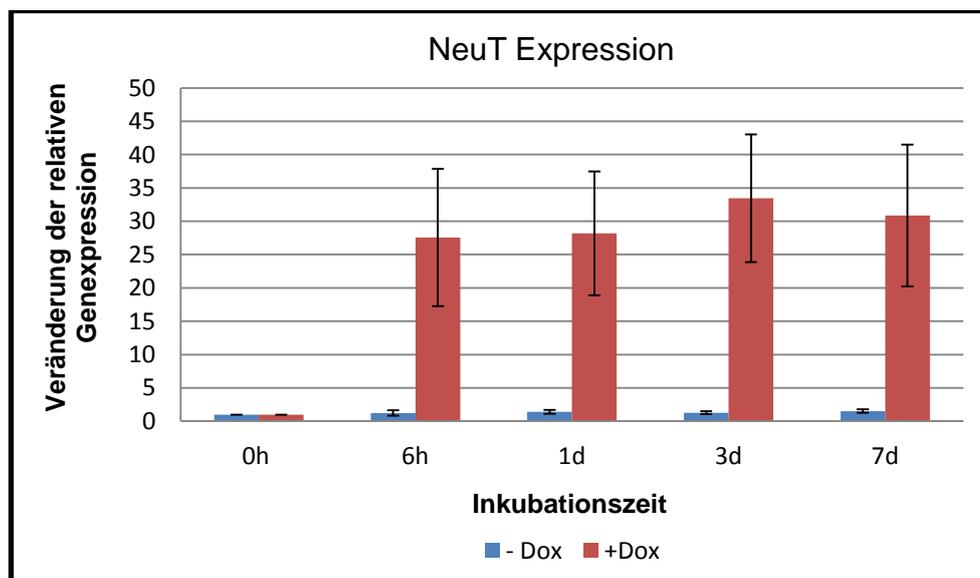


Abbildung 3.1: ERBB2/NeuT RNA Expression in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden RNA-Extrakte isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Die Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n=3$ unabhängigen Experimenten.

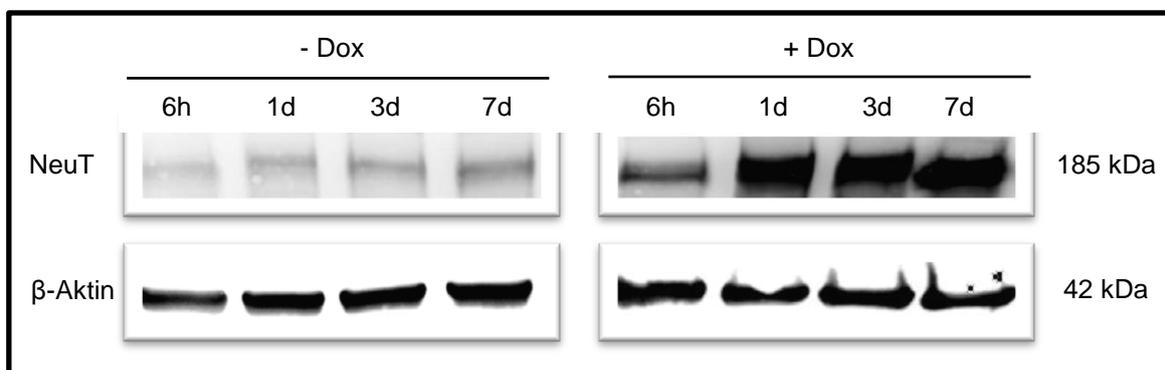


Abbildung 3.2: ERBB2/NeuT Protein Expression in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden Protein-Extrakte generiert und mittels Western Blot Technik analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus $n=3$ unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Onkogen ERBB2/NeuT induzierte vorzeitige Seneszenz korreliert mit Veränderung der Zellmorphologie in MCF-7 Zellen

Als Resultat der NeuT Überexpression durch Doxyzyklin Behandlung zeigten MCF-7 Zellen einen auffällig veränderten Phänotyp, der bereits nach 3 Tagen durch eine enorme Vergrößerung und eine Veränderung der dreidimensionalen Zellstruktur

charakterisiert ist, wobei nicht klar ist, inwieweit sich das Zellvolumen verändert. Ein zentralisierter Nukleolus sowie eine zunehmende Ausbildung von Vakuolen im Zytoplasma sind weitere Merkmale für das Eintreten der Seneszenz. Diese morphologischen Veränderungen lassen sich überwiegend in EGFP-positiven Zellen auffinden und sind ein charakteristisches Merkmal der zellulären Seneszenz (Abb. 3.3)

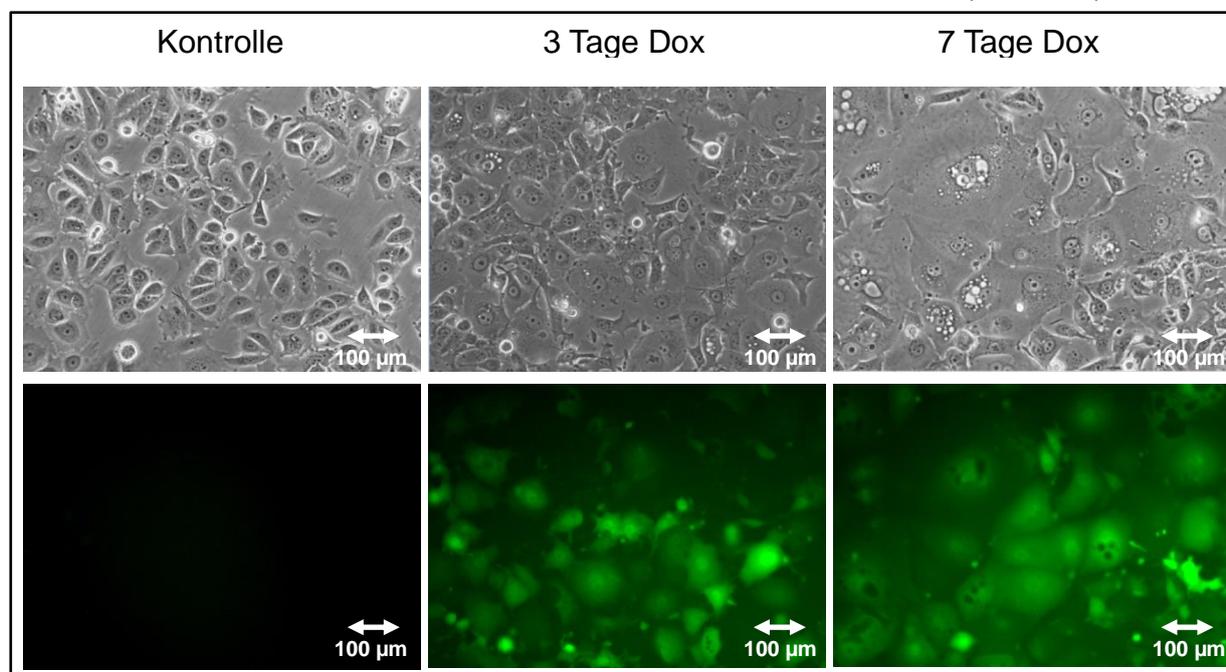


Abbildung 3.3: Morphologische Veränderungen während NeuT-induzierter Onkogen transformation und darauf folgender Seneszenz

MCF-7/NeuT Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit und ohne Doxyzyklin inkubiert. Doxyzyklin behandelte Zellen, die seneszent geworden sind, zeichnen sich durch ein vergrößertes Zytoplasma und einer gesteigerten Menge an Vakuolen aus und exprimieren das grünfluoreszierende Protein EGFP. (20x Vergrößerung)

Neben morphologischen Veränderungen infolge der Onkogen transformation wurden auch Veränderungen der Genexpression zeitabhängig untersucht, die teilweise in der Dissertation von Matthias Hermes (2007) beschrieben wurden. Dazu wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Anschalten der ERBB2 Überexpression RNA aus MCF-7/NeuT Zellen isoliert und mittels Affymetrix Gene Array (HG-U133A Plus 2) untersucht. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob ERBB2-abhängige Veränderungen der Genexpression auch bei Brustkrebspatienten zu finden sind.

3.2 Der HER2/ERBB2 Status zeigt ein verändertes Expressionsmuster in Brustkrebspatienten und im MCF-7/NeuT Zellmodell

Um den Einfluss der HER2/ERBB2 Überexpression auf die Genexpression in Brustkrebspatienten zu untersuchen, wurden verschiedene Affymetrix Gene-Array Daten-

sätze untersucht. Dabei wurde RNA aus Gewebe von Patienten (n=788), die sich aus den Kohorten Mainz, Rotterdam und Transbig zusammensetzen, mit nodal-negativem Mammakarzinom isoliert und mittels Affymetrix HG-U133A Gene Array untersucht. Ziel war es, die Gene zu identifizieren, die mit einem positiven HER2/ERBB2 Status assoziiert sind. Dabei erfolgte die Einteilung der Patientinnen in zwei unterschiedliche Subgruppen, wobei eine Gruppe positiv sowohl für den Estrogen-Rezeptor als auch den HER2-Rezeptor war (n= 57), während die zweite Gruppe nur einen positiven Estrogen-Rezeptor Status aufwies (n= 519), so dass spezifisch die durch HER2 veränderte Genexpression betrachtet werden konnte. Zur Beurteilung, ab wann ein Patient als HER2 bzw. Estrogen-Rezeptor positiv bzw. negativ gilt, erfolgte die Dichotomisierung, d.h. die Bestimmung eines sogenannten „Cut-Points“. Dieser definiert, ab welchem RNA Expressionslevel zwischen einem positiven und negativen Rezeptorstatus unterschieden wird (Häufigkeitsverteilung). Diese ist nachfolgend für die Gesamtkohorte (n= 788) für den Estrogen- als auch den HER2-Rezeptor graphisch dargestellt.

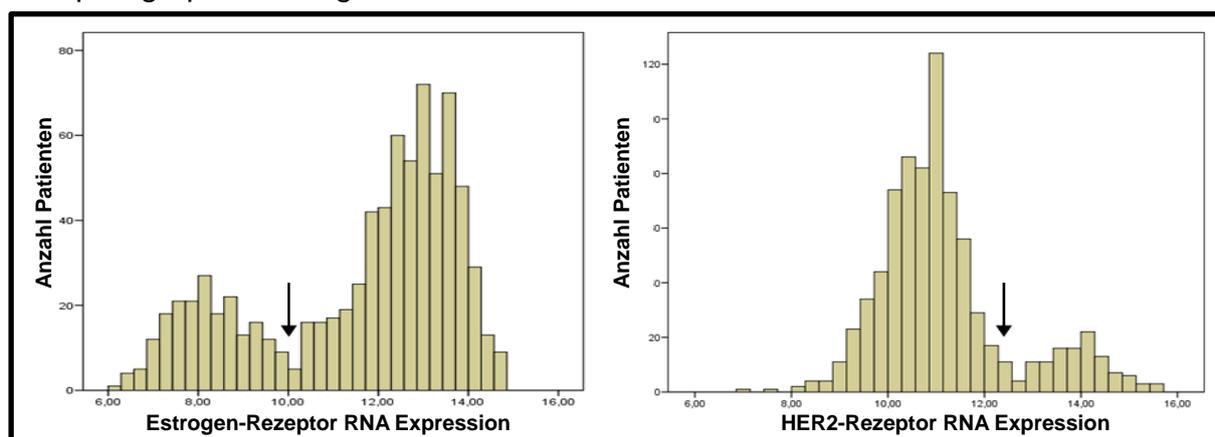


Abbildung 3.4: Häufigkeitsverteilung der Estrogen- und HER2-Rezeptor RNA Expression zur Charakterisierung des Rezeptor-Status von Brustkrebspatienten in der Gesamtkohorte (n=788) [3]

Für den Estrogen- sowie den HER2-Rezeptor zeigt sich eine bimodale Verteilung der RNA Expression. Der „Cut-Off“ Punkt für den Estrogen-Rezeptor wurde auf 10 gelegt, für den HER2-Rezeptor betrug dieser 12,6. Anhand der festgelegten „Cut-Off“ Punkte konnten bei den Patienten zwischen einem Estrogen-Rezeptor positiven/negativen, einem HER2-Rezeptor positiven/negativen oder einem Estrogen-/HER2-Rezeptor positiven/negativen Status differenziert werden.

Anschließend wurde für jedes Gen die Mediane der Genexpression in jeder Subgruppe ermittelt. Dann erfolgte die Berechnung der Differenz der Mediane ($ER^+/HER2^+$ minus $ER^+/HER2^-$). Dabei deuten positive Differenzen in der Genexpression auf Gene hin, die durch HER2 Überexpression hochreguliert werden. Auf der anderen Seite deuten negative Differenzen auf Gene hin, die durch HER2 Überexpression herunterreguliert werden. In der Estrogen-Rezeptor positiven MCF-

7/NeuT Zelllinie wurde die Veränderung der Genexpression nach Anschalten der ERBB2 (NeuT) Überexpression zu verschiedenen Zeitpunkten vergleichend zur Kontrollbedingung untersucht. Um schließlich Gene zu finden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch ERBB2 Überexpression beeinflusst werden, wurden beide Datensätze miteinander verglichen und mögliche Überlappungen anhand von Venn-Diagrammen grafisch dargestellt (Abb.3.5)..

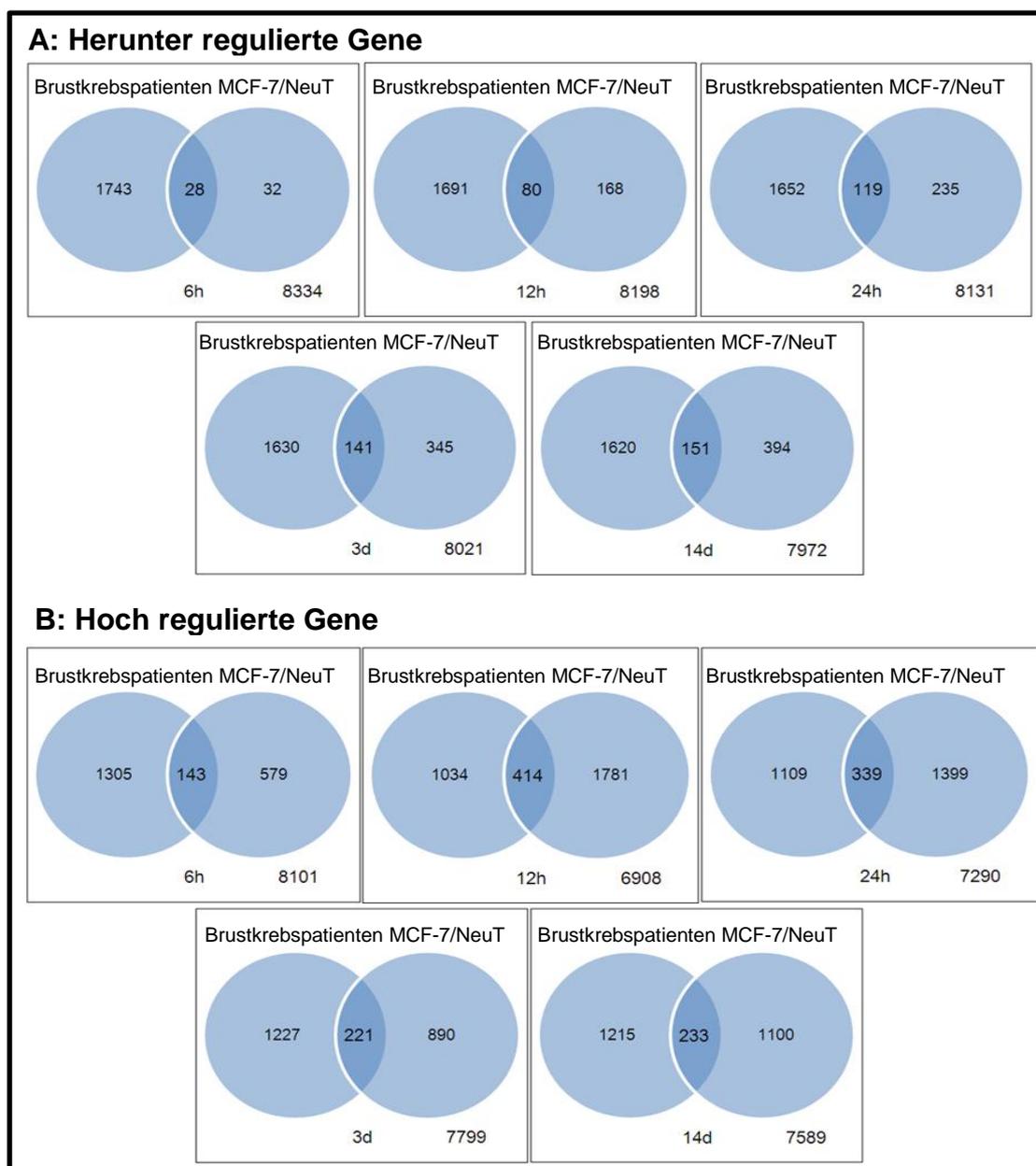


Abbildung 3.5: HER2/ERBB2 induzierte Veränderung der Genexpression in Brustkrebspatienten und MCF-7/NeuT Zellen

Anhand von Venn-Diagrammen wurde eine Veränderung des Expressionsmusters von Genen (10137) in Brustkrebspatientinnen und MCF-7/NeuT Zellen nach Anschalten der ERBB2 Überexpression durch Doxyzyklin zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Dabei wird zwischen Genen unterschieden, die entweder herunter- oder hochreguliert sind (**A** bzw. **B**). Die Überlappung beschreibt die Anzahl von Genen, die sowohl in Brustkrebspatienten als auch im MCF-7/NeuT Zellmodell gemeinsam herunter- oder hochreguliert sind. Bei Brustkrebspatienten wurden solche Gene einbezogen, die signifikant verändert vorlagen ($p < 0,05$). In MCF-7/NeuT Zellen wurden die Gene betrachtet, die eine Veränderung der Expression von mindestens einem Faktor 2 aufwiesen.

Allerdings wurden beide Datensätze auf zwei unterschiedlichen Mikrochips generiert (Brustkrebspatientinnen: Affymetrix HG-U133A; MCF-7/NeuT Zelllinie: HG-U133A Plus 2), so dass nur solche Gene betrachtet werden konnten, für die auf beiden Mikrochips die gleichen Probesets verwendet wurden. Die Anzahl dieser Gene belief sich auf insgesamt 10137. Im MCF-7/NeuT Modell wurden die Gene betrachtet, die eine zeitabhängige Veränderung der Genexpression von mindestens einem Faktor 2 nach ERBB2/NeuT Induktion aufzeigten.

Die Untersuchung von Genen (10137) in sowohl Brustkrebspatienten mit positiven HER2/ERBB2 Status als auch in ERBB2 überexprimierenden MCF-7/NeuT Zellen (Abb. 3.5) zeigte zunächst, dass etwa 17% der untersuchten Gene in Brustkrebspatienten signifikant ($p < 0,05$) herunterreguliert waren (1771 Gene). In MCF-7/NeuT Zellen variierte dieser Wert lediglich zwischen 0,6% (6h) und 5,4% (14d). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der untersuchten Gene (79-82%) nicht signifikant herunter reguliert wurde. Die gemeinsame Schnittmenge signifikant herunterregulierter Gene von HER2/ERBB2 positiven Brustkrebspatienten und ERBB2 überexprimierenden MCF-7/NeuT Zellen variierte je nach Zeitpunkt nach Anschalten der ERBB2 Expression zwischen 1,5% (6h) und 7% (14d). Auffällig war allerdings, dass die Mehrheit der in Brustkrebspatienten herunterregulierten Gene nicht mit denen in MCF-7/NeuT Zellen übereinstimmten. Auf der anderen Seite fanden sich viele in MCF-7/NeuT Zellen herunterregulierte Gene auch in Brustkrebspatienten wieder (47% nach 6h, 28% nach 14d). Dieser Befund deutet darauf hin, dass viele Gene durch ERBB2 gesteuert werden.

Bei der Untersuchung von Genen (10137) in HER2/ERBB2 positiven Brustkrebspatienten und ERBB2 überexprimierenden MCF-7/NeuT Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass 14% der untersuchten Gene in Brustkrebspatienten signifikant hochreguliert waren (1448). In MCF-7/NeuT Zellen variierte dieser Wert zwischen 7,1% (6h) und 13,1% (14d) und erreichte einen Maximalwert von 21,6 % nach 12h. Die Mehrheit der untersuchten Gene (80% nach 6h und 75% nach 14d) wurde nicht signifikant hochreguliert. Die gemeinsame Schnittmenge signifikant hochregulierter Gene variierte je nach Zeitpunkt nach Anschalten der ERBB2 Expression in MCF-7/NeuT Zellen zwischen 7% (6h), 13% (12h) und 9% (14d). Die Mehrheit (> 50%) der in Brustkrebspatienten signifikant hochregulierten Gene fand sich allerdings nicht in

MCF-7/NeuT Zellen wieder. Andererseits zeigte sich, dass zwischen 19,8% (6h) und 17,5% (14d) der in MCF-7/NeuT Zellen signifikant hochregulierten Gene auch in Brustkrebspatienten hochreguliert waren und wahrscheinlich direkt durch ERBB2 reguliert werden.

Der Vergleich zwischen HER2/ERBB2 positiven Patienten und ERBB2 überexprimierenden MCF-7/NeuT Zellen verdeutlichte allerdings auch, dass in beiden Systemen eine Vielzahl unterschiedlicher Gene unabhängig voneinander herunter- bzw. hochreguliert werden. Dies ist nicht zuletzt der Tatsache geschuldet, dass es sich bei den untersuchten Patienten um ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Geweben bzw. einem vollständigen Organismus handelt und auch andere Faktoren eine wichtige Rolle zur Regulation der Genexpression spielen. Dem vereinfachten MCF-7/NeuT System unterliegen möglicherweise andere bzw. zusätzliche Mechanismen zur Genexpression. Ein Beispiel stellt das Angebot von Nährstoffen dar. Zellen, die im Gewebe oder Organ als Verbund wachsen, werden nicht zwangsläufig einheitlich versorgt, während dies bei *in vitro* Zellkulturen, die als Monolayer wachsen, gewährleistet ist. Dies kann Einfluss auf die Aktivierung bzw. Prozessierung von Transkriptionsfaktoren haben, welche die Genregulation steuern. Inwieweit dies auftritt, hängt auch davon ab, welche Funktion ein entsprechendes Gen übernimmt. Dies kann dabei an der Progression des Zellzyklus, der Proliferation, der Zelldifferenzierung, dem Metabolismus oder der antioxidativen Zellantwort auf internen oder externen Stress beteiligt sein.

Im Zentrum dieser Arbeit stehen dabei Gene, die an der Aufrechterhaltung des Redox Status der Zelle beteiligt sind. Der Fokus ist dabei insbesondere auf Mitglieder des Thioredoxinsystems gerichtet, deren Veränderung auf genetischer Ebene in Zusammenhang mit Krebs gebracht werden. Dieses setzt sich aus den Proteinen Thioredoxin, Thioredoxin Reduktase und TXNIP („*Thioredoxin binding protein 2*“ bzw. „*Vitamin D3 upregulated protein*“) zusammen. Interessanterweise finden sich die an der Regulation von oxidativem Stress beteiligten Gene Thioredoxin und TXNIP in der oben beschriebenen gemeinsamen Schnittmenge für herunter- bzw. hochregulierter Gene wieder. Während Thioredoxin sowohl bei Brustkrebspatienten als auch im MCF-7/NeuT Zellmodell hochreguliert wird, erfolgt auf der anderen Seite eine Repression von TXNIP. Dies deutet auf eine relevante Beteiligung des Thioredoxin-

systems in Abhängigkeit des ERBB2/HER2 Status bzw. der ERBB2 Expression hin und soll im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden.

3.3 TrxR und TXNIP sind mit Prognose bei Brustkrebspatienten verknüpft

TrxR und TXNIP bilden zentrale Bestandteile und Regulatoren des Thioredoxin-systems und sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Dazu zählen neben der Regulation und Kontrolle des Redox Status auch Aufgaben, die mit der DNA Synthese, der Inhibition von Apoptose aber auch der Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren verknüpft sind [208-211]. Die Integration in solch essentielle zelluläre Prozesse zeigt die enorme Bedeutung dieser Proteine im Hinblick auf eine funktionierende Homöostase innerhalb der Zelle. Viele Literaturquellen beschreiben eine Veränderung der Genexpression von TrxR und TXNIP und zeigen damit verbundene Fehlregulationen von Signalwegen auf, die letztendlich zu verschiedensten Krebsarten führen können. Dabei spielt eine Störung des Gleichgewichts des Thioredoxin-systems nicht zwangsläufig die tragende Rolle der Fehlregulation. In dieser Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der Genexpression von TrxR und TXNIP und dem metastasefreien Überleben von Brustkrebspatienten besteht.

3.3.1 ERBB2/HER2 Überexpression verändert den Expressionsstatus von TrxR und TXNIP in metastasefreien Brustkrebspatienten

Kontrollmechanismen von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS: „*reactive oxygen species*“) spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung. Transformierte Zellen, die z.B durch eine erhöhte Expression des Onkogens ERBB2/HER2 charakterisiert sind, produzieren mehr ROS und nutzen diese, um die zelluläre Proliferationsrate zu steigern [112, 212]. Dabei spielt das generierte Level an ROS eine entscheidende Rolle, da diese zum einen wichtig für intrazelluläre Signalkaskaden sind und einerseits zum Überleben einer Zelle beitragen, zum anderen aber durch andauernde Exposition zur Schädigung bis hin zum Tod der Zelle führen können [84, 85, 112, 212]. Daher ist es von enormer Bedeutung, dass solche kritischen Mechanismen streng kontrolliert werden.

Die Daten von 788 metastasefreien Brustkrebspatienten (postoperativ), die keine Chemotherapie erhalten haben, wurden hinsichtlich ihrer Expression von Thioredoxin Reduktase und TXNIP in Bezug auf den ERBB2/HER2 Status analysiert, um die Bedeutung des Thioredoxinsystems zu untersuchen. Die Daten bezüglich TrxR und TXNIP RNA Expression in Bezug auf metastasefreies Überleben sind nachstehender Tabelle (Tab. 3.1) zu entnehmen. Diese zeigen, dass die TrxR RNA Expression in Brustkrebspatienten mit schlechter Prognose assoziiert ist, während die TXNIP RNA Expression mit verbesserter Prognose assoziiert ist.

Tabelle 3.1: Korrelation von TrxR und TXNIP RNA Expression mit metastasefreiem Überleben

	Prognostischer Faktor	P-Wert	Hazard Ratio	95% CI
Mainz Kohorte (n=200)	TrxR Expression	0,032	1,920	1,058-3,486
	TXNIP Expression	0,017	0,598	0,392-0,912
Rotterdam Kohorte (n=286)	TrxR Expression	0,004	1,755	1,196-2,576
	TXNIP Expression	<0,001	0,654	0,525-0,815
Transbig Kohorte (n=302)	TrxR Expression	0,021	1,692	1,084-2,642
	TXNIP Expression	0,013	0,639	0,448-0,910
Gesamtkohorte (n=788)	TrxR Expression	<0,001	1,955	1,519-2,518
	TXNIP Expression	<0,001	0,642	0,554-0,743

TrxR RNA Expression ist in nodal-negativen Brustkrebspatienten mit schlechter Prognose hinsichtlich metastasefreies Überleben assoziiert (Univariate Cox-Analyse). Im Gegensatz dazu zeigt die TXNIP RNA Expression diesbezüglich eine bessere Prognose; **CI**: Konfidenzintervall

Der Zusammenhang zwischen metastasefreies Überleben und der TrxR und TXNIP RNA Expression wurde mittels Kaplan Meier Analyse visualisiert (Abb. 3.6) und zeigte, dass eine erhöhte TrxR RNA Expression mit schlechtem metastasefreies Überleben verknüpft ist. Gleichzeitig erhöhte die gesteigerte TXNIP RNA Expression das metastasefreies Überleben der Patienten und ist daher mit besserer Prognose assoziiert.

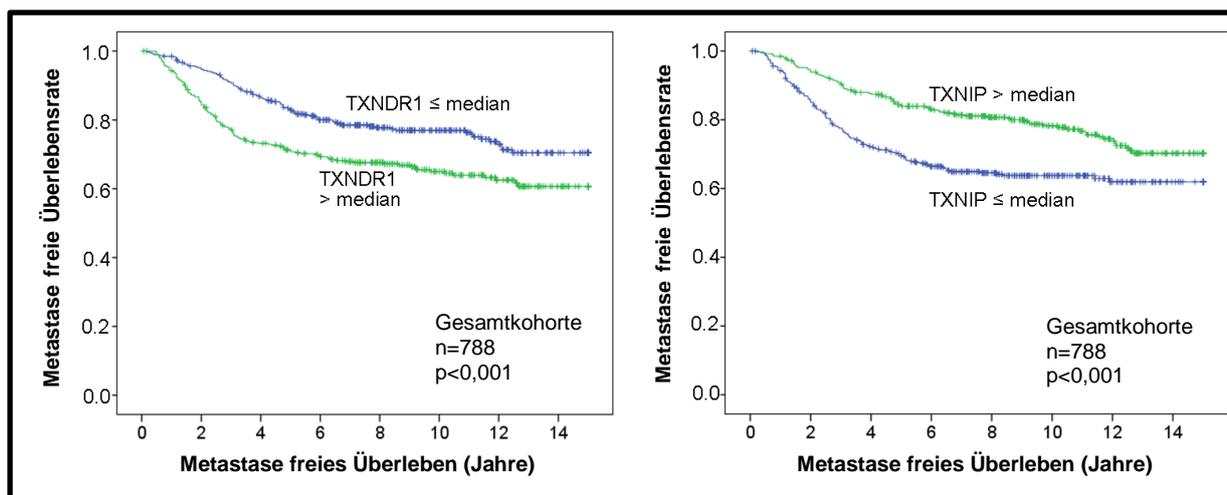


Abbildung 3.6: Zusammenhang zwischen TrxR und TXNIP mit metastasefreier Überlebenszeit [3]
Hohe TrxR Expression ist mit einer verminderten metastasefreien Überlebenszeit assoziiert, während eine gesteigerte TXNIP Expression mit einer verlängerten metastasefreien Überlebenszeit assoziiert ist. Die Analyse beinhaltet 788 Patienten mit nodal-negativem Brustkrebs, die keine Chemotherapie erhalten haben.

Hinsichtlich des krankheitsfreien- und Gesamtüberleben in Bezug auf die TrxR und TXNIP Expression konnte nur in der Mainz Kohorte eine signifikante Assoziation und damit eine verbesserte Prognose aufgezeigt werden.

Tabelle 3.2: Korrelation von TrxR und TXNIP RNA Expression mit krankheitsfreien und Gesamtüberleben

Überleben	Prognostischer Faktor	P-Wert	Hazard Ratio	95% CI
krankheitsfrei	TrxR Expression	0,010	2,025	1,180-3,476
	TXNIP Expression	0,012	0,617	0,423-0,899
Gesamt	TrxR Expression	0,032	1,838	1,054-3,204
	TXNIP Expression	0,192	0,774	0,526-1,137

In nodal-negativen Brustkrebspatienten der Mainz Kohorte (n=200) ist eine Assoziation zwischen TrxR und TXNIP RNA Expression und der krankheitsfreien- bzw. Gesamtüberlebensrate nachweisbar (Univariate Cox Analyse); **CI**: Konfidenzintervall

3.3.2 Die TrxR Expression ist mit dem ERBB2 Status in Brustkrebspatienten verknüpft

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz von ERBB2 wurden die Expressionsdaten von TrxR und TXNIP in Zusammenhang mit dem ERBB2 Status der Brustkrebspatienten sowohl in den einzelnen Kohorten als auch in der Gesamtkohorte analysiert (ER⁺/HER2⁺ minus ER⁺/HER2⁻). Dabei zeigte sich im Vergleich zu ERBB2-negativen Brustkrebspatienten eine gesteigerte TrxR Expression in ERBB2-positiven

Brustkrebspatienten sowohl in den einzelnen als auch in der Gesamtkohorte. Für TXNIP konnte lediglich ein Trend hinsichtlich verminderter Expression in ERBB2-positiven Patienten in den einzelnen Kohorten festgestellt werden. Allein die Gesamtkohorte zeigte einen leicht antikorrelativen Zusammenhang zwischen positiven ERBB2 Status und verminderter TXNIP RNA Expression auf. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Ergebnissen der Analyse der differentiellen Genexpression zu bringen. Der Zusammenhang zwischen dem ERBB2 Status und der TrxR bzw. TXNIP RNA Expression ist Abb. 3.7 zu entnehmen.

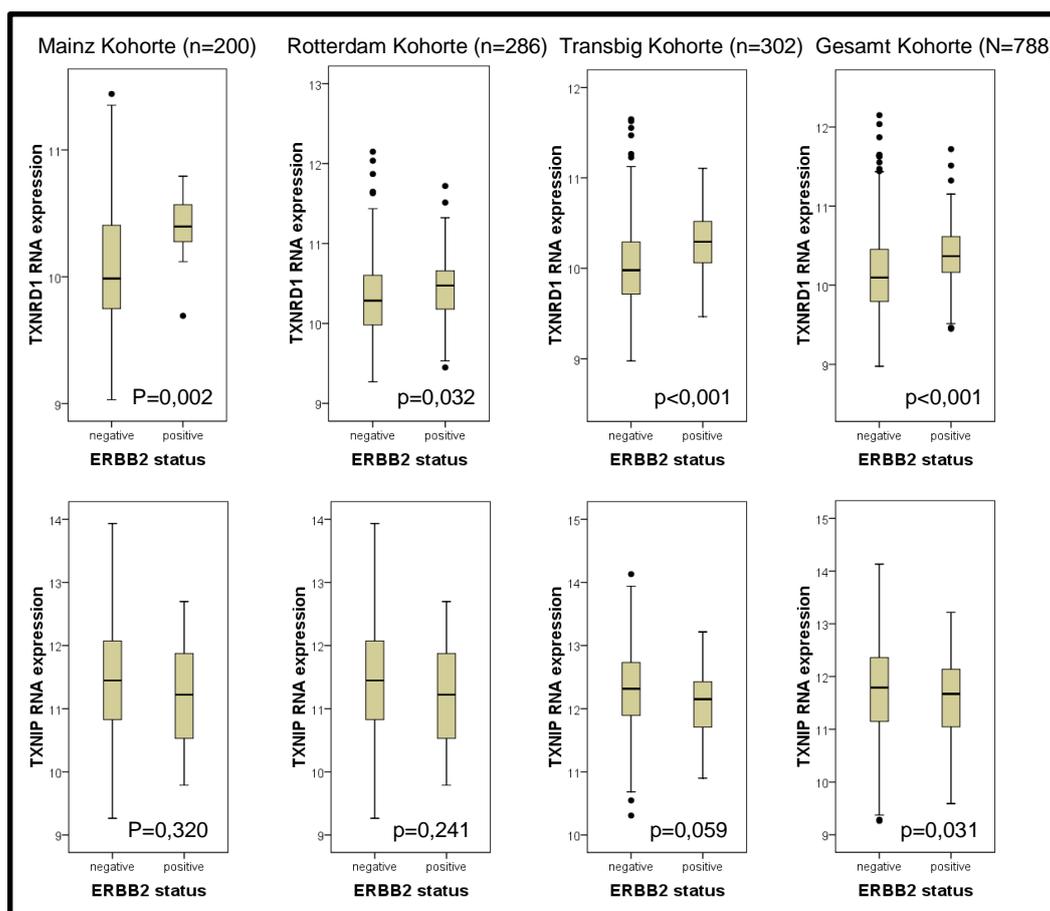


Abbildung 3.7: Zusammenhang zwischen ERBB2 Status und TrxR bzw. TXNIP RNA Expression [3]

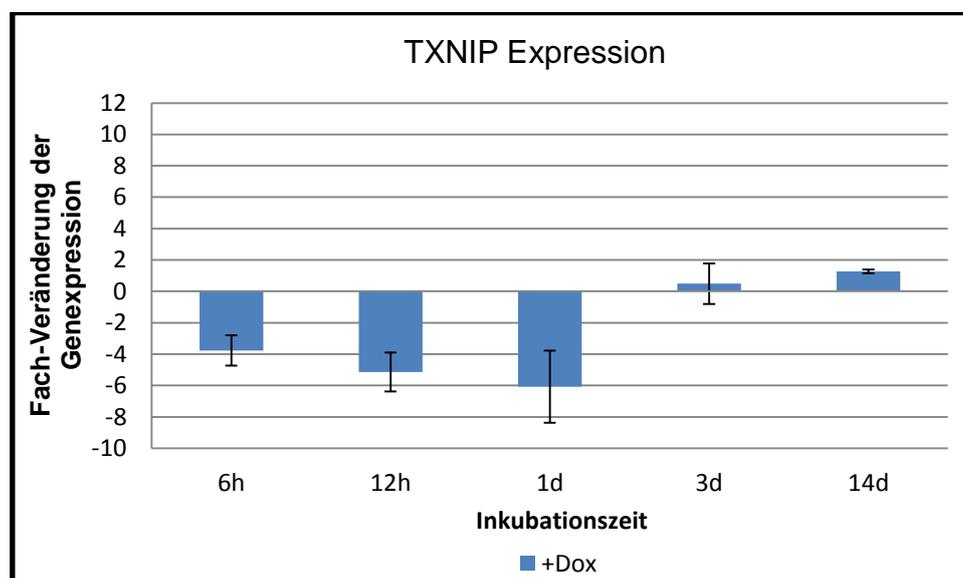
Ein positiver ERBB2 Status ist mit einem signifikant hohen Level an TrxR Expression assoziiert. Die signifikante Assoziation wurde in allen drei unabhängigen Kohorten sowie in der Gesamtkohorte von 788 Patienten mit nodal-negativem Brustkrebs erzielt. Im Gegensatz zu TrxR wurde in Patienten mit ERBB2-positiven Status ein Trend zur verringerten TXNIP Expression detektiert. Dieser Trend erwies sich nur in der Gesamtkohorte als signifikant. Die dargestellten Boxen entsprechen dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Diese werden durch den Median in das obere und untere Quantil unterteilt. Die Länge der Box wird durch den Interquartilabstand bestimmt, der ein Maß für die Streuung der Daten darstellt. Die Fehlerbalken (Antennen) beschreiben die außerhalb der Box liegenden Werte. Daten, die außerhalb der Antennen und der Box liegen, sind als Punkte gekennzeichnet und gelten als ausreißerverdächtig.

3.4 Der Expressionsstatus von ERBB2/NeuT steht in Zusammenhang mit dem Expressionsmuster von TrxR und TXNIP in MCF-7/NeuT Zellen

Gestützt durch die klinischen Daten der Brustkrebspatienten wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein Einfluss von ERBB2/NeuT auf das Thioredoxinsystem *in vitro* unter Verwendung des MCF-7/NeuT Zellsystems untersucht.

3.4.1 TrxR und TXNIP zeigen ein verändertes Expressionsmuster infolge der ERBB2/NeuT Onkogen transformation in MCF-7/NeuT Zellen

Infolge der Assoziation von TrxR und TXNIP mit dem klinisch relevanten ERBB2 Status und dem gefundenen Zusammenhang zwischen der TrxR und TXNIP RNA Expression und dem metastasefreien Überleben von Brustkrebspatienten sollte eine Regulation des Thioredoxinsystems durch ERBB2/NeuT untersucht werden. Dazu konnten bereits durchgeführte Affymetrix Gene Array Analysen innerhalb der Arbeitsgruppe um Prof. Jan Hengstler genutzt werden, welche die Veränderung des RNA Expressionsmusters nach Einschalten der NeuT-Expression durch Doxyzyklin (Tet-On) zeigten. Nach Einschalten der NeuT Expression, definiert als Tag 0, wurde in bestimmten Zeitintervallen (bis 14 Tage) RNA aus Zellen isoliert, in cDNA konvertiert und mittels Affymetrix Gene Array auf Veränderungen der Genexpression genomweit untersucht. Die zeitabhängigen Expressionsdaten für die Mitglieder des Thioredoxinsystems Thioredoxin Reduktase, Thioredoxin und TXNIP sind nachstehend aufgeführt (Abb. 3.8 und 3.9).



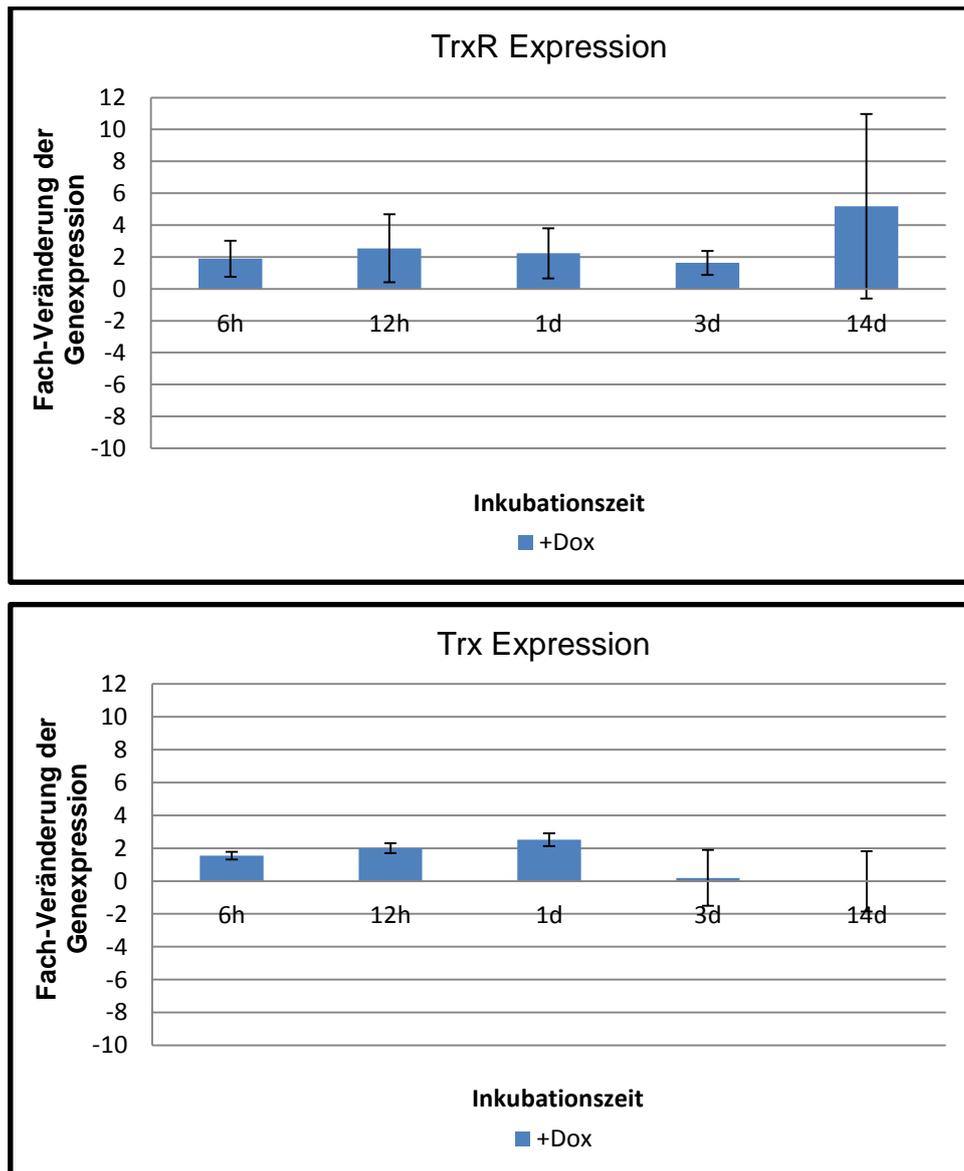


Abbildung 3.8: ERBB2/NeuT vermittelte Veränderung der Expression von TXNIP, TrxR und Trx in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Doxycyclin inkubiert. Anschließend wurden RNA-Extrakte isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Affymetrix Gene Array HG-U133A Plus 2 analysiert. Das Ergebnis repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unterschiedlichen Probesets der Expression von TXNIP, TrxR und Trx. Die Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden auf die Kontrollbedingung (0h) normiert. Positive Werte beschreiben eine fach-gesteigerte Expression des untersuchten Zielgens im Vergleich zur Kontrollbedingung, negative Werte eine fach-verminderte Expression.

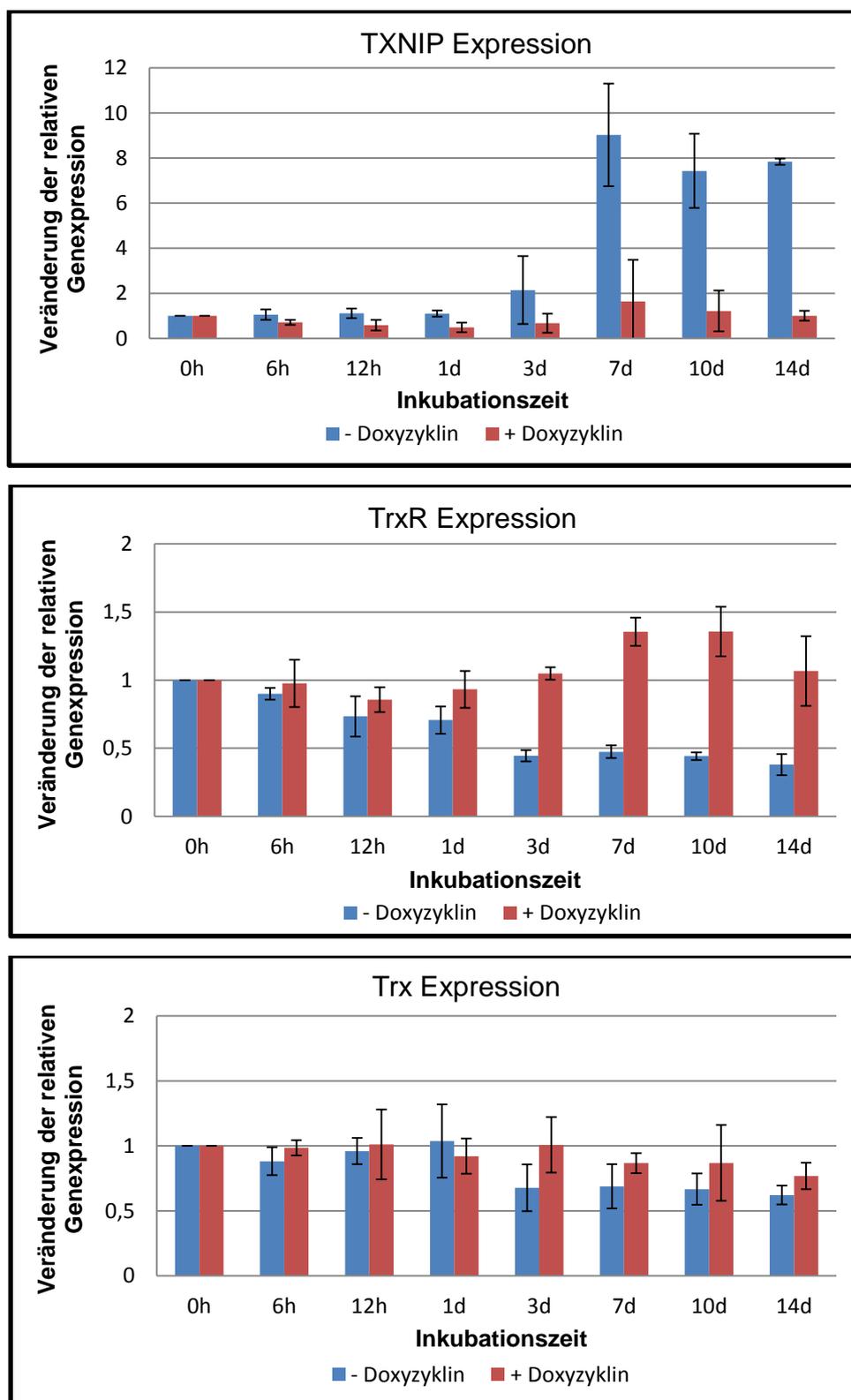
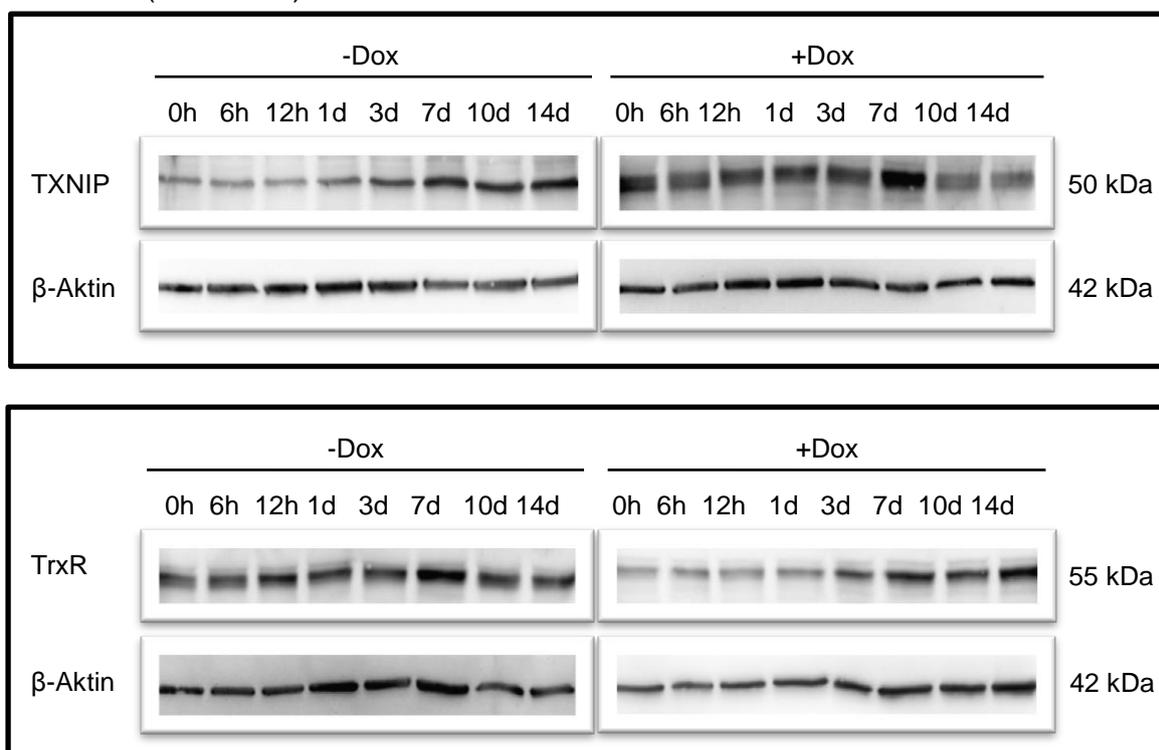


Abbildung 3.9: ERBB2/NeuT-vermittelte Veränderung der RNA Expression von TXNIP, TrxR und Trx in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Die Gene Array Expressionsdaten von TXNIP konnten im MCF-7/NeuT Zellsystem nach Doxyzyklin Inkubation erfolgreich mittels qRT-PCR bestätigt werden. Zunächst konnte bis Tag 3 eine kontinuierliche Repression der RNA gezeigt werden ehe bis Tag 7 das Ausgangsniveau wieder erreicht bzw. bis Tag 14 sogar minimal überschritten wurde. Lediglich die Kontrollproben zeigten ab Tag 7 eine stark gesteigerte RNA Expression, die bis Tag 14 stagnierte und möglicherweise auf die zunehmende Zelldichte zurückzuführen war. Das Expressionsniveau der TrxR zeigte sich im zeitlichen Verlauf zwar erhöht, vergleichsweise jedoch schwächer als beim Gene Array. Die Kontrollsituation zeigte dagegen eine kontinuierliche Abnahme der TrxR Expression. Während Trx gemäß Gene Array Daten einen vergleichbaren Expressionsverlauf zu TrxR zeigte, konnte dies mittels quantitativer realtime PCR nicht bestätigt werden, da diese Daten einen Trend der zeitabhängigen RNA Repression aufzeigten. Dieser Sachverhalt lag sowohl in der Kontrollsituation als auch in der durch onkogen-vermittelte Zelltransformation vor. Der Informationsgehalt der vorliegenden RNA Daten gibt jedoch keinen Aufschluss über die Proteinexpression, da RNA- und Proteinlevel nicht immer in gleichem Maße exprimiert werden. Daher wurden zusätzlich die zeitabhängigen Proteinlevel von TrxR, Trx und TXNIP unter Kontrollbedingungen sowie nach ERBB2-vermittelter Onkogentransformation untersucht (Abb. 3.10).



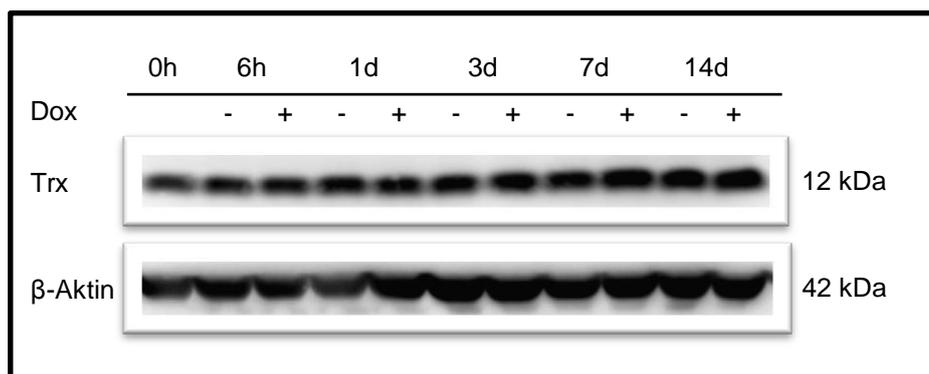


Abbildung 3.10: ERBB2/NeuT-vermittelte Protein Expression von TXNIP, TrxR und Trx in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit und ohne Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden Proteinextrakte generiert und mittels Western Blot Analyse detektiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Während unter Kontrollbedingungen bereits ein Anstieg der Proteinexpression von TXNIP beobachtet werden konnte und damit im möglichen Zusammenhang mit der Zelldichte steht, zeigte sich für Doxyzyklin-behandelte Zellen im Gegensatz zu den Daten des Gene Arrays und der qRT-PCR ein hohes basales Level über den gesamten Inkubationszeitraum. Für TrxR zeigte sich über den Inkubationszeitraum von 14 Tagen ein konstanter Level an Protein. Doxyzyklin-behandelte Zellen zeigten ab Tag 3 eine eindeutig gesteigerte Expression von TrxR, die bis Tag 14 konstant hoch blieb und sich mit den Ergebnissen von Gene Array und qRT-PCR deckte. Für Thioredoxin zeigte das Level an Gesamtprotein in unbehandelten und behandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend zeigte sich insgesamt sowohl für TXNIP als auch für Trx keine zuverlässige Übereinstimmung im Hinblick ihrer RNA- und Proteindaten. Für TrxR wurde unter Verwendung des MCF-7/NeuT Zellsystems ein direkter Zusammenhang zwischen Genexpression und ERBB2 Überexpression deutlich. Aus diesem Grund konzentrierten sich die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente auf die mechanistische Aufklärung der Hochregulierung von TrxR durch ERBB2.

3.5 ERBB2/NeuT onkogen-vermittelte Aktivierung von Signalwegen in seneszenten MCF-7 Zellen

Die Überexpression von NeuT resultiert in der Aktivierung von zahlreichen Signalwegen, die unter anderem Prozesse wie Apoptose oder Proliferation innerhalb einer

Zelle steuern. Dazu zählen sowohl der RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT als auch der p38 Signalweg im späten Stadium der Seneszenz (Cadenas *et al.*, 2010, Trost *et al.*, 2005). Da sich eines der Ziele dieser Arbeit auf die mechanistische Aufklärung der onkogen-vermittelten Hochregulation der TrxR konzentriert, wurde zunächst ein möglicher direkter zeitabhängiger Einfluss von NeuT sowie der vier bedeutenden Signalwege RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, p38/MAPK sowie SAPK/JNK auf die Regulation von TrxR untersucht. Dazu wurden MCF-7/NeuT Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen mit Doxyzyklin und entsprechenden Inhibitoren, welche die beschriebenen Signalwege blockieren, inkubiert und hinsichtlich des RNA- bzw. Proteinlevels von TrxR mittels qRT-PCR und Western Blot analysiert.

3.5.1 NeuT beeinflusst die Expression von TrxR nur indirekt

Durch die Doxyzyklin-induzierte Onkogen transformation in Folge der ERBB2/NeuT Überexpression konnte ein zeitabhängiger Anstieg von TrxR sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene gefunden werden. Bisher konnte allerdings nicht geklärt werden, welchem molekularen Mechanismus diese Veränderung zu Grunde liegt. Um diesen Sachverhalt aufzuklären bzw. besser zu verstehen, sollte zunächst ein möglicher direkter Einfluss von NeuT auf TrxR herausgefunden werden. Das verwendete MCF-7/NeuT Modell zeichnet sich dadurch aus, dass NeuT zum einen stark überexprimiert wird und zum anderen konstitutiv aktiv ist. Der Versuchsansatz sah daher eine Inaktivierung von NeuT vor, welche durch die Substanz Lapatinib gewährleistet werden sollte. Bei Lapatinib handelt es sich um einen Tyrosinkinase-Inhibitor, der im Bereich der klinischen Forschung zur Behandlung von Patientinnen mit HER2/Neu positivem Mammakarzinom eingesetzt wird [3, 85, 213, 214].

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von insgesamt 3 und 7 Tagen mit Lapatinib allein sowie in Kombination mit Doxyzyklin während der induzierten NeuT Überexpression behandelt (Abb. 3.11). Dazu wurden zunächst Toxizitätsstudien (Neutralrot Assay) durchgeführt, um eine adäquate, nicht zytotoxische Behandlung mit Lapatinib zu gewährleisten. Um die erfolgreiche Inhibierung von NeuT durch Lapatinib zu überprüfen, wurde das Phosphorylierungslevel von ERK1/2 (Abb. 3.12) untersucht, da bereits erfolgreich gezeigt werden konnte (Dissertation Trost, 2005), dass NeuT zur Aktivierung und daher Phosphorylierung von ERK1/2 führt.

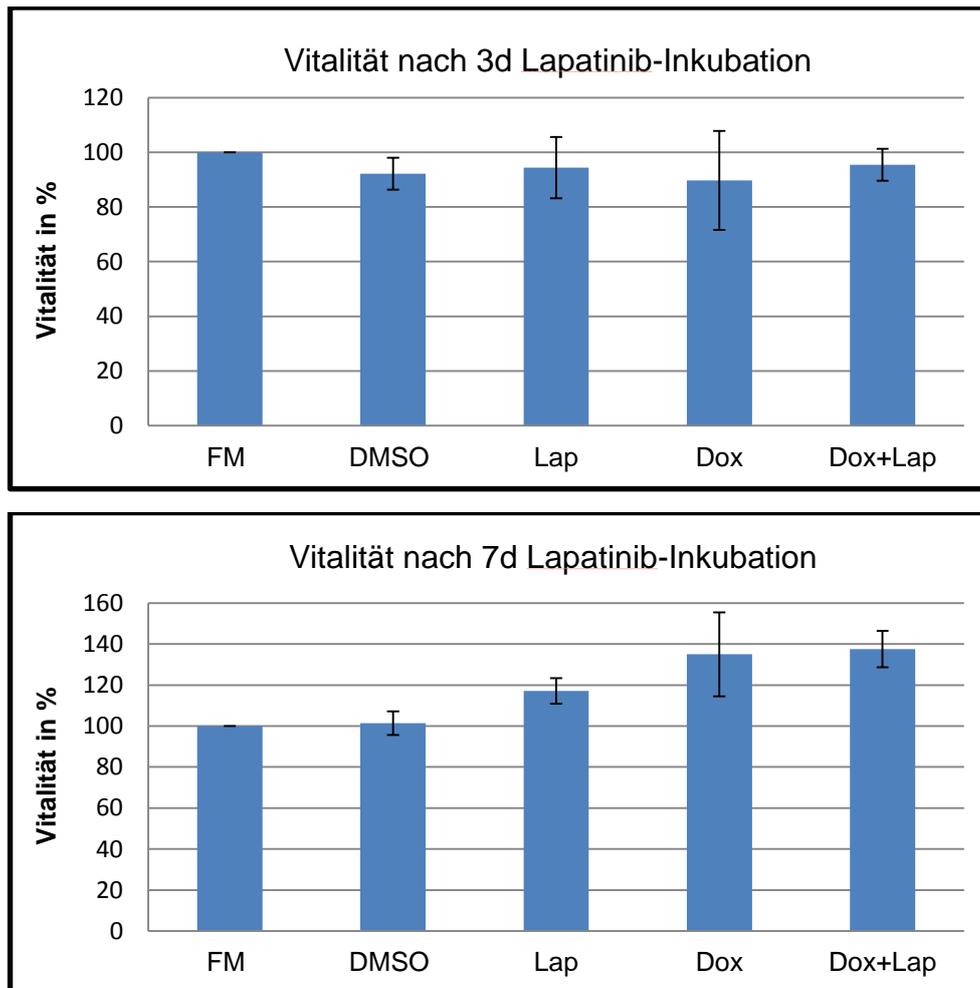
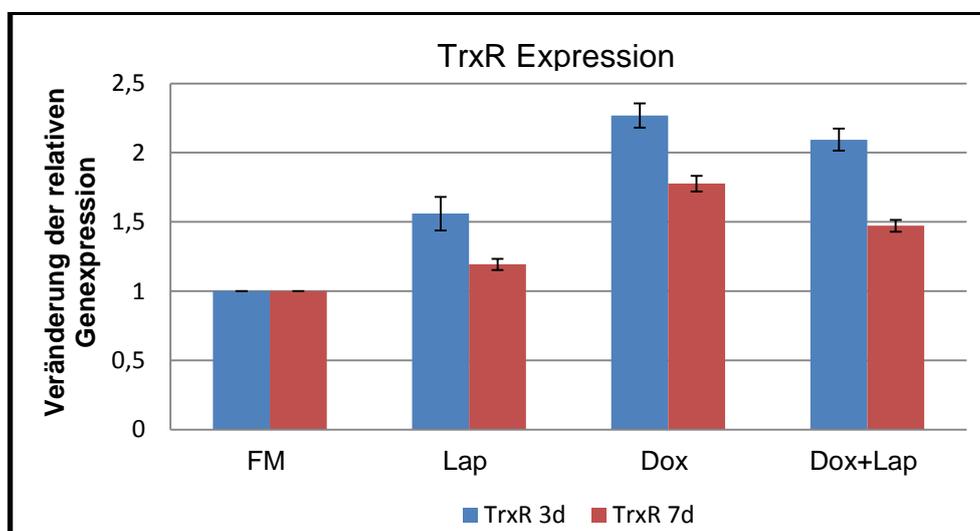


Abbildung 3.11: Einfluss der Hemmung der NeuT Kinaseaktivität durch Lapatinib auf die Vitalität von MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 3 und 7 Tagen mit Doxyzyklin und/oder Lapatinib ($1 \mu\text{M}$), einem NeuT Tyrosinkinasehemmer, inkubiert. Die Zugabe von Lapatinib erfolgte stets 1 Stunde vor Doxyzyklin Zugabe. Anschließend wurden Veränderungen der Zell Vitalität mittels Neutralrotassay bestimmt. Die generierten Proben wurden auf die Kontrollbedingung (Vitalität 100%, FM= Full Media, DMSO= 0,1%) normiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen zweier biologischer Replikate eines Experiments aus insgesamt $n=2$ unabhängigen Experimenten.



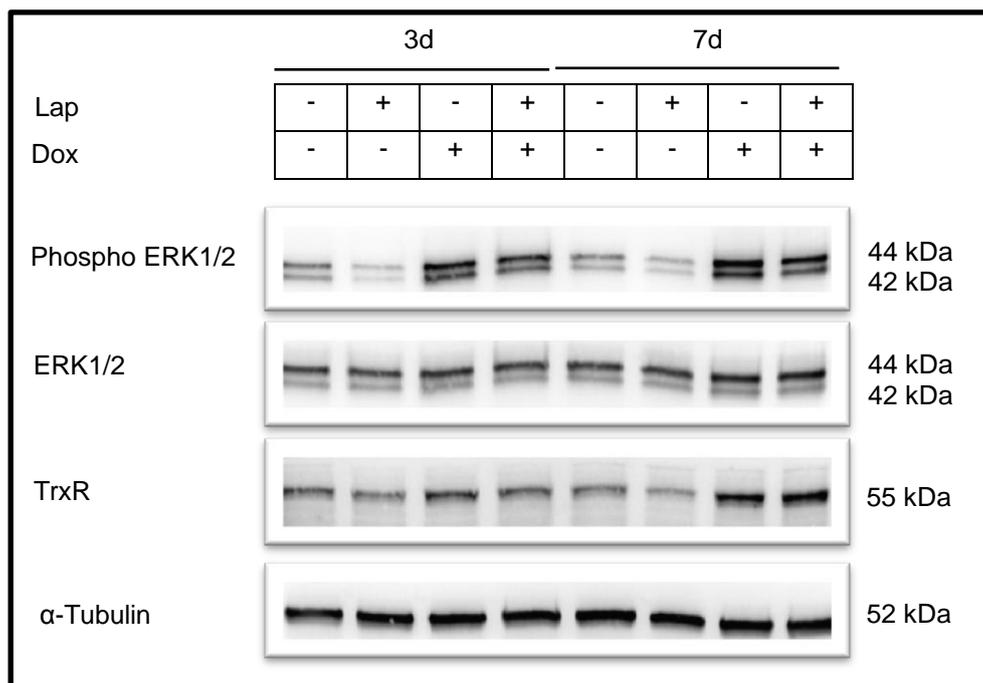


Abbildung 3.12: Einfluss der Hemmung der NeuT Kinaseaktivität durch Lapatinib auf die TrxR Expression von MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 3 und 7 Tagen mit Doxyzyklin und/oder Lapatinib (1 μ M), einem NeuT Tyrosinkinasehemmer, inkubiert. Anschließend wurden sowohl RNA- als auch Proteinextrakte generiert und mittels qRT-PCR und Western Blot Technik hinsichtlich der TrxR Expression untersucht. Um die Wirkungsweise von Lapatinib zu bestätigen, wurde der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 untersucht, welcher durch Doxyzyklin-Induktion über NeuT stark induziert wird und durch Lapatinib infolge einer möglichen NeuT Inhibition reduziert werden sollte. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der verschiedenen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Lapatinib nach 3 Tagen keine Zytotoxizität aufwies bzw. die Vitalität in der Seneszenz mit und ohne Inaktivierung von NeuT sogar leicht anstieg. Allerdings konnte sowohl nach 3 als auch nach 7 Tagen nur eine geringe Minimierung der TrxR RNA Expression als Folge der NeuT Inaktivierung durch Lapatinib festgestellt werden. Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 mittels Immunoblottings zeigte, dass ERK1/2 nach wie vor stark phosphoryliert vorlag und Lapatinib nicht in der Lage war dieses zu unterdrücken. Gleichzeitig konnte eine Hemmung von endogenem ERK1/2 durch Lapatinib aufgezeigt werden, da sowohl die Gesamtproteinmenge von ERK1/2 als auch die von TrxR verringert war.

Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass NeuT nicht durch Lapatinib hemmbar war. Eine mögliche Ursache könnte auch dadurch bedingt sein, dass die hohe Menge an überexprimierten NeuT nicht durch den Inhibitor aufgefangen werden und inhibiert werden konnte. Eine wahrscheinliche Erklärung könnte in der Punktmutation von NeuT, die zur konstitutiven Aktivität des Rezeptors führt, zu finden sein. Die Mutation findet sich in der Transmembrandomäne des Rezeptors und führt durch den Aminosäureaustausch zu einer strukturellen Änderung der Rezeptorkonformation von NeuT, so dass vermutlich die Tyrosinkinase Domäne infolgedessen nicht durch Lapatinib hemmbar ist.

3.5.2 Der MEK/ERK Signalweg zeigt eine mögliche Beteiligung an der Regulation von TrxR

Über das RAS Protein werden viele intrazelluläre Prozesse gesteuert, die zu unterschiedlichen Phänotypen führen können. Viele Studien haben gezeigt, dass die Überexpression des RAS bzw. RAF Proteins die Proliferation von Zellen unterbindet und sogar vorzeitige Seneszenz auslösen kann [71, 215]. Auf der anderen Seite begünstigt mutiertes RAS die Tumorentstehung infolge der unkontrollierten Zellproliferation, indem beispielsweise Tumorsuppressorgene ausgeschaltet werden [216]. Um einen Einfluss des RAS/RAF/MEK/ERK Signalweges auf die Expression von TrxR zu untersuchen, wurde dieser durch Verwendung eines MEK1/2 Inhibitors (PD98059) blockiert. MEK1/2 Inhibitoren besitzen eine hohe klinische Relevanz und sind daher von besonderer Bedeutung. Außerdem sollte gezeigt werden, in wieweit die gesteigerte Expression von TrxR in MCF-7/NeuT Zellen durch zusätzliche Blockade von MEK beeinflusst wird. Durch Inhibition von MEK1/2 wird die Phosphorylierung seiner beiden Zielproteine, ERK1/2, unterbunden. Bei ERK1 und ERK2 handelt es sich um zwei 42 kDa bzw. 44 kDa große Serin/Threonin Kinasen, welche durch gleichzeitige Phosphorylierung der Threonin- bzw. Tyrosinreste aktiviert werden. Während humanes ERK1 an den Positionen Thr202/Tyr204 phosphoryliert wird, geschieht dies bei ERK2 an den Positionen Thr185/Tyr187 [217]. Die Funktionalität des verwendeten Inhibitors sowie die RNA und Proteinexpressionsdaten von TrxR sind nachfolgend in Abbildung 3.13 aufgeführt.

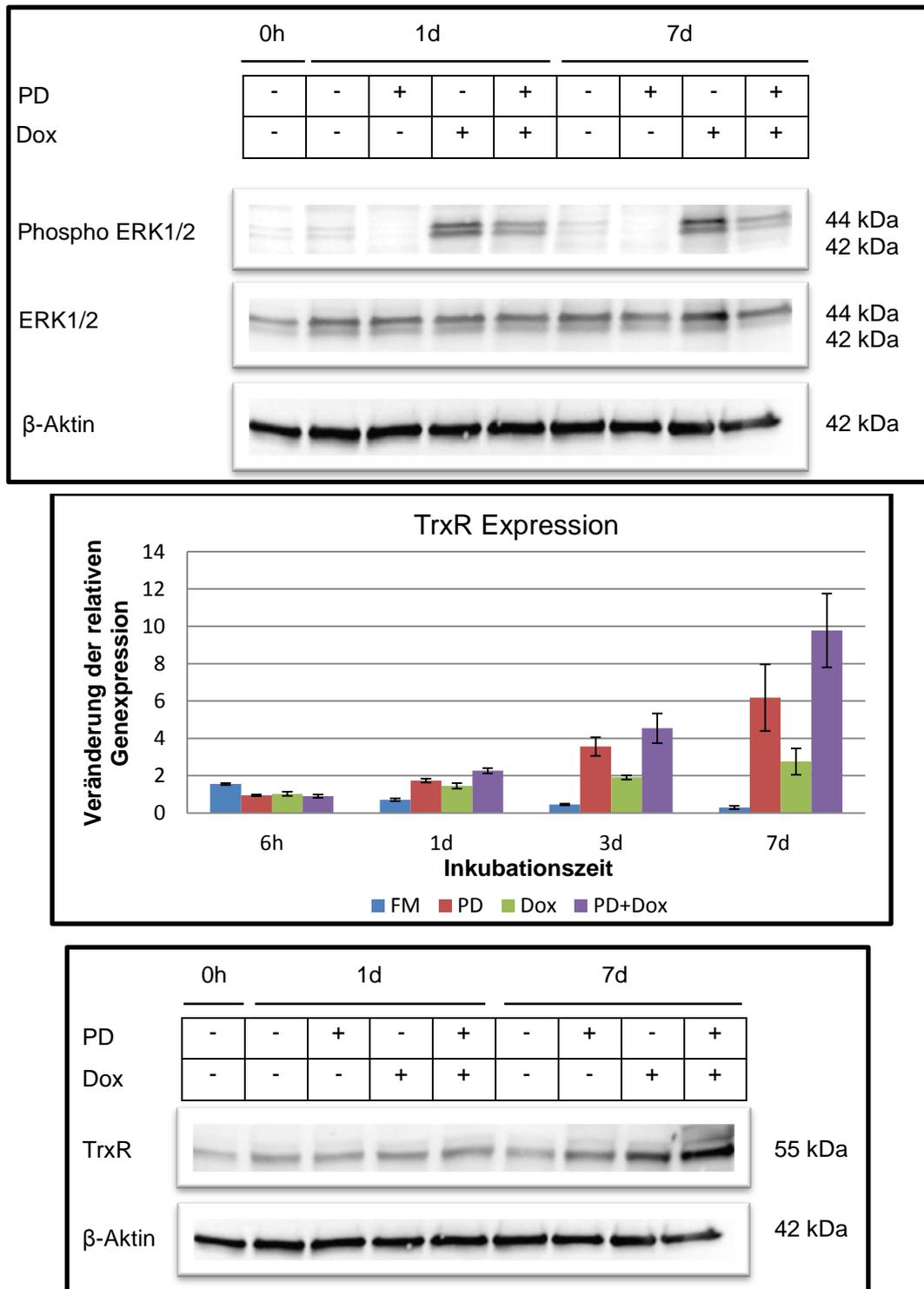


Abbildung 3.13: Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen bzw. 1 und 7 Tagen mit dem MEK1/2 Inhibitor PD98059 (25 μ M) und/oder Doxyzyklin inkubiert. Zur Kontrolle der Wirkungsweise von PD98059 wurde der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2, Substrat von MEK1/2, mittels Western Blot analysiert. Eine mögliche Veränderung der RNA- und Proteinexpression von TrxR wurde mittels qRT-PCR und Western Blot untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) dreier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h) normiert. Dieser Wert entspricht 1 und ist nicht gesondert aufgeführt. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression. Werte <1 eine verminderte Expression.

Es zeigte sich, dass die basale Phosphorylierung von ERK1/2 in den unbehandelten Kontrollzellen grundsätzlich nur sehr schwach vorlag. Eine andere Situation skizzierte sich erwartungsgemäß bereits 1 Tag nach NeuT Induktion. Der Phosphorylierungsgrad war bereits maximal und lag auch nach 7 Tagen unverändert hoch vor. Die durch NeuT hervorgerufene Aktivierung von ERK1/2 konnte durch den MEK Inhibitor beträchtlich reduziert, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden. Während die basale Expression von TrxR auf RNA Ebene erwartungsgemäß über den gesamten Zeitraum konstant abnahm, blieb die Proteinmenge unverändert. Auch die durch NeuT Induktion hervorgerufene gesteigerte TrxR Expression war sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene nachweisbar. Überraschenderweise zeigte sich ein enormer Anstieg des RNA Levels von TrxR (Faktor 6) durch die Blockade von MEK1/2. Dieser Effekt verstärkte sich durch die Kombination von NeuT Induktion und MEK1/2 Inhibition und zeigte seinen Höchstwert nach 7 Tagen (Faktor 10). Diese Ergebnisse ließen sich per Immunoblot zwar grundsätzlich bestätigen, allerdings nicht so signifikant wie auf RNA Ebene. Um den Effekt der stark erhöhten RNA Expression von TrxR zu bestätigen, wurden obige Experimente aufgrund der enorm gesteigerten RNA Expression analog mit einem zusätzlichen MEK1/2 Inhibitor, U0126, durchgeführt (Abb 3.14).

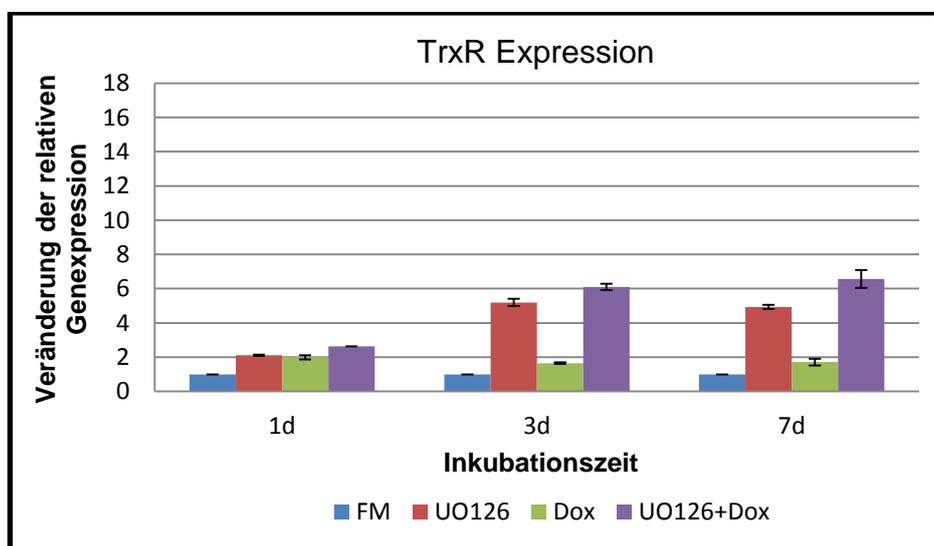


Abbildung 3.14: Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA Expression von TrxR mittels U0126

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen mit dem MEK1/2 Inhibitor U0126 (10 μ M) und/oder Doxyzyklin inkubiert. Eine mögliche Veränderung der RNA Expression von TrxR wurde mittels qRT-PCR untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) aus $n=2$ biologischen Replikaten eines Experiments. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Dieser Wert ist nicht gesondert aufgeführt. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Wie bei PD98059 führte die Behandlung mit U0126 zu einer Erhöhung der TrxR RNA Expression (Faktor 5), welche in Kombination mit Doxyzyklin minimal gesteigert wurde (Faktor 6). Obwohl beide Inhibitoren ein ähnliches Ergebnis aufzeigten, unterschieden sie sich in der Effizienz der Hemmung von MEK1/2. PD98059 bindet inaktives, nicht phosphoryliertes MEK1/2 und blockiert dessen Aktivierung durch das in der Signalkaskade vorgeschaltete c-RAF Protein. Allerdings zeigte PD98059 eine effizientere Blockade für MEK1 im Vergleich zu MEK2 [218]. U0126 inhibiert MEK1/2 in gleicher Weise wie PD98059, zeigt allerdings eine höhere Sensitivität bzgl. MEK1 und MEK2 [219].

Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es bei der Behandlung sowohl mit PD98059 als auch mit U0126 zu „*Off-Target*“ Effekten kommen kann, die zu unerwünschten Nebeneffekten in der Zelle führen können. Für die verwendeten Inhibitoren ist neben der MEK1/2 Hemmung auch eine mögliche ERK5 Inhibition in der Literatur beschrieben [220]. Aus diesem Grund wurden obige Experimente mit einem spezifischen MEK5 Inhibitor, (BIX02189), durchgeführt, um eine mögliche MEK5/ERK5 Inhibierung und daraus resultierender TrxR Expression auszuschließen.

3.5.2.1 Die Regulierung von TrxR ist MEK5/ERK5 unabhängig

Zur Aufklärung eines möglichen „*Off-Target*“ Effekts der Inhibitoren PD98059 und U0126 wurden obige Experimente analog unter Verwendung des spezifischen MEK5 Inhibitors (BIX02189) durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen phosphoryliert MEK5 sein Substrat ERK5 und aktiviert es [220-222]. Sollte die durch PD98059 und U0126 induzierte RNA Expression von TrxR als „*Off-Target*“ Effekt über die Hemmung des MEK5/ERK5 Signalweges laufen, würde dies durch Inhibition von MEK5 mittels BIX02189 ebenfalls zur RNA Induktion führen. Der Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA Expression von TrxR ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

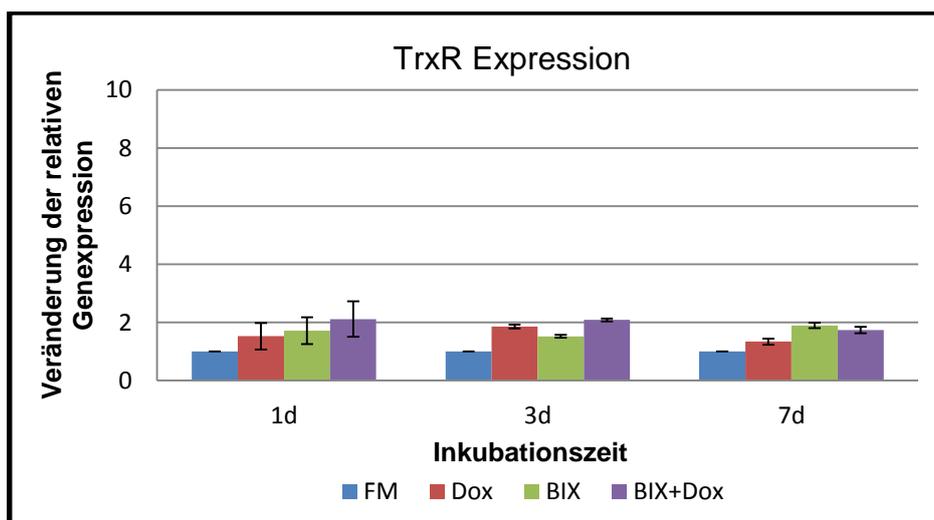


Abbildung 3.15: Einfluss der Hemmung von MEK1/2 auf die RNA Expression von TrxR
MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen mit dem MEK5 Inhibitor BIX02189 (20 μ M) und/oder Doxyzyklin inkubiert. Eine mögliche Veränderung der RNA Expression von TrxR wurde mittels qRT-PCR untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) aus n=2 biologischen Replikaten eines Experiments. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Dieser Wert ist nicht gesondert aufgeführt. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Die RNA Expression von TrxR wurde durch Verwendung des MEK5 Inhibitors BIX02189 nicht drastisch gesteigert. Diese lag mit einem Faktor von maximal 2 im Vergleich zur Kontrollsituation (=1) im Bereich der natürlichen Schwankung. Das Ergebnis ließ vermuten, dass MEK5 keinen Einfluss auf die Expression von TrxR hat.

3.5.2.2 Knockdown von MEK1/2 und ERK1/2 mittels siRNA zeigt keinen Einfluss auf die Regulation von TrxR

Um die mechanistische Regulation der Expression von TrxR weiter aufzuklären und eine Beteiligung von MEK1/2 und ERK1/2 zu bestätigen, wurden die entsprechenden Isoformen jeweils getrennt voneinander durch komplementäre siRNA herunterreguliert und hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die TrxR RNA- und Proteinexpression untersucht. Sollten sowohl die Inhibition von MEK1/2 durch PD98059 als auch das gezielte Ausschalten dieser Gene zur gesteigerten TrxR Expression führen, läge die Vermutung nahe, dass TrxR über den MEK/ERK Signalweg reguliert wird. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst der Erfolg der Herunterregulation von MEK1/2 und ERK1/2 auf RNA- und Proteinebene überprüft (Abb. 3.16 und 3.17).

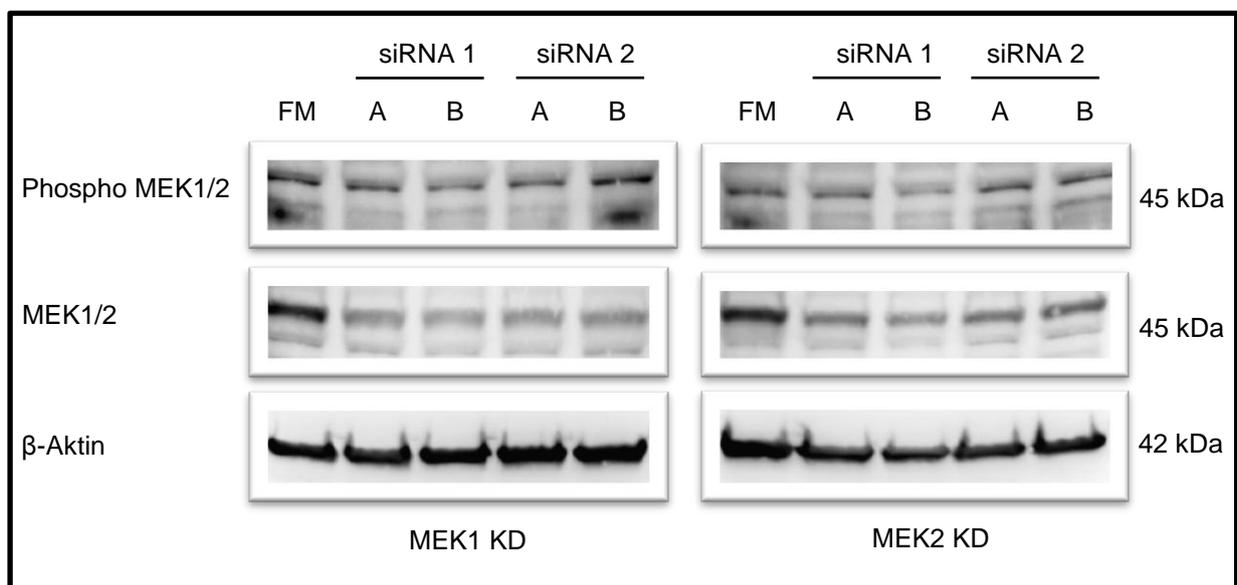
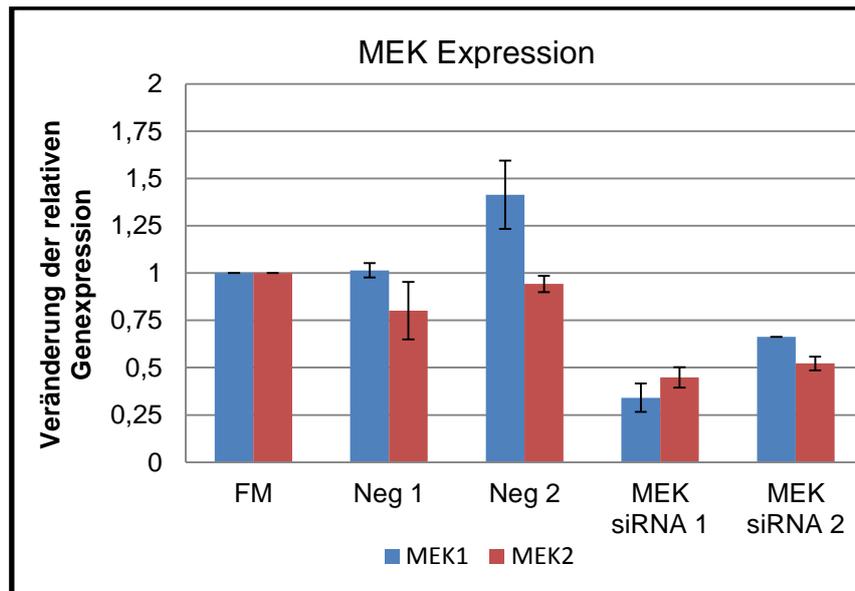


Abbildung 3.16: MEK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für 48 Stunden mit zwei unterschiedlichen und spezifischen siRNA (10 nM) Konstrukten, die gegen MEK1 bzw. MEK2 gerichtet sind, inkubiert. Anschließend wurden sowohl RNA- als auch Proteinlysate hergestellt und mittels qRT-PCR bzw. Western Blot Technik hinsichtlich des KD Erfolges analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

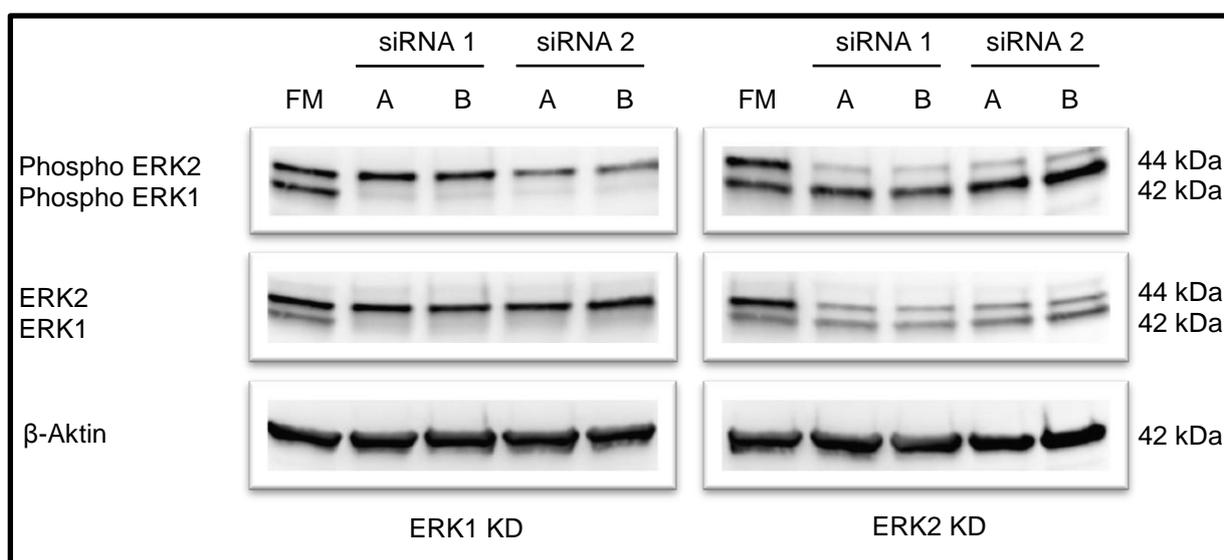
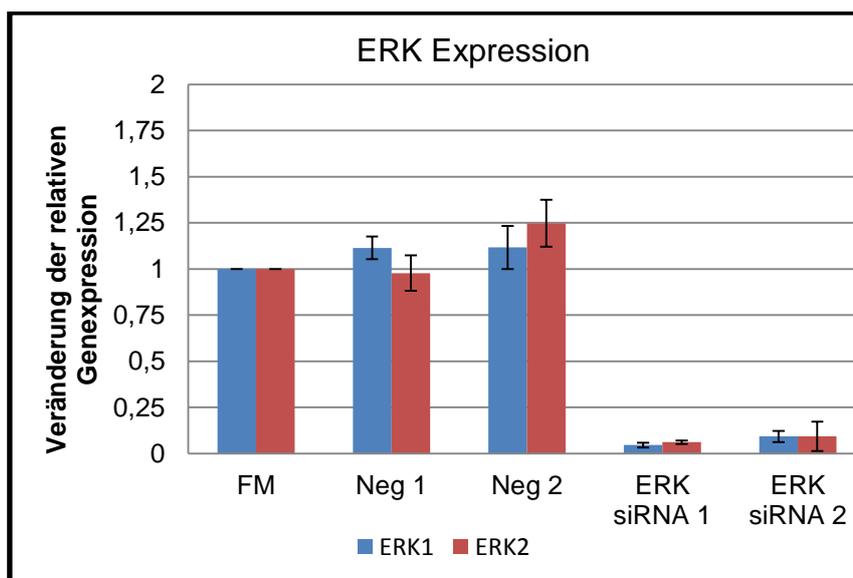


Abbildung 3.17: ERK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für 48 Stunden mit zwei unterschiedlichen und spezifischen siRNA (10 nM) Konstrukten, die gegen ERK1 bzw. ERK2 gerichtet sind, inkubiert. Anschließend wurden sowohl RNA- als auch Proteinlysate hergestellt und mittels qRT-PCR bzw. Western Blot Technik hinsichtlich des KD Erfolges analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Die Herunterregulation von MEK1 und MEK 2 betrug je nach verwendeter siRNA zwischen 30 und 70% (RNA). Das Phosphorylierungsmuster der MEK1/2 defizienten Zellen zeigte im Vergleich zur Kontrollsituation keinen Unterschied, eine starke Abnahme der Gesamtproteinmenge von MEK1 bzw. MEK2 durch siRNA konnte nachgewiesen werden und zeigte damit eine erfolgreiche Herunterregulation dieser Proteine auf. Dieser Effekt zeigte sich auch für die Herunterregulation von ERK1 und

ERK2. Für beide Isoformen konnte eine erfolgreiche Repression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erzielt werden. ERK1/2 RNA und ERK1 Protein wurden mit über 90% nahezu komplett herunterreguliert. Die Repression von ERK 1 resultierte in einen Verlust der ERK1 Phosphorylierung, gleichzeitig wurde auch die Gesamtproteinmenge von ERK1 nahezu komplett herunterreguliert. Die Repression von ERK2 zeigte ein vergleichbares Ergebnis, wenngleich die Herunterregulation auf Proteinebene sowohl für phosphoryliertes als auch nicht-phosphoryliertes ERK2 nicht vollständig gelungen ist. In Zusammenhang mit dem Knockdown der jeweiligen MEK bzw. ERK Isoformen wurde hinsichtlich der mechanistischen Regulation die Expression von TrxR untersucht (Abb. 3.18 und 3.19).

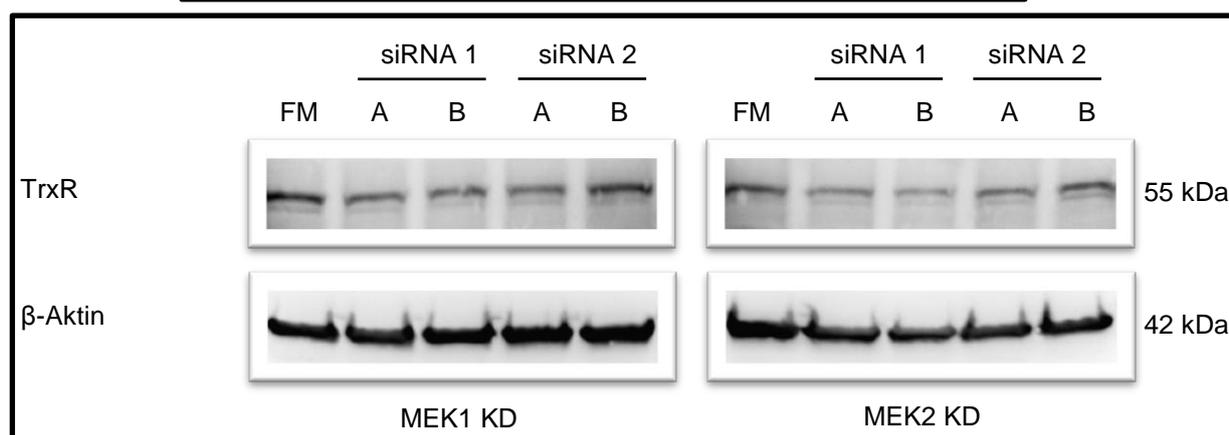
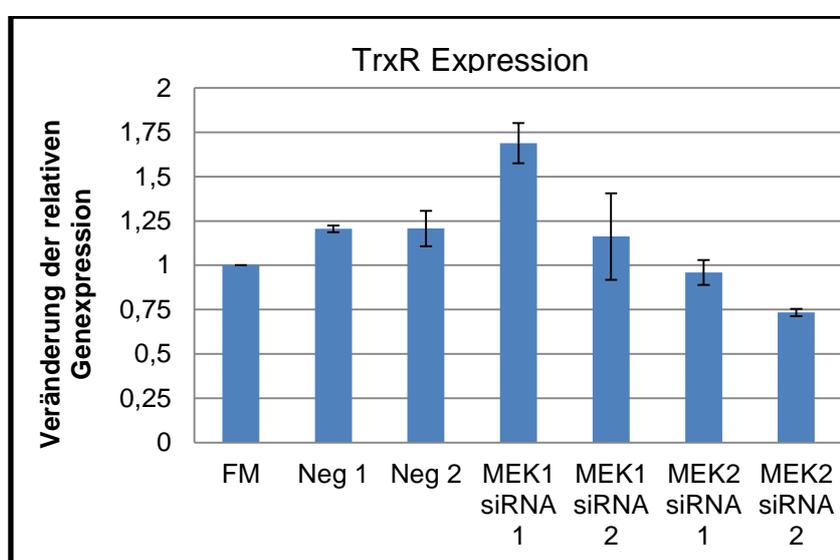


Abbildung 3.18: Einfluss des MEK1/2 Knockdown auf die TrxR Expression in MCF-7/NeuT Zellen
MCF-7/NeuT Zellen wurden für 48 Stunden mit spezifischer gegen MEK1/2 gerichteter siRNA inkubiert. Anschließend wurden RNA und Proteinlysate hergestellt und hinsichtlich TrxR Expression mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

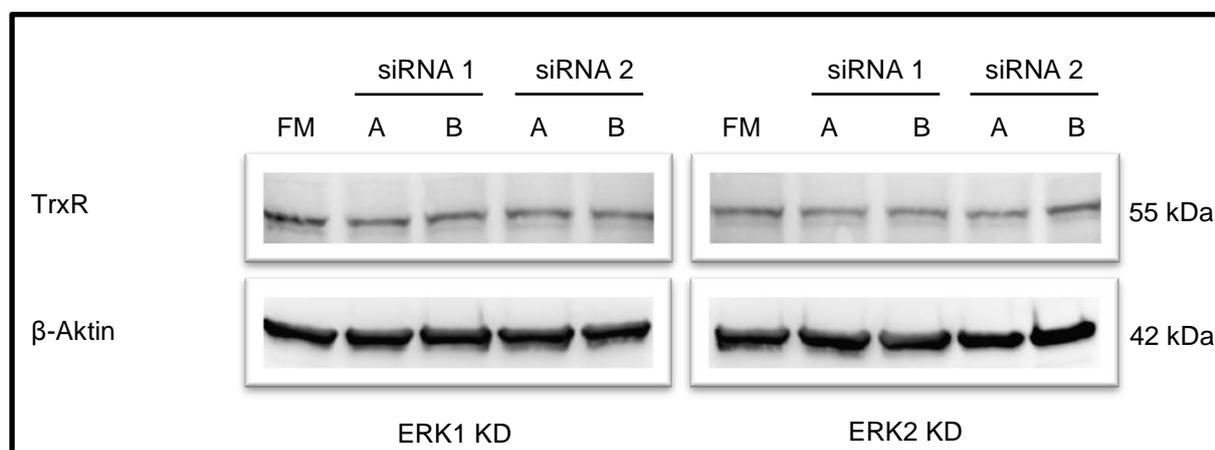
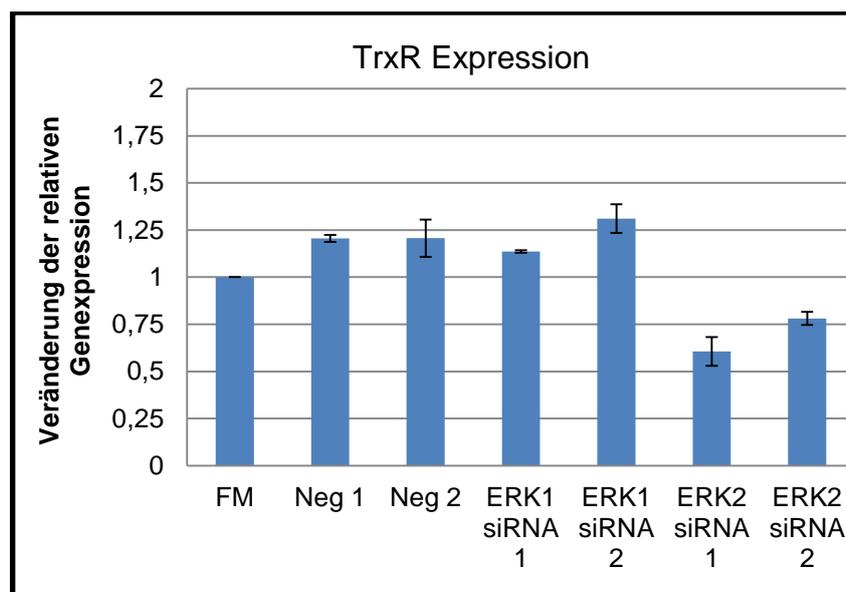


Abbildung 3.19 Einfluss des ERK1/2 Knockdown auf die TrxR Expression in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für 48 Stunden mit spezifischer gegen ERK1/2 gerichteter siRNA inkubiert. Anschließend wurden RNA und Proteinlysate hergestellt und hinsichtlich TrxR Expression mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt $n=2$ unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Sowohl der Knockdown von ERK1/2 als auch von MEK1/2 zeigte keinen starken Einfluss auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR. Die TrxR Expression schwankte nach MEK1 und MEK2 Repression nur geringfügig und unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollsituation. Auf Proteinebene konnte ebenfalls keine Veränderung aufgezeigt werden. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Repression beider ERK Isoformen auf. Während die Herunterregulation von ERK1 keinen Einfluss auf die TrxR Expression hatte, resultierte die ERK2 Repression in einer bis zu 30% verminderten TrxR RNA Level. Bestätigen ließ sich der Befund durch

Proteinexpression allerdings nicht, diese blieb unverändert und ist mit der der Kontrollsituation vergleichbar. Schlussendlich konnte eine Regulation der TrxR Expression über MEK bzw. ERK nicht nachgewiesen werden. Um einen möglichen Kompensationsmechanismus, der durch das Herunterregulieren von nur einer Isoform und das gleichzeitige Einspringen der anderen bedingt sein könnte, auszuschließen, erfolgte das gleichzeitige Ausschalten von MEK1/2 bzw. ERK1/2 (Abb. 3.20 und 3.21).

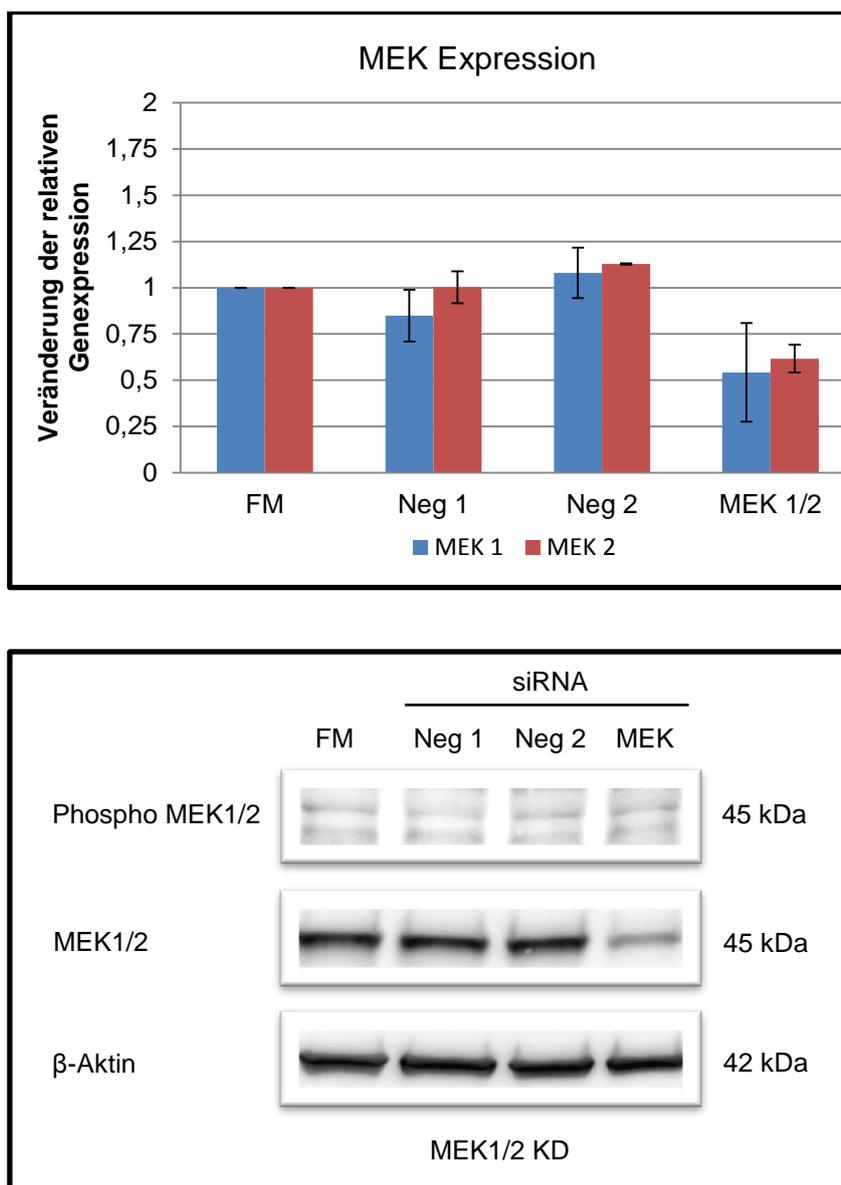


Abbildung 3.20: MEK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden gleichzeitig für 48 Stunden mit spezifische siRNA (10 nM) Konstrukten, die gegen MEK1 bzw. MEK2 gerichtet sind, inkubiert. Anschließend wurden sowohl RNA- als auch Proteinlysate hergestellt und mittels qRT-PCR bzw. Western Blot Technik hinsichtlich des KD Erfolges analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

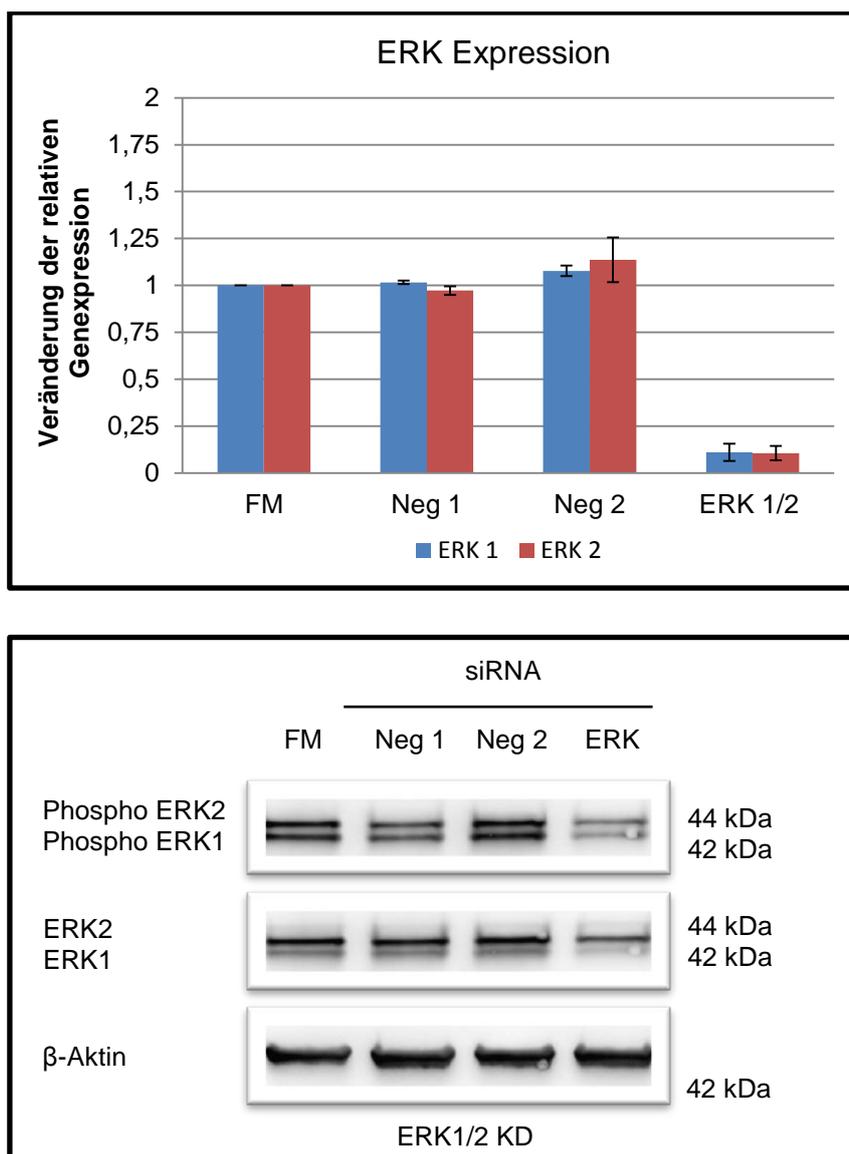


Abbildung 3.21: ERK1/2 Knockdown in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden gleichzeitig für 48 Stunden mit spezifische siRNA (10 nM) Konstrukten, die gegen ERK1 bzw. ERK2 gerichtet sind, inkubiert. Anschließend wurden sowohl RNA- als auch Proteinlysate hergestellt und mittels qRT-PCR bzw. Western Blot Technik hinsichtlich des KD Erfolges analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Das gleichzeitige Herunterregulieren von MEK1/2 zeigte auf RNA eine Effizienz von etwa 45%, auf Proteinebene spiegelte sich dieser Effekt deutlicher wieder. Eine basale Phosphorylierung von MEK1/2 konnte nicht detektiert werden, dafür konnte die Gesamtproteinmenge erfolgreich und signifikant herunterreguliert werden. Für ERK1/2 zeigt sich auf RNA Ebene mit über 90% eine nahezu komplette Herunterregulation beider Isoformen, auf Proteinebene zeigte sich eine deutliche Abnahme der

Gesamtproteinmenge. Abschließend wurde ein möglicher Einfluss des Knockdowns von MEK1/2 bzw. ERK1/2 auf die Expression von TrxR untersucht (Abb. 3.22).

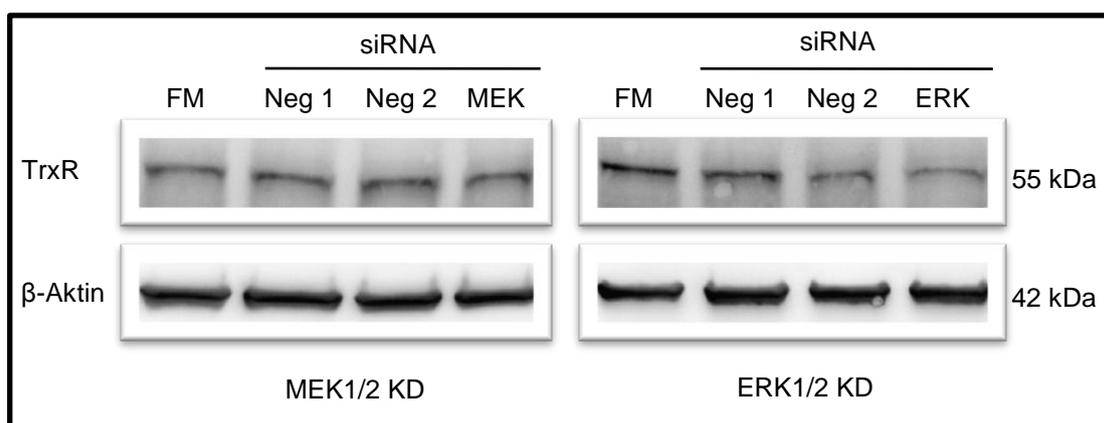
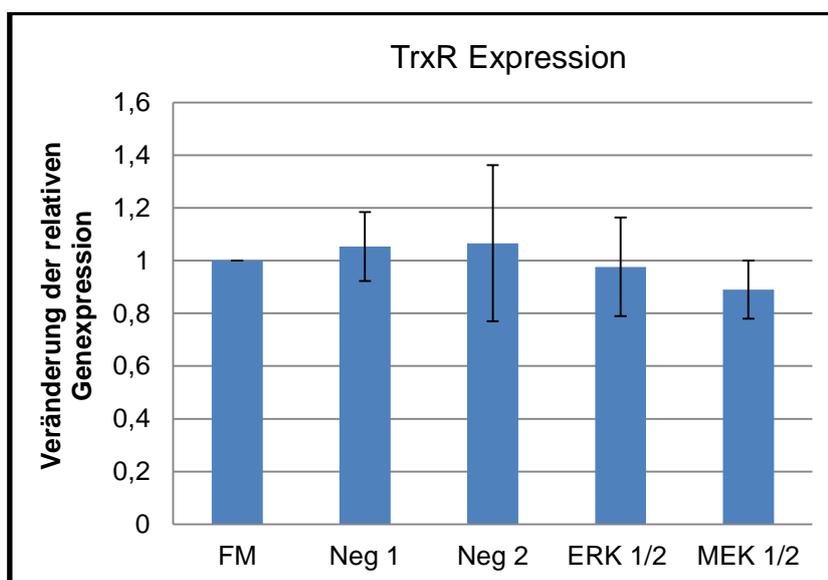


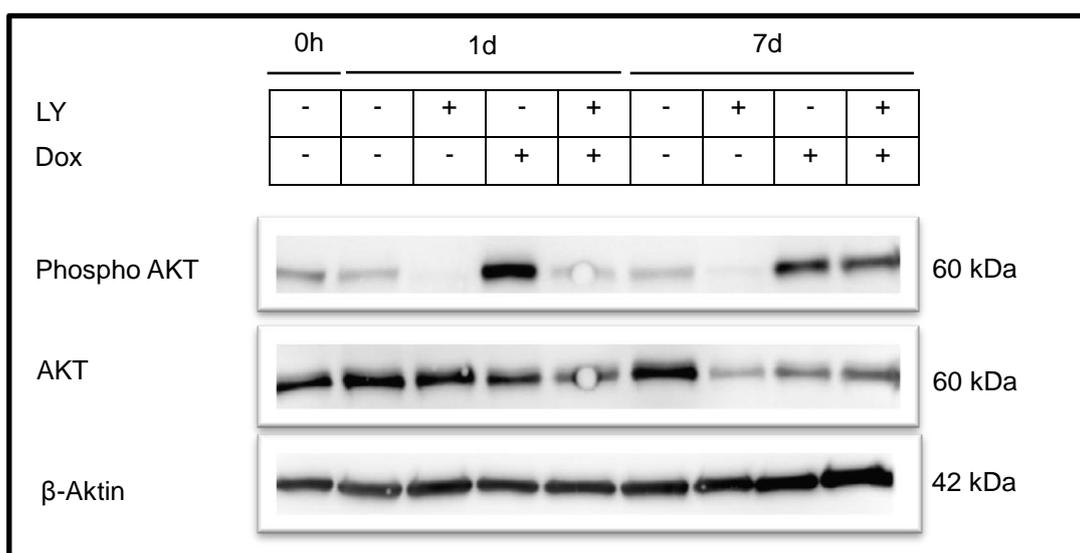
Abbildung 3.22: Einfluss des Mek1/2 und ERK1/2 Knockdown auf die TrxR Expression in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für 48 Stunden mit spezifischer gegen MEK1/2 und ERK1/2 gerichteter siRNA inkubiert. Anschließend wurden RNA und Proteinlysate hergestellt und hinsichtlich TrxR Expression mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gestei-gerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Zusammenfassend konnte kein Einfluss durch die Herunterregulation von sowohl MEK1/2 als auch ERK 1/2 auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR gezeigt werden. Das steht im Gegensatz zu der beobachteten Hochregulation von TrxR nach Zugabe des MEK1/2 Inhibitors PD98059.

3.5.3 Der AKT/PI3K Signalweg zeigt eine Beteiligung an der Unterdrückung der TrxR Expression

Der AKT/PI3K Signalweg stellt einen sehr komplexen Signaltransduktionsweg in der Zelle dar. Vielfältige Zellvorgänge wie Proliferation, Stoffwechsel und Apoptose werden unter anderem durch diesen Weg reguliert. Innerhalb der wissenschaftlichen Literatur wird die Rolle von aktiviertem AKT kontrovers diskutiert. So zeigen einige Studien, dass AKT zelluläre Seneszenz induziert [223-225] während andere belegen, dass AKT nur einen schwachen Einfluss auf die Induktion von Seneszenz besitzt [70] oder gar in Folge dieser herunterreguliert wird bzw. diese antagonisiert [215, 226]. In Bezug auf verschiedene Krebsarten spielt der AKT/PI3K Signalweg ebenfalls eine dominierende Rolle, da dieser meist als Folge einer „*loss-of-function*“ Mutation des Proteins PTEN konstitutiv aktiv ist, ähnlich wie mutiertes RAS, und zu vermehrter Proliferation und verminderter Apoptose führt [227, 228]. Um einen möglichen Einfluss des AKT/PI3K Signalweges auf die Regulation von TrxR zu untersuchen, wurde dieser durch Hemmung der PI3K mittels Inhibitor LY294002 unterdrückt. Außerdem sollte durch Hemmung des AKT/PI3K Signalweges bei gleichzeitiger NeuT Expression ein möglicher Einfluss auf die TrxR Expression veranschaulicht werden. Die Hemmung von PI3K durch LY294002 resultierte in der unterdrückten Phosphorylierung (Thr308/Ser473) seines Substrates, der Serin/Threonin Kinase AKT (60 kDa). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.23 aufgeführt.



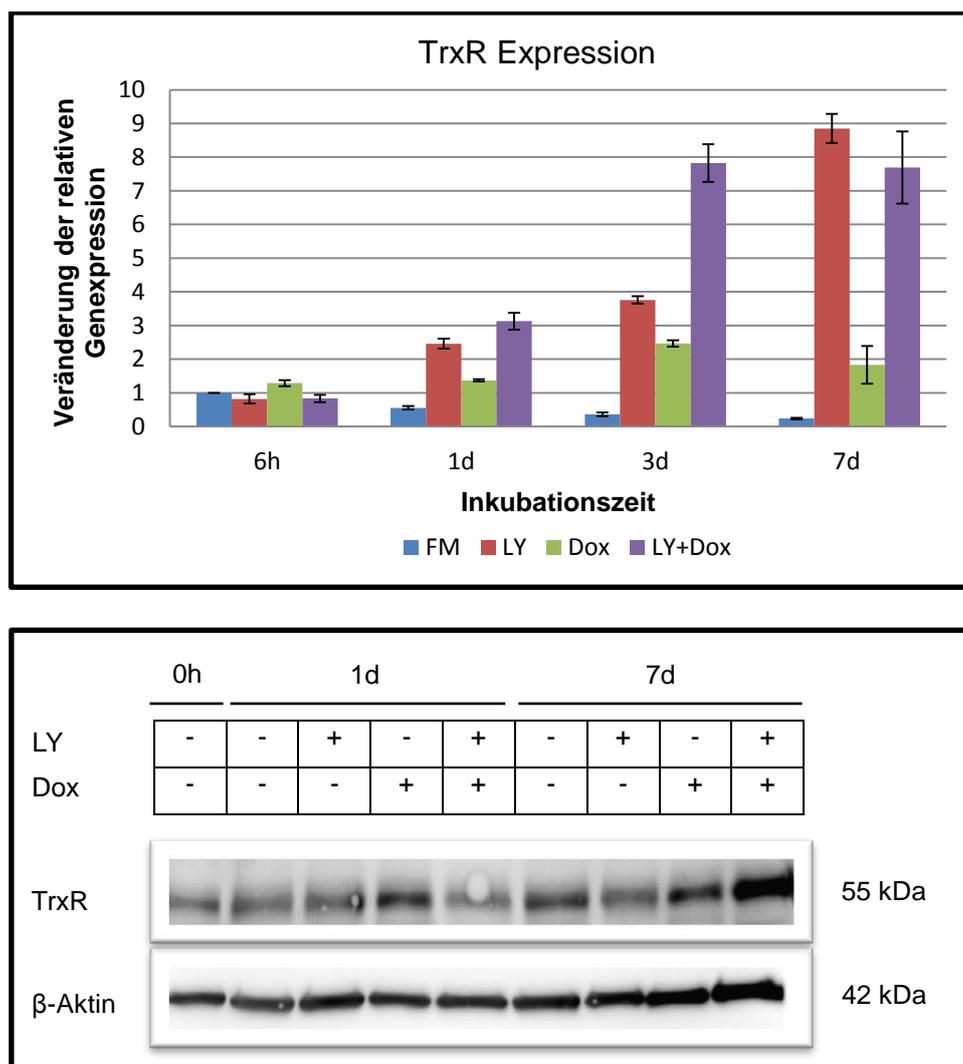


Abbildung 3.23: Einfluss der Hemmung von PI3K auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen bzw. 1 und 7 Tagen mit dem PI3K Inhibitor LY294002 (20 μ M) und/oder Doxyzyklin inkubiert. Zur Kontrolle der Wirkungsweise von LY294002 wurde der Phosphorylierungsgrad von AKT, Substrat von PI3K, mittels Western Blot analysiert. Eine mögliche Veränderung der RNA- und Proteinexpression von TrxR wurde mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) dreier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Dieser Wert entspricht =1 und ist nicht gesondert aufgeführt. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Das Ergebnis zeigte, dass infolge der NeuT Induktion AKT bereits nach Tag 1 aktiviert (phosphoryliert) vorlag und dieser Zustand auch nach 7 Tagen aufrechterhalten wurde. Infolge der PI3K Hemmung durch LY294002 wurde die AKT Phosphorylierung an Tag 1 erfolgreich unterdrückt, allerdings gelang die Hemmung der AKT Phosphorylierung bei gleichzeitiger Überexpression von NeuT an Tag 7 nicht mehr. Die Hemmung des PI3K/AKT Signalweges resultierte, ähnlich der Hemmung von

MEK1/2, in einer gesteigerten RNA Expression von TrxR. Gleichzeitig wurde dieser Effekt durch zusätzliche NeuT Induktion besonders beim Übergang in die Seneszenz an Tag 3 maximiert. Eine Korrelation von RNA und Proteindaten ließ sich allerdings nur bedingt aufzeigen. Die bereits an Tag 1 gesteigerte RNA Expression korrelierte nicht mit einem erhöhten Proteinlevel, was sich möglicherweise durch eine zeitlich verzögerte Abfolge der Proteintranslation erklären ließe. An Tag 7 zeigte nur die Hemmung von PI3K in Kombination mit NeuT Induktion ein entsprechend hohes Proteinlevel auf, während die alleinige Inaktivierung von AKT auf Proteinebene ein mit der Kontrollsituation vergleichbares basales Level aufwies.

3.5.4 Die Hemmung des p38 Signalweges steigert die Expression von TrxR

Der p38/MAPK Signalweg stellt einen wichtigen Signaltransduktionsweg in Hinblick auf Stressfaktoren, die von außen auf die Zelle einwirken, dar. Dazu zählen Stimuli wie inflammatorische Cytokine, UV-Strahlung, Hitzeschock aber auch Wachstumsfaktoren. Des Weiteren ist dieser Signalweg, ebenso wie MEK/ERK und AKT/PI3K an der Zelldifferenzierung, Zellproliferation aber auch Apoptose beteiligt [229-231]. Verschiedene Studien belegen, dass p38 eine bedeutende Rolle in der Vermittlung zellulärer Seneszenz einnimmt [84, 232, 233]. Arbeiten haben bereits gezeigt, dass p38 in Folge der NeuT-vermittelten Seneszenz im MCF-7 Modell durch Phosphorylierung der Aminosäuren Thr180/Tyr182 aktiviert wird (Trost *et al.* 2005). Zudem gibt es Hinweise in der Literatur, die zeigen, dass der p38/MAPK Signalweg einen indirekten Einfluss auf das Thioredoxinsystem besitzt. So führen beispielsweise Hyperglykämien zu oxidativem Stress und als Konsequenz zu kardiovaskulären Krankheiten bei Diabetes. Auslöser kann die Generierung hoher Level an ROS durch die Inaktivierung von Thioredoxin, welche durch eine gesteigerte Expression von TXNIP, natürlicher Inhibitor von Trx, einhergeht. Der Prozess der gesteigerten TXNIP Expression wird durch p38 gesteuert [234]. Um einen möglichen Einfluss auf TrxR zu untersuchen wurde p38 mittels Inhibitor zeitabhängig (SB202190) gehemmt. Die Ergebnisse sind Abbildung 3.24 zu entnehmen.

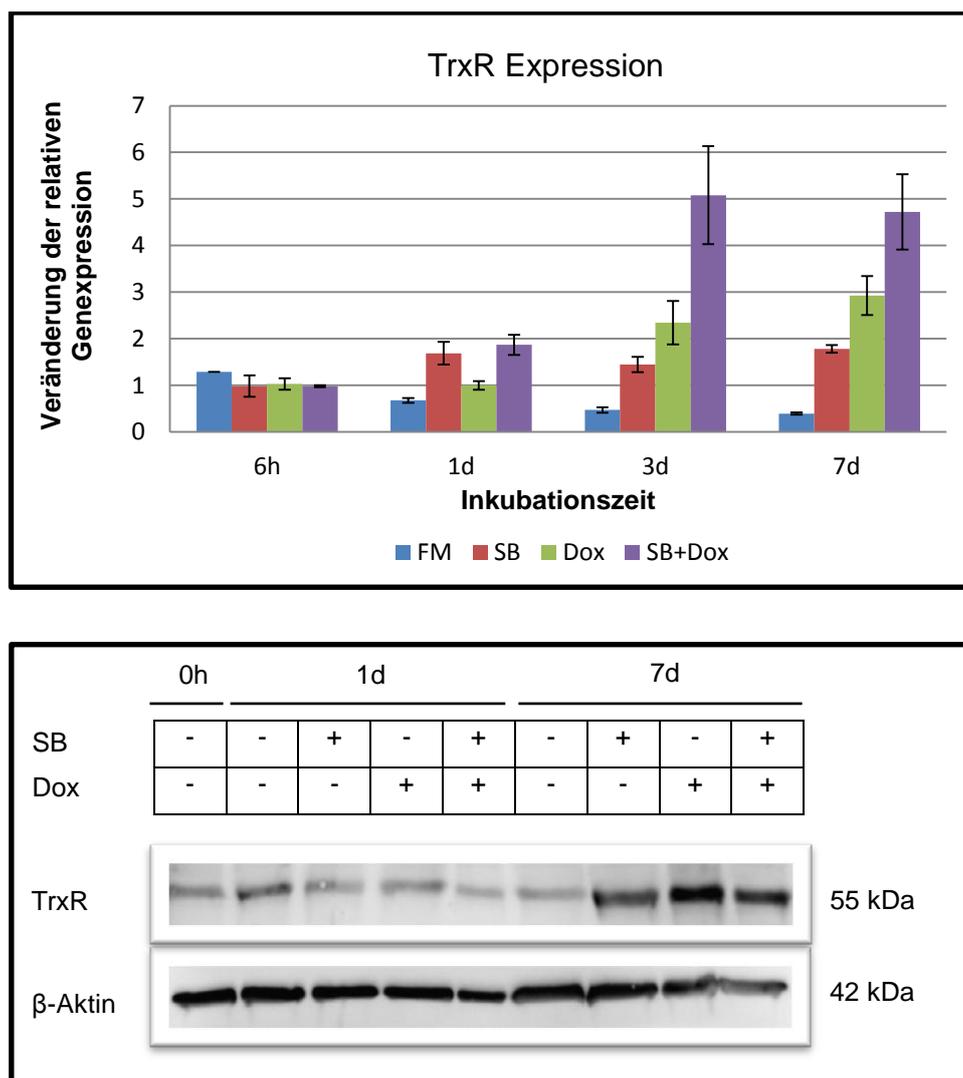


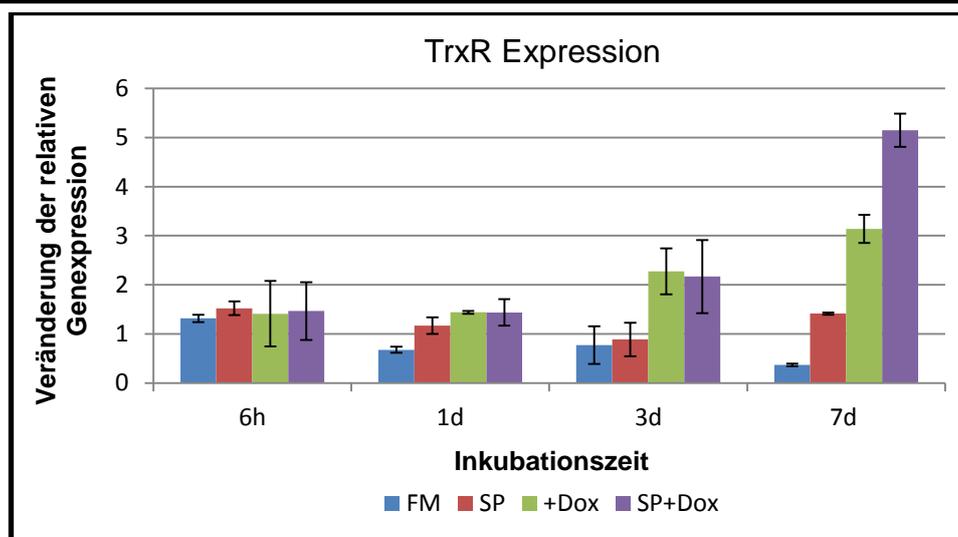
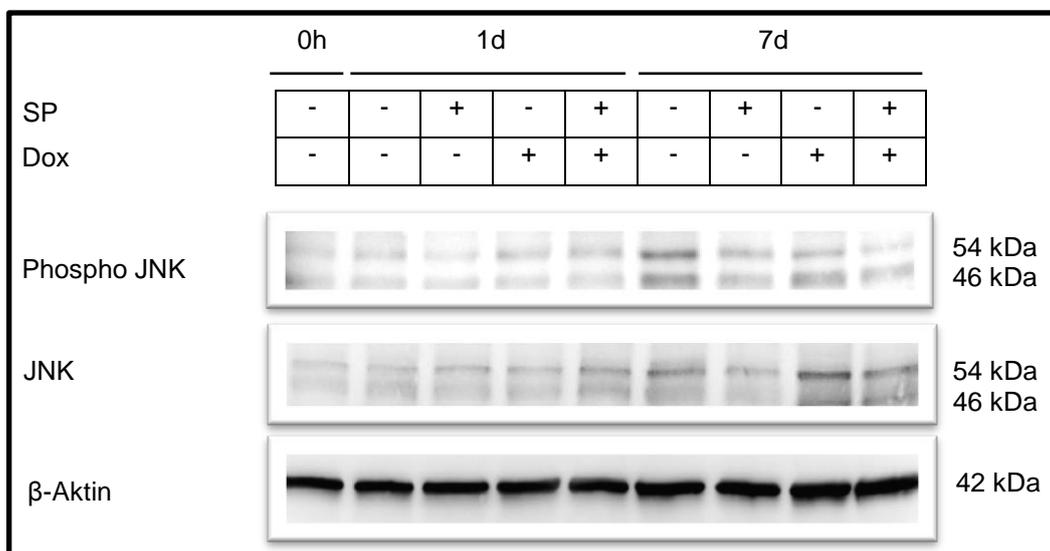
Abbildung 3.24: Einfluss der Hemmung von P38 MAPK auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen bzw. 1 und 7 Tagen mit dem P38 MAPK Inhibitor SB202190 (25 μ M) und/oder Doxozyklin inkubiert. Eine mögliche Veränderung der RNA- und Proteinexpression von TrxR wurde mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) dreier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Dieser Wert ist nicht gesondert aufgeführt. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Die Hemmung von p38/MAPK durch SB202190 zeigte auf RNA Ebene keinen großen Einfluss auf die Regulation von TrxR. Lediglich in seneszenten MCF-7/NeuT Zellen sowie die Kombination aus NeuT Überexpression und p38 Inhibition führte zu einem signifikanten Anstieg der RNA. Eine Korrelation mit den generierten Proteindaten war nur bedingt möglich. Die p38 Inhibition zeigte nach 7 Tagen eine mögliche Beteiligung an der TrxR Regulation, da deren Proteinlevel im Vergleich zur Kontrolle signifikant anstieg.

3.5.5 TrxR wird unabhängig vom SAPK/JNK Signalweg reguliert

Der SAPK/JNK Signalweg zählt wie der p38/MAPK Weg zu den Stress-induzierbaren Signaltransduktionswegen in der Zelle. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der Phosphorylierungslevel von SAPK/JNK im Zuge der NeuT-vermittelten Onkogen-transformation unverändert blieb. Dennoch wurde durch JNK Hemmung ein möglicher Einfluss auf TrxR untersucht, auch wenn der SAPK/JNK Weg im Verlauf der Seneszenz keine entscheidende Rolle einzunehmen schien. Die Inhibition von JNK mittels SP600125 unterdrückte die Phosphorylierung des Substrates, Phospho-JNK (Thr183/Tyr185, 46 bzw. 54 kDa). Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 3.25 aufgeführt.



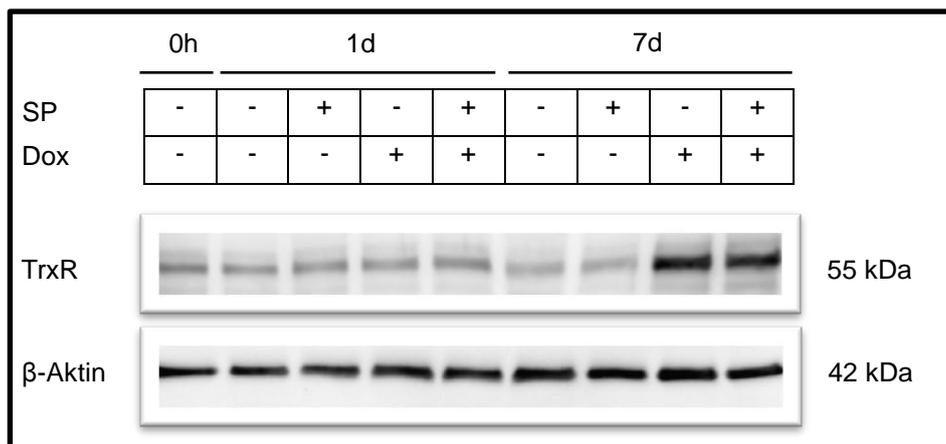


Abbildung 3.25: Einfluss der Hemmung von JNK auf die RNA- und Proteinexpression von TrxR
MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Zeitraum von 1, 3 und 7 Tagen bzw. 1 und 7 Tagen mit dem JNK Inhibitor SP600125 (25 μ M) und/oder Doxozyklin inkubiert. Zur Kontrolle der Wirkungsweise von SP600125 wurde der Phosphorylierungsgrad von p-JNK mittels Western Blot analysiert. Eine mögliche Veränderung der RNA- und Proteinexpression von TrxR wurde mittels qRT-PCR und Western Blot Technik untersucht. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) dreier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (0h, Wert 1) normiert. Dieser Wert ist nicht gesondert aufgeführt. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Einen alleinigen Einfluss des SAPK/JNK Signaltransduktionsweges auf die TrxR Regulierung konnte nicht gezeigt werden. Sowohl RNA als auch Proteinlevel blieben über den gesamten Zeitraum der Inhibitor Exposition unverändert. Nur im späten Stadium der Seneszenz zeigte die SAPK/JNK Inhibition einen maximalen Effekt im Vergleich zu seneszenten Zellen, der sich wiederum auf Proteinebene nicht bestätigen ließ, so dass aufgrund des langen Inkubationszeitraumes auf einen toxischen Effekt des Inhibitors geschlossen werden musste, da Signalwege wie SAPK/JNK und p38/MAPK besonders empfindlich auf äußere Stressoren reagieren. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die untersuchten Signaltransduktionswege nicht an der ERBB2-vermittelten Induktion von TrxR beteiligt sind. Auffällig ist allerdings, dass alle verwendeten Inhibitoren zu einem gesteigerten TrxR RNA Level führen. Die Gründe dafür konnten allerdings nicht aufgeklärt werden.

3.6 Untersuchung der Rolle des Thioredoxinsystems in der NeuT-vermittelten Seneszenz

Um die Bedeutung von TrxR im Rahmen der NeuT-induzierten Onkogen transformation genauer zu untersuchen und zu verstehen, wurden Experimente durchge-

führt, die zunächst Aufschluss über den Redox Status seneszenten Zellen geben sollten. Gleichzeitig wurde die Gesamtaktivität des Thioredoxinsystems bestimmt, um eine mögliche Bedeutung des gesteigerten Expressionslevels von TrxR zu erklären.

3.6.1 ERBB2/NeuT induziert oxidativen Stress in MCF-7 Zellen

Physiologische und teils pathologische Änderungen in der Zelle werden häufig mit oxidativen Stress in Zusammenhang gebracht und kontrovers diskutiert. Auslöser sind Transformationen innerhalb einer Zelle, wie z.B. Apoptose, Zellzyklusprogression oder das Altern der Zelle [71, 215, 216]. Studien zufolge wird oxidativer Stress mit der Beeinflussung und Veränderung intrazellulärer Signalwege und Seneszenz in Verbindung gebracht [71, 216]. Demzufolge wurde der Redox Status der MCF-7/NeuT Zellen, nach Induktion der NeuT Expression, auf einen möglichen veränderten Spiegel an oxidativen Stress untersucht. Der Level an oxidativen Stress wurde unter Verwendung des spektrophotometrischen Thiobarbitursäure-Assays gemessen (Abb. 3.26), welcher auf der Detektion von Malondialdehyd (MDA) infolge zellulärer Lipidperoxidation basiert, bei dem freie Radikale die Zellmembran schädigen.

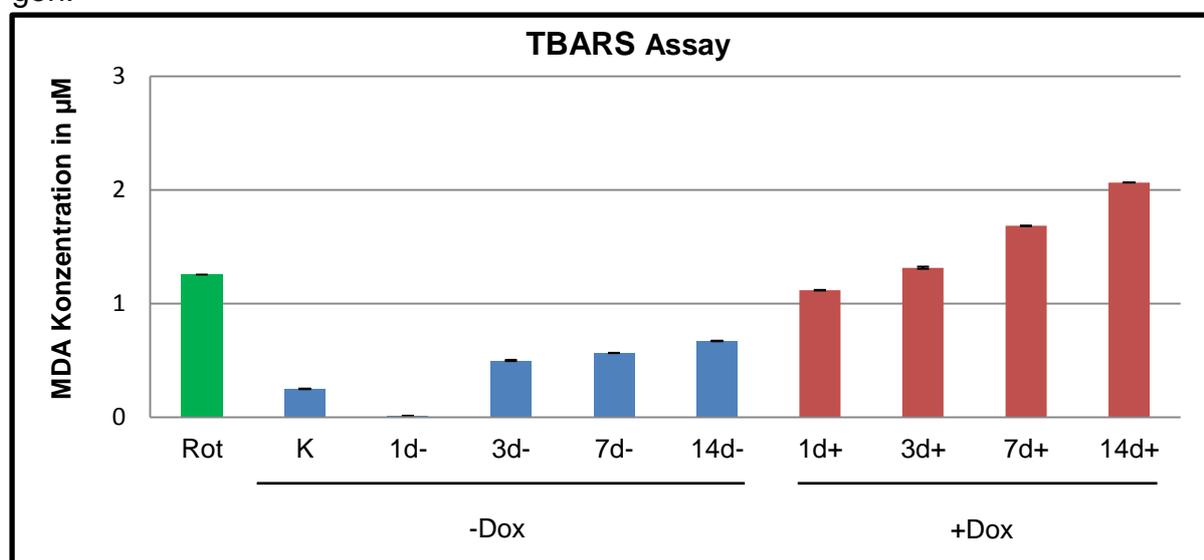


Abbildung 3.26: ERBB2-vermittelter Anstieg von oxidativen Stress in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum in An- und Abwesenheit von Doxozyklin inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen gesammelt und mittels TBARS Assay photometrisch bei 530-540 nm hinsichtlich ROS analysiert. Die gemessene Menge an MDA/TBA Addukt ist ein Maß für die gesteigerte Lipidoxidation. Das Ergebnis repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie ein repräsentatives Ergebnis aus n=3 unabhängigen Experimenten; **Rot**: Rotenon

Durch die Überexpression von NeuT stieg die MDA Konzentration, welche ein indirektes Maß für ein gesteigertes Level an oxidativen Stress darstellte, stark an. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um die Substanz Rotenon, einem Vertreter der Rotenoide, welches auch Verwendung als Insektizid findet. Rotenon führte zur Akkumulation von ROS, indem es durch Blockade von Komplex 1 die Elektronenübertragung der Atmungskette an der mitochondrialen Zellmembran verhinderte [235, 236]. Die Messung des MDA-Gehaltes zeigte in den Kontrollzellen nur einen minimalen zeitabhängigen Anstieg, welcher möglicherweise auf eine Zunahme der Zelldichte zurückzuführen war. Bereits an Tag 1 lag dieser Wert deutlich über dem der Kontrollsituation und auf einem ähnlichen Niveau der Positivkontrolle. Ein Maximum wurde an Tag 14 erreicht und lag etwa um das zehnfache über dem Wert der Kontrolle. Oxidativer Stress wurde schlussendlich aufgrund der unmittelbaren ROS Akkumulation nach NeuT Überexpression direkt durch NeuT ausgelöst und erhöht sich in der Seneszenz.

3.6.2 Die Aktivität der TrxR bleibt konstant während der NeuT-vermittelten Seneszenz

Redox-regulierte Proteine sind in vielen Signaltransduktionswegen involviert und können als Folge einer Fehlregulation zu Krankheiten oder anderen pathologischen Phänotypen führen, welche auf Induktion von oxidativen Stress beruhen können [210, 237, 238]. Bei Thioredoxin Reduktase handelt es sich um eine zentrale Komponente des Thioredoxin-Systems, welche Thioredoxin sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter Bedingungen von oxidativen Stress reduziert, um durch ROS induzierte Proteinschäden zu beheben und den Redox Status der Zelle aufrecht zu erhalten [239, 240]. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit der gesteigerte Level an ROS durch NeuT Induktion mit der Aktivität der TrxR zusammenhängt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in der Seneszenz der Level an TrxR sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene ansteigt. Demnach wäre aufgrund der Aktivierung des Thioredoxin-Systems, speziell durch die gesteigerte TrxR Expression, eine zunehmende Aktivität von TrxR zu erwarten. Vor diesem Hintergrund wurde die Aktivität von TrxR vor und in der Seneszenz photometrisch mittels Ellman´s Reagenz bestimmt [241] (Abb. 3.27).

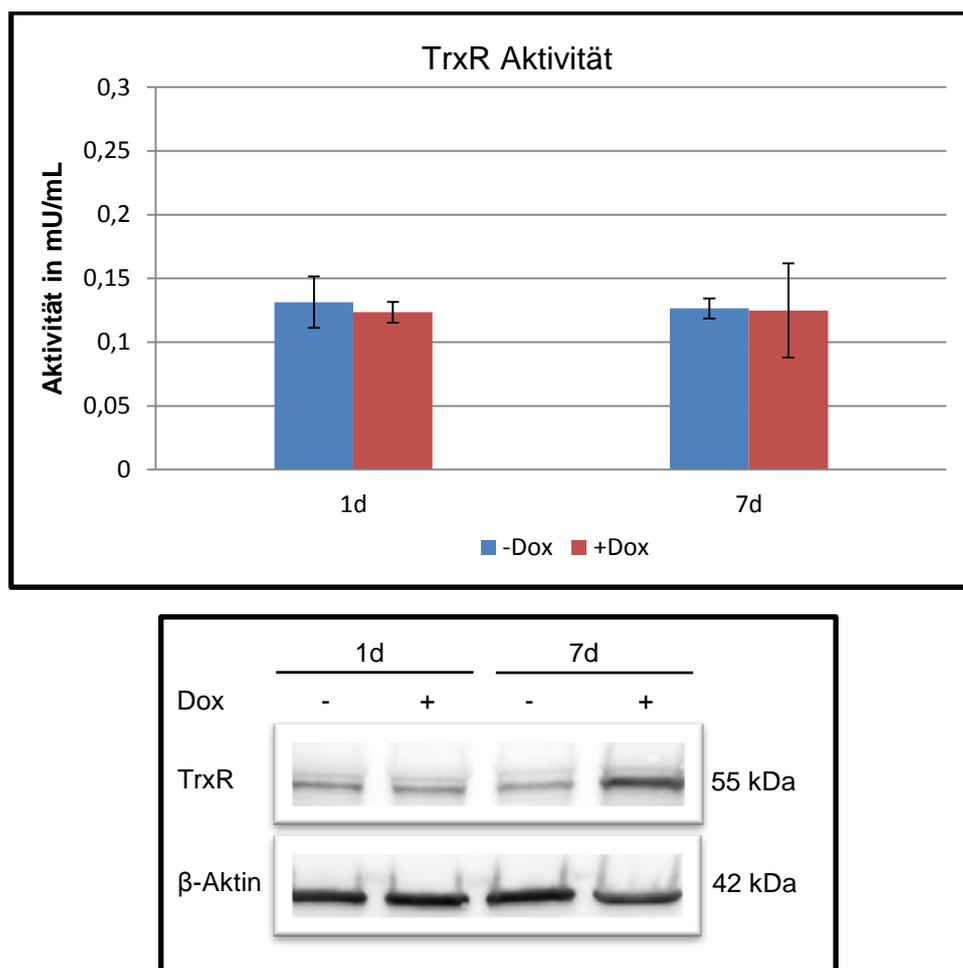


Abbildung 3.27: Möglicher Einfluss der gesteigerten TrxR Expression auf dessen Gesamtaktivität in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für einen Gesamtzeitraum von 1 bzw. 7 Tagen in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und unter Verwendung des TrxR Aktivitätsassay Kits bei 412 nm vermessen. Der Gesamtzeitraum der kinetischen Messung betrug 15 min, das jeweilige Messintervall 30 sek. Zur Überprüfung der durch Doxyzyklin induzierten gesteigerten Menge an TrxR wurde ein Teil des Gesamtlisates mittels Western Blot untersucht. Das Ergebnis repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen (Aktivitätsassay) sowie einen repräsentativen Western Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Überraschenderweise spiegelte der Sachverhalt nicht das zu erwartende Ergebnis bzgl. der TrxR Aktivität wieder. Es konnte weder ein Unterschied zwischen Kontrollzellen und NeuT induzierten Zellen noch ein zeitabhängiger Unterschied vor und in der Seneszenz ermittelt werden. Letztendlich konnte die gesteigerte TrxR Expression und die Akkumulation von ROS nicht in Einklang mit dessen unveränderter Aktivität gebracht werden.

3.6.3 Der Redox Status von Trx verändert sich zugunsten des reduzierten Zustandes durch Einleiten der Seneszenz

Die Regulation von TrxR im Rahmen der NeuT induzierten Onkogen transformation erweist sich als sehr komplex. Um den Zusammenhang zwischen TrxR Expression, erhöhtem ROS Level und unveränderter TrxR Aktivität besser zu verstehen, wurde zunächst das TrxR Substrat, Thioredoxin, untersucht. Thioredoxin wird von TrxR unter Verbrauch von NADPH reduziert und aktiviert. Daher hängen die Aktivität und der Redox Status von Trx entscheidend von der TrxR Aktivität und der verfügbaren Menge an NADPH ab. Als Schlüsselenzym der zellulären Redox-Regulierung erfüllt es sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus zahlreiche Aufgaben. Die Reduktion und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53, NF- κ B oder NRF2 reguliert deren Fähigkeit an DNA zu binden und mögliche Zellantworten auf Stimuli wie oxidativen Stress oder Wachstumsfaktoren zu induzieren [242-244].

Um den Redox Status von Thioredoxin zu charakterisieren, wurde zunächst die Redox Western Blot Technik etabliert. Für die Etablierung der Redox Western Blot Technik wurden MCF-7 Zellen für verschiedene Zeitpunkte mit unterschiedlichen Konzentrationen Wasserstoffperoxid zur Oxidation von Trx behandelt und analysiert. Diese Technik erlaubt die Auftrennung kleiner oxidiertes und reduziertes Proteine voneinander. Das Prinzip basiert auf der Derivatisierung reaktiver Thiolgruppen mittels IAA, welches an reduzierte Thiole bindet und diesen zusätzliche negative Ladung verleiht, wodurch reduzierte Proteine (Trx) das elektrische Feld während der SDS-PAGE schneller passieren können. Oxidierte Thiole werden nicht derivatisiert und passieren das elektrische Feld langsamer. Für die Generierung der Kontrollen wurden Zellen sowohl mit einem oxidierenden (Wasserstoffperoxid) als auch einem reduzierenden Reagenz (DTT) behandelt. Die Ergebnisse sind anhand von Redox Western Blots in Abbildung 3.28 und 3.29 dargestellt.

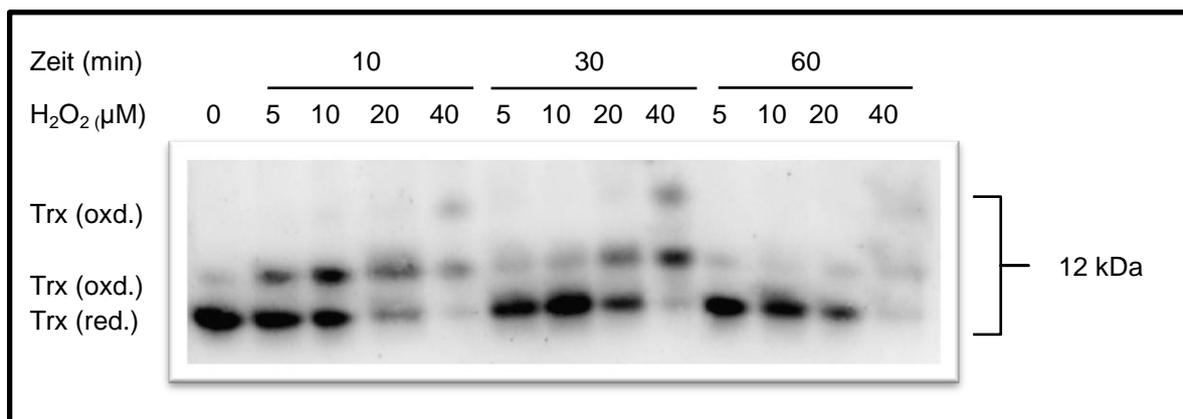


Abbildung 3.28: Redox Western Blot in MCF-7/NeuT Zellen nach Behandlung mit H₂O₂

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate (+50 mM IAA) hergestellt und via Western Blot analysiert. IAA bindet dabei nur an reduziertes Trx und verleiht zusätzliche negative Ladung, so dass reduziertes Trx das native Polyacrylamidgel schneller passiert als oxidiertes Trx. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=2 unabhängigen Experimenten.

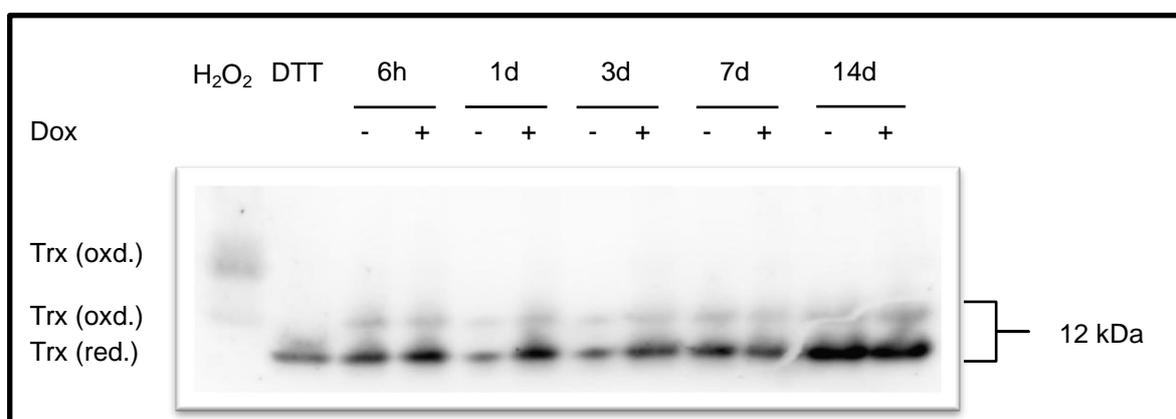


Abbildung 3.29: Redox Western Blot in MCF-7/NeuT Zellen nach Behandlung mit Doxyzyklin

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate (+50 mM IAA) hergestellt und via Western Blot analysiert. Zusätzlich wurden sowohl eine Kontrolle für vollständig oxidiertes (Wasserstoffperoxid), als auch reduziertes (DTT) Trx hergestellt, indem die Zellen jeweils für 30 min mit Wasserstoffperoxid bzw. DTT inkubiert wurden. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass Thioredoxin unter verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid teilweise bzw. vollständig oxidiert werden konnte. Erfolgte die Exposition über einen längeren Zeitraum (60 min), konnte selbst kein oxidiertes Thioredoxin mehr detektiert werden. Eine mögliche Ursache könnte in der Aggregation über Disulfidbrücken mit anderen cysteinhaltigen Proteinen liegen, die als Folge zu einem höheren Gesamtmolekulargewicht von Trx führte [153]. Die Möglichkeit der Detektion der unterschiedlichen Redox Zustände von Trx erlaubte die zeitabhängige Untersuchung von Trx infolge der NeuT Überexpression. Das Resultat zeigte zum einen, dass der basale Redoxstatus von Thioredoxin in den Kontrollzellen fast ausschließ-

lich auf Seiten des reduzierten Zustandes liegt und zum anderen, dass mit Beginn der Seneszenz nach NeuT Expression ab Tag 1 vermehrt reduziertes Trx im Vergleich zu den Kontrollzellen vorlag. Aufgrund der auftretenden ROS Akkumulation (Kapitel 3.6.1) wäre ein hoher Level an zumindest teilweise oxidierten Trx zu erwarten gewesen. Lediglich an Tag 14 zeigten auch die Kontrollzellen einen erhöhten Level an reduzierten Trx, welches vermutlich auf eine hohe Zelldichte und dem damit verbundenen Stress verknüpft ist. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass trotz erhöhtem Level an ROS und konstanter Aktivität von TrxR ein gesteigerter Level an reduziertem Trx mit Beginn der Seneszenz detektiert werden konnte.

3.6.4 Hyperoxidierung von Peroxiredoxinen als Folge von oxidativem Stress in seneszenten MCF-7/NeuT Zellen

Peroxiredoxine gehören, ebenfalls wie Thioredoxin und Glutathion, zu den essentiellen Proteinen, die zur Aufrechterhaltung der Redox Homöostase innerhalb der Zelle unabdingbar sind. Sie besitzen eine Thioredoxinperoxidase Aktivität und spielen eine wichtige Rolle zum Schutz gegen oxidativen Stress, Altern und Krebs [153, 154]. Peroxiredoxine stellen damit ein funktional wichtiges Substrat von Trx dar und können infolge von oxidativen Stress hyperoxidiert werden, so dass eine Interaktion mit Trx nicht mehr möglich ist.

Durch die unveränderte Aktivität von TrxR bei gleichzeitiger Zunahme der Menge an reduzierten Trx unter Bedingungen von oxidativen Stress ist die Aufgabe der gesteigerten Menge an TrxR sowie die des reduzierten Trx unklar. Vor diesem Hintergrund sollte zunächst die Regulation von Trx im Hinblick auf dessen Substrate, die Peroxiredoxine, untersucht werden. Diese wurden mittels Redox Western Blot zeitabhängig nach NeuT Expression hinsichtlich ihres Redox Status durch Verwendung eines Antikörpers, der sich spezifisch gegen eine hyperoxidierte funktionelle Gruppe des katalytischen Zentrums (SO_3H : Sulfonsäurerest) richtet, untersucht. Das Ergebnis ist in Form eines Western Blots in Abbildung 3.30 dargestellt.

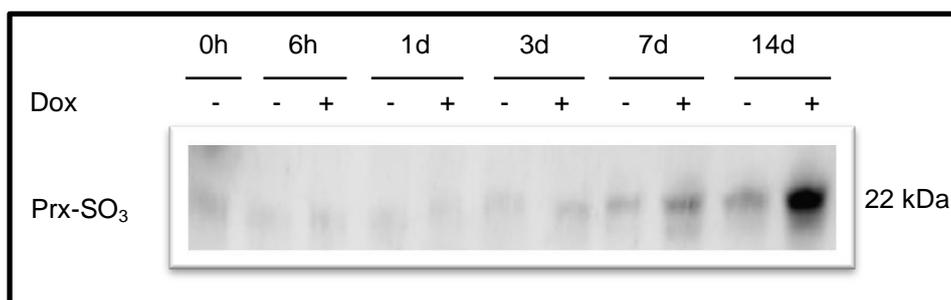


Abbildung 3.30: Hyperoxidierung von Peroxiredoxinen in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und via Western Blot mittels spezifischen Antikörper für hyperoxidierte Peroxiredoxine analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Mit Beginn der Seneszenz ab Tag 3 konnte ein Anstieg hyperoxidierte Peroxiredoxine detektiert werden, der im späten Stadium der Seneszenz (Tag 14) sein Maximum erreichte, während für die Kontrollzellen über den Gesamtzeitraum nur ein minimaler Anstieg verzeichnet werden konnte. Dieser Befund lässt sich mit dem Anstieg von ROS in Einklang bringen, welcher einen ähnlichen Zeitverlauf aufwies. Gleichzeitig erklärte dies die gesteigerte Menge an reduzierten Trx in der Seneszenz. Hyperoxidierte Peroxiredoxine kommen für Trx nicht weiter als Substrat in Frage bzw. können von Trx also nicht reduziert werden, so dass dies eine Entkopplung der gegenseitigen Wechselwirkung zur Folge hat. Bemerkenswert ist allerdings, dass das Aufrechterhalten von Trx im reduzierten Zustand in einem Milieu von oxidativen Stress gewährleistet ist und Trx womöglich eine wichtige Rolle infolge der NeuT vermittelten Onkogen transformation spielt. Die Rollen von Trx und TrxR sind allerdings weiterhin unklar und werden daher mit Hilfe funktionaler Assays untersucht.

3.7 Bedeutung des Thioredoxinsystems für das zelluläre Überleben

Die Charakterisierung der ERBB2 Überexpression im MCF-7/NeuT Zellmodell hat sowohl massive genotypische als auch phänotypische Veränderungen aufgezeigt. Einerseits induziert die Onkogen transformation vorzeitige Seneszenz, die mit einer morphologischen Veränderung der Zellen einhergeht und zum anderen zeigen sich signifikante Veränderungen hinsichtlich der Expression verschiedener Gene. Im Fokus stehen dabei Mitglieder des Thioredoxinsystems, die mit der Regulation und Kontrolle von oxidativen Stress in Verbindung stehen. Die funktionale Bedeutung von TrxR und Trx soll daher in der NeuT-vermittelten Seneszenz näher untersucht wer-

den. Thioredoxin ist nicht nur an der Kontrolle und Aufrechterhaltung einer Redox Homöostase innerhalb der Zelle involviert, sondern zeigt laut neuen Studien auch eine mögliche Beteiligung an der Regulation von zellulären Degradationsprozessen, die mit dem Überleben der Zelle assoziiert sind.

Vor diesem Hintergrund wurde der Fokus im weiteren Verlauf auf die funktionelle Analyse von Trx in Bezug auf das zelluläre Überleben gerichtet. Dazu wurde zunächst das Thioredoxin-regulierende Enzym TrxR mittels Arsentrioxid (ATO) durch Alkylierung des katalytisch aktiven Zentrums von TrxR gehemmt, so dass Trx nicht weiter reduziert werden konnte und kein Substrat mehr für TrxR darstellte. Ein Einfluss der Hemmung von TrxR auf die Autophagie wurde anschließend untersucht.

3.7.1 Die Hemmung von TrxR fördert die Akkumulation von Autophagosomen und verändert die Aktivität der Autophagie

Um einen Einfluss von Trx auf die Autophagie zu untersuchen, wurde TrxR, welches Trx unter Verbrauch von NADPH reduziert, mittels ATO [245] für einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden inhibiert, so dass Trx nur im oxidierten und damit inaktiven Zustand vorliegen sollte. Unter physiologischen Bedingungen liegt Trx in der aktiven, reduzierten Form in der Zelle vor (Kontrolle). Ein Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen hinsichtlich des Markerproteins für Autophagie, LC3-II, sollte Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen Trx und Veränderungen der Autophagie liefern und ist in Form eines Western Blots in Abbildung 3.31 dargestellt.

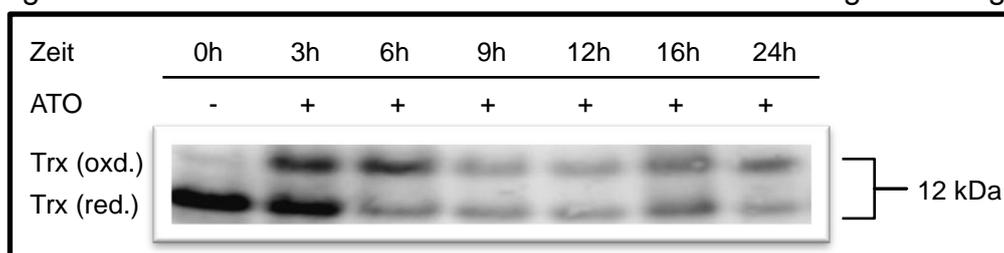


Abbildung 3.31: Einfluss der Hemmung von TrxR auf den Redox Status von Trx

MCF-7 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit Arsentrioxid (ATO, 10 μ M), einem potenten TrxR Inhibitor, inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate (+50 mM IAA) hergestellt und via Redox Western Blot hinsichtlich des Redox Status von Trx analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Durch Inhibition von TrxR durch ATO erfolgte bereits nach 3 Stunden eine partielle Oxidation von Trx und einer damit verbundenen Abnahme des reduzierten Zustandes, welche bereits nach 6 Stunden maximal war und das Gleichgewicht somit auf

Seiten des oxidierten Zustandes verschob. Nach 9 Stunden ATO Exposition war sowohl die Menge an oxidierten als auch reduzierten Trx minimal und blieb während des restlichen Inkubationszeitraumes von 24 Stunden unverändert niedrig. Die Veränderung des Redox Gleichgewichts zu Gunsten des oxidierten Zustandes führte gleichzeitig zu einem zeitabhängigen Anstieg des Autophagiemarkers LC3-II, welcher nach 9 Stunden induziert wurde und nach einem Expositionszeitraum von 24 Stunden maximal vorlag. Dieser Sachverhalt zeigte daher eine Assoziation zwischen der zunehmenden Oxidation von Trx und dem Anstieg von LC3-II, welcher stellvertretend für die Zunahme der Anzahl der Autophagosomen steht, und damit einen möglichen kausalen Zusammenhang von Trx in der Autophagie aufzeigt (Abb. 3.32).

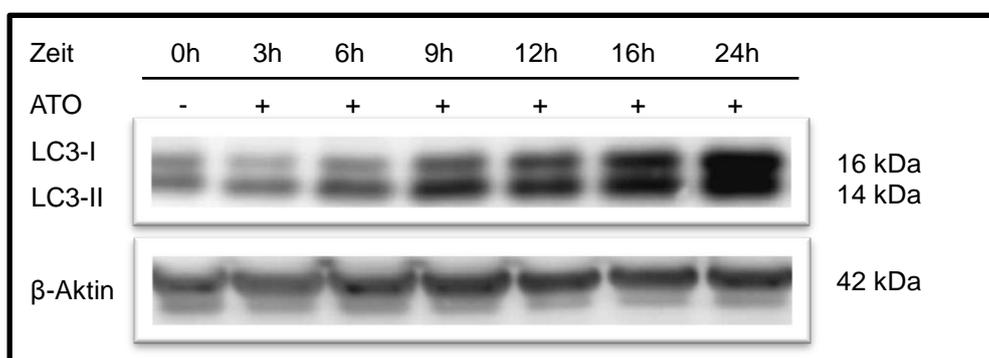


Abbildung 3.32: Einfluss der Hemmung von TrxR auf die Autophagie

MCF-7 Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit Arsentrioxid (ATO, 10 μ M), einem potenten TrxR Inhibitor, inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und via Western Blot hinsichtlich des Autophagiemarkers LC3-I/LC3-II untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Um einen direkten Zusammenhang zwischen Trx und der Autophagie zu bestätigen und einen in der Literatur beschriebenen „*Off-Target*“-Effekt (MAPK Signalweg Aktivierung, Induktion von Apoptose [246, 247]) durch die Inkubation mit ATO auszuschließen, wurde in nachfolgenden Experimenten das direkte Herunterregulieren von TrxR und Trx mittels siRNA durchgeführt. Die Herunterregulation von Trx mittels siRNA sollte dabei mit der Oxidation von Trx mittels ATO vergleichbar sein, da sowohl das komplette Fehlen als auch die Oxidation von Trx einen Verlust der Trx Funktion zur Folge hatte. Darüber hinaus erfolgte die Kombination von TrxR bzw. Trx Knock-down und zusätzlicher ATO Exposition. Die Ergebnisse der erfolgreichen Herunterregulation von TrxR und Trx sind nachfolgend auf RNA- und Proteinebene in den Abbildungen 3.33 und 3.34 dargestellt.

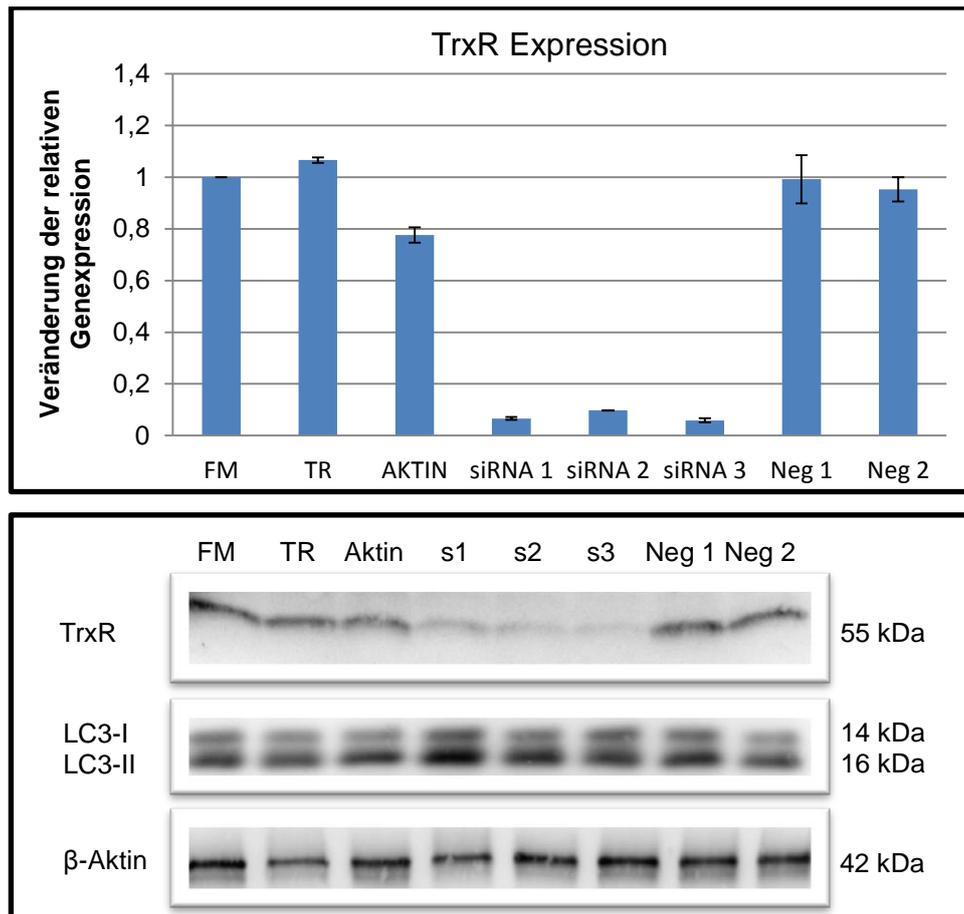
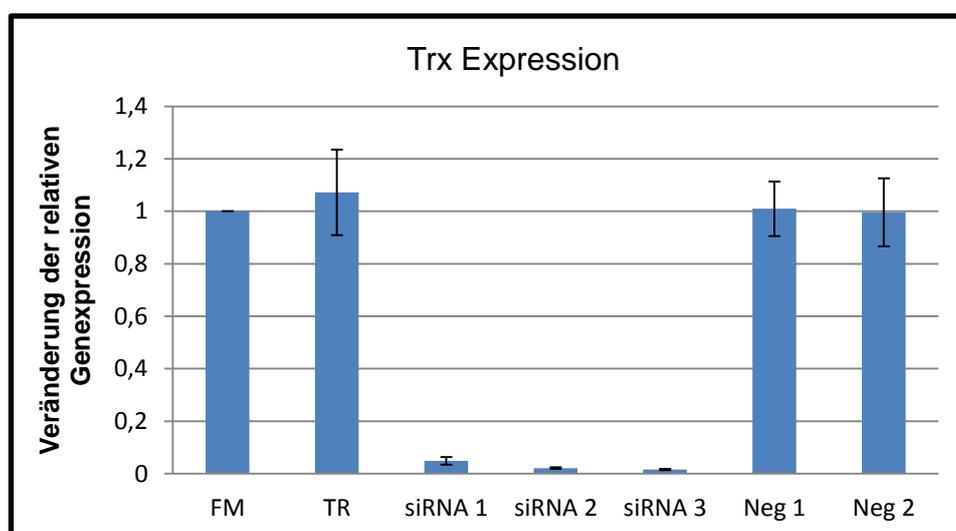


Abbildung 3.33: Einfluss des TrxR Knockdown auf den Autophagiemarker LC3-I und LC3-II

MCF-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifisch gegen TrxR gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate generiert und mittels Western Blot bezüglich Veränderungen von LC3-I/LC3-II analysiert. Neg1/Neg2 stellen Negativkontrollen dar, bei denen Zellen mit unspezifischer siRNA behandelt wurden; **TR**: Transfektionsreagenz. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.



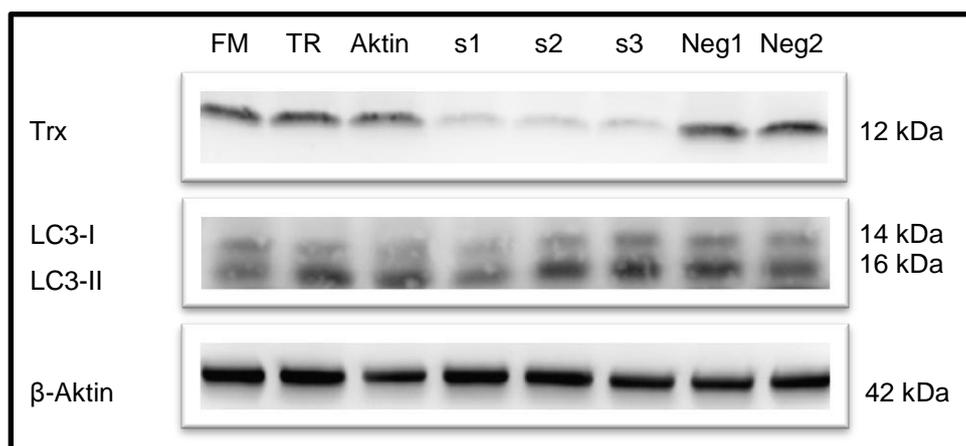


Abbildung 3.34: Einfluss des Trx Knockdown auf den Autophagiemarker LC3

MCF-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifisch gegen Trx gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate generiert und mittels Western Blot bezüglich Veränderungen von LC3-I/LC3-II analysiert. Neg1/Neg2 stellen Negativkontrollen dar, bei denen Zellen mit unspezifischer siRNA behandelt wurden; TR: Transfektionsreagenz. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=2 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Die Ergebnisse zeigten, dass TrxR und Trx sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene erfolgreich herunterreguliert werden konnten. Die Verwendung zweier nicht komplementärer siRNA (Negativkontrolle 1+2) zeigte außerdem, dass die siRNA selbst keinen Einfluss auf die Genexpression von TrxR bzw. Trx besaß. Ein signifikanter Anstieg der LC3-II Expression konnte sowohl nach Herunterregulation von TrxR als auch für Trx nicht festgestellt werden. Gleichzeitig zeigte sich der Redox Status von Trx unverändert. Die Herunterregulation von TrxR führte überraschenderweise nicht zur Oxidation von Trx (Abb. 3.35).

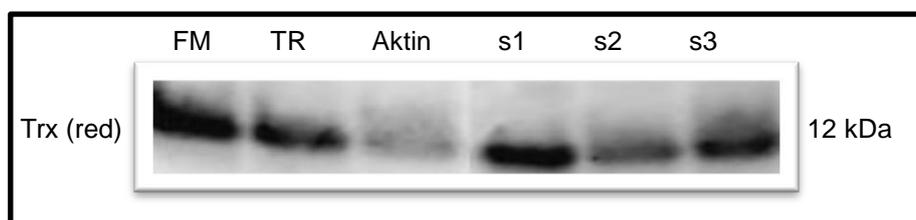


Abbildung 3.35: Einfluss des TrxR Knockdown auf den Redox Status von Trx

MCF-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifisch gegen TrxR gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate (+50 mM IAA) hergestellt und via Western Blot hinsichtlich des Redox Status von Trx analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Ein signifikanter Anstieg der LC3-II Expression konnte auch durch die Herunterregulation von Trx allein nicht erzielt werden. Vor diesem Hintergrund erfolgte die zu-

sätzliche Inkubation mit ATO, um eine mögliche Beteiligung von TrxR und Trx an der gesteigerten LC3-II Expression durch ATO auszuschließen (Abb. 3.36 und 3.37).

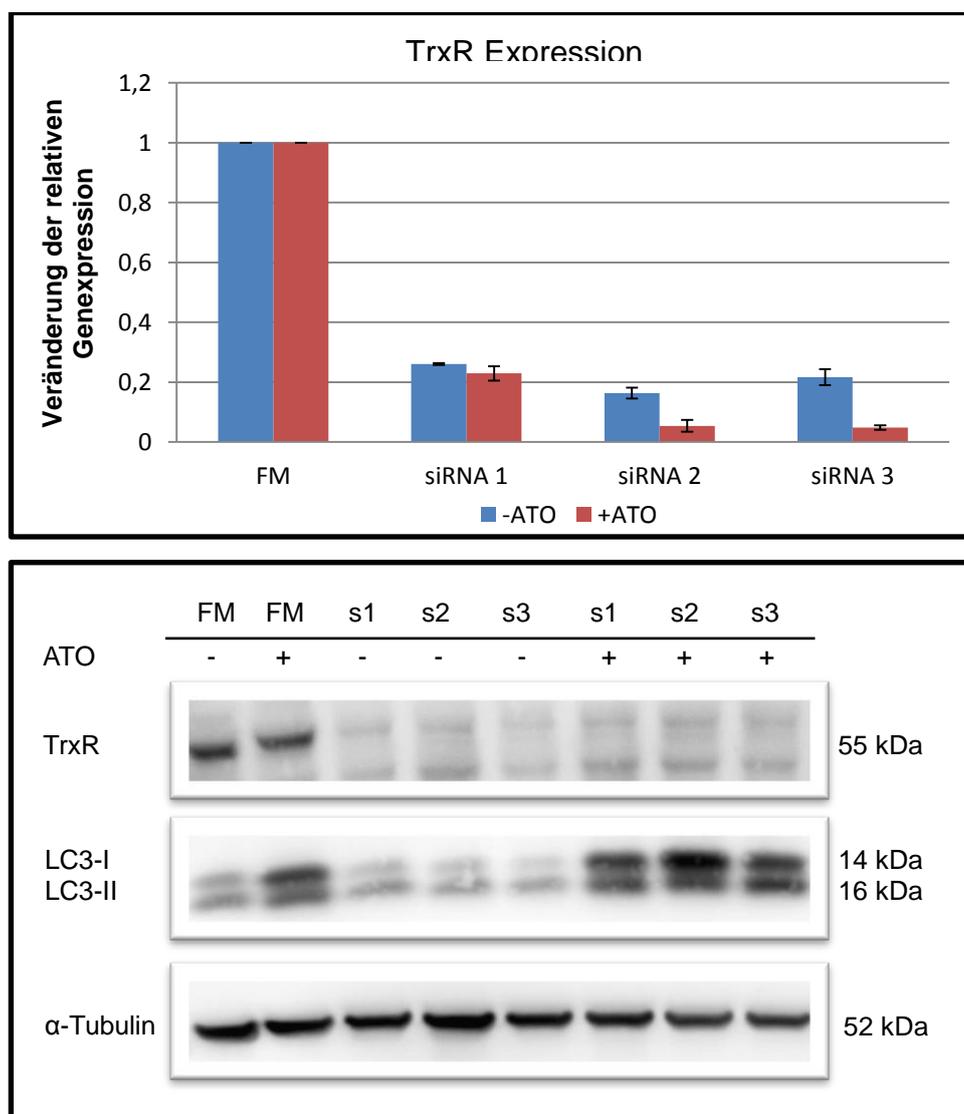


Abbildung 3.36: Einfluss des TrxR Knockdown unter Bedingungen von oxidativen Stress auf den Autophagiemarker LC3-I und LC3-II

MCF-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifisch gegen TrxR gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Zellen für weitere 24 Stunden mit ATO (10 μ M) inkubiert, während ein anderer Teil keine ATO Exposition erfuhr. Anschließend wurden Proteinlysate generiert und mittels Western Blot bezüglich Veränderungen von LC3-I/LC3-II analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=3 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

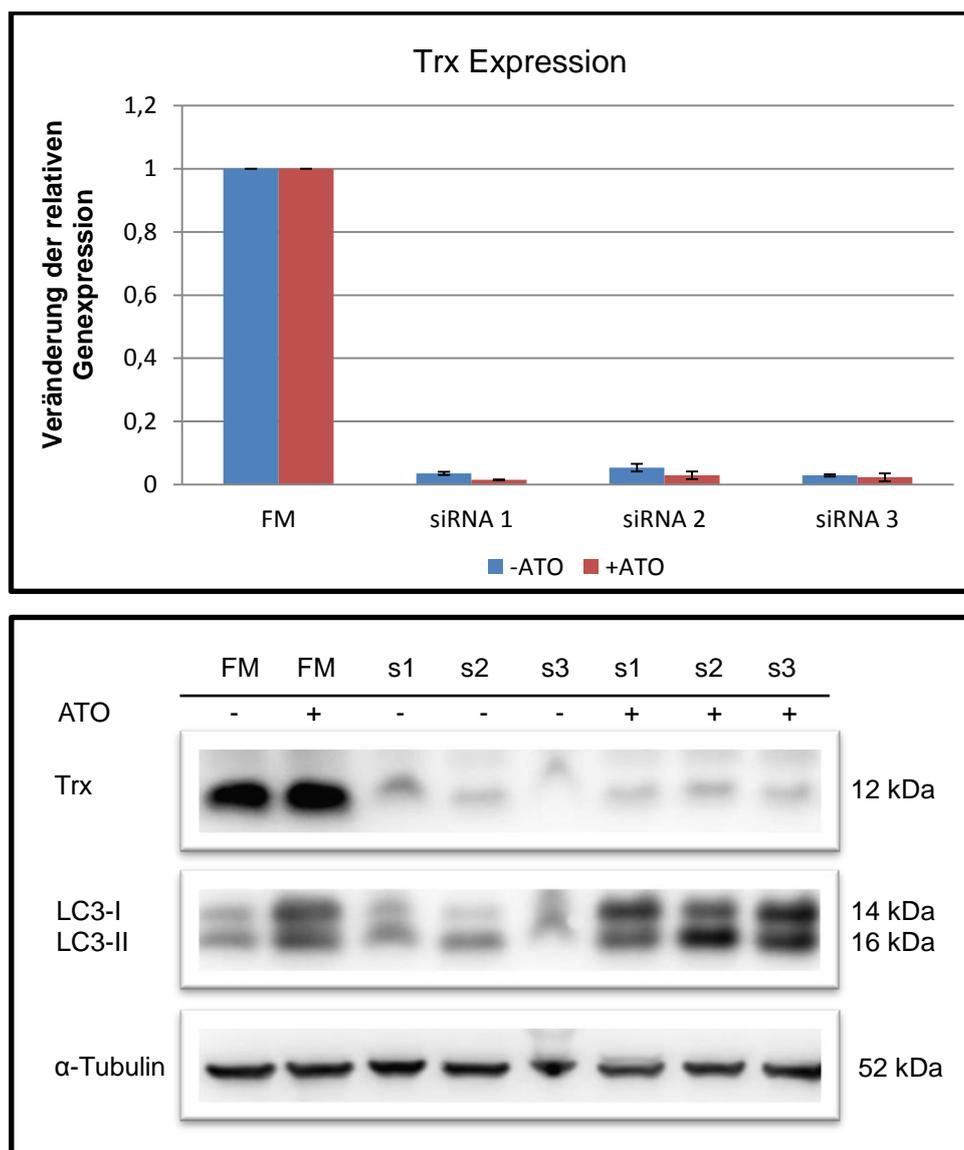


Abbildung 3.37: Einfluss des Trx Knockdown unter Bedingungen von oxidativen Stress auf den Autophagiemarker LC3-I und LC3-II

MCF-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifisch gegen Trx gerichteter siRNA (s1-s3) inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Zellen für weitere 24 Stunden mit ATO (10 μ M) inkubiert, während ein anderer Teil keine ATO Exposition erfuhr. Anschließend wurden Proteinlysate generiert und mittels Western Blot bezüglich Veränderungen von LC3-I/LC3-II analysiert. Das Ergebnis zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen (RNA Expression) zweier biologischer Replikate eines Experiments sowie einen repräsentativen Western Blot aus insgesamt n=3 unabhängigen Experimenten. Die RNA Proben der unterschiedlichen Zeitpunkte wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode auf die Kontrollbedingung (FM, Wert 1) normiert. Werte >1 beschreiben eine zur Kontrollbedingung gesteigerte Expression, Werte <1 eine verminderte Expression.

Die Ergebnisse deuteten an, dass die Veränderung der Autophagie in Form einer gesteigerten Autophagosomeninduktion nicht über TrxR oder Trx vermittelt wurde, da ein Anstieg des Autophagiemarkers LC3-II bereits in den mit ATO behandelten Kontrollzellen auftrat und sich nicht signifikant von den Proben, in denen zusätzlich TrxR oder Trx herunterreguliert wurden, unterschied. Lediglich das Verhältnis von LC3-I zu LC3-II schien sich bei Verwendung bestimmter siRNA zu verschieben,

Aussagen über eine Steigerung des Levels von LC3-II konnten daher allerdings nicht getroffen werden. Es ist davon auszugehen, dass ATO entweder toxisch auf die Zellen wirkte und daher Autophagie induzierte oder dass ATO andere Targets außer TrxR hat.

Im Zusammenhang mit Autophagie gibt es weitere Hinweise in der Literatur, die andeuten, dass Trx über die Regulation der PI3K/AKT und p38/MAPK Signalwege eine Rolle in der Autophagie spielen könnte. Unter Bedingungen von oxidativen Stress verändert sich der Redox Status von Trx, welches oxidiert wird und damit in der inaktiven Form vorliegt. Studien zeigen, dass eine Komplexbildung von reduzierten Trx mit ASK1 eine Aktivierung des p38/MAPK Signalweges verhindern [165, 248]. Steigt der Level an ROS in der Zelle an, resultiert dies in der Oxidation von Trx, so dass es zur Aufhebung des Trx/ASK1 Komplexes kommt und der p38/MAPK Signalweg durch ASK1 aktiviert werden kann. Studien haben außerdem gezeigt, dass die Regulation der Autophagie mit der Aktivierung von p38/MAPK über ASK1 in Verbindung steht [249-252]. Neben ASK1 kann Trx Komplexe mit weiteren Proteinen bilden, wodurch die Aktivierung von Signalkaskaden unterdrückt wird. Dazu zählt auch die Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), welches die Hydrolyse von verschiedenen Phosphorsäureestern in der Zelle katalysiert. Bedeutsam sind vor allen Dingen signalübertragende Moleküle wie PIP₁, PIP₂, PIP₃ sowie AKT, welche direkt an der Regulation des PI3K/AKT Signalweges beteiligt sind [227]. Die Komplexbildung von PTEN mit reduzierten Trx unterdrückt die PTEN induzierte Hemmung des PI3K/AKT Signalweges, so dass dieser permanent aktiv ist und Proliferation und Hemmung der Apoptose zur Folge hat. Gleichzeitig wird mTOR aktiviert und die Autophagie blockiert [253, 254]. Daher kann die Oxidation von Trx, z.B. durch ATO, bzw. das vollständige Herunterregulieren über diesen Signalweg zu einer Induktion der Autophagie führen.

Abschließend wurde daher untersucht, ob die Herunterregulation von Trx zur Inhibition des PI3K/AKT Signalweges (Induktion der Autophagie) führt bzw. eine Aktivierung des p38/MAPK Signalweges (Autophagiereifung durch Fusion von Autophagosom und Lysosomen) zeigte. Zum einen wurde Trx dafür direkt mittels siRNA herunterreguliert, zum anderen erfolgte die gleichzeitige Exposition mit ATO,

um einen möglichen Nebeneffekt direkt aufzuzeigen. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 3.38 dargestellt.

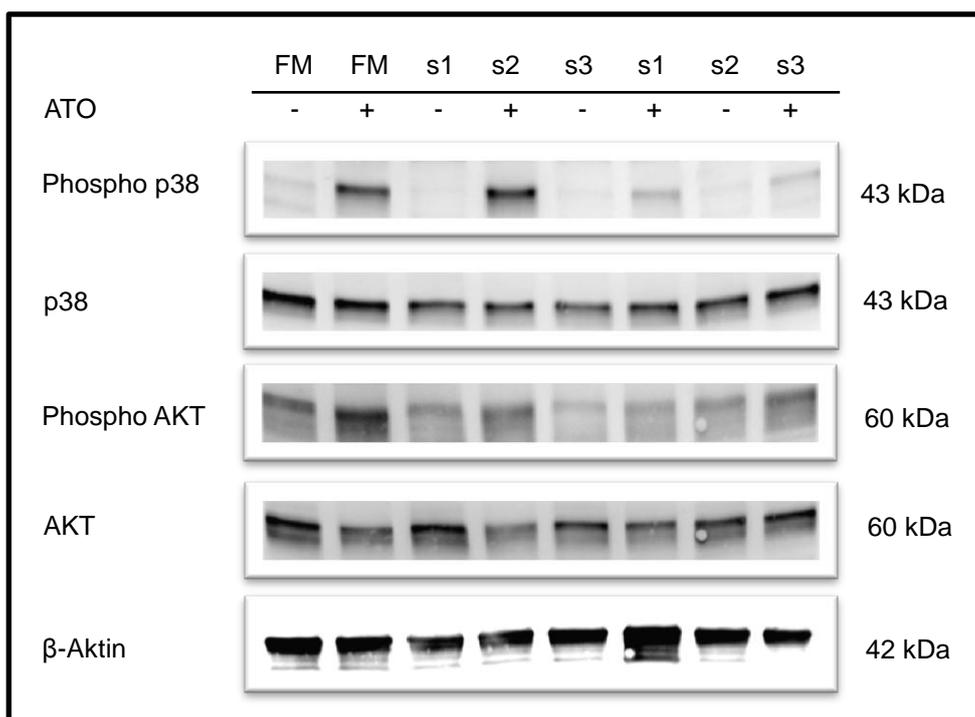


Abbildung 3.38: Einfluss des Trx Knockdown auf essentielle zelluläre Signalwege in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden für 72 Stunden mit spezifisch gegen Trx gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Zellen für weitere 24 Stunden mit ATO (10 μ M) inkubiert, während ein anderer Teil keine ATO Exposition erfuhr. Anschließend wurden Proteinlysate generiert und mittels Western Blot hinsichtlich Veränderungen von Proteinen essentieller zellulärer Signalwege untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=2 unabhängigen Ex-

Die direkte Herunterregulation von Trx zeigte keinerlei Einfluss auf eine Veränderung des p38/MAPK und PI3K/AKT Signalweges. Sowohl der Phosphorylierungsstatus von AKT als auch von p38 bleiben unverändert, während eine Exposition mit ATO bereits in der Kontrollsituation eine Phosphorylierung von P38 und AKT induzierte, die gleichermaßen in den Trx defizienten Zellen auftrat. Gleichzeitig führte eine Inkubation mit ATO zur Abnahme des basalen Levels des AKT Proteins. Eine Beteiligung von Trx in Form einer Autophagieinduktion konnte in parental MCF-7 Zellen nicht aufgezeigt werden. Eine mögliche Ursache könnte im Fehlen eines Stimulus für oxidativen Stress begründet sein, welcher Voraussetzung für die Induktion von Autophagie ist. Aus diesem Grund wurden TrxR und Trx im MCF-7/NeuT Zellsystem herunterreguliert und anschließend für drei Tage mit Doxyzyklin inkubiert, um die Seneszenz einzuleiten. Gleichzeitig zeigten vorherige Ergebnisse, dass zu diesem Zeitpunkt ein hoher Level an oxidativen Stress detektiert werden konnte und die Menge an reduzierten Trx bereits gestiegen war. Bei einer Beteiligung von Trx an der

Induktion der Autophagie sollte daher ein gesteigerter Level an LC3-I bzw. LC3-II zu erwarten sein (Abb. 3.39).

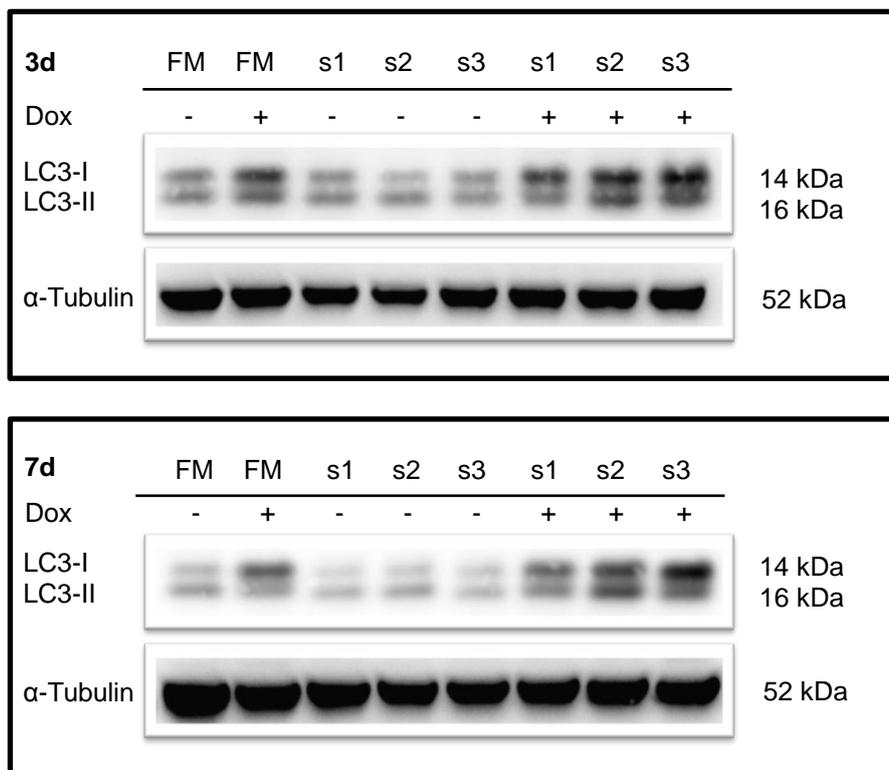


Abbildung 3.39: Einfluss des Trx KD in der prä-Seneszenz (3d) und Seneszenz (7d) auf LC3-I und LC3-II in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7 Zellen wurden für 48 Stunden mit spezifisch gegen Trx gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Zellen für weitere 3 bzw. 7 Tage mit Doxycyclin inkubiert, während ein anderer Teil keine Doxycyclin Exposition erfuhr. Anschließend wurden Proteinlysate generiert und mittels Western Blot bezüglich Veränderungen von LC3-I/LC3-II analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten.

Die Kontrollzellen zeigten wie die Trx defizienten Zellen sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 keine signifikante LC3-I und LC3-II Expression. NeuT Überexpression allein resultierte in einer gesteigerten Expression von LC3-I, nicht aber LC3-II. Mit Beginn der Seneszenz an Tag 3 zeigten Trx defiziente Zellen im Vergleich zur alleinigen NeuT Überexpression eine minimal gesteigerte Menge an LC3-II, dieser Effekt ließ sich auch im späten Stadium der Seneszenz an Tag 7 beobachten. Der Unterschied war allerdings minimal und gab daher keinen beweiskräftigen Aufschluss über eine Beteiligung von Trx an der Autophagie, so dass sich diese Hypothese durch die durchgeführten Experimente nicht bestätigen ließ. Gleichzeitig wurde ein möglicher Einfluss auf die Vitalität der Trx bzw. TrxR defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen untersucht (Abb. 3.40). Dadurch sollte herausgefunden werden, ob das Fehlen eines antioxidativ wirkenden Schutzmechanismus das Überleben der Zellen negativ beeinflusst.

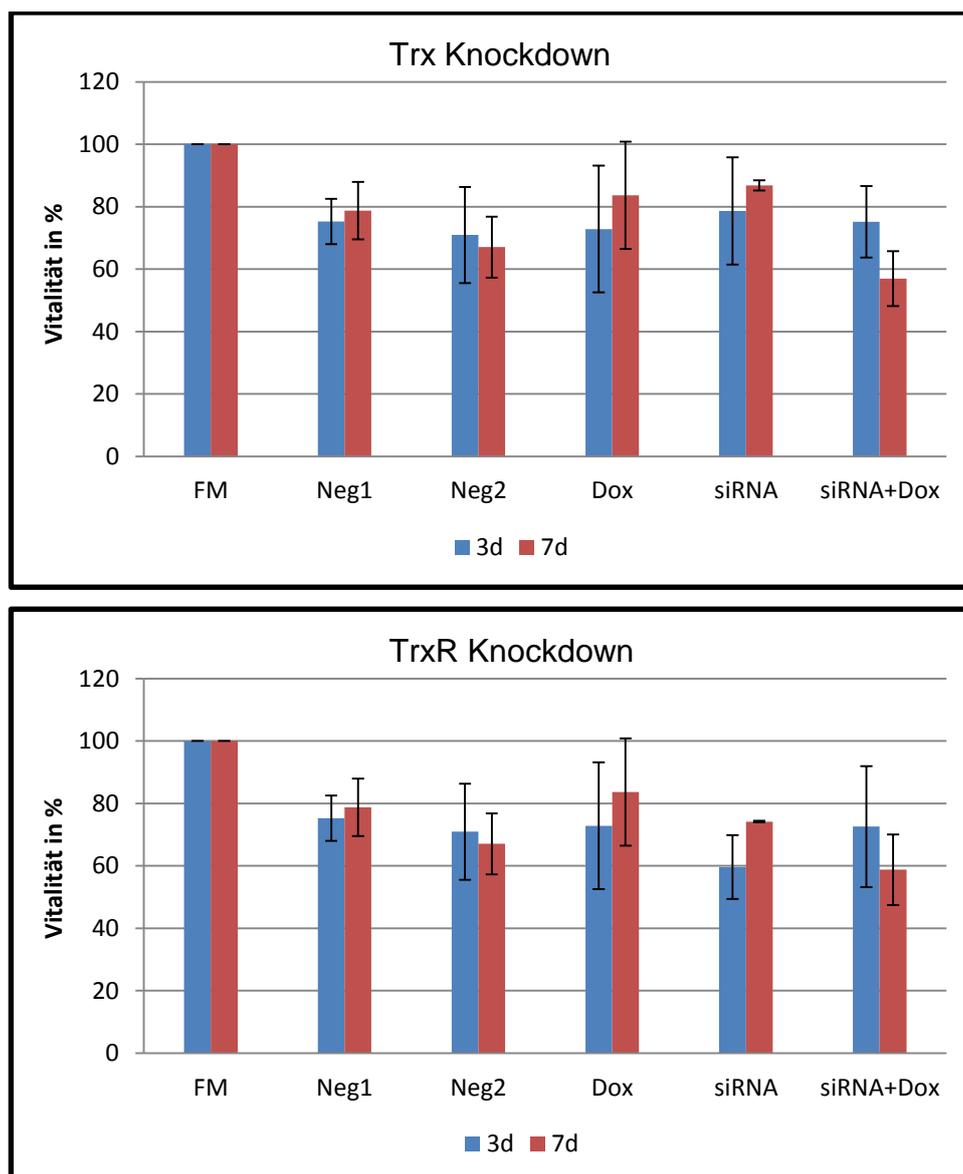


Abbildung 3.40: Einfluss des Trx/TrxR Knockdown in der prä-Seneszenz (3d) und Seneszenz (7d) auf die Vitalität der MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7 Zellen wurden für 48 Stunden mit spezifisch gegen Trx gerichteter siRNA (s1-s3, 10 nM) inkubiert. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Zellen für weitere 3 bzw. 7 Tage mit Doxycyclin inkubiert, während ein anderer Teil keine Doxycyclin Exposition erfuhr. Neg1/Neg2 stellen Negativkontrollen dar, bei denen Zellen mit unspezifischer siRNA behandelt wurden. Nach dem jeweiligen Inkubationszeitraum wurden die Zellen für 3h bei 37°C mittels Neutralrot gefärbt, gewaschen und abschließend mittels Plate Reader bei 540 nm vermessen. Die Daten wurden dabei auf die Kontrollbedingung (Vitalität =100%; FM = Full Media) normiert. Das Ergebnis repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen von n=2 unabhängigen Experimenten.

Zunächst konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit der Negativkontrolle einen Einfluss auf die Zellvitalität aufzeigte, die zwischen 20 und 30% minimiert ist. Die Behandlung mit Doxycyclin führte sowohl in der prä-Seneszenz als auch in der Seneszenz zu keinem signifikanten Verlust der Vitalität, diese belief sich zwischen 75 und 85%. Dieses Ergebnis deckte sich mit fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, die zwar eine Veränderung der Zellmorphologie, nicht aber die Zunahme von

Apoptose aufzeigten. Der Knockdown von Trx allein resultierte nicht in einer drastischen Abnahme der Vitalität (20%). Der Trx Knockdown nach NeuT Überexpression zeigte dagegen in der Seneszenz (Tag 7) eine Minderung der Zellvitalität von 40% und ist möglicherweise auf den gleichzeitigen Verlust des Thioredoxinsystems und dem erhöhten Level an oxidativen Stress zurückzuführen. Der TrxR Knockdown nach NeuT Überexpression zeigte einen ähnlichen Effekt, die verbleibende Zellvitalität betrug in der Seneszenz etwa 60%, während die alleinige Herunterregulation von TrxR zum gleichen Zeitpunkt eine Abnahme der Vitalität von 15% aufzeigte. Die Ergebnisse geben somit Hinweise darauf, dass der alleinige Verlust eines antioxidativ wirkenden Schutzmechanismus keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität aufweist. Der Verlust dessen, gepaart mit einem erhöhten Level an oxidativen Stress resultiert allerdings in der Abnahme der Vitalität von etwa 40%.

Da sich dennoch viele Hinweise in der Literatur finden, die eine mögliche Beteiligung von Thioredoxin an zellulären Degradationsprozessen aufzeigen, wurde neben der Autophagie ein zweiter wichtiger Entsorgungsweg von Zellbestandteilen genauer untersucht. Das Proteasom, ein Proteinkomplex von annähernd 1700 kDa degradiert Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu Fragmenten und fungiert als Multienzymkomplex zur Qualitätskontrolle von Proteinen. Dieser Enzymkomplex steht im Verdacht unter Beteiligung von Trx redox-reguliert zu sein und damit hinsichtlich der Aktivität beeinflusst zu werden [184]. Vor diesem Hintergrund wurde die proteasomale Aktivität zeitabhängig in MCF-7/NeuT Zellen zu den Zeitpunkten (Tag 1, 3 und 7) einer gesteigerten Menge reduzierten Thioredoxins im Vergleich zu Kontrollzellen vermessen. Abbildung 3.41 zeigt das Ergebnis der Proteasomaktivität in Abhängigkeit der zeitabhängigen Doxyzyklin Behandlung in MCF-7/NeuT Zellen.

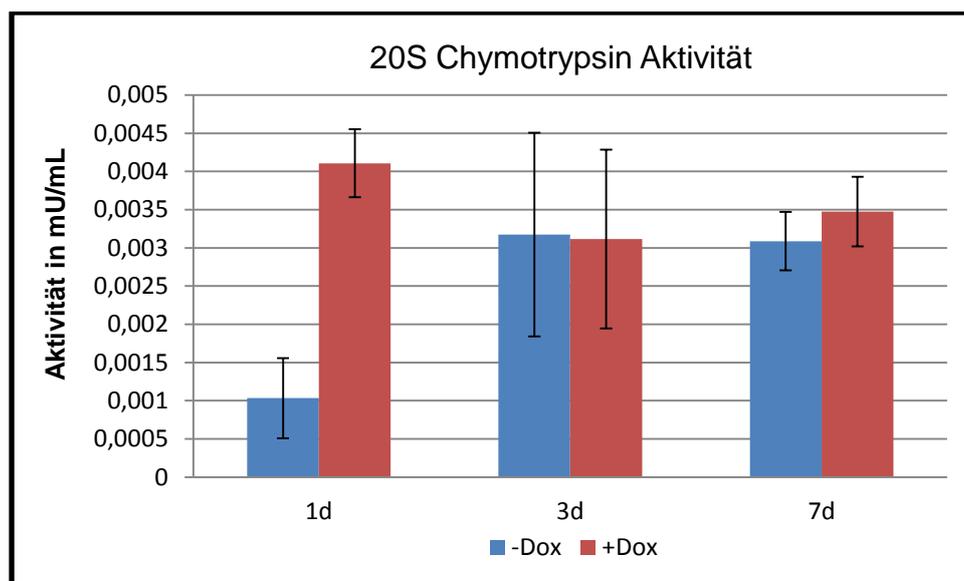


Abbildung 3.41: Bestimmung der Proteasomaktivität im Zuge der zellulären Seneszenz in MCF-7/NeuT Zellen

MCF-7/NeuT Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin inkubiert. Anschließend wurden diese geerntet und anhand des Protokolls des Kits zur Bestimmung der proteasomalen Aktivität vorbereitet. Die Messung zur Detektion der Fluoreszenzintensität (Excitation: 380 nm, Emission: 460 nm) erfolgte bei 37°C und über einen Gesamtzeitraum von 2 Stunden, wobei das Messintervall 1 Minute betrug. Das Ergebnis repräsentiert Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=4 unabhängigen Experimenten.

Ein Vergleich der proteasomalen Aktivität zwischen unbehandelten Kontroll- und überexprimierenden NeuT Zellen zeigte nur an Tag 1 einen deutlichen Unterschied. Vor dem Einleiten der Seneszenz erreichte die proteasomale Aktivität ihr Maximum und unterschied sich um einen Faktor 4 von dem der Kontrollzellen. In der Seneszenz an Tag 3 und 7 lag die Aktivität bei beiden Bedingungen auf einem annähernd gleich hohen Level, das nur minimal unter dem maximalen Wert zu Beginn der Seneszenz lag.

Der signifikante Aktivitätsunterschied zu Beginn der Seneszenz ging mit einer gesteigerten Menge an reduzierten Thioredoxin an Tag 1 einher. Diese Korrelation deutet möglicherweise auf eine Beteiligung von Trx an der Steigerung der proteasomalen Aktivität hin. Allerdings spiegelte sich dieser Effekt nicht im späteren Verlauf der Seneszenz wieder. Untersuchungen der proteasomalen Aktivität nach Herunterregulation von Trx mit und ohne Doxyzyklin induzierter NeuT Expression zeigten allerdings widersprüchliche und nicht-reproduzierbare Ergebnisse, so dass eine Beteiligung von Trx an zellulären Degradationsprozessen im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

4 Diskussion

4.1 TrxR und TXNIP sind mit schlechter Prognose in Brustkrebspatienten assoziiert und zeigen einen Zusammenhang mit einem positiven ERBB2 Status

Das Ziel dieser Studie war es, erstmals einen prognostischen Zusammenhang zwischen zwei Mitgliedern des Thioredoxinsystems, TrxR und TXNIP, und der Entstehung von Metastasen von Patienten mit Brustkrebs zu untersuchen, da dieses System zur Kontrolle von oxidativem Stress als möglicher Angriffspunkt zur Behandlung des Mammakarzinoms immer mehr in den Fokus gerückt ist [255, 256]. Gründe dafür sind in vielfältigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu suchen, die gezeigt haben, dass sich eine erhöhte Expression von Trx in vielen aggressiv voranschreitenden Tumoren wiederfindet. Das gezielte Ausschalten von TrxR, welches den Redoxstatus von Trx und damit dessen Aktivität kontrolliert, konnte im Mausexperiment das Tumorwachstum verlangsamen und die Anzahl an Metastasen verringern [257]. Dies zeigt die Bedeutung von TrxR und Trx an der Tumorentwicklung auf. Des Weiteren konnte die tumorsuppressive Wirkung als Folge der Inhibition des Trx Signalweges in Mäusen mit Brust-, Nieren- und Darmxenografts bestätigt werden [258, 259]. Außerdem ist bekannt, dass Tumorzellen ein erhöhtes basales Level an ROS zur Induktion der Proliferation benötigen und generieren [112, 212], gleichzeitig allerdings ein Mechanismus zum Schutz der Zelle vor toxischen ROS Konzentrationen gewährleistet sein muss, welches in vielen Fällen mit einer gesteigerten Expression von Trx einhergeht. Durch dieses Gleichgewicht der einerseits gesteigerten Menge an ROS und andererseits erhöhten Menge an aktiven Trx wird gleichzeitig die Apoptose der Tumorzellen verhindert, indem aktives Trx Proteine wie ASK1, welches Apoptose induziert, inhibiert [260, 261]. Daher liegt die Hypothese nahe, dass sowohl TrxR, welches Trx reduziert, als auch TXNIP als Trx Inhibitor eine bedeutende Rolle in der Regulation von oxidativen Stress in Tumorzellen zukommt. Eine prognostische Relevanz im Hinblick auf das Überleben von Brustkrebspatienten im Zusammenhang mit Expressionsdaten von Mitgliedern des Thioredoxinsystems konnte bisher allerdings nicht aufgezeigt werden und wurde daher in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Grundlage der Untersuchungen waren drei Affymetrix Gene Array Datensätze von insgesamt 788 Brustkrebspatienten (ohne

Chemotherapie), die sich aus den Kohorten Mainz (n=200), Rotterdam (n=286), Transbig (n=302) zusammensetzten. Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte TrxR Expression in den einzelnen sowie der Gesamtkohorte mit schlechter Prognose und verringertem metastasefreien Überleben der Patientinnen verknüpft war. Zudem bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem ERBB2 Status und der TrxR Expression. Für TXNIP konnte eine inverse Assoziation hinsichtlich metastasefreien Überlebens der Patientinnen festgestellt werden. Patienten mit einer relativ hohen TXNIP Expression zeigten eine bessere Prognose als Patienten mit einer relativ niedrigen Expression. Eine signifikante Abhängigkeit der TXNIP Expression in Bezug auf den ERBB2 Status konnte im Vergleich zu TrxR nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse spiegeln lediglich einen Trend wider, dass ein positiver ERBB2 Status in Zusammenhang mit einer verringerten Expression von TXNIP steht. Dass eine inverse Assoziation zwischen der Genexpression von TrxR und TXNIP hinsichtlich der Überlebensrate von Patienten verknüpft ist, wurde bisher anhand unterschiedlicher Literaturquellen in verschiedenen Geweben untersucht. Dies stärkt die in dieser Arbeit getätigte Hypothese, dass die erhöhte TrxR und verringerte TXNIP Genexpression in Brustkrebspatienten mit schlechter Prognose assoziiert sind. Eine Aufrechterhaltung bzw. verstärkte Aktivierung des Thioredoxinsystems scheint Tumorzellen einen Vorteil zu gewähren und einer Zellschädigung durch den gesteigerten Bedarf an ROS entgegenzuwirken. Die Beobachtung der inversen Genexpression ist mit Literaturquellen in Einklang zu bringen, die in anderen Tumorarten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen gesteigerter Aktivität und Genexpression von Trx und TrxR Expression sowie der Assoziation mit schlechter Prognose und verringertem Patientenüberleben aufzeigen. Die erhöhte Trx Expression in Darmkrebspatienten ist mit einer verringerten Überlebensrate verbunden [262], während eine verminderte Expression von Trx beim Lungenkarzinom mit besserer Prognose und erhöhter Überlebensrate verknüpft ist [263]. Die verminderte TXNIP Expression zeigt bei Patienten mit großem B-Zell Lymphom ebenfalls eine Korrelation mit schlechter Prognose [264]. Die Bedeutung des Thioredoxinsystems wird zusätzlich durch weitere in dieser Studie gefundene Assoziationen von Proteinen und Transkriptionsfaktoren wie PRDX2, RRM2, VEGF und HIF-1 α (Assoziation mit Prognose), die von Trx reguliert werden können, untermauert. Um die Assoziation der Genexpression von TrxR und TXNIP im Hinblick auf veränderte biologische Prozesse in Brustkrebspatienten besser verstehen zu können, wurden

die vorgestellten Expressionsdaten mit den bereits publizierten Expressionssignaturen, auch Metagenen genannt, verglichen [213, 265-267]. Die stärkste Korrelation zeigte sich beim Proliferationsmetagen. Während in schnell proliferierenden Tumoren TrxR hochreguliert wird, konnte gleichzeitig eine verringerte TXNIP Expression festgestellt werden [268-271]. Das Estrogen-Rezeptor Metagen zeigte eine inverse Korrelation mit TrxR. Dies bedeutet, dass Tumore mit Verlust der Estrogen-Rezeptor vermittelten Expressionssignatur, welche bekanntlich aggressiver sind, auch eine erhöhte TrxR Expression zeigen. Die Tatsache, dass die hohe TrxR Expression mit einem positiven ERBB2 Status assoziiert ist, stellt die Frage, ob eine Transformation durch das ERBB2 Onkogen das Thioredoxinsystem direkt stimuliert. Um den Einfluss von ERBB2 auf die Expression und Aktivität des Thioredoxinsystems besser verstehen zu können, wurde die MCF-7/NeuT Zelllinie verwendet, welche die induzierbare Expression einer konstitutiv aktiven Variante von ERBB2, NeuT, erlaubte.

4.2 Das Expressionsmuster von TrxR und TXNIP ist abhängig von der ERBB2 Expression in MCF-7/NeuT Zellen

Die Verwendung von induzierbaren ERBB2 Expressionssystemen in Mäusen und Zelllinien hat bislang einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des ERBB2-assoziierten Wirkungsmechanismus und damit entwickelten Therapiemöglichkeiten gegenüber Brustkrebs geliefert [186, 272]. Um einen Einfluss von ERBB2 auf die direkte Expression von TrxR und TXNIP zu untersuchen, wurde das MCF-7/NeuT Tet-On Zellsystem verwendet, welches die Expression von NeuT, einer onkogenen und konstitutiv aktiven Variante von ERBB2, erlaubt.

Die Funktionalität des Systems wurde sowohl durch Expression von NeuT auf RNA- und Proteinebene als auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen zur Detektion des koexprimierten EGFP überprüft. Gleichzeitig resultierte die NeuT Induktion in einer gesteigerten Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 und AKT [3], welche an der Signalweiterleitung von ERBB-Rezeptoren beteiligt sind. Die Induktion von NeuT beeinflusste sowohl die Expression von TXNIP als auch von TrxR auf RNA- und Proteinebene. Während TXNIP innerhalb von 24 Stunden nach Doxyzyklin Zugabe drastisch herunterreguliert wurde, zeigte die gesteigerte Expression von TrxR einen gegenläufigen Trend. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide redox-

sensitiven Proteine durch ERBB2 bzw. NeuT beeinflusst wurden und im MCF-7/NeuT Zellsystem die Situation widerspiegeln, welche in den Patientenkohorten mit schlechter Prognose assoziiert waren. Ein Zusammenhang zwischen dem Anschalten von ERBB2 und der gesteigerten Menge an TrxR konnte bereits in Kardiomyozyten etabliert und aufgezeigt werden [273]. Neuregulin 1 β , ein Ligand des ERBB2-Rezeptors, führte zur gesteigerten Expression von Trx und TrxR mRNA und Protein sowie weiterer Gene, die mit antioxidativen Schutz assoziiert sind. Dieser Befund unterstützt die These, dass der frühe Anstieg der TrxR mRNA eine direkte Antwort der ERBB2 Signalübertragung darstellt. Das hohe TrxR Level 14 Tage nach NeuT Expression könnte auf die Akkumulation von ROS zurückzuführen sein. 4-Hydroxynonenal, eines der Hauptprodukte der Lipidperoxidation, führt bekanntlich über die transkriptionale Aktivierung des NF-E2-verwandten Faktor 2 Signalweges zu einer erhöhten TrxR mRNA Expression. Gleichzeitig verfügt der TrxR Promotor über ein „*antioxidant response element*“ (ARE), welches durch Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies zur gesteigerten Expression von TrxR zu diesem späten Zeitpunkt beiträgt [274].

Für TXNIP konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen ERBB2 Induktion und verändertem Expressionsmuster festgestellt werden, welcher allerdings einer anderen Kinetik folgte als die von TrxR. Der initialen Herunterregulation des TXNIP Transkriptes (24 Stunden) folgte eine Wiederherstellung des mRNA Ausgangsniveaus nach einem Gesamtzeitraum von 14 Tagen. Die unmittelbare Herunterregulation des TXNIP Transkriptes nach ERBB2 Induktion deutet abermals auf eine direkte Verbindung zwischen beiden Faktoren hin, obwohl bisher kein direkter Einfluss des ERBB2 Signalweges auf das TXNIP Transkript in der Literatur beschrieben ist. Obwohl der molekulare Mechanismus der TXNIP Regulation unklar ist, stimmt dieses biphasische Verhalten von TXNIP, der Herunterregulation direkt nach ERBB2 Expression und Regeneration nach Eintritt des Zellzyklusarrests bzw. der Seneszenz, mit der inversen Korrelation von TXNIP zum Proliferationsmetagen in der Brustkrebspatientenstudie überein. Dies ist gleichzeitig in Einklang mit der bisher bekannten Funktion von TXNIP als Tumorsuppressor zu bringen [275].

Die initiale Aktivierung von TrxR sowie die Repression der TXNIP Transkription durch den ERBB2 Signalweg kann als ein durch ERBB2-vermitteltes Überlebensprogramm

zum Schutz und Prävention vor oxidativen Stress interpretiert werden. Des Weiteren können TXNIP und TrxR als Effektoren von ERBB2 gedeutet werden, dessen multiple zelluläre Funktionen zur Proliferation, Resistenz gegen Apoptose, metabolischer Umprogrammierung und letztendlich zum etablierten ERBB2-positiven Brustkrebstumor beitragen.

Unter Berücksichtigung der Akkumulation von ROS nach 14 Tagen in seneszenten MCF-7/NeuT Zellen und der gleichzeitigen Erholung des TXNIP mRNA Level zum gleichen Zeitpunkt, scheint dies die protektive Rolle von Trx als ROS *Scavenger* negativ zu beeinflussen. Die Erholung von TXNIP kann zur Bindung und daher zur Hemmung von reduzierten Trx führen und eine Akkumulation von ROS begünstigen. Es ist daher denkbar, dass sich Trx im inaktiven Zustand an TXNIP gebunden befindet. Interessanterweise tritt der Anstieg an reduzierten Trx bereits nach 1 bis 3 Tagen nach ERBB2 Expression auf, einem Zeitpunkt, an dem TXNIP bereits drastisch herunterreguliert ist. Die mRNA von Trx bleibt davon allerdings nahezu unberührt, nach 14 Tagen zeigt sich sogar eine tendenzielle Repression dieser. Ein genauer Mechanismus zur Regulation von ROS unter Beteiligung der Mitglieder des Thioredoxinsystems kann allerdings nicht geliefert werden.

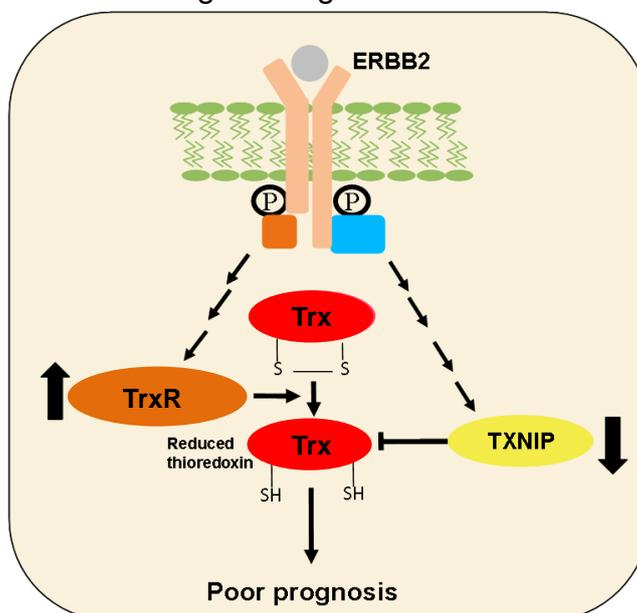


Abbildung 4.1: ERBB2-vermittelte Expression von TrxR und TXNIP und die Assoziation mit Prognose [3]

Die Hochregulation von TrxR sowie die Herunterregulation von TXNIP durch ERBB2 sind vorteilhaft für die Tumorentwicklung in Patienten und mit schlechter Prognose assoziiert; **Trx**: Thioredoxin; **TrxR**: Thioredoxin Reduktase; **TXNIP**: Thioredoxin Interacting Protein

Zusammenfassend betrachtet zeigt die ERBB2 Überexpression ein verändertes Expressionsmuster von Mitgliedern des Thioredoxinsystems auf, welche in Zusam-

menhang mit schlechter Prognose in Brustkrebspatienten stehen. Ob und zu welchem Maß reaktive Sauerstoffspezies mechanistisch dabei eine entscheidende Rolle spielen, ist zu diesem Zeitpunkt jedoch unklar.

4.3 Die Regulation von TrxR erfolgt nicht über die MEK1/2, p38/MAPK, PI3K/AKT und JNK/SAPK Signalwege

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen gesteigerter TrxR Expression und schlechter Prognose bei Brustkrebspatienten und der gefundenen Abhängigkeit der TrxR Expression von der ERBB2 Expression *in vivo* und *in vitro*, sollte versucht werden, den molekularen Mechanismus der TrxR Regulation durch ERBB2 aufzuklären. Durch die Aktivierung essentieller Signalwege (MEK1/2, p38/MAPK, PI3K/AKT, JNK/SAPK) infolge der ERBB2 Expression [43, 84, 276] im MCF-7/NeuT Zellmodell sollte der Fokus der mechanistischen TrxR Regulation auf diese gerichtet werden. Dazu wurde jeder einzelne Signalweg mit einem spezifischen Inhibitor gehemmt und die Expression von TrxR sowohl auf mRNA als auch Proteinebene untersucht. Auffallend war, dass die Inhibition jedes einzelnen Signalweges in einer zeitabhängigen, teils drastisch gesteigerten Expression der TrxR mRNA resultierte, die sich allerdings nicht immer mit der Menge an exprimierten Protein deckte und somit schwierig zu interpretieren war. Es besteht die Möglichkeit, dass die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren bereits oxidativen Stress ausgelöst hat und somit zur gesteigerten Expression von TrxR führte. Um dies zu überprüfen, müssten die getätigten Inhibitorversuche zusätzlich in Kombination mit einem ROS Scavenger, wie N-Acetylcystein, wiederholt werden oder eine mögliche Akkumulation von ROS gemessen werden.

Von besonderem Interesse war allerdings die gesteigerte TrxR Expression in Folge der Inhibition des MEK1/2 Signalweges, da viele Inhibitoren des MEK1/2 Signalweges klinischen Einsatz finden [277-280]. Dies führte zu der Frage, inwieweit ein Einsatz solcher Inhibitoren als sinnvoll zu erachten ist, da sie durch die Induktion der antioxidativen Zellantwort zu einer erhöhten Apoptose Resistenz führen können. Zur Bestätigung der Induktion von TrxR Expression infolge der Inhibition der MEK1/2 Signalübertragung wurden sowohl MEK1 und MEK2 sowie deren Substrate ERK1 und ERK2 einzeln mittels siRNA herunterreguliert. Zusätzlich erfolgte das gleichzei-

tige Herunterregulieren von MEK1/2 bzw. ERK1/2 um eine mögliche Kompensation der jeweiligen Isoform auszuschließen. Überprüft wurde daraufhin die Expression von TrxR mRNA und Protein. Die Hemmung des MEK1/2/ERK1/2 Signalweges mittels Knockdown von MEK1/2 und ERK1/2 führte zu keiner Veränderung des TrxR Levels und konnte somit die Wirkung der MEK1/2 Inhibitoren nicht bestätigen. Die in Kapitel 3.5.2 beschriebenen möglichen „*Off-Target*“ Effekte [220], welche eine mögliche Hemmung von ERK5 zur Folge haben können, der verwendeten Inhibitoren PD98059 und U0126, konnten ausgeschlossen werden. Warum die Hemmung des MEK1/2 Signalweges mittels „*small molecule*“ Inhibition bzw. siRNA Knockdown zu unterschiedlichen Ergebnissen führte, ist nicht verstanden. Zusammenfassend bleibt die mechanistische Regulation von TrxR in Folge einer ERBB2 Überexpression weiterhin unklar.

4.4 Die ERBB2-vermittelte Onkogen transformation führt zur Änderung des Redoxgleichgewichts im MCF-7/NeuT Zellsystem

Die Schädigung von Organismen durch einen veränderten Level an oxidativem Stress führt häufig zu physiologischen und pathologischen Änderungen wie z.B. Apoptose [281, 282], Zellzyklusprogression [283], Ischämie [284] oder anderen degenerativen Krankheiten [285]. Zudem werden intrazelluläre Signalwege gesteuert [286, 287], die sowohl das Überleben als auch den Tod einer Zelle steuern [288]. In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen von Spangenberg *et al.* und Trost *et al.* gezeigt, dass die Überexpression der onkogenen Variante von ERBB2, NeuT, im MCF-7/NeuT Zellsystem zur vorzeitigen Seneszenz führt [85]. Seneszente Zellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, einen erhöhten Level an ROS zu generieren, welche möglicherweise mit dem molekularen Mechanismus der Seneszenz verknüpft sind [289, 290]. Gleichzeitig ist eine gesteigerte Menge an oxidativem Stress ein typischer Marker für verschiedene Arten von Krebs [291-293]. Unter Bedingungen von oxidativem Stress werden redox-sensitive Proteine wie Trx oxidiert, was einerseits dazu führt, dass die vorgeschaltete TrxR ihr Substrat Trx abermals reduziert und dabei selbst oxidiert wird. Unter Verbrauch von NADPH und Wechselwirkung mit dem Kofaktor FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) kann das katalytisch aktive Zentrum von TrxR wieder reduziert werden. Große Mengen an ROS führen zur dauerhaften Oxidation von TrxR, die durch mRNA und Proteinprozes-

sierung kompensiert werden kann. Das dadurch stets aktive Trx interagiert mit nachgeschalteten ROS *Scavengern*, den Peroxiredoxinen. Unter Bedingungen von mildem oxidativen Stress katalysieren diese ROS in Form von z.B. Wasserstoffperoxid zu Wasser und werden dabei selbst teilweise oxidiert, allerdings direkt durch Trx wieder reduziert und aktiviert, so dass der antioxidative Schutz aufrechterhalten bleibt. Exzessive Mengen an oxidativem Stress führen dagegen zur vollständigen, mehrfachen Oxidation des katalytisch aktiven Zentrums der Peroxiredoxine, so dass diese aufgrund der veränderten Molekülstruktur kein Substrat mehr von Trx sind und hyperoxidiert vorliegen. Dadurch bleibt der reduzierte Status von Trx erhalten, so dass dieses zur Reparatur von oxidativ geschädigten Proteinen im Rahmen der antioxidativen Zellantwort verwendet werden kann [153].

Der Level an ROS wurde zeitabhängig nach Induktion der ERBB2 Expression im MCF-7/NeuT Modell gemessen. Dabei konnte ein kontinuierlicher, zeitabhängiger Anstieg der ROS Konzentration detektiert werden, der sein Maximum in der späten Phase der Seneszenz erreichte. Gleichzeitig wurden Mitglieder des Thioredoxinsystems hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht, da diese für die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts innerhalb der Zelle essentiell sind und diese vor oxidativen Schädigungen schützen [294-296]. Während die mRNA- und Proteinexpression von TrxR erhöht war, blieb diese von Trx nahezu konstant. Überraschenderweise konnte für Trx allerdings trotz Bedingungen von gesteigertem oxidativen Stress ein erhöhter Level an reduzierten und somit katalytisch aktivem Trx aufgezeigt werden. Dieser Effekt zeigte sich bereits mit Einleiten der Seneszenz (Tag 1-3) und dem Anstieg des ROS Levels. Demnach wäre zum einen aufgrund der gesteigerten Expression von TrxR als auch dem Anstieg von reduzierten Trx eine erhöhte katalytische Aktivität von TrxR zu erwarten gewesen. Diese zeigte sich allerdings unverändert. Stattdessen konnte eine Hyperoxidation der Peroxiredoxine nachgewiesen werden. Diese zeigte einen ähnlichen zeitabhängigen Verlauf wie der beobachtete Anstieg von ROS und erreichte das Maximum in der späten Phase der Seneszenz (Tag 7-14). Die Steigerung von oxidativem Stress kann grundsätzlich eine Folge der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) darstellen, die durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden [297]. In dem von uns verwendeten Zellmodell handelt es sich um eine konstitutiv aktivierte RTK, welche durch das Tet-On Zellmodell gesteuert wird. Trost *et al.* konnten für dieses Zellsystem nachweisen, dass eine gesteigerte

Expression des Proteins p21 vorliegt [84]. Unabhängig von diesem Befund zeigen Untersuchungen von Marcip *et al.*, dass die gesteigerte Expression von p21 mit einem Anstieg an oxidativen Stress einhergeht [298] und somit einen Beitrag zum erhöhten ROS Spiegel leistet. Zudem ist bekannt, dass ein gesteigerter Level an ROS die Oxidation von redox-sensitiven Proteinen begünstigt, dazu zählen sowohl das Selenoprotein TrxR als auch das über Cysteinreste [299] katalytisch aktive Trx [157].

Wie kann daher unter diesen Umständen die gesteigerte Menge an reduziertem Trx mit Beginn der Seneszenz erklärt werden? Das Zusammenspiel zweier Prozesse kann diesen Befund möglicherweise erklären. Einerseits führt die gesteigerte Expression von TrxR dazu, dass das Gleichgewicht auf Seiten von reduziertem Trx gehalten werden kann. Andererseits führt die Entkopplung von Trx und seinem Substrat, den Peroxiredoxinen, dazu, dass diese nicht mehr reduziert werden und Trx nicht weiter oxidiert wird. Beide Mechanismen resultieren letztendlich in der gesteigerten Menge an reduziertem Trx. Grafisch lässt sich dies durch Abbildung 4.2 zusammenfassen.

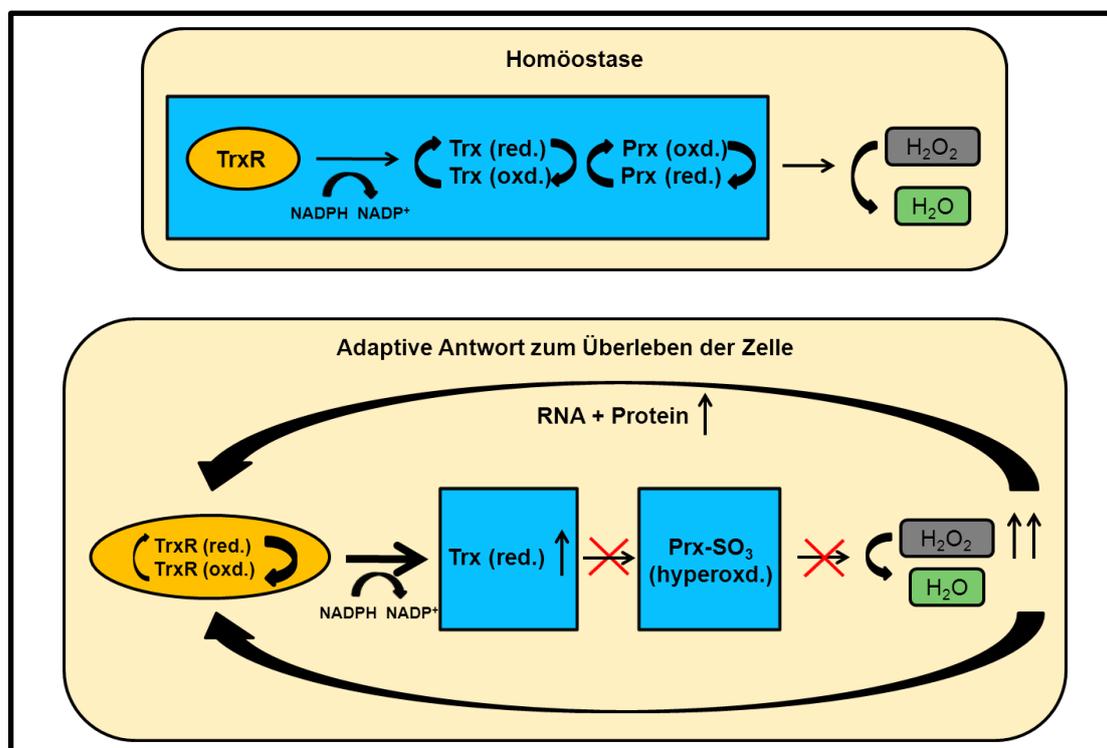


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des antioxidativ wirkenden Schutzmechanismus in der Homöostase und unter Bedingungen von oxidativen Stress in MCF-7/NeuT Zellen

Trx: Thioredoxin; TrxR: Thioredoxin Reduktase; TXNIP: Thioredoxin Interacting Protein; Prx: Peroxiredoxin; red: reduziert; oxd.: oxidiert; H₂O₂: Wasserstoffperoxid

Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein vornehmend reduzierendes Milieu innerhalb der Zelle vor. Reaktive Sauerstoffspezies sind für das Überleben der Zelle essentiell, da sie entscheidend an der Signalübertragung beteiligt sind, insofern keine toxische Konzentration erreicht wird. Das Thioredoxinsystem fungiert als antioxidativ wirkendes Schutzsystem, indem es Peroxiredoxine, die ROS in Form von Wasserstoffperoxid zu Wasser detoxifizieren und dabei selbst oxidiert werden, reduzieren. Thioredoxin wird bei diesem Vorgang oxidiert, kann aber unter Verbrauch von NADPH von der TrxR abermals in den aktiven, reduzierten Zustand überführt werden. Solange sich die Zelle in der Homöostase befindet und eine bestimmte Konzentration an ROS nicht überschritten wird, handelt es sich bei dem beschriebenen antioxidativ wirkenden System um einen zusammenhängenden, ineinandergreifenden Mechanismus zum Schutz der Zelle. Sobald die Konzentration an ROS ansteigt und einen toxischen Schwellenwert überschreitet, resultiert dies in einer Unterbrechung des Systems. Zunächst führt dies zur einfachen Oxidation der Peroxiredoxine. Steigt die Konzentration an ROS weiterhin an, erfolgt die mehrfache Oxidation der Peroxiredoxine, bis diese hyperoxidiert vorliegen und nicht mehr in den reduzierten Zustand überführt werden können, da sie aufgrund der veränderten Molekülstruktur kein Substrat von Thioredoxin mehr darstellen. Dies führt neben den äußeren Stimuli zur weiteren Akkumulation von ROS, da eine Detoxifizierung durch Peroxiredoxine unterbrochen ist. Gleichzeitig kommt es zur irreversiblen Oxidation der TrxR, so dass Thioredoxin ebenfalls nicht mehr durch TrxR reduziert werden kann. Interessanterweise haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass Trx dennoch im reduzierten Zustand unter Bedingungen von oxidativen Stress vorliegt. Dies kann, zusammen mit einigen Hinweisen aus der Literatur, dadurch erklärt werden, dass eine irreversible Oxidation von TrxR durch eine gesteigerte RNA und Proteinexpression kompensiert wird. Gesteigerte RNA und Proteinmengen in dem von uns verwendeten MCF-7/NeuT System bestätigen diese Hypothese. Demnach scheint es von besonderer Bedeutung zu sein, dass gerade Trx als Antioxidant im reduzierten Zustand gehalten wird, um oxidativ geschädigte Proteine zu reparieren. Diese Vermutung ist mit Untersuchungen von Day *et al.* (2012) in Einklang zu bringen. Dies hätte zur Folge, dass sich sowohl TrxR als auch die Peroxiredoxine „opfern“, um den reduzierten Zustand von Trx aufrecht zu halten. Gleichzeitig finden sich Hinweise in der Literatur, dass hyperoxidierten Peroxiredoxinen eine Chaperon-Aktivität zuge-

sprochen wird [300, 301]. Dies könnte zur Bindung beschädigter und oxidiertes Proteine führen und letztendlich zur Degradation dieser führen.

Die gesteigerte Expression von TrxR führt zu einem erhöhten Level an reduzierten Trx. Allerdings bleibt unklar, welchem Mechanismus die gesteigerte Synthese von TrxR zu Grunde liegt. Es finden sich Hinweise in der Literatur, die eine mögliche mechanistische Erklärung für die gesteigerte TrxR Expression liefern [302]. TrxR wird als typisches „*Housekeeping gene*“ bezeichnet, dessen mRNA post-translational durch sogenannte „AUUUA-Motive (AU-reiche Elemente oder ARE)“ modifiziert werden kann [303-306]. Gleichzeitig verfügt der TrxR Promoter über ein POU Motiv, welches von den Transkriptionsfaktoren OCT-1, SP1 und SP3 gebunden werden kann. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren führt einerseits zur Stabilisierung der mRNA und erlaubt andererseits eine schnelle Prozessierung des entsprechenden Proteins, um rasch auf extrazelluläre Signale wie z.B. Stress (auch oxidativ) reagieren zu können [303, 305]. Dabei sollte nach Möglichkeit ein Gleichgewicht zwischen intrazellulärer ROS Signalübertragung für physiologische Zellprozesse und dem gleichzeitigen Schutz vor exzessiven Mengen an ROS gehalten werden. Im Fall von TrxR führt die Interaktion von SP1 und OCT-1 zur Aktivierung des TrxR Promoters [307, 308]. Beide Transkriptionsfaktoren sind als redox-sensitiv beschrieben und verlieren durch Oxidation ihre DNA-bindende Fähigkeit, welches in einer gesteigerten Expression dieser resultiert [309-311]. Neben der Aufrechterhaltung des aktiven TrxR Promotors durch die beschriebenen Transkriptionsfaktoren, erfolgt eine rasche Stabilisierung der transkribierten mRNA durch die ARE, welche eine schnelle Proteinprozessierung gewährleistet [306]. Die Akkumulation von ROS führt nicht allein zu einer gesteigerten Expression von TrxR mRNA und Protein, sondern aktiviert weitere zelluläre Signalwege. Dazu gehört ebenfalls die unmittelbare Aktivierung der regulatorischen, stressabhängigen p38/MAPK [285]. Die Aktivierung des p38/MAPK Signalweges nach ERBB2 Induktion konnte bereits durch Trost *et al.* aufgezeigt werden. Die Induktion des p38/MAPK Signalweges resultierte in der Hochregulation des Proteins MK2 („*Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*“, MAPKAPK2) [312]. Dieses induziert selbst die Stabilisierung von ARE-haltigen mRNAs und verliert gleichzeitig die eigene Stabilität, wodurch weitere ROS generiert werden [313-315] und TrxR inaktivieren [316], welches eine gesteigerte mRNA Expression zur Folge hat. In der Literatur finden sich weitere Beispiele, welche diese

Art von Regulation von TrxR beschreiben. Die schnelle (Stunden) Generierung von TrxR mRNA und Prozessierung von Protein konnte nach Exposition von exogenen Stimuli wie z.B. Wasserstoffperoxid und 1-chloro-2,4dinitrobenzen [316] oder Phorbol-12-myristat-13-acetat [317] detektiert werden. 1-chloro-2,4dinitrobenzen stellt ein alkylierendes Reagenz dar und inhibiert TrxR und Glutathion irreversibel, so dass ROS nicht ausreichend detoxifiziert werden können [318]. Phorbol-12-myristat-13-acetat aktiviert Proteinkinase C und ist als Tumorpromoter bekannt. Außerdem wird durch Phorbol-12-myristat-13-acetat das Enzym Stickstoffmonooxid Synthase aktiviert, welches Stickstoffmonooxid generiert und dadurch oxidativen Stress induziert [319]. In Knochenmark-abgeleiteten Stromazellen (KM102) führte die Behandlung von Phorbol-12-myristat-13-acetat in Kombination mit Interleukin 1 β zu einer signifikant erhöhten TrxR mRNA Expression innerhalb von 4 Stunden [317, 320]. Auch in peripheren Blutmonozyten und myeloiden Leukämiezellen [321] sowie Osteoblasten [322] führte eine Vitamin-D3 Behandlung zur raschen, allerdings transienten Expression von TrxR mRNA. Es gilt allerdings zu beachten, dass TrxR nicht nur unter speziellen Wachstumsbedingungen oder exogenen Stimuli prozessiert wird, sondern transient in vielen Geweben [305, 323-326] und Zelltypen [327] exprimiert wird. Die beschriebene TrxR Prozessierung auf RNA Ebene infolge der ROS Akkumulation würde gleichzeitig eine Erklärung für die nach ERBB2 Induktion unveränderte Aktivität von TrxR liefern, die trotz induzierter Expression von TrxR sowohl in der prä-Seneszenz als auch in der späten Phase der Seneszenz keinen Anstieg zeigt. Gleichzeitig könnte dieser Regulationsmechanismus die in Kapitel 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4 und 3.5.5 beschriebene TrxR Expression unter Verwendung der unterschiedlichen Inhibitoren zur Blockade der MEK1/2, p38/MAPK, PI3K/AKT und JNK/SAPK Signalwege erklären.

4.5 Trx spielt keine entscheidende Rolle bei der ERBB2-induzierten Steigerung zellulärer Degradationsprozesse

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Trx unter Bedingungen von oxidativen Stress nicht nur die Reparatur oxidierter und geschädigter Proteine übernimmt [153, 328], sondern auch zelluläre Degradationsprozesse wie Autophagie und den proteasomalen Abbau von Proteinen regulieren kann. Atg4 ist ein redox-sensitives Protein welches durch ROS inaktiviert wird, so dass Autophagie induziert wird [162].

Obwohl Atg4 kein bekanntes Substrat von Trx ist, könnte seine Redox-Regulation abhängig von antioxidativen Proteinen wie Trx essentiell sein. Ein weiteres Beispiel stellt die Regulation des 20S Komplexes des Proteasoms dar, welches ebenfalls im Verdacht steht, durch Trx reguliert zu werden. Dabei konnte *in vitro* beobachtet werden, dass eine Oxidation katalytisch aktiver Cysteine zur Aktivitätsminderung der Chymotrypsin-Aktivität des 20S Proteasoms führte. Die Zugabe von aktiven Trx konnte die Aktivität allerdings wieder auf das ursprüngliche Niveau anheben [184]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zur Akkumulation von geschädigtem zellulärem Material führt und Degradationsprozesse aktiviert werden, da eine Reparatur oxidiertes und damit zytotoxischer Proteine allein nicht mehr ausreicht [158, 329-332].

Unsere Untersuchungen konnten in MCF-7/NeuT Zellen zunächst zeigen, dass die Inhibition von TrxR durch ATO in eine zeitabhängige Oxidation von Trx bei gleichzeitigem Anstieg des Autophagiemarkers LC3-II resultierte. Dies ist in Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Induktion von Autophagie durch oxidativen Stress zu bringen. Allerdings führten Knockdown Versuche von sowohl TrxR als auch Trx nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Der Anstieg des Autophagiemarkers bei Zugabe von ATO konnte aller Wahrscheinlichkeit nach durch „Off-Target“ Effekte von ATO [246, 247] erklärt werden und nicht auf die gezielte Regulation durch Trx, da ein Knockout von Trx bzw. TrxR nicht zu einer signifikanten Änderung des LC3-I und LC3-II Levels führten. Darüber hinaus ließ sich auch die postulierte Aktivierung der Autophagie über den PI3K/AKT bzw. p38/MAPK Signalweg durch Interaktion von Trx mit PTEN bzw. ASK1 nicht bestätigen. Eine Veränderung der Signalwege durch das Ausschalten von Trx konnte auch nicht gezeigt werden. Untersuchungen im MCF-7/NeuT Modell zeigten beim Knockout von Trx unter Bedingungen von oxidativen Stress nur einen minimalen Effekt auf die gesteigerte Expression von LC3-I und LC3-II, so dass lediglich eine Tendenz hinsichtlich der Beteiligung von Trx an der Regulation der Autophagie in der onkogen-vermittelten Seneszenz zu erkennen ist.

Untersuchungen zur proteasomalen Aktivität in MCF-7/NeuT Zellen zeigten unmittelbar nach NeuT Induktion (Tag 1) signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollbedingung. Die gesteigerte Chymotrypsin Aktivität tritt zeitgleich mit dem Beginn der ROS Akkumulation sowie dem Vorhandensein von mehr reduzierten Trx auf und

könnte einen Hinweis auf eine Redox Regulation geben. Allerdings zeigten Messungen der proteasomalen Aktivität in Zellen, in denen Trx mittels siRNA herunterreguliert wurde, keine reproduzierbaren Ergebnisse und können daher nicht zur Interpretation herangezogen werden.

Zusammenfassend konnte keine eindeutige direkte Beteiligung von Trx an der Aktivierung zellulärer Degradationsprozesse gezeigt werden, obwohl diese in der Literatur als redox-sensitiv beschrieben werden. Dies lässt sich womöglich durch Kompensationsmechanismen erklären, die in der Lage sind, den Ausfall des Thioredoxinsystems zu kompensieren, möglicherweise durch das Einspringen weiterer antioxidativ wirkender Systeme, wie z.B. das Glutathionsystem. In der Literatur finden sich diesbezüglich mehrere Hinweise, die diese Vermutung unterstützen. So konnte anhand von Untersuchungen in HeLa Zellen gezeigt werden, dass eine Inhibition der TrxR durch klinisch eingesetzte Inhibitoren wie Aurothioglukose (ATG) zur Behandlung von rheumatischer Arthritis [333] und Monomethylarsensäure (MMA(III)) [334] zwar zur Inhibierung der TrxR Aktivität führten, dies allerdings nicht zu einer Oxidation von Trx führte. Gleiches galt für Experimente, in denen TrxR mittels siRNA herunterreguliert wurde. Die bisherige Annahme, dass nur TrxR in der Lage ist Trx zu reduzieren, wurde daher grundlegend in Frage gestellt. Aus diesem Grund wurde kontrovers über Kompensationsmechanismen diskutiert, die in der Lage sind, für inaktives TrxR einzuspringen und Trx im katalytisch aktiven Zustand zu halten. Diese Vermutung konnte ebenfalls mit Hilfe von HeLa Zellen bestätigt werden. Holmgren *et al.* (2012) haben gezeigt, dass Mitglieder des Glutathionsystems, einem weiteren antioxidativ wirkenden Schutzmechanismus, in der Lage sind, Trx zu reduzieren, falls TrxR inhibiert ist. Das Glutathionsystem setzt sich aus den Mitgliedern Glutathion (GSH), Glutathion-Reduktase (GSR), Glutaredoxin (GRX) sowie dem Kofaktor NADPH zusammen und ist wie das Thioredoxinsystem sowohl in Mitochondrien (GSH2, GSR2, GRX2) als auch im Zytosol (GSH1, GSR1, GRX1) lokalisiert [328, 335]. Obwohl das Thioredoxin- und das Glutathionsystem prinzipiell auf unterschiedliche Weise für die Aufrechterhaltung des Redox Status in der Zelle zuständig sind, konnten einige Überlappungen hinsichtlich ihrer Funktion detektiert werden, so dass eine Störung eines der Systeme durch das andere kompensiert werden kann. In Glutathionreduktase defizienten Zellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass oxidiertes Glutathion, welches als Disulfid vorliegt, durch Trx re-

duziert werden kann und dadurch zur Regeneration von reduzierten Glutathion beiträgt [336]. Ein besonderes Augenmerk hinsichtlich der reduktiven Kompensation ist dabei auf Grx2 gerichtet. In verschiedenen Krebszelllinien konnte Grx2 nicht nur in Mitochondrien, sondern auch im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert werden und zeigte dabei Einfluss hinsichtlich der Reduktion von Trx [337, 338]. Unter Bedingungen von oxidativen Stress, welcher oftmals in Tumoren vorherrscht, zeigte sich Grx2 im Gegensatz zu Trx unempfindlich gegenüber Oxidation und wirkte außerdem als Backup für TrxR, um Trx zu reduzieren [339].

Weitere Untersuchungen in Hefe untermauern die Hypothese, dass eines der beiden Systems für das jeweilige andere einspringen kann. Für die Zellvitalität ist allerdings unabdingbar, dass mindestens eines der antioxidativen Systeme funktionsfähig vorliegt. Untersuchungen mit Hefe-Doppelmutanten haben gezeigt, dass das gleichzeitige Ausschalten von sowohl Trx1/Trx2 als auch Grx1/Grx2 zum Tod der Zelle führt [340, 341], während das Ausschalten von einzelnen Mitgliedern von einem der Systeme mit dem Überleben der Zellen assoziiert war [342].

Vor diesem Hintergrund ist erklärbar, warum Krebszellen in den verschiedensten Tumorarten trotz Bedingungen von oxidativen Stress einen Überlebensvorteil aufweisen. Durch die Fähigkeit ein inaktiviertes antioxidatives System infolge von Oxidation durch ein weiteres zu ersetzen, zeigen sich Krebszellen als äußerst flexibel und resistent trotz widriger Umgebungsbedingungen. Gleichzeitig kann in dem von uns verwendeten MCF-7/NeuT Zellmodell erklärt werden, warum trotz hohen ROS Konzentrationen der Level an reduziertem Trx konstant hoch bleibt.

5 Zusammenfassung

Für die Tumorentstehung- und entwicklung spielen Kontrollmechanismen zur Regulation von oxidativen Stress eine entscheidende Rolle. Transformierte Zellen generieren mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und tragen damit nicht nur zur genomischen Instabilität bei, sondern nutzen hohe ROS Konzentrationen auch zur Steigerung der eigenen Proliferationsrate.

Ziel der Arbeit sollte es sein, antioxidative Systeme in Krebszellen besser zu verstehen. Dazu wurde In einem ersten Schritt der Arbeit zunächst ein mittels Affymetrix Gene Array generierter Datensatz von Patienten mit nodal-negativem Mammakarzinom untersucht. Die Gesamtzahl von n=788 Patienten setzte sich aus den drei Kohorten Mainz, Rotterdam und Transbig zusammen. Ziel der Studie war es, solche Gene zu identifizieren, die in Abhängigkeit des HER2-Rezeptors, welcher als klinisch relevanter prognostischer Marker gilt und in 25-30% aller Brustkrebspatienten überexprimiert wird, ein verändertes Expressionsmuster aufzeigen und prognostischen Einfluss im Mammakarzinom besitzen. Zusätzlich sollten solche Gene untersucht werden, die den Redox Status der Zelle kontrollieren. Im zweiten Schritt sollte die Relevanz der identifizierten Gene unter Verwendung der HER2-Rezeptor überexprimierenden MCF-7/NeuT Brustkrebszelllinie untersucht werden.

Die Analyse des Datensatzes von Patienten mit nodal-negativem Mammakarzinom hat aufgezeigt, dass allein drei Mitglieder des Thioredoxinsystems, Thioredoxin Reduktase (TrxR), Thioredoxin (Trx) und Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP), Schlüsselenzyme zur Kontrolle von oxidativen Stress, ein verändertes Expressionsmuster aufweisen und zudem mit Prognose assoziiert sind. In den drei einzelnen sowie in der Gesamtkohorte war TrxR mit schlechter Prognose assoziiert. Im Gegensatz dazu war TXNIP in der Gesamtkohorte mit verbesserter Prognose assoziiert, ähnliche Ergebnisse zeigten auch die einzelnen Kohorten Mainz, Rotterdam und Transbig. HER2-Rezeptor positive Patienten zeigten sowohl in den einzelnen als auch in der Gesamtkohorte eine deutlich gesteigerte Genexpression von TrxR auf. Der HER2-Rezeptor wurde als ein Faktor identifiziert, der das Redox-Gleichgewicht unvorteilhaft beeinflusst. Die induzierbare Expression des HER2-Rezeptors zeigte in MCF-7/NeuT Zellen nicht nur eine stark gesteigerte Expression von TrxR, sondern

auch eine unmittelbar verminderte Expression von TXNIP. Der Eintritt der Zellen in die vorzeitige Seneszenz und die nachfolgende Hochregulation von TXNIP war außerdem durch eine Akkumulation von ROS begleitet. Untersuchungen des Redox Gleichgewichts in MCF-7/NeuT Zellen durch entsprechende Immunoblot-Verfahren zeigten neben hohen ROS Konzentrationen auch eine gesteigerte Aktivität von Trx und die Entkopplung von seinem Substrat, dem Peroxiredoxinsystem, auf, um die Zelle vor weiteren Schädigungen zu schützen. Dies repräsentiert ein bemerkenswertes Ergebnis und stellt einen Mechanismus der Adaption hinsichtlich eines gesteigerten Levels an oxidativem Stress dar. Eine gesteigerte Aktivität antioxidativ wirkender Mechanismen und die Akkumulation von ROS sind signifikante Charakteristika für Tumore und bieten einen Überlebensvorteil.

Ein direkter Einfluss des HER2-Rezeptors auf die Expression des Thioredoxinsystems wurde bislang nicht beschrieben. Darum wurde versucht, den zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen. Inhibition der RAS/MEK/ERK, p38/MAPK, PI3K/AKT und SAPK/JNK Signalwege mittels „*small molecule*“ Inhibitoren und Knockdown Versuche sollten Aufschluss über die Regulation der gesteigerten TrxR Expression geben. Diese Untersuchungen führten allerdings zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Die Relevanz der gesteigerten Menge an reduzierten Trx und einen möglichen Zusammenhang mit Autophagie wurde durch „*small molecule*“ Inhibitoren und Knockdown Versuchen untersucht. Hinweise zur Regulation redox-sensitiver Proteine in der Autophagie durch Trx sind bereits in der Literatur beschrieben. Um Veränderungen in der Autophagie zu verifizieren, wurde das Markerprotein für Autophagie, LC3-II, mittels Immunoblot untersucht. Eine Beteiligung von Trx an die durch HER2-induzierte oder basale Autophagie konnte nicht eindeutig aufgezeigt werden. Allerdings konnte eine Abnahme der Zellvitalität in Trx defizienten Zellen detektiert werden und unterstreicht die enorme Bedeutung antioxidativ wirkender Mechanismen zur Regulation von oxidativen Stress in Tumorzellen.

Schlussendlich zeigten die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit, dass dem Thioredoxinsystem auch im Mammakarzinom eine bedeutende Rolle zukommt und daher einen möglichen Angriffspunkt für neuartige Therapeutika zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten für Brustkrebspatienten liefert.

6 Literatur

1. Kabbarah, O. and L. Chin, *Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man*. Front Biosci, 2006. 11: p. 928-42.
2. Berndt, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, *Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(3): p. H1227-36.
3. Cadenas, C., et al., *Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. 12(3): p. R44.
4. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(2): p. 127-37.
5. Reddy, J.P. and Y. Li, *Oncogene-induced senescence and its role in tumor suppression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011. 16(3): p. 247-56.
6. Levi, F., et al., *The fall in breast cancer mortality in Europe*. Eur J Cancer, 2001. 37(11): p. 1409-12.
7. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, *Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005?* J Cell Mol Med, 2005. 9(1): p. 208-21.
8. Vogel, V.G., et al., *Re: tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(19): p. 1504.
9. Boccardo, F., et al., *Chemotherapy versus tamoxifen versus chemotherapy plus tamoxifen in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer patients: results of a multicentric Italian study*. Breast Cancer Adjuvant Chemo-Hormone Therapy Cooperative Group. J Clin Oncol, 1990. 8(8): p. 1310-20.
10. Bezwoda, W.R., et al., *Treatment of metastatic breast cancer in estrogen receptor positive patients. A randomized trial comparing tamoxifen alone versus tamoxifen plus CMF*. Cancer, 1982. 50(12): p. 2747-50.
11. Hung, M.C. and Y.K. Lau, *Basic science of HER-2/neu: a review*. Semin Oncol, 1999. 26(4 Suppl 12): p. 51-9.
12. Baselga, J., et al., *Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. Semin Oncol, 1999. 26(4 Suppl 12): p. 78-83.

13. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. 20(3): p. 719-26.
14. Nahta, R. and F.J. Esteva, *Trastuzumab: triumphs and tribulations*. Oncogene, 2007. 26(25): p. 3637-43.
15. Gago, F.E., M.A. Fanelli, and D.R. Ciocca, *Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006. 98(1): p. 36-40.
16. Witters, L.M., et al., *Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody*. Breast Cancer Res Treat, 1997. 42(1): p. 1-5.
17. Kunisue, H., et al., *Anti-HER2 antibody enhances the growth inhibitory effect of anti-oestrogen on breast cancer cells expressing both oestrogen receptors and HER2*. Br J Cancer, 2000. 82(1): p. 46-51.
18. Pietras, R.J., *Interactions between estrogen and growth factor receptors in human breast cancers and the tumor-associated vasculature*. Breast J, 2003. 9(5): p. 361-73.
19. Morris, C. and A. Wakeling, *Fulvestrant ('Faslodex')--a new treatment option for patients progressing on prior endocrine therapy*. Endocr Relat Cancer, 2002. 9(4): p. 267-76.
20. Gutierrez, M.C., et al., *Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase*. J Clin Oncol, 2005. 23(11): p. 2469-76.
21. Le, X.F., et al., *Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling*. J Biol Chem, 2005. 280(3): p. 2092-104.
22. Yu, J., et al., *PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells*. Mol Cell, 2001. 7(3): p. 673-82.
23. Fabian, C.J., *The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer*. Int J Clin Pract, 2007. 61(12): p. 2051-63.

24. Goss, P.E., *Breast cancer prevention--clinical trials strategies involving aromatase inhibitors*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. 86(3-5): p. 487-93.
25. Goss, P.E. and K. Strasser-Weippl, *Prevention strategies with aromatase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2004. 10(1 Pt 2): p. 372S-9S.
26. Bray, D. and S. Lay, *Computer simulated evolution of a network of cell-signaling molecules*. Biophys J, 1994. 66(4): p. 972-7.
27. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. 19(3): p. 183-232.
28. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. 103(2): p. 211-25.
29. Simon, M.A., *Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals*. Cell, 2000. 103(1): p. 13-5.
30. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. 244(4905): p. 707-12.
31. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
32. Downward, J., et al., *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*. Nature, 1984. 307(5951): p. 521-7.
33. Alimandi, M., et al., *Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas*. Oncogene, 1995. 10(9): p. 1813-21.
34. Gorgoulis, V., et al., *Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas*. Anticancer Res, 1992. 12(4): p. 1183-7.
35. Irish, J.C. and A. Bernstein, *Oncogenes in head and neck cancer*. Laryngoscope, 1993. 103(1 Pt 1): p. 42-52.
36. Moscatello, D.K., et al., *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*. Cancer Res, 1995. 55(23): p. 5536-9.
37. Ross, J.S. and J.A. Fletcher, *The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy*. Oncologist, 1998. 3(4): p. 237-252.

38. Troyer, K.L. and D.C. Lee, *Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. 6(1): p. 7-21.
39. Shih, C., et al., *Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts*. Nature, 1981. 290(5803): p. 261-4.
40. Bargmann, C.I., M.C. Hung, and R.A. Weinberg, *The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein*. Nature, 1986. 319(6050): p. 226-30.
41. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. EMBO J, 2000. 19(13): p. 3159-67.
42. Harari, D. and Y. Yarden, *Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer*. Oncogene, 2000. 19(53): p. 6102-14.
43. Zhou, B.P., et al., *HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway*. J Biol Chem, 2000. 275(11): p. 8027-31.
44. Busse, D., R.S. Doughty, and C.L. Arteaga, *HER-2/neu (erbB-2) and the cell cycle*. Semin Oncol, 2000. 27(6 Suppl 11): p. 3-8; discussion 92-100.
45. Reese, D.M. and D.J. Slamon, *HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer*. Stem Cells, 1997. 15(1): p. 1-8.
46. Citri, A., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3*. Exp Cell Res, 2003. 284(1): p. 54-65.
47. Macaluso, M., et al., *Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer*. J Cell Physiol, 2002. 192(2): p. 125-30.
48. Tzivion, G., Z. Luo, and J. Avruch, *A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity*. Nature, 1998. 394(6688): p. 88-92.
49. Crews, C.M., A. Alessandrini, and R.L. Erikson, *The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product*. Science, 1992. 258(5081): p. 478-80.
50. Kosako, H., et al., *Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation*. EMBO J, 1992. 11(8): p. 2903-8.
51. Khokhlatchev, A.V., et al., *Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation*. Cell, 1998. 93(4): p. 605-15.

52. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, *Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies*. *Endocr Relat Cancer*, 2001. 8(3): p. 161-73.
53. Zwick, E., C. Wallasch, and A. Ullrich, *HER2/neu: a target for breast cancer therapy*. *Breast Dis*, 2000. 11: p. 7-18.
54. Shelton, J.G., et al., *Effects of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells*. *Oncogene*, 2003. 22(16): p. 2478-92.
55. Pianetti, S., et al., *Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I kappa B-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN*. *Oncogene*, 2001. 20(11): p. 1287-99.
56. Fedi, P., et al., *Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members*. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(1): p. 492-500.
57. Prigent, S.A. and W.J. Gullick, *Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera*. *EMBO J*, 1994. 13(12): p. 2831-41.
58. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. *Exp Cell Res*, 1961. 25: p. 585-621.
59. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(9): p. 729-40.
60. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. *Cell*, 1997. 88(5): p. 593-602.
61. Wei, S., S. Wei, and J.M. Sedivy, *Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts*. *Cancer Res*, 1999. 59(7): p. 1539-43.
62. Gorgoulis, V.G. and T.D. Halazonetis, *Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. 22(6): p. 816-27.

63. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(20): p. 9363-7.
64. Wright, W.E. and J.W. Shay, *Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting*. Curr Opin Genet Dev, 2001. 11(1): p. 98-103.
65. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, *Telomeres, stem cells, senescence, and cancer*. J Clin Invest, 2004. 113(2): p. 160-8.
66. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. 120(4): p. 513-22.
67. Sager, R., *Senescence as a mode of tumor suppression*. Environ Health Perspect, 1991. 93: p. 59-62.
68. Collado, M. and M. Serrano, *Senescence in tumours: evidence from mice and humans*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(1): p. 51-7.
69. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. Genes Dev, 2010. 24(22): p. 2463-79.
70. Lin, A.W., et al., *Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling*. Genes Dev, 1998. 12(19): p. 3008-19.
71. Zhu, J., et al., *Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf*. Genes Dev, 1998. 12(19): p. 2997-3007.
72. Sarkisian, C.J., et al., *Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis*. Nat Cell Biol, 2007. 9(5): p. 493-505.
73. Braig, M., et al., *Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development*. Nature, 2005. 436(7051): p. 660-5.
74. Collado, M., et al., *Tumour biology: senescence in premalignant tumours*. Nature, 2005. 436(7051): p. 642.
75. Morton, J.P., et al., *Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(1): p. 246-51.
76. Goel, V.K., et al., *Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice*. Oncogene, 2009. 28(23): p. 2289-98.
77. Young, A.P., et al., *VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400*. Nat Cell Biol, 2008. 10(3): p. 361-9.

78. Bartkova, J., et al., *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. *Nature*, 2006. 444(7119): p. 633-7.
79. Wang, X., et al., *Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells*. *Cancer Res*, 1998. 58(22): p. 5019-22.
80. te Poele, R.H., et al., *DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 2002. 62(6): p. 1876-83.
81. Chang, B.D., et al., *Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs*. *Oncogene*, 1999. 18(34): p. 4808-18.
82. Coppe, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. *PLoS Biol*, 2008. 6(12): p. 2853-68.
83. Roberson, R.S., et al., *Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers*. *Cancer Res*, 2005. 65(7): p. 2795-803.
84. Trost, T.M., et al., *Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2005. 65(3): p. 840-9.
85. Spangenberg, C., et al., *ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the alpha5beta1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions*. *Cancer Res*, 2006. 66(7): p. 3715-25.
86. Trost, T.M., *Konditionale Modellsysteme zur Untersuchung der ErbB2-induzierten Tumorgenese*. Fachbereich Biologie, Universität Mainz, Diss., 2005.
87. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. *Eur J Biochem*, 1993. 215(2): p. 213-9.
88. Schweizer, U., et al., *Selenium and brain function: a poorly recognized liaison*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. 45(3): p. 164-78.
89. Varsik, P., et al., *Familial occurrence of myoclonic epilepsy syndrome and acute intermittent porphyria*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2005. 26(1): p. 7-12.
90. Varsik, P., et al., *The quest of cavum septi pellucidi: obscure chance event discovery or the result of some encoded disturbance? Developmental cerebral*

- dysplasias, cavum septi pellucidi and epilepsy: clinical, MRI and electrophysiological study.* Neuro Endocrinol Lett, 2005. 26(3): p. 219-24.
91. Kollar, B., et al., *Solitary epileptic seizure--the risk of recurrence.* Neuro Endocrinol Lett, 2006. 27(1-2): p. 16-20.
 92. Alexander, R.W., *Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective.* Hypertension, 1995. 25(2): p. 155-61.
 93. Araujo, V., et al., *Oxidant-antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis.* Biofactors, 1998. 8(1-2): p. 155-9.
 94. Baynes, J.W., *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.* Diabetes, 1991. 40(4): p. 405-12.
 95. Ogrunc, M., et al., *Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation.* Cell Death Differ, 2014.
 96. Kobayashi, Y., X. Qi, and G. Chen, *MK2 Regulates Ras Oncogenesis through Stimulating ROS Production.* Genes Cancer, 2012. 3(7-8): p. 521-30.
 97. Humphries, K.M. and L.I. Szveda, *Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal.* Biochemistry, 1998. 37(45): p. 15835-41.
 98. Sies, H. and C.F. Menck, *Singlet oxygen induced DNA damage.* Mutat Res, 1992. 275(3-6): p. 367-75.
 99. Sies, H., *Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection.* Mutat Res, 1993. 299(3-4): p. 183-91.
 100. Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species.* Int Microbiol, 2000. 3(1): p. 3-8.
 101. Kumar, B., et al., *Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype.* Cancer Res, 2008. 68(6): p. 1777-85.
 102. Ishikawa, K., et al., *ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis.* Science, 2008. 320(5876): p. 661-4.
 103. Kaspar, J.W., S.K. Niture, and A.K. Jaiswal, *Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress.* Free Radic Biol Med, 2009. 47(9): p. 1304-9.
 104. Kang, K.W., S.J. Lee, and S.G. Kim, *Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress.* Antioxid Redox Signal, 2005. 7(11-12): p. 1664-73.

105. Bellezza, I., A.L. Mierla, and A. Minelli, *Nrf2 and NF-kappaB and Their Concerted Modulation in Cancer Pathogenesis and Progression*. *Cancers* (Basel), 2010. 2(2): p. 483-97.
106. St-Pierre, J., et al., *Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain*. *J Biol Chem*, 2002. 277(47): p. 44784-90.
107. Bell, E.L., et al., *The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production*. *J Cell Biol*, 2007. 177(6): p. 1029-36.
108. Gottlieb, E. and I.P. Tomlinson, *Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update*. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(11): p. 857-66.
109. Guzy, R.D., et al., *Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis*. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(2): p. 718-31.
110. Ku, H.H., U.T. Brunk, and R.S. Sohal, *Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species*. *Free Radic Biol Med*, 1993. 15(6): p. 621-7.
111. Sohal, R.S., B.H. Sohal, and W.C. Orr, *Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies*. *Free Radic Biol Med*, 1995. 19(4): p. 499-504.
112. Trachootham, D., et al., *Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate*. *Cancer Cell*, 2006. 10(3): p. 241-52.
113. Asayama, K., et al., *Purification and immunoelectron microscopic localization of cellular glutathione peroxidase in rat hepatocytes: quantitative analysis by postembedding method*. *Histochemistry*, 1994. 102(3): p. 213-9.
114. Dhaunsi, G.S., et al., *Demonstration of Cu-Zn superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. Biochemical and immunochemical evidence*. *J Biol Chem*, 1992. 267(10): p. 6870-3.
115. Schrader, M. and H.D. Fahimi, *Peroxisomes and oxidative stress*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1763(12): p. 1755-66.
116. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004. 44: p. 239-67.

117. Reddy, J.K., D.L. Azarnoff, and C.E. Hignite, *Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens*. Nature, 1980. 283(5745): p. 397-8.
118. Moody, D.E., et al., *Peroxisome proliferation and nongenotoxic carcinogenesis: commentary on a symposium*. Fundam Appl Toxicol, 1991. 16(2): p. 233-48.
119. Heidenreich, W.F., et al., *Multistage models and the incidence of cancer in the cohort of atomic bomb survivors*. Radiat Res, 2002. 158(5): p. 607-14.
120. Kaiser, J.C., et al., *Lung tumour risk in radon-exposed rats from different experiments: comparative analysis with biologically based models*. Radiat Environ Biophys, 2004. 43(3): p. 189-201.
121. Little, M.P., et al., *Systems biological and mechanistic modelling of radiation-induced cancer*. Radiat Environ Biophys, 2008. 47(1): p. 39-47.
122. Riley, P.A., *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation*. Int J Radiat Biol, 1994. 65(1): p. 27-33.
123. Tulard, A., et al., *Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity*. Free Radic Biol Med, 2003. 35(1): p. 68-77.
124. Leach, J.K., et al., *Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen*. Cancer Res, 2001. 61(10): p. 3894-901.
125. Hwang, E.S. and P.E. Bowen, *DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007. 47(1): p. 27-50.
126. Shen, H.M. and C.N. Ong, *Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis*. Mutat Res, 1996. 366(1): p. 23-44.
127. Nishigori, C., Y. Hattori, and S. Toyokuni, *Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis*. Antioxid Redox Signal, 2004. 6(3): p. 561-70.
128. Tanaka, T., et al., *High incidence of allelic loss on chromosome 5 and inactivation of p15INK4B and p16INK4A tumor suppressor genes in oxystress-induced renal cell carcinoma of rats*. Oncogene, 1999. 18(25): p. 3793-7.
129. Dunn, L.L., et al., *The emerging role of the thioredoxin system in angiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(11): p. 2089-98.

130. Welsh, S.J., et al., *The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis.* Cancer Res, 2002. 62(17): p. 5089-95.
131. Kang, S.W., et al., *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha.* J Biol Chem, 1998. 273(11): p. 6297-302.
132. Matsui, M., et al., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene.* Dev Biol, 1996. 178(1): p. 179-85.
133. Nonn, L., et al., *The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice.* Mol Cell Biol, 2003. 23(3): p. 916-22.
134. Clarke, F.M., et al., *Identification of molecules involved in the 'early pregnancy factor' phenomenon.* J Reprod Fertil, 1991. 93(2): p. 525-39.
135. Laurent, T.C., E.C. Moore, and P. Reichard, *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B.* J Biol Chem, 1964. 239: p. 3436-44.
136. Wakasugi, H., et al., *Epstein-Barr virus-containing B-cell line produces an interleukin 1 that it uses as a growth factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(3): p. 804-8.
137. Saxena, G., J. Chen, and A. Shalev, *Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein.* J Biol Chem, 2010. 285(6): p. 3997-4005.
138. Schulze, P.C., et al., *Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. 26(12): p. 2666-72.
139. Turturro, F., E. Friday, and T. Welbourne, *Hyperglycemia regulates thioredoxin-ROS activity through induction of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in metastatic breast cancer-derived cells MDA-MB-231.* BMC Cancer, 2007. 7: p. 96.
140. Chutkow, W.A., et al., *Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a critical regulator of hepatic glucose production.* J Biol Chem, 2008. 283(4): p. 2397-406.

141. Yoshioka, J., et al., *Targeted deletion of thioredoxin-interacting protein regulates cardiac dysfunction in response to pressure overload*. *Circ Res*, 2007. 101(12): p. 1328-38.
142. Lillig, C.H. and A. Holmgren, *Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(1): p. 25-47.
143. Powis, G. and W.R. Montfort, *Properties and biological activities of thioredoxins*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001. 30: p. 421-55.
144. Powis, G. and W.R. Montfort, *Properties and biological activities of thioredoxins*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41: p. 261-95.
145. Powis, G., et al., *Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors*. *Chem Biol Interact*, 1998. 111-112: p. 23-34.
146. Nishinaka, Y., et al., *Redox control of cellular function by thioredoxin; a new therapeutic direction in host defence*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2001. 49(4): p. 285-92.
147. Matthews, J.R., et al., *Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62*. *Nucleic Acids Res*, 1992. 20(15): p. 3821-30.
148. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. *Science*, 1997. 275(5296): p. 90-4.
149. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. *EMBO J*, 1998. 17(9): p. 2596-606.
150. Semenza, G.L., *Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000. 35(2): p. 71-103.
151. Yasuda, S., et al., *Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance*. *J Hepatol*, 2004. 40(1): p. 117-23.
152. Mathupala, S.P., A. Rempel, and P.L. Pedersen, *Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions*. *J Biol Chem*, 2001. 276(46): p. 43407-12.
153. Day, A.M., et al., *Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival*. *Mol Cell*, 2012. 45(3): p. 398-408.

-
154. Park, K.J., et al., *Protective effects of peroxiredoxin on hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes*. Korean Circ J, 2012. 42(1): p. 23-32.
 155. Hanschmann, E.M., et al., *Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3*. J Biol Chem, 2010. 285(52): p. 40699-705.
 156. Du, Y., et al., *Thioredoxin 1 is inactivated due to oxidation induced by peroxiredoxin under oxidative stress and reactivated by the glutaredoxin system*. J Biol Chem, 2013. 288(45): p. 32241-7.
 157. Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cell Signal, 2012. 24(5): p. 981-90.
 158. Aiken, C.T., et al., *Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes*. Mol Cell Proteomics, 2011. 10(5): p. R110 006924.
 159. Dunlop, R.A., U.T. Brunk, and K.J. Rodgers, *Oxidized proteins: mechanisms of removal and consequences of accumulation*. IUBMB Life, 2009. 61(5): p. 522-7.
 160. Reggiori, F. and D.J. Klionsky, *Autophagy in the eukaryotic cell*. Eukaryot Cell, 2002. 1(1): p. 11-21.
 161. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy*. Dev Cell, 2004. 6(4): p. 463-77.
 162. Scherz-Shouval, R., et al., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. EMBO J, 2007. 26(7): p. 1749-60.
 163. Chen, Y., et al., *Hyperactivation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) promotes breast cancer progression through enhancing glucose starvation-induced autophagy and Akt signaling*. J Biol Chem, 2014. 289(2): p. 1164-73.
 164. Niso-Santano, M., et al., *ASK1 overexpression accelerates paraquat-induced autophagy via endoplasmic reticulum stress*. Toxicol Sci, 2011. 119(1): p. 156-68.

165. Hsieh, C.C. and J. Papaconstantinou, *Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice*. FASEB J, 2006. 20(2): p. 259-68.
166. Levine, B. and V. Deretic, *Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(10): p. 767-77.
167. Huang, J. and D.J. Klionsky, *Autophagy and human disease*. Cell Cycle, 2007. 6(15): p. 1837-49.
168. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. 451(7182): p. 1069-75.
169. Shintani, T. and D.J. Klionsky, *Autophagy in health and disease: a double-edged sword*. Science, 2004. 306(5698): p. 990-5.
170. Klionsky, D.J., *The molecular machinery of autophagy: unanswered questions*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 1): p. 7-18.
171. Massey, A., R. Kiffin, and A.M. Cuervo, *Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(12): p. 2420-34.
172. Yang, Z. and D.J. Klionsky, *An overview of the molecular mechanism of autophagy*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. 335: p. 1-32.
173. Klionsky, D.J., et al., *A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes*. Dev Cell, 2003. 5(4): p. 539-45.
174. Xie, Z. and D.J. Klionsky, *Autophagosome formation: core machinery and adaptations*. Nat Cell Biol, 2007. 9(10): p. 1102-9.
175. Komatsu, M., et al., *Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons*. Cell Death Differ, 2007. 14(5): p. 887-94.
176. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period*. Nature, 2004. 432(7020): p. 1032-6.
177. Gaczynska, M., K.L. Rock, and A.L. Goldberg, *Role of proteasomes in antigen presentation*. Enzyme Protein, 1993. 47(4-6): p. 354-69.
178. Baumeister, W., et al., *The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease*. Cell, 1998. 92(3): p. 367-80.
179. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. 82(2): p. 373-428.
180. Naujokat, C. and S. Hoffmann, *Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis*. Lab Invest, 2002. 82(8): p. 965-80.

181. Lecker, S.H., A.L. Goldberg, and W.E. Mitch, *Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(7): p. 1807-19.
182. Murata, S., Y. Takahama, and K. Tanaka, *Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides*. Curr Opin Immunol, 2008. 20(2): p. 192-6.
183. Molineaux, S.M., *Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer*. Clin Cancer Res, 2012. 18(1): p. 15-20.
184. Silva, G.M., et al., *Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome*. FEBS J, 2008. 275(11): p. 2942-55.
185. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973. 51(5): p. 1409-16.
186. Moody, S.E., et al., *Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis*. Cancer Cell, 2002. 2(6): p. 451-61.
187. Dankort, D., et al., *Multiple ErbB-2/Neu Phosphorylation Sites Mediate Transformation through Distinct Effector Proteins*. J Biol Chem, 2001. 276(42): p. 38921-8.
188. Guy, C.T., R.D. Cardiff, and W.J. Muller, *Activated neu induces rapid tumor progression*. J Biol Chem, 1996. 271(13): p. 7673-8.
189. Go, Y.M. and D.P. Jones, *Thioredoxin redox western analysis*. Curr Protoc Toxicol, 2009. Chapter 17: p. Unit17 12.
190. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. 138(1): p. 141-3.
191. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
192. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 425-79.
193. Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg, *Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes*. Annu Rev Biochem, 1996. 65: p. 801-47.

194. Hochstrasser, M., *Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. 7(2): p. 215-23.
195. McNaught, K.S., et al., *Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. 2(8): p. 589-94.
196. Fransen, M., *Cyclophilin D: a therapeutic target to counteract reactive oxygen species-mediated damage in neurodegenerative disease?* *Brain*, 2012. 135(Pt 12): p. 3525-6.
197. Buizza, L., et al., *Conformational altered p53 as an early marker of oxidative stress in Alzheimer's disease*. *PLoS One*, 2012. 7(1): p. e29789.
198. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radic Biol Med*, 1991. 11(1): p. 81-128.
199. Marnett, L.J., *Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde*. *IARC Sci Publ*, 1999(150): p. 17-27.
200. Marnett, L.J., *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. *Mutat Res*, 1999. 424(1-2): p. 83-95.
201. Draper, H.H., et al., *A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials*. *Free Radic Biol Med*, 1993. 15(4): p. 353-63.
202. Haasnoot, J., E.M. Westerhout, and B. Berkhout, *RNA interference against viruses: strike and counterstrike*. *Nat Biotechnol*, 2007. 25(12): p. 1435-43.
203. Cerutti, H. and J.A. Casas-Mollano, *On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man*. *Curr Genet*, 2006. 50(2): p. 81-99.
204. Siomi, H. and M.C. Siomi, *On the road to reading the RNA-interference code*. *Nature*, 2009. 457(7228): p. 396-404.
205. Borenfreund, E. and J.A. Puerner, *Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption*. *Toxicol Lett*, 1985. 24(2-3): p. 119-24.
206. Nemes, Z., et al., *The pharmacological relevance of vital staining with neutral red*. *Experientia*, 1979. 35(11): p. 1475-6.
207. Lullmann-Rauch, R., *Drug-induced lysosomal storage disorders*. *Front Biol*, 1979. 48: p. 49-130.

-
208. Ashino, T., et al., *Redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. 33(4): p. 760-8.
209. Song, J.S., et al., *Role of thioredoxin 1 and thioredoxin 2 on proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2011. 20(9): p. 1529-37.
210. Hawkes, H.J., T.C. Karlenius, and K.F. Tonissen, *Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: a study of functional and putative regulatory elements*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(1): p. 303-14.
211. Masutani, H., S. Ueda, and J. Yodoi, *The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2005. 12 Suppl 1: p. 991-8.
212. Schumacker, P.T., *Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword*. *Cancer Cell*, 2006. 10(3): p. 175-6.
213. Schmidt, M., et al., *The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer*. *Cancer Res*, 2008. 68(13): p. 5405-13.
214. Chen, K.S. and H.F. DeLuca, *Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1219(1): p. 26-32.
215. Courtois-Cox, S., et al., *A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence*. *Cancer Cell*, 2006. 10(6): p. 459-72.
216. Wajapeyee, N., et al., *Oncogenic RAS directs silencing of tumor suppressor genes through ordered recruitment of transcriptional repressors*. *Genes Dev*, 2013. 27(20): p. 2221-6.
217. Ferrell, J.E., Jr. and R.R. Bhatt, *Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 1997. 272(30): p. 19008-16.
218. Rosen, L.B., et al., *Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras*. *Neuron*, 1994. 12(6): p. 1207-21.
219. Favata, M.F., et al., *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. *J Biol Chem*, 1998. 273(29): p. 18623-32.
220. Wauson, E.M., et al., *Off-target effects of MEK inhibitors*. *Biochemistry*, 2013. 52(31): p. 5164-6.

221. Obara, Y. and N. Nakahata, *The signaling pathway leading to extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) activation via G-proteins and ERK5-dependent neurotrophic effects*. Mol Pharmacol, 2010. 77(1): p. 10-6.
222. Tataka, R.J., et al., *Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 377(1): p. 120-5.
223. Chen, Z., et al., *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. Nature, 2005. 436(7051): p. 725-30.
224. Majumder, P.K., et al., *A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression*. Cancer Cell, 2008. 14(2): p. 146-55.
225. Oyama, K., et al., *AKT induces senescence in primary esophageal epithelial cells but is permissive for differentiation as revealed in organotypic culture*. Oncogene, 2007. 26(16): p. 2353-64.
226. Kortlever, R.M., P.J. Higgins, and R. Bernards, *Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence*. Nat Cell Biol, 2006. 8(8): p. 877-84.
227. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. 275(5308): p. 1943-7.
228. Meier, F., et al., *The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma*. Front Biosci, 2005. 10: p. 2986-3001.
229. Kummer, J.L., P.K. Rao, and K.A. Heidenreich, *Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. 272(33): p. 20490-4.
230. Yee, A.S., et al., *The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression*. Gene, 2004. 336(1): p. 1-13.
231. Wang, Y., et al., *Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family*. J Biol Chem, 1998. 273(4): p. 2161-8.

-
232. Wang, W., et al., *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence*. Mol Cell Biol, 2002. 22(10): p. 3389-403.
233. Bulavin, D.V., et al., *Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity*. Nat Genet, 2002. 31(2): p. 210-5.
234. Li, X., et al., *Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 381(4): p. 660-5.
235. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2003. 23(34): p. 10756-64.
236. Li, N., et al., *Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production*. J Biol Chem, 2003. 278(10): p. 8516-25.
237. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radic Biol Med, 2014. 66: p. 75-87.
238. Ballal, A. and A.C. Manna, *Control of thioredoxin reductase gene (trxB) transcription by SarA in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2010. 192(1): p. 336-45.
239. Koharyova, M. and M. Kolarova, *Oxidative stress and thioredoxin system*. Gen Physiol Biophys, 2008. 27(2): p. 71-84.
240. Holmgren, A. and J. Lu, *Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 396(1): p. 120-4.
241. Riener, C.K., G. Kada, and H.J. Gruber, *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine*. Anal Bioanal Chem, 2002. 373(4-5): p. 266-76.
242. Hansen, J.M., Y.M. Go, and D.P. Jones, *Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. 46: p. 215-34.
243. Hayashi, T., Y. Ueno, and T. Okamoto, *Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin*. J Biol Chem, 1993. 268(15): p. 11380-8.

-
244. Hansen, J.M., W.H. Watson, and D.P. Jones, *Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1*. *Toxicol Sci*, 2004. 82(1): p. 308-17.
245. Lu, J., E.H. Chew, and A. Holmgren, *Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(30): p. 12288-93.
246. Wang, Y., et al., *Arsenic trioxide induces the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through activation of caspase-3 and inhibition of HERG channels*. *Exp Ther Med*, 2011. 2(3): p. 481-486.
247. Ye, J., et al., *Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase enhances apoptosis induced by arsenic trioxide in human breast cancer MCF-7 cells*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005. 32(12): p. 1042-8.
248. Manoharan, R., H.A. Seong, and H. Ha, *Thioredoxin inhibits MPK38-induced ASK1, TGF-beta, and p53 function in a phosphorylation-dependent manner*. *Free Radic Biol Med*, 2013. 63: p. 313-24.
249. Tang, G., et al., *Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways*. *Hum Mol Genet*, 2008. 17(11): p. 1540-55.
250. Webber, J.L. and S.A. Tooze, *Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP*. *EMBO J*, 2010. 29(1): p. 27-40.
251. Keil, E., et al., *Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45beta-MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy*. *Cell Death Differ*, 2013. 20(2): p. 321-32.
252. Moruno-Manchon, J.F., E. Perez-Jimenez, and E. Knecht, *Glucose induces autophagy under starvation conditions by a p38 MAPK-dependent pathway*. *Biochem J*, 2013. 449(2): p. 497-506.
253. Huang, J. and B.D. Manning, *A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes*. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 1): p. 217-22.
254. Kamada, Y., et al., *Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy*. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(4): p. 1049-58.
255. Urig, S. and K. Becker, *On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy*. *Semin Cancer Biol*, 2006. 16(6): p. 452-65.
256. Powis, G. and D.L. Kirkpatrick, *Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy*. *Curr Opin Pharmacol*, 2007. 7(4): p. 392-7.

-
257. Yoo, M.H., et al., *Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells*. J Biol Chem, 2006. 281(19): p. 13005-8.
 258. Wells, G., et al., *4-Substituted 4-hydroxycyclohexa-2,5-dien-1-ones with selective activities against colon and renal cancer cell lines*. J Med Chem, 2003. 46(4): p. 532-41.
 259. Bradshaw, T.D., et al., *Elucidation of thioredoxin as a molecular target for antitumor quinols*. Cancer Res, 2005. 65(9): p. 3911-9.
 260. Liu, Y. and W. Min, *Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner*. Circ Res, 2002. 90(12): p. 1259-66.
 261. Liu, H., et al., *Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin*. Mol Cell Biol, 2000. 20(6): p. 2198-208.
 262. Raffel, J., et al., *Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival*. J Lab Clin Med, 2003. 142(1): p. 46-51.
 263. Kakolyris, S., et al., *Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2001. 7(10): p. 3087-91.
 264. Tome, M.E., et al., *A redox signature score identifies diffuse large B-cell lymphoma patients with a poor prognosis*. Blood, 2005. 106(10): p. 3594-601.
 265. Schmidt, M., et al., *Coordinates in the universe of node-negative breast cancer revisited*. Cancer Res, 2009. 69(7): p. 2695-8.
 266. Schmidt, M., et al., *Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer--comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial*. Ann Oncol, 2009. 20(2): p. 258-64.
 267. Schmidt, M., et al., *Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer*. Clin Cancer Res, 2008. 14(18): p. 5849-55.

-
268. Takahashi, Y., et al., *Decreased expression of thioredoxin interacting protein mRNA in inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis*. *Oncol Rep*, 2007. 18(3): p. 531-5.
269. Lincoln, D.T., et al., *The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer*. *Anticancer Res*, 2003. 23(3B): p. 2425-33.
270. Han, S.H., et al., *VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression*. *Oncogene*, 2003. 22(26): p. 4035-46.
271. Butler, L.M., et al., *The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11700-5.
272. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. *Cancer Cell*, 2005. 8(3): p. 197-209.
273. Giraud, M.N., et al., *Expressional reprogramming of survival pathways in rat cardiocytes by neuregulin-1beta*. *J Appl Physiol (1985)*, 2005. 99(1): p. 313-22.
274. Chen, Z.H., et al., *4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2*. *J Biol Chem*, 2005. 280(51): p. 41921-7.
275. Kim, W.J., et al., *Antisense-thioredoxin inhibits angiogenesis via pVHL-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha degradation*. *Int J Oncol*, 2005. 26(4): p. 1049-52.
276. Akhtar, S., et al., *Activation of ErbB2 and Downstream Signalling via Rho Kinases and ERK1/2 Contributes to Diabetes-Induced Vascular Dysfunction*. *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e67813.
277. Martin-Liberal, J., L. Lagares-Tena, and J. Larkin, *Prospects for MEK inhibitors for treating cancer*. *Expert Opin Drug Saf*, 2014.
278. Grimaldi, A.M., E. Simeone, and P.A. Ascierto, *The role of MEK inhibitors in the treatment of metastatic melanoma*. *Curr Opin Oncol*, 2014. 26(2): p. 196-203.
279. Wang, D., et al., *Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(8): p. 1248-55.
280. Henderson, Y.C., et al., *MEK inhibitor PD0325901 significantly reduces the growth of papillary thyroid carcinoma cells in vitro and in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2010. 9(7): p. 1968-76.

-
281. Tor, Y.S., et al., *Induction of apoptosis through oxidative stress-related pathways in MCF-7, human breast cancer cells, by ethyl acetate extract of Dillenia suffruticosa*. BMC Complement Altern Med, 2014. 14(1): p. 55.
282. Johann, A.M., et al., *Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and attenuates the oxidative burst*. Cell Death Differ, 2006. 13(9): p. 1533-40.
283. Boonstra, J. and J.A. Post, *Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells*. Gene, 2004. 337: p. 1-13.
284. Otani, H., *Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning*. Antioxid Redox Signal, 2004. 6(2): p. 449-69.
285. Allen, R.G. and M. Tresini, *Oxidative stress and gene regulation*. Free Radic Biol Med, 2000. 28(3): p. 463-99.
286. Aslan, M. and T. Ozben, *Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways*. Antioxid Redox Signal, 2003. 5(6): p. 781-8.
287. Poli, G., et al., *Oxidative stress and cell signalling*. Curr Med Chem, 2004. 11(9): p. 1163-82.
288. Martindale, J.L. and N.J. Holbrook, *Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival*. J Cell Physiol, 2002. 192(1): p. 1-15.
289. Hagen, T.M., et al., *Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(7): p. 3064-9.
290. Chen, Q., et al., *Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(10): p. 4337-41.
291. Ambrosone, C.B., *Oxidants and antioxidants in breast cancer*. Antioxid Redox Signal, 2000. 2(4): p. 903-17.
292. Emerit, I., *Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis*. Free Radic Biol Med, 1994. 16(1): p. 99-109.
293. Klaunig, J.E., et al., *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1998. 106 Suppl 1: p. 289-95.
294. Penney, R.B. and D. Roy, *Thioredoxin-mediated redox regulation of resistance to endocrine therapy in breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1836(1): p. 60-79.

-
295. Go, Y.M. and D.P. Jones, *Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013. 48(2): p. 173-81.
296. Sengupta, R. and A. Holmgren, *The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1820(6): p. 689-700.
297. Behrend, L., G. Henderson, and R.M. Zwacka, *Reactive oxygen species in oncogenic transformation*. Biochem Soc Trans, 2003. 31(Pt 6): p. 1441-4.
298. Macip, S., et al., *Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence*. EMBO J, 2002. 21(9): p. 2180-8.
299. Rundlof, A.K. and E.S. Arner, *Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events*. Antioxid Redox Signal, 2004. 6(1): p. 41-52.
300. An, B.C., et al., *Improvement of chaperone activity of 2-Cys peroxiredoxin using gamma ray*. J Radiat Res, 2011. 52(6): p. 694-700.
301. Kim, S.Y., et al., *The 1-Cys peroxiredoxin, a regulator of seed dormancy, functions as a molecular chaperone under oxidative stress conditions*. Plant Sci, 2011. 181(2): p. 119-24.
302. Rundlof, A.K., M. Carlsten, and E.S. Arner, *The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene*. J Biol Chem, 2001. 276(32): p. 30542-51.
303. Gasdaska, J.R., et al., *Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements*. J Biol Chem, 1999. 274(36): p. 25379-85.
304. Fujiwara, N., et al., *Functional expression of rat thioredoxin reductase: selenocysteine insertion sequence element is essential for the active enzyme*. Biochem J, 1999. 340 (Pt 2): p. 439-44.
305. Koishi, R., et al., *Cloning and characterization of a novel oxidoreductase KDRF from a human bone marrow-derived stromal cell line KM-102*. J Biol Chem, 1997. 272(4): p. 2570-7.
306. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. Trends Biochem Sci, 1995. 20(11): p. 465-70.

-
307. Gunther, M., M. Laithier, and O. Brison, *A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening*. Mol Cell Biochem, 2000. 210(1-2): p. 131-42.
 308. Strom, A.C., et al., *The transcription factors Sp1 and Oct-1 interact physically to regulate human U2 snRNA gene expression*. Nucleic Acids Res, 1996. 24(11): p. 1981-6.
 309. Lickteig, K., et al., *Effects of oxidation and reduction on the binding of transcription factors to cis-regulatory elements located in the FGF-4 gene*. Mol Reprod Dev, 1996. 44(2): p. 146-52.
 310. Wu, X., et al., *Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change*. Mol Cell Biol, 1996. 16(3): p. 1035-46.
 311. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(22): p. 12222-6.
 312. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. 78(6): p. 1027-37.
 313. Winzen, R., et al., *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. EMBO J, 1999. 18(18): p. 4969-80.
 314. Lasa, M., et al., *Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade*. Mol Cell Biol, 2000. 20(12): p. 4265-74.
 315. Pages, G., et al., *Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability*. J Biol Chem, 2000. 275(34): p. 26484-91.
 316. Sun, Q.A., et al., *Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases*. J Biol Chem, 1999. 274(35): p. 24522-30.
 317. Howie, A.F., et al., *Identification of a 57-kilodalton selenoprotein in human thyrocytes as thioredoxin reductase and evidence that its expression is regulated through the calcium-phosphoinositol signaling pathway*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(6): p. 2052-8.

318. Arner, E.S., M. Bjornstedt, and A. Holmgren, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*, 1995. 270(8): p. 3479-82.
319. Castagna, M., et al., Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 1982. 257(13): p. 7847-51.
320. Anema, S.M., et al., Thioredoxin reductase is the major selenoprotein expressed in human umbilical-vein endothelial cells and is regulated by protein kinase C. *Biochem J*, 1999. 342 (Pt 1): p. 111-7.
321. Schutze, N., et al., The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells--regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and selenite. *Biofactors*, 1999. 10(4): p. 329-38.
322. Schutze, N., et al., Identification by differential display PCR of the selenoprotein thioredoxin reductase as a 1 alpha,25(OH)2-vitamin D3-responsive gene in human osteoblasts--regulation by selenite. *Biofactors*, 1998. 7(4): p. 299-310.
323. Miranda-Vizueté, A., et al., Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem*, 1999. 261(2): p. 405-12.
324. Rozell, B., et al., Immunohistochemical localization of thioredoxin and thioredoxin reductase in adult rats. *Eur J Cell Biol*, 1985. 38(1): p. 79-86.
325. Gasdaska, J.R., et al., Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue. *Genomics*, 1996. 37(2): p. 257-9.
326. Rundlof, A.K., et al., Prominent expression of the selenoprotein thioredoxin reductase in the medullary rays of the rat kidney and thioredoxin reductase mRNA variants differing at the 5' untranslated region. *Biochem J*, 2000. 347 Pt 3: p. 661-8.
327. Berggren, M., et al., Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*, 1996. 16(6B): p. 3459-66.

-
328. Griffiths, H.R., et al., Redox regulation of protein damage in plasma. *Redox Biol*, 2014. 2: p. 430-435.
329. Zhang, H., et al., Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicol Sci*, 2009. 110(2): p. 376-88.
330. Minibayeva, F., et al., Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol Biochem*, 2012. 59: p. 11-9.
331. Malaviya, R., J.D. Laskin, and D.L. Laskin, Oxidative stress-induced autophagy: Role in pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014. 275(2): p. 145-151.
332. Breusing, N. and T. Grune, Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol Chem*, 2008. 389(3): p. 203-9.
333. Arner, E.S. and A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*, 2000. 267(20): p. 6102-9.
334. Wang, Z., et al., Study of interactions between arsenicals and thioredoxins (human and *E. coli*) using mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007. 21(22): p. 3658-66.
335. Lundberg, M., et al., Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J Biol Chem*, 2001. 276(28): p. 26269-75.
336. Kanzok, S.M., et al., The thioredoxin system of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Glutathione reduction revisited. *J Biol Chem*, 2000. 275(51): p. 40180-6.
337. Zhang, H., et al., Glutaredoxin 2 Reduces Both Thioredoxin 2 and Thioredoxin 1 and Protects Cells from Apoptosis Induced by Auranofin and 4-Hydroxynonenal. *Antioxid Redox Signal*, 2014.
338. Lonn, M.E., et al., Expression pattern of human glutaredoxin 2 isoforms: identification and characterization of two testis/cancer cell-specific isoforms. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10(3): p. 547-57.
339. Du, Y., et al., Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J Biol Chem*, 2012. 287(45): p. 38210-9.

340. Draculic, T., I.W. Dawes, and C.M. Grant, A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 2000. 36(5): p. 1167-74.
341. Muller, E.G., A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell*, 1996. 7(11): p. 1805-13.
342. Trotter, E.W. and C.M. Grant, Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Rep*, 2003. 4(2): p. 184-8.

7 Anhang

7.1 Wissenschaftliche Publikationen

- (1) Cadenas C, **Franckenstein D**, Schmidt M, Gehrman M, Hermes M, Geppert B, Schormann W, Maccoux LJ, Schug M, Schumann A, Wilhelm C, Freis E, Ickstadt K, Rahnenführer J, Baumbach JI, Sickmann A, Hengstler JG. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3):R44

- (2) Cadenas C, Vosbeck S, Hein EM, Hellwig B, Langer A, Hayen H, **Franckenstein D**, Büttner B, Hammad S, Marchan R, Hermes M, Selinski S, Rahnenführer J, Peksel B, Török Z, Vígh L, Hengstler JG. Glycerophospholipid profile in oncogene-induced senescence. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep;1821(9):1256-68

7.2 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen genutzt als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen

Dortmund, den 04.06.2014

.....

Dennis Franckenstein

7.3 Danksagung

- Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Jan G. Hengstler für die überaus interessante Themenstellung, die gute Betreuung und stets anregende Diskussion während der Durchführung der Arbeit sowie die mir jederzeit gewährte Unterstützung und kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Herrn Professor Dr. Frank Wehner gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats der Arbeit in der Abteilung Systemische Zellbiologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund.
- Herrn Dr. Leif Dehmelt danke ich für die Übernahme des dritten Gutachters dieser Arbeit.
- Ein ganz spezieller Dank richtet sich an Dr. Cristina Cadenas für die stets hervorragende Betreuung, Hilfestellung und kritische Durchsicht dieser Arbeit. Ohne die kritischen und intensiven Diskussionen wäre der Erfolg dieser Arbeit nicht möglich gewesen.
- Mein Dank gilt außerdem der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jörg Rahnenführer an der TU Dortmund für die statistische Auswertung unserer Tumordaten mit den Programmen „SPSS“ und „R“.
- Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. Markus Schug für die Einführung in die Technik der quantitativen Realtime PCR sowie der gemeinsamen Zeit am IfaDo.
- Meinen Mitstreitern Sonja Vosbeck und Michaela Lesjak möchte ich besonders für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des IfaDo danken. Ihr seid mir stets eine große Hilfe in schwierigen Phasen dieser Arbeit gewesen.
- Ich bedanke mich außerdem bei ALLEN Mitarbeitern des IfaDo, die mich auf die eine oder andere Weise unterstützt haben.

- Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung während der gesamten Durchführung dieser Arbeit bedanken, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

- Meiner Verlobten Sherine Ramadan danke ich besonders für die seelische Unterstützung in der letzten Phase dieser Arbeit. Durch aufmunternde Worte hast du mir stets zur Seite gestanden und das obwohl es in dieser Zeit nicht immer einfach mit mir war.