

**Rekonstruktion von
Gen-Interaktionsnetzen durch *in vitro*
RNA Interferenz und globale
Expressionsanalyse**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mark Fellmann

aus

Mönchengladbach, NRW

Heidelberg, im August 2008

Aus der Abteilung
Molekulare Genomanalyse
am
Deutschen Krebsforschungszentrum

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Werner Buselmaier
Zweitgutachter: Herr PD Dr. Holger Sültmann

Einige der hier dargestellten Ergebnisse wurden vorab auf wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert:

Vorträge

- M. Fellmann, R. Kuner, H. Froehlich, A. Tresch, T. Beissbarth, M. Ruschhaupt, A. Poustka, H. Sueltmann
„Reconstruction of gene interaction networks from microarray data and RNA interference experiments“
10th Status Seminar Chip Technologies
Januar 2008, DECHEMA, Frankfurt/Main, Deutschland
- M. Fellmann, R. Kuner, H. Froehlich, A. Tresch, T. Beissbarth, M. Ruschhaupt, A. Poustka, H. Sueltmann
„Reconstruction of gene interaction networks from microarray data and RNA interference experiments“
4th Status Seminar Chemical Biology
November 2007, DECHEMA, Frankfurt/Main, Deutschland
- M. Fellmann, A. Bunes, T. Beissbarth, M. Ruschhaupt, A. Tresch, R. Kuner, A. Poustka, H. Sueltmann
„Unravel the ER-alpha pathway in breast cancer: A combinatorial approach of RNA interference and DNA microarray technology“
NGFG Meeting
November 2006, Heidelberg, Deutschland

Poster Präsentationen

- M. Fellmann, H. Froehlich, A. Tresch, T. Beissbarth, M. Ruschhaupt, R. Kuner, A. Poustka, H. Sueltmann
„Different approaches to estimate networks from microarray data and RNA interference experiments“
Bioperspectives
Mai 2007, Köln, Deutschland
- M. Fellmann, A. Bunes, T. Beissbarth, M. Ruschhaupt, A. Tresch, R. Kuner, A. Poustka, H. Sueltmann
„Unravel the ER-alpha pathway in breast cancer: A combinatorial approach of RNA interference and DNA microarray technology“
9th Status Seminar Chip Technologies
Februar 2007, DECHEMA, Frankfurt/Main, Deutschland

- M. Fellmann, A. Bunes, M. Ruschhaupt, A. Tresch, T. Beissbarth, R. Kuner, A. Poustka, H. Sueltmann
„Delineating breast cancer gene expression systems by RNA interference and global microarray analysis in human tumor cells“
International Conference on Systems Biology
Oktober 2006, Yokohama, Japan
- M. Fellmann, A. Bunes, A. Tresch, R. Kuner, M. Ruschhaupt, O. Sahin, T. Beissbarth, D. Arlt, S. Wiemann, A. Poustka, H. Sueltmann
„Delineating breast cancer gene expression systems by RNA interference and global microarray analysis“
Systems Biology of Mammalian Cells Conference
Juli 2006, Heidelberg, Deutschland
- M. Fellmann, A. Bunes, A. Tresch, M. Ruschhaupt, O. Sahin, T. Beissbarth, D. Arlt, S. Wiemann, R. Kuner, A. Poustka, H. Sueltmann
„Construction of gene expression networks by RNA interference in human cells“
Genomes to Systems Conference
März 2006, Manchester, UK

Danksagungen

In erster Linie bin ich Prof. Dr. Annemarie Poustka post mortem zu tiefem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Werner Buselmaier danke ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

Meinem Gruppenleiter, Herrn PD Dr. Holger Sültmann, danke ich herzlich für die Betreuung, Unterstützung und Finanzierung meiner Arbeiten.

Über die Jahre meiner Dissertation hat vor allem eine Person meinen besonderen Dank für ihren unermüdlichen Laboreinsatz verdient: Sabrina Balaguer-Puig!

Very special thanks go to Andrew J. Smith, L^AT_EX- and Photoshopexpert, HelpDesk-Hotline and, first of all, very good friend. Thanks mate!

Holger Fröhlich danke ich für die bioinformatischen Arbeiten und geduldige Diskussionsbereitschaft.

Einige Kollegen (offensichtlich sogar recht viele) waren in diese Arbeiten involviert und stets freundliche sowie kritische Diskussionspartner: Christian Löbke, Özgür Sahin, Ruprecht Kuner, Florian Hahne, Achim Tresch, Tim Beissbarth, Markus Ruschhaupt, Frauke Henjes, Andreas Bunes, Dirk Ledwinka, Nicole Chui Pressinotti und, nicht zuletzt, mein Praktikant Mathias Munschauer.

Als nächstes möchte ich einigen sehr guten Freunden für die Zeit in Heidelberg und Düsseldorf danken: Florian Reh, Sven Mesecke, Anne Lotzemer-Jentges, Jakob A. Tschäpe, Marianne Uteng, Van-Duc Luu, Christian Fenster, Maria Georgiou, Thorsten Gelbrich und Andreas Kaiser.

Dank an meine Schwester Sonja mit Boris, Carolin und Sophie für die familiäre Unterstützung.

Ein ganz besonderer, herzlicher Dank gebührt meinen wunderbaren und großartigen Eltern, die mich in all den Jahren stets liebevoll unterstützt, aufgemuntert, und immer an mich geglaubt haben.

Til sist ønsker jeg å utrykke min dypeste takknemlighet til den viktigste personen i livet mitt: Linda Løvdok. Jeg får ikke gitt uttrykk for hvor heldig og takknemlig jeg er for at du er ved min side. Tusen takk for at du alltid er der for meg.

In three minutes, 98 percent of all the matter there is or will ever be has been produced. We have a universe. It is a place of the most wondrous and gratifying possibility, and beautiful, too. And it was all done in about the time it takes to make a sandwich

Bill Bryson

**Rekonstruktion von
Gen-Interaktionsnetzen durch *in vitro* RNA Interferenz und globale
Expressionsanalyse**

Inaugural-Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Mark Fellmann

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xvii
Abstract	xix
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	2
1.2 Hormonabhängigkeit des Mammakarzinoms	2
1.2.1 Endokrine Therapie des Mammakarzinoms	6
1.3 Der Estrogenrezeptor	7
1.4 Aktivitäten des ER α	8
1.4.1 Die genomische Aktivität des ER α	9
1.4.2 Die nicht-genomische Aktivität des ER α	10
1.5 RNA Interferenz und siRNA	12
1.5.1 Der Mechanismus der RNA Interferenz	12
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Zelllinien	17
2.2 Chemikalien	17
2.3 Puffer, Medien, Reaktionslösungen und Enzyme	18
2.4 Reaktionskits	19
2.5 Nukleotide und Nukleinsäuren	19
2.6 „Assay on Demand“ für TaqMan qRT-PCR-Analysen	19
2.7 siRNAs	20
2.8 Kultivierung und Passagierung von MCF-7 Zellen	22
2.9 Transfektion humaner epithelialer Mammakarzinomzellen	22
2.10 Stimulation von Mammakarzinomzellen mit endokrinen Substanzen	23
2.11 Behandlung von Mammakarzinomzellen mit Tamoxifen	23
2.12 Weiterverarbeitung von Nukleinsäuren	24

2.12.1	RNA Isolation aus Zellkultur	24
2.12.2	Präzipitation von Nukleinsäuren	24
2.12.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	24
2.12.4	Qualitätskontrolle von isolierter total RNA	25
2.13	Erststrangsynthese von komplementärer DNA (cDNA-Synthese)	25
2.14	quantitative <i>realtime</i> -PCR (TaqMan)	26
2.14.1	$\Delta\Delta Ct$ -Methode	26
2.15	Biochemische Methoden	27
2.15.1	Zell-Lebensfähigkeits Assay WST-1	27
2.16	cDNA Microarray-Technologie	28
2.16.1	Herstellung von humanen, genomweiten cDNA-Microarrays	28
2.16.2	Nachbehandlung der gespotteten cDNA-Microarrays . . .	29
2.16.3	Lineare Amplifikation isolierter mRNA	30
2.16.4	Fluoreszenzmarkierung amplifizierter RNA	30
2.16.5	Hybridisierung von cDNA-Microarrays	31
2.16.6	Messung und Quantifizierung von cDNA-Microarrays . .	31
2.17	Statistische Auswertung der genomweiten Expressionsanalysen .	32
2.18	Netzwerkrekonstruktion durch Nested Effects Model Algorithmus	34
3	Ergebnisse	37
3.1	Auswahl der Gene für die post-transkriptionelle Genstilllegung .	38
3.2	Etablierung des Messprinzips	41
3.3	Genomweite Expressionsanalyse des Etablierungsexperimentes .	43
3.4	Überprüfung der Zell-Lebensfähigkeit	45
3.5	Post-Transkriptionelle Genstilllegung durch RNA Interferenz . .	47
3.5.1	<i>AKT1</i>	47
3.5.2	<i>AKT2</i>	48
3.5.3	<i>BCL2</i>	49
3.5.4	<i>CCNG2</i>	49
3.5.5	<i>ESR1</i>	49
3.5.6	<i>FOXA1</i>	50
3.5.7	<i>HSPB8</i>	50
3.5.8	<i>MAPK1</i>	50
3.5.9	<i>STAT5B</i>	50
3.5.10	<i>STC2</i>	51
3.5.11	<i>TMEM45B</i>	51
3.5.12	<i>TP53</i>	52

3.5.13	<i>XBP1</i>	52
3.6	Kombinatorische post-transkriptionelle Genstilllegungen	52
3.6.1	<i>CCNG2</i> und <i>ESR1</i>	53
3.6.2	<i>ESR1</i> und <i>MAPK1</i>	53
3.6.3	<i>MAPK1</i> und <i>STAT5B</i>	53
3.7	Stimulation und Inhibition des Estrogenrezeptors	54
3.7.1	Stimulation mit 17 β -Estradiol	55
3.7.2	Inhibition mit Tamoxifen	56
3.8	Expressionsanalysen nach Genstilllegung	57
3.8.1	Expressionsprofil <i>AKT1</i> Silencing	58
3.8.2	Expressionsprofil <i>AKT2</i> Silencing	59
3.8.3	Expressionsprofil <i>BCL2</i> Silencing	60
3.8.4	Expressionsprofil <i>CCNG2</i> Silencing	60
3.8.5	Expressionsprofil <i>ESR1</i> Silencing	61
3.8.6	Expressionsprofil <i>ESR1/CCNG2</i> Silencing	61
3.8.7	Expressionsprofil <i>ESR1/MAPK1</i> Silencing	62
3.8.8	Expressionsprofil <i>FOXA1</i> Silencing	62
3.8.9	Expressionsprofil <i>HSPB8</i> Silencing	63
3.8.10	Expressionsprofil <i>MAPK1</i> Silencing	63
3.8.11	Expressionsprofil <i>MAPK1/STAT5B</i> Silencing	64
3.8.12	Expressionsprofil <i>STAT5B</i> Silencing	64
3.8.13	Expressionsprofil <i>STC2</i> Silencing	64
3.8.14	Expressionsprofil <i>TMEM45B</i> Silencing	64
3.8.15	Expressionsprofil <i>TP53</i> Silencing	65
3.8.16	Expressionsprofil <i>XBP1</i> Silencing	65
3.9	Netzwerkrekonstruktion aus den Literaturdaten	65
3.10	Netzwerkrekonstruktion aus den genomweiten Expressionsanalysen	67
3.11	Epistaseanalyse der kombinierten Silencing Experimente	68
3.11.1	Epistaseanalyse von <i>ESR1</i> und <i>CCNG2</i>	70
3.11.2	Epistaseanalyse von <i>ESR1</i> und <i>MAPK1</i>	71
3.11.3	Epistaseanalyse von <i>MAPK1</i> und <i>STAT5B</i>	71
3.12	Expressionsanalysen der Behandlung mit endokrinen Substanzen	72
3.12.1	Expressionsanalyse der 17 β -Estradiol Behandlung	73
3.12.2	Expressionsanalyse der Tamoxifen Behandlung	73
3.13	Hierarchische Clusteranalysen	74
3.13.1	Vergleich ER α Silencing und Tamoxifen Behandlung	74

3.13.2 Vergleich ER α Stimulation und Tamoxifen Behandlung	76
3.13.3 Vergleich ER α Stimulation und ER α Silencing	76
3.14 Connectivity Map Vergleich	77
3.14.1 Connectivity Map Vergleich <i>ESR1</i> Silencing	79
3.14.2 Connectivity Map Vergleich <i>ESR1</i> Stimulation	79
3.14.3 Connectivity Map Vergleich <i>ESR1</i> Inhibition	81
3.14.4 Connectivity Map Vergleich <i>AKT2</i> Silencing	81
3.14.5 Connectivity Map Vergleich <i>CCNG2</i> Silencing	83
3.14.6 Connectivity Map Vergleich <i>XBP1</i> Silencing	83
4 Diskussion	85
4.1 Validierung der konstruierten Netzwerkhypothese	85
4.1.1 Vergleich mit literaturbekannten Interaktionen	86
4.1.2 Validierung durch Epistaseanalysen	91
4.2 Validierung der Expressionsprofile durch Connectivity Map	92
4.3 Einfluss endokriner Substanzen auf die globale Genexpression	93
4.4 Vorschlag neuer therapeutischer Ziele	95
A Anhang	101
A.1 Qualitätskontrolle isolierter total und amplifizierter RNA	101
A.2 Graphen der selektiven mRNA Reduktion	102
A.3 Hierarchische Clusteranalysen	110
Literaturverzeichnis	113
Abbildungsverzeichnis	131
Tabellenverzeichnis	133
Abkürzungsverzeichnis	135

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde durch die Kombination von gezielten posttranskriptionellen Genstilllegungen mit Hilfe von sequenzspezifischen siRNAs und anschließender genomweiter Expressionsanalyse mit cDNA Microarrays die Rekonstruktion von Gen-Interaktionsnetzwerken in der ER-positiven Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 etabliert. Zunächst wurden die verfügbaren Techniken der RNA Interferenz und der genomweiten Expressionsanalyse grundlegend an die Fragestellung und die Bedingungen der MCF-7 Zelllinie angepasst. Durch die Experimente wurden hochwertige Messdaten für die statistische Auswertung der Messungen zur Erstellung bzw. Rekonstruktion von Netzwerken erstellt.

Der „Nested Effects Model“ (NEM) Netzwerk Algorithmus konnte durch unterschiedliche Vergleiche (Literaturdaten, Epistaseanalyse und Connectivity Map Datenbank) mehrfach biologisch validiert werden. Durch die Interpretation des transitiv reduzierten, gerichteten Graphen der statistischen Analyse mit dem NEM Algorithmus konnte der bisher nicht beschriebene aktivierende Effekt der *CCNG2* Expression auf die Expression von *ESR1* dargestellt werden.

Die Vergleiche der Expressionsprofile nach Silencing von *AKT2* bzw. *XBP1* mit den Experimenten der Connectivity Map Datenbank zeigten starke Korrelationen zu Behandlungen von MCF-7 Zellen mit antiestrogenen Substanzen (Fulvestrant und Raloxifen) bzw. PI3K Inhibitoren (Wortmannin und LY294002). Aufgrund dieser Ergebnisse, sowie der Positionierung der beiden Gene oberhalb des Estrogenrezeptors im postulierten NEM-Interaktionsnetzwerk, wurden *AKT2* und *XBP1* als potentielle neue therapeutische Ziele in der Behandlung von estrogenabhängigen Mammakarzinomen postuliert.

Durch einen Vergleich der Expressionsänderung nach Stimulation des Estrogenrezeptors mit 17β -Estradiol bzw. Inhibition mit Tamoxifen und der gezielten Stilllegung durch sequenzspezifische siRNAs in Form von hierarchischen Clusteranalysen konnte der transkriptionelle Kofaktor *FHL2* als weiteres potentielles therapeutisches Ziel postuliert werden.

Abstract

By combining targeted post-transcriptional gene silencing using sequence specific siRNAs and genome-wide cDNA microarrays, this work was focused on reconstructing gene interaction networks in ER-positive MCF-7 breast carcinoma cells. Initially, the technique of RNA interference and genome-wide expression profiling was adapted to the constitutive problems and requirements of the employed MCF-7 cell line system. High-grade performance data for statistical interpretation of the recordings were compiled for use in generating and reconstructing gene interaction networks.

The „Nested Effects Model“ (NEM) algorithm was validated biologically using different approaches (literature data, epistasis analysis and Connectivity Map database). Interpretation of the transitive reduced and directed graph resulting from the statistical analysis of the NEM algorithm yielded a description of the activating effect of *CCNG2* expression on the expression of *ESR1* which was unknown until now.

The comparison of the expression profiles (after silencing of *AKT2* and *XBP1*) with the results from the Connectivity Map database resulted in a strong correlation to the treatment of MCF-7 cells with anti-estrogens (fulvestrant and raloxifene) or PI3K inhibitors (Wortmannin and LY294002). According to these results, as well as the positioning of the *AKT1* and *XBP1* upstream of the estrogen receptor in the postulated NEM interaction network, these two genes could be postulated as potential new therapeutical targets in the treatment of estrogen depending breast carcinomas.

Hierarchical cluster analysis of the expression profiles after selective stimulation of the estrogen receptor with 17β -Estradiol, the inhibition with tamoxifen, and the targeted knock down of *ESR1* with sequence specific siRNAs revealed the transcriptional cofactor *FHL2* as a potential new therapeutical target for sufficient treatment of estrogen dependent breast cancer.

1 Einleitung

Seit der Entwicklung der cDNA-Microarrays (Skena et al. [1995]) zur globalen Expressionsanalyse wurden diese zur Untersuchung von genomweiten Expressionsänderungen in tumorösen Geweben verwendet (DeRisi et al. [1996]). Ziel dieser Untersuchungen war die Entdeckung von eindeutigen Mustern in der Veränderung des genomweiten Expressionsprofils in Bezug auf bestimmten Stadien einer Krebserkrankung oder die Vorhersage von Krankheitsverläufen (Golub et al. [1999], Perou et al. [1999]). Abgeleitet aus den ermittelten Expressionsprofilen wurden Aussagen über die Prognose der Tumorerkrankung getroffen (van 't Veer et al. [2002], West et al. [2001]) und eine Vielzahl von Genen als Prognosemarker für den Krankheitsverlauf identifiziert (Badve et al. [2007], Esseghir et al. [2007], Mackay et al. [2003], Oh et al. [2006], Park et al. [2002], Sagara et al. [2004]). Im Fokus der Expressionsanalyse stehen vor allem Gene, denen Schlüsselfunktionen in Signaltransduktionspfaden zugeschrieben werden, wie z. B. das Gen *ESR1*. Als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor ist der Estrogenrezeptor (ER) an der transkriptionellen Regulation einer großen Anzahl von Genen beteiligt (Klinge [2001], O'Lone et al. [2004]) und wird zur pathologischen Einstufung von Mammakarzinomen verwendet (Block et al. [1975]).

Durch die Entwicklung von bioinformatischen Algorithmen zur Rekonstruktion von Netzwerken (Markowitz et al. [2005], Wagner [2001, 2002, 2004]) wurde versucht, die Interaktionen in regulatorischen Pfaden aus experimentellen Daten zu rekonstruieren, um mögliche neue therapeutische Ziele zu identifizieren. Die Entdeckung der RNA Interferenz (Fire et al. [1998]) und die Anwendung dieser Technologie auf humane Zellsysteme (Caplen et al. [2001]) führte zu neuen Möglichkeiten der Rekonstruktion von Gen-Interaktionsnetzwerken durch gezielte Störung von regulatorischen Pfaden und Messung der Effekte durch genomweite Expressionsanalyse. Mit Hilfe von neu entwickelten Algorithmen sollen durch die Rekonstruktion von Interaktionsnetzwerken aus Microarraydaten nach RNA Interferenzexperimenten (Fröhlich et al. [2007, 2008]) bisher unbekannte, regula-

torische Interaktionen zwischen Brustkrebsrelevanten Genen und mögliche neue therapeutische Ziele ermittelt werden.

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Derzeit erkranken in Deutschland jährlich mehr als 57.000 Frauen an Brustkrebs. Damit stellt Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland und weltweit dar ([Stewart and Kleihues \[2003\]](#)). Mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 63 Jahren (s. [Abb. 1.1](#)) liegt Brustkrebs sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen bei der Frau in Deutschland. Seit 1980 steigt die Brustkrebsinzidenz in Deutschland stetig an, während die Mortalität bei Mammakarzinomen seit 1990 leicht zurück geht (s. [Abb. 1.2](#)). Derzeit liegt die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit Mammakarzinom bei ca. 81 % (betrachtet über alle Studien) ([Koch-Institut \[2008\]](#)).

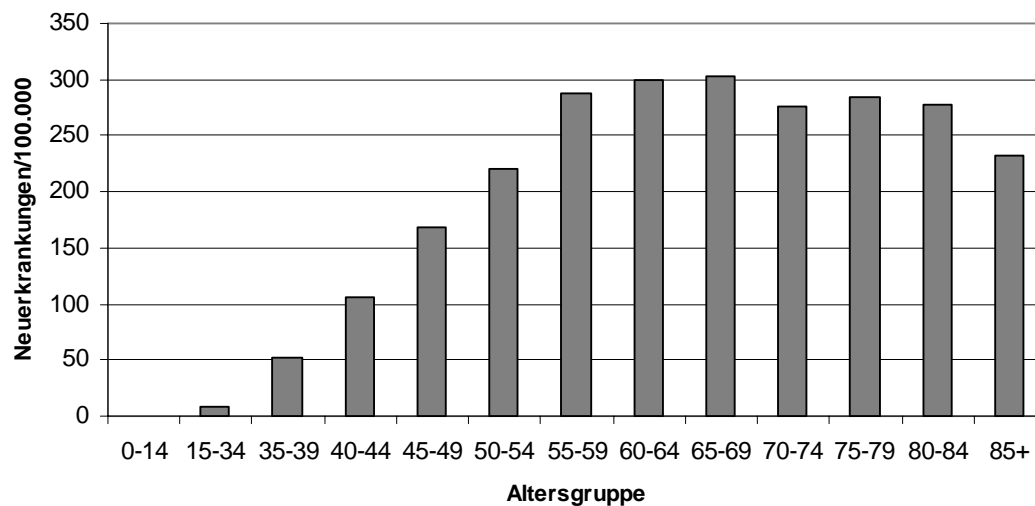


Abbildung 1.1: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2004, ICD-10 C50 Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen. Datenquelle: [Koch-Institut \[2008\]](#)

1.2 Hormonabhängigkeit des Mammakarzinoms

Die Entwicklung des Brustdrüsengewebes beginnt während der Embryogenese. Bei der Geburt haben weibliche sowie männliche Säuglinge ein ähnliches,

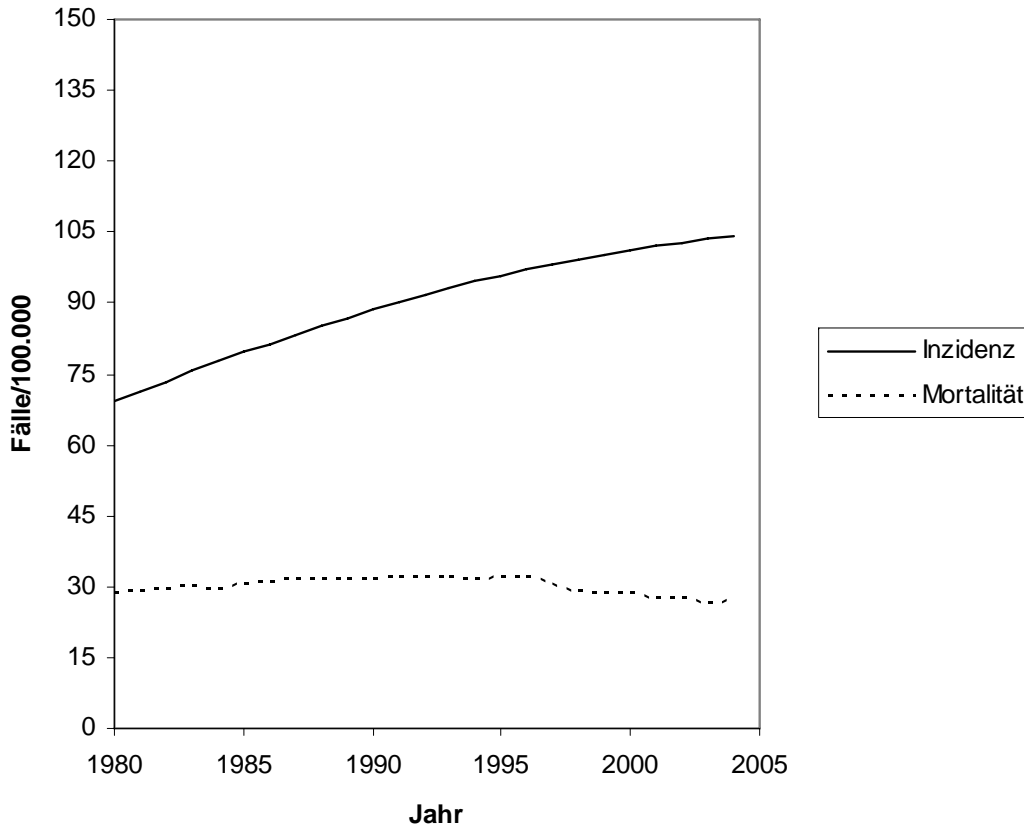


Abbildung 1.2: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1980-2004, ICD-10 C50. Fälle pro 100.000 (Europastandard). Datenquelle: Koch-Institut [2008]

rudimentäres Drüsengewebe (Ali and Coombes [2002]). Durch den Beginn der weiblichen Pubertät wird die Entwicklung der Brustdrüsen in Folge der Abgabe von Estrogenen in hoher Konzentration sowie von Progesteronen durch die Ovarien eingeleitet. Nach der Pubertät durchläuft das weibliche Brustdrüsengewebe Zyklen von Wachstum und Involution, welche durch die hormonellen Änderungen während der Monatszyklen sowie durch Schwangerschaft und Milchbildung reguliert werden. Eine Schwangerschaft führt zu einer Erhöhung der ductalen Verästelung und vermehrter Differenzierung innerhalb des Brustdrüsengewebes, welches nach der Entwöhnung des Säuglings zu einer Regression des Brustgewebes durch Apoptose führt (Russo and Russo [1994]). Abb. 1.3 zeigt schematisch den Aufbau der weiblichen Brustdrüse. Die ductale Struktur des weiblichen Brustdrüsengewebes besteht aus einer kontinuierlichen Schicht aus epithelialen Zellen (s. Abb. 1.4), welche für die Produktion der Milch verantwortlich sind.

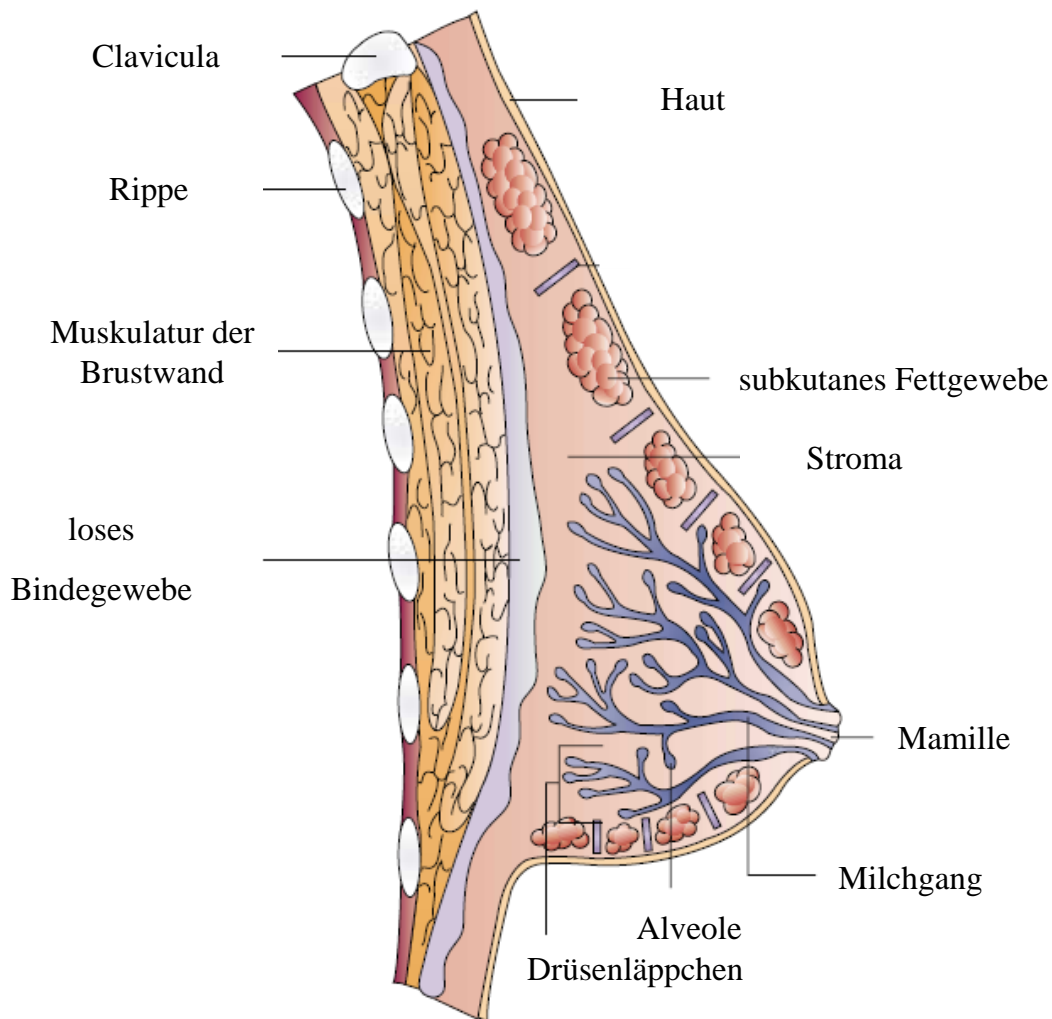


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der Brustdrüse

Diese epithelialen Zellen sind ebenfalls für die zelluläre Antwort auf das Sexualhormon 17β -Estradiol zuständig. Im normalen, ruhenden Brustgewebe sind 15 - 20 % der Epithelzellen ER-positiv, die Anzahl der Estrogen-positiven Zellen ändert sich jedoch im Laufe des Menstruationszyklus. ER-positive Epithelzellen in der nicht-tumorösen Brust reagieren meist nicht mit einer Differenzierung in Folge einer 17β -Estradiol-Bindung. Stattdessen differenzieren die ER-negativen Epithelzellen in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft der ER-positiven Zellen. Es wird vermutet, dass die ER-positiven Epithelzellen die Proliferation der ER-negativen Zellen durch die Sekretion von parakrinen Faktoren unterstützen (Ali and Coombes [2002]). Der Einfluss der von den Ovarien produzierten Estrogene auf das Wachstum von metastasierenden Mammakarzinomen wurde

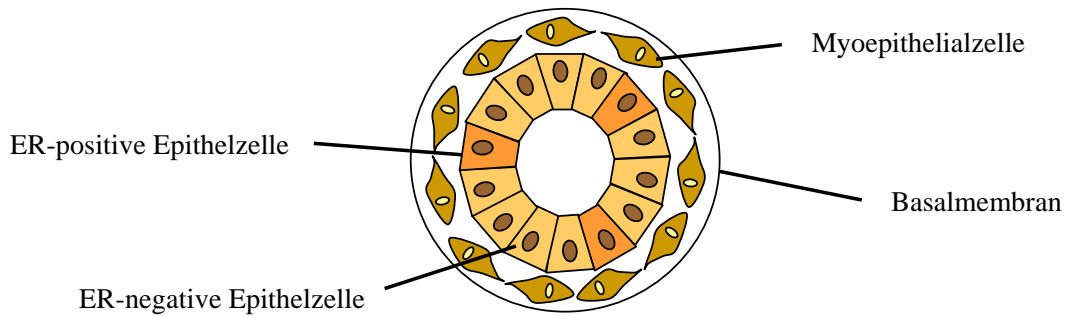


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau eines Milchgangs im Querschnitt

bereits 1896 von George Beatson beschrieben. Beatson konnte zeigen, dass eine Ovariectomie bei Frauen mit metastasierendem Mammakarzinom zu einem Anstieg der Lebenserwartung führte (Beatson [1896]). Es ist bekannt, dass das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms mit einer frühen Menarche, einer späten (vollständigen) Schwangerschaft, spät einsetzender Menopause sowie der prolongierten Estrogenexposition einhergeht (Ali and Coombes [2002]). Weiterhin konnte in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen einer dauerhaft erhöhten Estrogenkonzentration im Blut und dem Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms beschrieben werden (Yager and Davidson [2006]). Diese Einflüsse der Estrogene auf die Progression eines Mammakarzinoms haben zur Entwicklung endokriner Therapieformen geführt, welche darauf abzielen, die proliferierende Wirkung der Estrogene zu unterbinden. Das Sexualhormon 17β -Estradiol wird bei prämenopausalen Frauen primär in den Ovarien synthetisiert. Neben den Ovarien kann das Hormon jedoch auch u. a. in den mesenchymalen Zellen des Fettgewebes synthetisiert werden (Simpson et al. [2000]). Die 17β -Estradiol Biosynthese wird durch Aromatase, ein Enzym der Cytochrom P450 Superfamilie, aus androgenen Steroiden in mehreren Schritten synthetisiert (Pasqualini et al. [1996], Simpson and Davis [2001]). Diese ovarienunabhängige Synthese von 17β -Estradiol ist vor allem bei postmenopausalen Frauen von großer Bedeutung, da so die Versorgung mit 17β -Estradiol für die nicht-reproduktiven Funktionen des Hormons, wie die Aufrechterhaltung der Knochendichte und den Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen, gewährleistet wird. Die Synthese von 17β -Estradiol in den Ovarien wird durch die Menopause beendet. In postmenopausalen Patientinnen ist die Konzentration an 17β -Estradiol innerhalb von Tumoren oftmals stark erhöht (Pasqualini et al.

[1996]), da Mammakarzinome in hohem Maße Aromatasen produzieren und somit die ovarienunabhängige 17β -Estradiol Produktion fördern (Castagnetta et al. [1996]).

1.2.1 Endokrine Therapie des Mammakarzinoms

Das Mittel der Wahl nach Diagnose eines Mammakarzinoms ist die chirurgische Entfernung des tumorösen Gewebes. An die chirurgische Entfernung des Tumors schließt meist eine adjuvante Therapie an. Dabei wird durch die Kombination verschiedenster Therapiewege versucht, die Erkrankung, wenn möglich, kurativ zu behandeln. Im Rahmen einer adjuvanten Therapie kommen meist Chemotherapie, Hormontherapie und Strahlentherapie zur Anwendung. Die Hormontherapie des Mammakarzinoms kann dabei auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen wird versucht, den Effekt der Estrogene auf das Wachstum von ER-positiven Mammakarzinomen zu unterbinden. Dabei wurde der selektive **E**strogen **R**ezeptor **M**odulator (SERM) Tamoxifen anfänglich bei der Behandlung von metastasierenden ER-positiven Mammakarzinomen eingesetzt (Ward [1973]). In der Zwischenzeit gehört Tamoxifen zur Standardtherapie nach chirurgischer Entfernung von ER-positiven Mammakarzinomen (Osborne [1998], Osborne and Schiff [2005]) bei prämenopausalen Patientinnen. Die Therapie von Patientinnen mit operablem Mammakarzinom mit Tamoxifen über einen Zeitraum von ein bis zwei Jahren führt zu einer Verminderung des Wiederauftretens des Karzinoms sowie zu einer Lebensverlängerung. Durch eine fünfjährige Behandlung wird dabei eine Reduktion der Sterberate um 28 % und des Wiederauftretens um 51 % erzielt (Osborne [1998]). Bei postmenopausalen Patientinnen hat sich die Behandlung mit Aromatase Inhibitoren als ein neuer Standard durchgesetzt (Howell et al. [2005]). Durch die Inhibition der Aromatase wird die katalytische Umwandlung von Androstendion und Testosteron in die Estrogene Estron und Estradiol unterbunden (Simpson et al. [1994]). Die Behandlung von prämenopausalen Patientinnen mit Aromatase Inhibitoren ist nicht angezeigt, da diese lediglich die ovarienunabhängige Estrogenproduktion unterbinden. Daher kann im Rahmen einer adjuvanten Therapie bei prämenopausalen Patientinnen durch eine medikamentöse Ovariektomie mit einem Agonisten gegen das „Luteinizing-hormone-releasing hormone“ (LHRH) (z.B. Goserelin, Leuprorelin und Buserelin) die Sekretion des luteinisierenden Hormons (LH) durch die Hypophyse vermindert werden, was zu einer Blockade der

Folikelreifung und damit zu einer Verringerung der Estrogenproduktion in den Ovarien führt (Klijn et al. [2001]). In 15 - 25 % der Patientinnen mit Mammakarzinom ist eine Überexpression des Gens *HER2/neu* zu verzeichnen (Slamon et al. [1987, 1989]). Her2/neu gehört zur Familie der Vier-Transmembran Rezeptor Tyrosin Kinasen, die Wachstum, Differenzierung und Überleben von Zellen regulieren (Gschwind et al. [2004], Yarden and Sliwkowski [2001]). Trastuzumab (Herceptin, Roche), ein monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Her2/neu, wird bei Patientinnen mit Her2/neu positiven, metastasierenden Mammakarzinomen als zusätzliche Therapie eingesetzt (Baselga et al. [2005], Gonzalez-Angulo et al. [2006], Vogel et al. [2002]).

1.3 Der Estrogenrezeptor

Estrogene gehören zur Klasse der Steroidhormone und haben Einfluss auf eine große Anzahl von unterschiedlichen Prozessen im menschlichen Körper. Hauptsächlich sind sie an der Regulation des Wachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt (Nilsson et al. [2001]). 17β -Estradiol stellt das häufigste und wichtigste Estrogen dar, parallel dazu sind jedoch auch geringe Konzentrationen der Estrogene Estron und Estriol zu finden (Björnstrom and Sjöberg [2005]). Die biologischen Effekte der Estrogene werden durch die Estrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$, welche beide zur großen Superfamilie der Kernrezeptoren gehören, vermittelt.

Die Struktur des $ER\alpha$ Der $ER\alpha$ gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren, wird durch das Gen *ESR1* auf Chromosom 6q25.1 codiert (Gosden et al. [1986]) und ist modular aus einzelnen Regionen aufgebaut (s. Abb. 1.5), welche zur Bildung von unabhängigen Domänen führen (Claessens and Gewirth [2004], Kumar et al. [2004], Nilsson et al. [2001]). Die N-terminale Domäne (A/B-Region) ist an der inter- sowie intramolekularen Wechselwirkung des Estrogenrezeptors sowie der Transkription von Genen beteiligt. Die DNA-Binde-Domäne (C in Abb. 1.5) ermöglicht die Dimerisierung des $ER\alpha$ und die anschließende Bindung an die spezifischen ERE-Sequenzen (Estrogen Response Elements) innerhalb der Promoterregionen von Zielgenen. Die Bindung erfolgt dabei mit Hilfe der beiden Zink-Finger Domänen innerhalb des Estrogenrezeptordimers. Durch die D-Region (Hinge-Domäne) wird ebenfalls die Dimerisierung des Rezeptors,

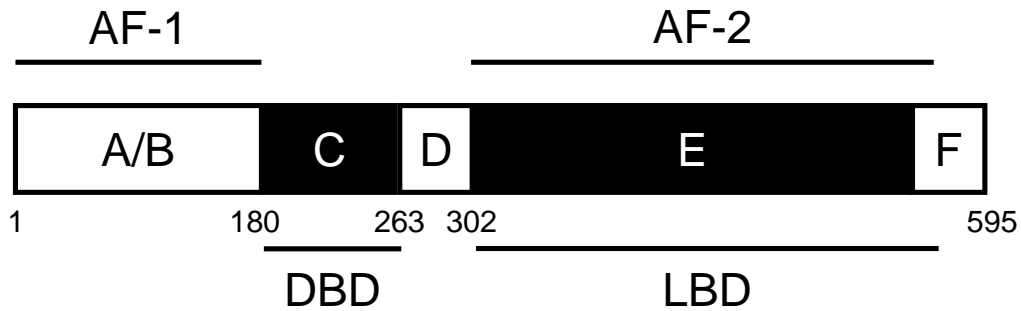


Abbildung 1.5: Organisation der funktionellen Domänen des ER α . Die Positionen der Aminosäuren sind an den Grenzen der jeweiligen Domänen angegeben.

sowie die Bindung des Rezeptors an Chaperone heat-shock Proteine vermittelt. Die „Ligand Binding Domain“ LBD (E/F Region in Abb. 1.5) ermöglicht die Bindung des 17 β -Estradiol und reguliert die Transkription der Zielgene (Nilsson et al. [2001]). Die A/B- und E/F Region des ER α entspricht den beiden spezifische Aktivierungsfunktionen (s. Abschnitt 1.5), die wichtig sind für die Aktivierung der ligandenabhängigen Transkription. Durch Interaktion mit einer Reihe von Kofaktoren wird die Transkription von Zielgenen vermittelt, die keine spezifischen ERE-Sequenzen in ihren Promoterregionen tragen (Björnstrom and Sjöberg [2005]).

1.4 Aktivitäten des ER α

Der Estrogenrezeptor kann das Signal einer Estradiolbindung auf zwei verschiedene Weisen weitervermitteln. Der klassische Mechanismus der Estrogenrezeptoraktivität beinhaltet die Bindung des Estrogens an den Estrogenrezeptor im Kern, was zu einer Dimerisierung des Estrogenrezeptors mit anschließender Bindung an die ERE innerhalb der Promotoren seiner Zielgene führt (Nilsson et al. [2001]). Weiterhin führt die Bindung des Estrogens zu einer Konformationsänderung innerhalb der „Ligand Binding Domain“ (LBD, s. Abb. 1.5) des Rezeptor, wodurch die Bindung von Koaktivatorproteinen ermöglicht wird (Rosenfeld and Glass [2001], Stossi et al. [2006]). In beiden Fällen führt die Interaktion des Estrogenrezeptor mit 17 β -Estradiol zu einer transkriptionellen Aktivierung der assoziierten Gene, indem Koaktivatoren und Komponenten der basalen Tran-

skriptionsmaschinerie rekrutiert werden (Glass and Rosenfeld [2000], McKenna and O'Malley [2002]). Zusätzlich zu den kernständigen Estrogenrezeptoren können die plasmamembranassoziierten Estrogenrezeptoren den sog. nicht-genomischen Signaltransduktionsweg der Estrogenbindung vermitteln (Björnstrom and Sjöberg [2005], Zhang and Trudeau [2006]), was zu Änderungen in der Regulation der Genexpression führt. Abb. 1.7 und Abb. 3.1 stellen schematisch die Interaktionen der Gene im Estrogenrezeptor Signalweg dar.

1.4.1 Die genomische Aktivität des ER α

Direkte Assoziation zu ERE-Sequenzen In grundlegenden Arbeiten wurde die Funktion des ER α als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor beschrieben (Saceda et al. [1988]). Die Bindung von 17 β -Estradiol an den ER α im Kern hat eine Konformationsänderung zur Folge, was zum Lösen des ER α von den Chaperonen führt (Fliss et al. [2000]). Es folgt die Dimerisierung des Rezeptors und damit die Aktivierung der transkriptionellen Domäne des ER α . Der dimerisierte Rezeptor kann nun an spezifische ERE in den Promotorregionen der Zielgene binden (Abb. 1.6) und deren Transkription regulieren (O'Lone et al. [2004]).

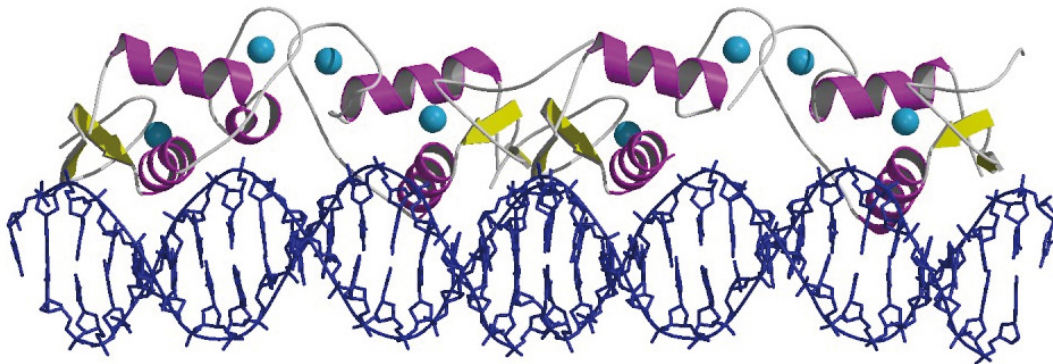


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Bindung des dimerisierten ER α an die ERE der DNA (PDB ID:1HCQ nach Schwabe et al. [1993])

ERE-unabhängige genomische Aktivität Neben der direkten Assoziation des ER α zur DNA aufgrund der Sequenzspezifität der ERE kann der ER α auch indirekt als Transkriptionsfaktor fungieren, ohne direkt an die Ziel-DNA zu binden.

Dazu benötigen die Promotoren, die nicht über eine ERE-ähnliche Sequenz verfügen, einen sekundären DNA-bindenden Transkriptionsfaktor, der durch Interaktion mit dem ER α die Transkription des Zielgens aktiviert. Dieser Mechanismus wird im allgemeinen als „transcriptional cross-talk“ bezeichnet (Gottlicher et al. [1998]). In ca. 35 % der primär als 17 β -Estradiol-abhängig bezeichneten Gene wird die Transkription durch eine indirekte ER α -DNA-Interaktion aktiviert. Die Transkription von Genen, die GC-reiche Promotorsequenzen beinhalten, wird durch Interaktion des ER α mit dem Transkriptionsfaktor SP1 reguliert (Porter et al. [1997]). Zusätzlich kann die Transkription von Zielgenen durch die Interaktion des ER α mit dem Aktivator Protein-1 (AP-1) aktiviert (Gaub et al. [1990], Sabbah et al. [1999], Umayahara et al. [1994], Webb et al. [1995]), aber auch deaktiviert (Philips et al. [1998], Schmitt et al. [1995]) werden (s. Abb. 1.7). Bei der ERE-unabhängigen genomischen Aktivität des ER α ist eine direkte Bindung des ER α an die DNA, wie im Falle der direkten DNA-Assoziation, nicht zwingen notwendig, auch wenn die DNA-Bindedomäne des ER α häufig beteiligt ist (Jakacka et al. [2001]).

1.4.2 Die nicht-genomische Aktivität des ER α

Eine Vielzahl der Effekte, die durch die Estrogene ausgeübt werden, findet aufgrund des Einflusses des ER α auf die Genexpression statt. Diese Einflüsse auf transkriptioneller Ebene treten mit einer Zeitverzögerung von ungefähr zwei Stunden ein (Farach-Carson and Davis [2003], Marino et al. [2005]). Daneben sind jedoch Effekte durch Estrogene bekannt, die sehr schnell stattfinden und somit nicht auf die Aktivierung von bestimmten Genen und darauf folgender Proteinsynthese beruhen können. Diese Effekte werden als nicht-genomische Aktivitäten der Estrogenrezeptoren bezeichnet und sind häufig mit der Aktivierung von unterschiedlichen Protein-Kinase-Kaskaden assoziiert (Losel and Wehling [2003]). Diese sehr schnellen Einflüsse der Estrogenbindung an die Estrogenrezeptoren werden hauptsächlich durch vier Signaltransduktionskaskaden vermittelt: Phospholipase C (*PLC*)/ Protein Kinase-C (*PKC*) (Morley et al. [1992]), RAS/RAFf/MAPK (Klinge et al. [2005], Marino et al. [2002]), Phosphatidylinositol-3 Kinase (*PI3K/AKT*) (Björnstrom and Sjöberg [2005]) und cAMP/ Protein Kinase-A (Picotto et al. [1996]). Diese Signalwege sind sehr eng mit weiteren Signaltransduktionskaskaden verknüpft. Der 17 β -Estradiol- ER α Komplex interagiert mit dem IGF1 Rezeptor, was zu einer Aktivierung dieses Rezeptors

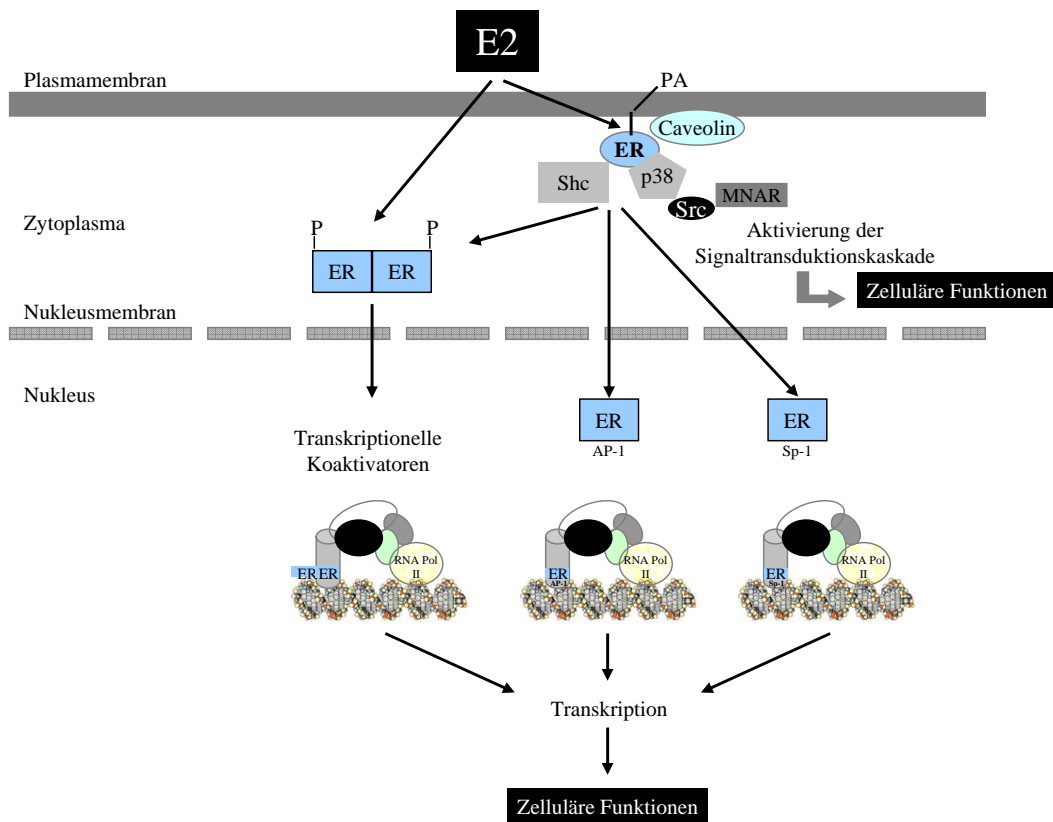


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der verschiedenen Aktivitäten im ER α -Signalweg. Die Palmitoylierung (PA) ermöglicht die Lokalisation des ER α (ER) an der Plasmamembran. Bindung von 17 β -Estradiol (E2) induziert die Relokalisation des ER α , was zur Assoziation von Signalproteinen und der Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden führt. Die Kinasen phosphorylieren den ER α , vermitteln die Bindung von Koaktivatoren und ermöglichen somit die Aktivierung von AP-1 und Sp-1. Nach der Dimerisierung ist der ER α in der Lage, direkt mit den ERE der DNA zu interagieren. Die indirekte Assoziation des ER α mit der DNA wird durch Protein-Protein Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren AP-1 und Sp-1 vermittelt. (AP-1, activating protein-1; MNAR, modulator of non-genomic activity des ER α ; PA, Palmitinsäure; Sp-1, stimulating factor-1)

und damit zur Aktivierung des MAPK Signalwegs führt (Kahlert et al. [2000]). Zusätzlich aktiviert der 17β -Estradiol-ER α Komplex den EGF-Rezeptor durch Involvierung von G-Proteinen, der SRC Kinase und Matrix-Metalloproteinasen, was zu einer Aktivierung des Mapk und Akt Signalwegs führt (Razandi et al. [2003]).

1.5 RNA Interferenz und siRNA

Das Phänomen der RNA Interferenz (RNAi) (Fire et al. [1998]) wurde zuerst in Pflanzen entdeckt und ist in einer Vielzahl von eukaryontischen Organismen bekannt (Tijsterman et al. [2002], Ullu et al. [2004]). Ausgelöst wird die RNAi durch dsRNA Vorläufermoleküle, welche im Zytoplasma der Zelle in kurze, doppelsträngige RNA Moleküle mit einer Länge von 21 bis 28 Nukleotiden prozessiert werden. Diese kurzen RNA-Duplices leiten die Erkennung und unmittelbare Spaltung der komplementären, einzelsträngigen Ziel-RNA ein (Meister and Tuschl [2004]). In Abhängigkeit von ihrer Herkunft bzw. ihrer Funktion wird zwischen drei Typen natürlich vorkommender, kurzer RNAs unterschieden: short interfering RNAs (siRNAs), repeat-associated RNAs (rasiRNAs) und microRNAs (miRNAs). Durch RNA-Matrizen abhängige RNA Polymerisation oder durch Hybridisierung überlappender Transkripte können dsRNA Moleküle natürlich synthetisiert werden, welche anschließend als Quelle für siRNAs und rasiRNAs fungieren können (Meister and Tuschl [2004]). Daneben können aus hairpin-RNA Konstrukten miRNAs prozessiert werden, die anschließend eine Gen-Repression auf Translationsebene vermitteln oder eine Degradation der mRNA einleiten können.

1.5.1 Der Mechanismus der RNA Interferenz

Anfänglich wurde das RNA silencing als ein antiviraler Mechanismus betrachtet, mit dem sich ein Organismus vor der RNA eines Virus schützen (Waterhouse et al. [2001]), oder eine zufällige Integration von transponierbaren Elementen verhindern kann. Die generelle Rolle des Silencings in der Regulation der Genexpression wurde erst erkannt, nachdem in Pflanzen und Tieren die Vorläufermoleküle der miRNAs entdeckt worden waren (Bartel [2004]). In Pflanzen

fungieren die miRNAs analog zu den siRNAs durch Spaltung der mRNA komplementärer Sequenz. Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* hingegen inhibieren miRNAs die Translation, indem spezifisch komplementäre Bereiche der mRNA im Bereich der 3' UTR (nicht-translatierte Region) erkannt werden und die Proteinsynthese durch Inhibition der Elongation unterbunden wird. Abb. 1.8 zeigt schematisch den Mechanismus der RNA Interferenz.

Prozessierung der dsRNA Vorläufer Die Prozessierung von kurzen RNAs innerhalb einer Zelle erfolgt schrittweise durch katalytisch wirksame dsRNA-spezifische RNase-III Typ Endonukleasen. miRNAs werden in Form von langen Primärtranskripten transkribiert und im Kern durch die RNase-III Typ Endonuklease Drosha im Zellkern präprozessiert (Lee et al. [2003, 2002]). Nach erfolgter Präprozessierung trägt die dsRNA eine 5'-Phosphatgruppe und einen zwei Nukleotide langen 3'-Überhang. Die miRNA-Vorläufer werden durch Exportin-5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma geschleust (Bohnsack et al. [2004]) und dort von einer weiteren Endonuklease (Dicer) in die native miRNA prozessiert (Hutvagner et al. [2001]). Durch die Prozessierung der miRNA-Vorläufer durch Dicer entstehen doppelsträngige RNA Moleküle mit einer Länge von 21 Nukleotiden, die, analog zu ihren Vorläufern, eine 5'-Phosphatgruppe sowie einen 3'-Überhang von zwei Nukleotiden besitzen. Die Schritte der Präprozessierung von langen dsRNA Molekülen werden nicht benötigt, wenn chemisch synthetisierte siRNA, die in ihrer Struktur den miRNAs entsprechen, gezielt zur RNA Interferenz in das Zytoplasma einer Zelle eingebracht werden.

Zusammensetzung des Silencing Komplexes Die frei im Zytoplasma verfügbaren doppelsträngigen siRNAs oder miRNAs werden nach der Dicer-Prozessierung in den sog. **RNA Induced Silencing Complex (RISC)** eingebunden (Hammond et al. [2000]). Es wird zwischen einem siRNA enthaltenden RISC Komplex und einem miRNA enthaltenden miRNP (micro ribonuclear particle) (Mourelatos et al. [2002]) unterschieden. Jeder RISC oder miRNP enthält ein Protein aus der Argonaut (Ago) Familie, welches wahrscheinlich direkt an die RNA bindet (Mourelatos et al. [2002]). Durch die Bildung des RISC oder miRNP werden die doppelsträngigen siRNA oder miRNA Moleküle unter ATP-Verbrauch entwunden und in Form ihrer einzelsträngigen Analoga in die Komplexe eingebaut. Dabei ist eine Neigung zum ausschließlichen Einbau des zur Ziel-

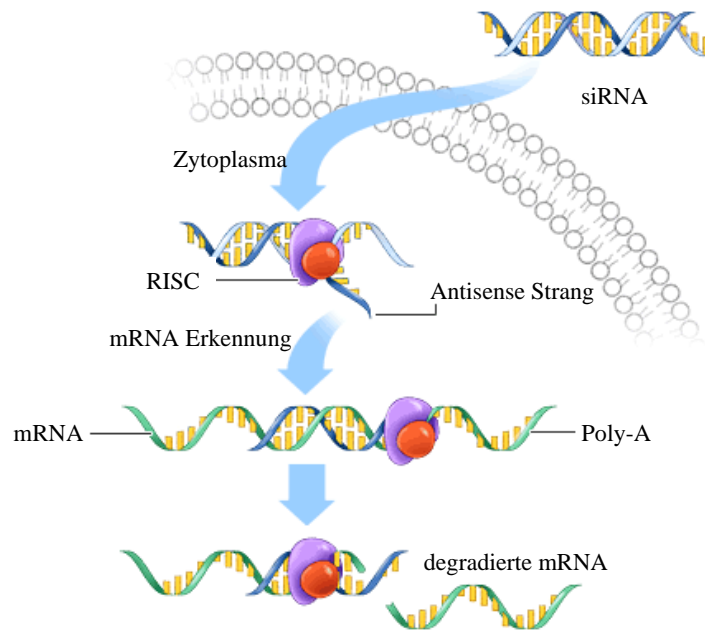


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der RNA Interferenz

RNA komplementären antisense-Strang der siRNA oder miRNA zu beobachten (Schwarz et al. [2003]).

mRNA Spaltung und translatorische Hemmung Die einzelsträngige siRNA des RISC vermittelt die sequenzspezifische Degradation der komplementären, oder nahezu komplementären Ziel-mRNA (Martinez et al. [2002]). Dabei wird die mRNA durch den RISC in der Mitte, zehn Nukleotide stromaufwärts des mit dem 5'-Ende gepaarten Nukleotids der siRNA, gespalten (Elbashir et al. [2001]). Der RISC Komplex katalysiert die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung in der Ziel-RNA, was zu einer Freisetzung von zwei Molekülen mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylterminus führt (Martinez and Tuschl [2004]). Die Spaltungsreaktion durch den RISC ist ATP-unabhängig (Nykänen et al. [2001]) und die siRNA geht unverändert aus der Spaltungsreaktion hervor. Durch Bindung des miRNP Komplexes an die Ziel-RNA wird die translatorische Elongation gehemmt, wodurch eine Reduktion der Proteinmenge ohne Veränderung der mRNA-Konzentration erreicht wird (Bartel [2004]).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Durchführung von *in vitro* RNA-Interferenz Experimenten zur gezielten, post-transkriptionellen Genstilllegung von spezifischen Genen mit Relevanz in der Entwicklung und Progression von metastasierenden Mammakarzinomen. Dazu mussten in vorbereitenden Experimenten die Bedingungen für die RNA Interferenz in der Brustkrebszelllinie MCF-7 entsprechend der Fragestellung etabliert werden. Die Zelllinie stellt einen idealen Modellorganismus für Untersuchungen des Estrogenrezeptor Signalwegs in Mammakarzinomen dar, da sowohl der $ER\alpha$ als auf der $ER\beta$ expriert wird. Durch die Auswahl der Gene für die RNA Interferenz Experimente (s. Abschnitt 3.1) wurde die Anknüpfung der zu erhebenden Daten an bisher bekannte Singaltransduktionswege in hormonabhängigen Mammakarzinomen erreicht. Die Datenerfassung erfolgte durch die Technologie der cDNA-Microarrays und anschließender statistischer Auswertung der erhaltenen Datensätze. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Bioinformatikern neue Algorithmen zur Rekonstruktion von Gen-Interaktionsnetzwerken entwickelt. Durch die Analyse der Messdaten sollen bisher unbekannte Gen-Gen-Interaktionen mit Bezug auf die Entwicklung von hormonabhängigen Mammakarzinomen sowie mögliche therapeutische Zielgene evaluiert werden. Mit Hilfe von kombinatorischen post-transkriptionellen Genstilllegungen von jeweils zwei Genen soll durch Epistaseanalyse die rekonstruierte Netzwerkhypothese validiert werden. Weiterhin sollen durch plattformübergreifende Vergleiche der aufgenommenen Expressionsprofile vorhergesagte Positionen einzelner Gene innerhalb des rekonstruierten Netzwerks überprüft werden.

2 Material und Methoden

Vor einer ausführlichen Beschreibung der durchgeführten Experimente im Rahmen dieser Dissertation werden im Folgenden die verwendeten Zelllinien, Materialien sowie Reagenzien mitsamt der Bezugsquellen aufgelistet. Bezugsquellen der nicht im Folgenden aufgelisteten Materialien sind direkt im Text vermerkt. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „pro Analysis“.

2.1 Zelllinien

- MCF-7 HTB-22, American Type Culture Collection, LGC Prochem, Wesel
- HeLa CCL-2, American Type Culutre Collection, LGC Prochem, Wesel

2.2 Chemikalien

- 5 M Ammoniumacetat, Ambion, Austin, Texas, USA
- 0.5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8, Ambion, Austin, Texas, USA
- 5 M Essigsäure, Riedel-deHaen, Seelze
- 1 M Natronlauge, Roth GmbH, Karlsruhe
- 1,4-Bis(sulfanyl)butan-2,3-diol (DTT), Karlsruhe
- Ethanol absolut, Riedel-deHaen, Seelze
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- DIG-Easy, Roche Diagnostics, Mannheim
- 0,25 % Trypsin-EDTA, Invitrogen, Karlsruhe
- 17 β -Estradiol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Tamoxifen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.3 Puffer, Medien, Reaktionslösungen und Enzyme

- 2x ABsolute QPCR Rox Mix, Thermo (ABgene), Epsom, UK
- 5x RT-Puffer, Invitrogen, Karlsruhe
- HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen, Hilden
- SuperScript III RNase-H, Invitrogen, Karlsruhe
- RNasin, Promega, Madison, Wisconsin, USA
- 20x SSC, 300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7
- 2x Hybridisierungspuffer, 2x DIG-Easy, 10x Denhardts Reagenz, Cot-1-DNA (2 ng/ μ l)
- 50 x Denhardts Reagenz, Ficoll (Typ 400, Serva), Polyvinylpyrrolid (Merck), BSA (Fraktion V; Roche)
- Spottingpuffer, 3x SSC, 1,5 M Betain
- GIBCO DPBS, Invitrogen, Karlsruhe
- GIBCO MEM 1x, Invitrogen, Karlsruhe
- GIBCO OptiMem 1x, Invitrogen, Karlsruhe
- GIBCO PEN-STREP, 5000 U/ml Penicillin, 5000 μ g/ml Streptomycin, Invitrogen, Karlsruhe
- GIBCO MEM NEAA 100x, Invitrogen, Karlsruhe
- Fetal Bovine Serum, Invitrogen, Karlsruhe
- Insulin Bovine, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.4 Reaktionskits

- Reverd Aid H-Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada
- Low RNA Input Linear Amplification Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- RNA 6000 Nano Lab Chip Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
- RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen, Hilden
- WST-1 Assay, Roche Diagnostics, Mannheim

2.5 Nukleotide und Nukleinsäuren

- RNA 6000 Ladder, Ambion, Austin, Texas, USA
- Human Cot-1-DNA, Invitrogen, Karlsruhe
- Random Hexamere Primer, MWG, Ebersberg
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Peqlab Biotechnologie, Erlangen
- Cy3-dCTP, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
- Cy5-dCTP, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

2.6 „Assay on Demand“ für TaqMan qRT-PCR-Analysen

Die in Tabelle 2.1 verwendeten „Assay on Demand“ Sonden für die TaqMan Analysen (s. Abschnitt 2.14) wurden von Applied Biosystems, Darmstadt bezogen.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Verwendete TaqMan-Assays

Gen Symbol	Assay ID	Gen Name
<i>AKT1</i>	HS00178289_m1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<i>AKT2</i>	HS00609846_m1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
<i>BCL2</i>	HS00153350_m1	BCL2-antagonist of cell death
<i>CCNG2</i>	HS00171119_m1	cyclin G2
<i>ESR1</i>	HS00174860_m1	estrogen receptor 1
<i>FOXA1</i>	HS00270129_m1	forkhead box A1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>HSPB8</i>	HS00205053_m1	heat shock 22kDa protein 8
<i>MAPK1</i>	Hs01046830_m1	mitogen-activated protein kinase 1
<i>STAT5B</i>	Hs00560035_m1	signal transducer and activator of transcription 5B
<i>STC2</i>	HS00175027_m1	stanniocalcin 2
<i>TMEM45B</i>	HS00431155_m1	transmembrane protein 45B
<i>TP53</i>	Hs00153349_m1	tumor protein p53
<i>XBP1</i>	HS00231936_m1	X-box binding protein 1

2.7 siRNAs

Für die selektiven post-transkriptionellen Genstilllegungen im Rahmen dieser Dissertation wurden chemisch synthetisierte siRNAs mit einer Länge von 21 Nukleotiden der Firmen Dharmacon, Lafayette, Collorado, USA sowie Qiagen, Hilden, Deutschland verwendet. Die jeweiligen Squeenzen und ID-Nummern der einzelnen siRNAs sind in Tabelle 2.2 zu finden.

Tabelle 2.2: Verwendete siRNA von Qiagen und Dharmacon

Gen Symbol	siRNA ID	antisense Sequenz 5' - 3'
<i>AKT1</i>	SI00299159	GUGGGUCUGGAAAGAGUACtt
<i>AKT1</i>	SI00299145	UCUUGGUCAGGUGGUGUGAtt
<i>AKT2</i>	SI00299173	AAUUCAUCAUCGAAGUACCtt
<i>AKT2</i>	SI00287672	UUCAUGGUCACUUUAGCCCgt
<i>BCL2</i>	SI00299397	UCUGCGACAGCUUAUAAUGga
<i>BCL2</i>	SI00299418	CUUCAUCACUAUCUCCCGGtt
<i>CCNG2</i>	SI00063021	UAUAAUAGUAUGGUAUAAGtg

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.2 – Fortsetzung Tabelle 2.2

Gen Symbol	siRNA ID	antisense Sequenz 5' - 3'
<i>CCNG2</i>	SI00063028	UUAAGGAUUAUCCACUGUCcc
<i>CCNG2</i>	SI00063014	UAGCCUAAUUAUUUCUGCCtt
<i>ESR1</i>	SI00002527	UUUGCACAUAAAGAUUGUCtg
<i>ESR1</i>	SI00002520	UUUAAGUACUGGUCUCCCGag
<i>ESR1</i>	SI00002513	UUGGCUUAAACAUCACUCCag
<i>ESR1</i>	SI00002506	UUGGUGUUGGAUGCAUGCCgg
<i>FOXA1</i>	SI00420476	UUUAAUUACAAUCACAUUGat
<i>FOXA1</i>	SI00420483	UUUAUUUAGCUGUUGACGGtt
<i>FOXA1</i>	SI00420490	UUCACAGUCCUAACAUCCTg
<i>HSPB8</i>	SI02224502	UUCAUUAACCAAACCAUGCgg
<i>HSPB8</i>	SI02224509	UUUCAUUAACCAAACCAUGCg
<i>MAPK1</i>	SI00300755	UCUUGAUAGCUACUCGAACtt
<i>MAPK1</i>	SI00300762	UGGUGCUCGAAUAAUGUCAtt
<i>STAT5B</i>	SI00100394	UUCAUUGUACAAUUAUUGGcg
<i>STAT5B</i>	SI00100408	UAAUUCAAGUCUCCCAAGCgg
<i>STC2</i>	SI00055013	UUGGUAAUUAACCUCCCGUCgg
<i>STC2</i>	SI00055020	UUCUCCUGCAUUCUAAGCGat
<i>STC2</i>	SI00055027	AAAGGUACGAGGAUAACGCgg
<i>TMEM45B</i>	SI00472367	UUUCUAAUAAGAAAGUACCtg
<i>TMEM45B</i>	SI00472374	UUGAUUUCUCUUGACACUGag
<i>TP53</i>	SI02623747	UUAGGUACUAAGGUCGACcdA
<i>TP53</i>	SI02623754	UGAACCAUUGUUCAAUUUCdG
<i>TP53</i>	SI02655170	UAACCCUCACAAUGCACUCdT
<i>TP53</i>	SI04384079	UUCAGCUCUCGGAACAUCUdC
<i>XBP1</i>	SI02656661	UCAAUUAUAGUAAUUAUUUCtt
<i>XBP1</i>	SI00763833	UAAAUUUCUAUAAUUUCACaa
<i>XBP1</i>	SI00763840	UUCAUUAUUGGCUUCCAGCtt
non-silencing Control	SI1022076	ACGUGACACGUUCGGAGAA
<i>ESR1</i>	D-003401-01	UCUCUAGCCAGGCACAUUCUU
<i>ESR1</i>	D-003401-02	AAGGUUGGCAGCUCUCAUGUU
<i>ESR1</i>	D-003401-03	UACUGGCCAAUCUUUCUCUUU
<i>ESR1</i>	D-003401-09	CUUCUUAFAFCFUUGAUCUU

2.8 Kultivierung und Passagierung von MCF-7 Zellen

Die Zellen der humanen, epithelialen Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 wurden in MEM Medium, ergänzt mit 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) nichtessentiellen Aminosäuren (GIBCO MEM NEAA 100x), 5 mg Rinderinsulin sowie 25.000 U Penicillin und 25 mg Streptomycin kultiviert. Um die Zellen kontinuierlich in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 geteilt und in frisches Kulturmedium überführt. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass die Konfluenz der Zellen stets unter 80% lag. Zum Splitten der Zellen wurde zuerst das Medium vollständig entfernt, die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen und anschließend durch 3 minütige Inkubation bei 37°C mit 3 ml 0,25% Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Durch Zugabe von 3 ml Medium wurde das Trypsin deaktiviert und die Zellen in geeigneter Dichte in neue Gewebekulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte in Greiner Bio-one Gewebekulturflaschen (250 ml) mit einer Bodenfläche von 75 cm² im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. Um für alle Experimente Zellen der gleichen Ursprungszelllinie zu verwenden, wurden zu Beginn aller Arbeiten Kryokulturen der MCF-7 Zellen in DMSO-haltigem Einfriermedium angelegt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Innerhalb einer Experimentreihe wurden die Zellen maximal bis zur Passage 15 verwendet.

2.9 Transfektion humaner epithelialer Mammakarzinomzellen

Zur gezielten Verringerung der mRNA Konzentration bestimmter Gene wurden chemisch synthetisierte siRNA (small interfering RNA) verwendet ([Caplen et al. \[2001\]](#)). Für die Transfektion wurden 3×10^5 MCF-7 Zellen/well in 6-well Kulturplatten (Nunc Δ Surface, Nunc, Roskilde, Dänemark) in antibiotikafreiem Medium ausgesät und 24 h präinkubiert. Die Transfektionen erfolgten mit einer Endkonzentration der siRNA von 50 nM in einem Volumen von 2400 μ l. Die jeweiligen siRNAs wurden zusammen mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben vermischt und für 10 min inkubiert.

2.10 Stimulation von Mammakarzinomzellen mit endokrinen Substanzen

Anschließend wurden die Transfektionskomplexe tropfenweise zu den präinkubierten Zellen hinzugegeben und für weitere 42 h bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Transfektion wurde durch Entfernen des Mediums und Waschen mit DPBS gestoppt. Anschließend erfolgte die Isolierung der total RNA (s. Abschnitt [2.12.1](#)).

2.10 Stimulation humaner, epithelialer Mammakarzinomzellen mit endokrinen Substanzen

Für eine gezielte Stimulation des Estrogenrezeptors (ESR1) in den verwendeten MCF-7 Zellen wurden diese mit dem endokrinen Steroidhormon 17 β -Estradiol behandelt. Dazu wurden die Zellen in phenolrotfreiem Medium GIBCO RPMI (Invitrogen, Karlsruhe) mit identischen Zusätzen wie in [2.8](#) für 66 h präinkubiert und anschließend für 3 h mit 10 nM 17 β -Estradiol behandelt. Danach erfolgte, analog zu [2.9](#), die Isolation der total RNA (s. Abschnitt [2.12.1](#)).

2.11 Behandlung humaner, epithelialer Mammakarzinomzellen mit Tamoxifen

Analog zu [2.10](#) erfolgte eine gezielte Inhibition des Estrogenrezeptors (ESR1) in den verwendeten MCF-7 Zellen durch Behandlung mit dem Selektiven Estrogen Rezeptor Modulator (SERM). Die Inhibition wurde in MEM Kulturmedium (analog zu [2.8](#)) nach 24-stündiger Präinkubation für 48 h mit einer Endkonzentration von 100 nM durchgeführt. Anschließend erfolgte die Isolation der total RNA (s. Abschnitt [2.12.1](#)).

2.12 Isolation, Aufreinigung, Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrollen von Nukleinsäuren

2.12.1 Isolation von total RNA aus eukaryontischen Zellen aus Zellkultur

Die Zellen wurden nach erfolgter Transfektion und Entfernen des Kulturmediums mit DPBS gewaschen und unmittelbar durch Zugabe von 350 μl RLT Puffer (aus RNeasy-Kit, Qiagen, Hilden) in der Kulturschale lysiert. Das Zelllysate wurde in nucleasefreie Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, mit 350 μl 70% (v/v) Ethanol versetzt und auf die RNeasy-Isolationssäulen pipettiert. Die Isolation der total RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Die Elution der total RNA erfolgte durch zweimalige Zugabe von jeweils 50 μl nucleasefreiem Wasser.

2.12.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Erhöhung der Konzentration der RNA-Lösung wurde eine Präzipitation mit 1/10 (v/v) 5 M NH_4OAc und 2,5 (v/v) 100% Ethanol bei -20°C über Nacht durchgeführt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation (Biofuge fresco, 4°C , 16000 x g , 60 min) sedimentiert, nach Entfernen des Überstandes mit 500 μl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (4°C , 16000 x g , 30 min) und nach erneuter Entfernung des Überstandes im Heizblock bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde die präzipitierte RNA in einem geeigneten Volumen nucleasefreiem Wasser aufgenommen.

2.12.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der total RNA Konzentration erfolgte durch Aufnahme des Absorptionsspektrums der wässrigen Nukleinsäurelösung zwischen 230 nm und 280 nm mit Hilfe eines NanoDrop ND-1000 UV/VIS Spectrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Die Umrechnung der Extinktionswerte in die jeweiligen Konzentrationen erfolgte automatisch durch

2.13 Erststrangsynthese von komplementärer DNA (cDNA-Synthese)

die Software des Geräteherstellers anhand des Lambert Beer'schen Gesetzes. Zusätzlich zur Konzentration wurde die Reinheit der isolierten Nukleinsäurelösung durch Bildung der Quotienten der Extinktionen bei 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm bestimmt.

2.12.4 Qualitätskontrolle von isolierter total RNA

Durch die Omnipräsenz von RNasen und die Instabilität der RNA ist eine Qualitätskontrolle der isolierten total RNA vor weiteren Analyseschritten zwingend notwendig. Die microfluidbasierte Analyse der RNA-Integrität mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) bietet eine schnelle und einfache Bestimmung der Konzentration sowie der Integrität der isolierten total RNA. Die Aufbreitung der Proben erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Analyse liefert ein Elektropherogramm sowie einen Wert für die RNA-Integrität (RIN-Wert). Nur Proben mit einem RIN-Wert ≥ 8 wurden für weitere Analysen verwendet. Ein Beispiel einer RNA Probe hoher Integrität ist in Abb. A.1 im Anhang A.1 zu finden.

2.13 Erststrangsynthese von komplementärer DNA (cDNA-Synthese)

Eine Erststrangsynthese komplementärer DNA (cDNA) erfolgte unter Verwendung des RevertAidTM H-Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas. Dazu wurden 10 - 1000 ng der extrahierten total RNA aus 2.12.1 mit 500 ng oligo(dT)₁₈-Primer versetzt, für 5 min bei 70°C (Biometra T-Personal PCR-Cycler) inkubiert und anschließend auf Eis auf 4°C abgekühlt. Nach Zugabe von 8 μ l Master-Reaktionsmix (4 μ l 5x Reaktionspuffer, 2 μ l 10 nM dNTP-Mix, 20 U RiboLockTM und 200 U RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase) wurde die Erststrangsynthese für 60 min bei 42°C durchgeführt und durch Erhitzen auf 70°C für 10 min (Hitzenaturierung der Reversen Transkriptase) gestoppt. Die erhaltene cDNA-Lösung wurde direkt zur quantitative *realtime*-PCR verwendet.

2.14 quantitative *realtime*-PCR (TaqMan)

Die TaqMan *realtime*-PCR bietet die Möglichkeit, die relative Expression einzelner Gene in kurzer Zeit mit einer sehr hohen Sensitivität zu bestimmen. Zur Quantifizierung einer cDNA wird dabei eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte sequenzspezifische Sonde eingesetzt, welche am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat) trägt. Solange sich diese beiden Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander befinden, kommt es zu einer Fluoreszenzauslöschung durch Quenching trotz Anregung. Die im qRT-PCR Mastermix enthaltene DNA-Polymerase besitzt eine Exonukleaseaktivität und entfernt bei der DNA Polymerisation die sequenzspezifische Sonde von der cDNA Matrize. Die Restriktion der TaqMan-Sonde führt zu einer räumlichen Trennung von Fluoreszenz- und Quencherfarbstoff. Nicht gebundene TaqMan-Sonden werden von der matrizenabhängigen DNA-Polymerase nicht gespalten. Dadurch ergibt sich eine zur cDNA-Konzentration direkt proportionale Zunahme der Fluoreszenz, welche geräteintern (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) in Anhängigkeit der durchlaufenen PCR-Zyklen registriert wird.

2.14.1 Bestimmung der relativen Genexpression nach quantitativer *realtime*-PCR ($\Delta\Delta C_t$ -Methode)

Die in 2.13 hergestellten cDNA-Lösungen konnten ohne weitere Aufreinigungsschritte zur quantitativen *realtime*-PCR Reaktion eingesetzt werden. Dazu wurden mind. 10 ng cDNA pro Reaktion in 5 μ l nukleasefreiem Wasser vorgelegt und die sequenzspezifische TaqMan-Sonde (0,5 μ l TaqMan-Sonde, 5,5 μ l qRT-PCR MasterMix) hinzugegeben. Die qRT-PCR Reaktion wurde im 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) Thermocycler für 40 Reaktionszyklen durchgeführt. Anschließend wurden die Ct-Werte mit Hilfe der SDS-Software (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) für die gesamte Reaktion anhand der Messdaten bestimmt. Zur Minimierung der Standardabweichung wurden alle Proben in Triplikaten aufgetragen und die mRNA Konzentrationen der jeweiligen Gene sowie des Housekeeping-Gens GAPDH (für die Normalisierung) bestimmt. Um eine Änderung der Expression eines Gens als Folge der Behandlung mit einer spezifischen siRNA zu bestimmen, wurden zusätzlich cDNA Proben aus mit Kontroll-siRNA

transfizierten Zellen aufgetragen. In einem ersten Auswerteschritt wurden zuerst für jede Probe die Mediane der GAPDH Ct-Werte ($Ct_{H,j}$) der Probentriplikate erstellt und von den Medianen der Probentriplikate der Ct-Werte ($Ct_{i,j}$) des zu bestimmenden Gens subtrahiert (ΔCt) (Gl. (2.1)).

$$\Delta Ct_{i,j} = Ct_{i,j} - Ct_{H,j} \quad \text{Gl. (2.1)}$$

In einem zweiten Schritt wurden für jedes Gen die auf die GAPDH Expression normalisierten Expressionswerte der Kontrolltransfektionen ($\Delta Ct_{i,R}$) von den ΔCt -Werten der jeweiligen Transfektionen ($\Delta Ct_{i,j}$) subtrahiert. Diese Berechnung ergaben die $\Delta\Delta Ct$ -Werte (Gl. (2.2)).

$$\Delta\Delta Ct_{i,j} = \Delta Ct_{i,j} - \Delta Ct_{i,R} \quad \text{Gl. (2.2)}$$

Die Änderungen des mRNA Expressionsniveaus nach Behandlung mit einer sequenzspezifischen siRNA gegenüber dem Expressionsniveau der gleichen mRNA, nach Behandlung mit einer Kontroll-siRNA, normalisiert gegen das Expressionsniveau des Houskeeping-Gens GAPDH, ergibt sich demnach aus Gl. (2.3).

$$\text{Expressionsniveau}_{i,j} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{Gl. (2.3)}$$

Expressionsniveaus >1 zeigen eine Überexpression der gemessenen mRNA in den transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollen an. Expressionsniveaus <1 entsprechen demnach einer geringeren Expression der jeweiligen mRNA in den transfizierten Zellen.

2.15 Biochemische Methoden

2.15.1 Zell-Lebensfähigkeits Assay WST-1

Mit Hilfe des WST-1 Proliferation Assays kann auf die Lebensfähigkeit der Zellen innerhalb des Experiments geschlossen werden. Der Assay beinhaltet

2 Material und Methoden

ein Tetrazoliumsals (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat), welches durch mitochondriale Dehydrogenasen reduziert wird (s. Abb. 2.1). Die Reduktion des hellroten Tetrazoliumsals zum tiefroten Formazan ist direkt proportional zur Anzahl an metabolisch aktiven Zellen innerhalb einer Kultur. Die Produktion des Formazans durch die metabolisch aktiven Zellen kann spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 450 nM bestimmt werden (Berridge et al. [1996]). Die Zellen wurden zur Mes-

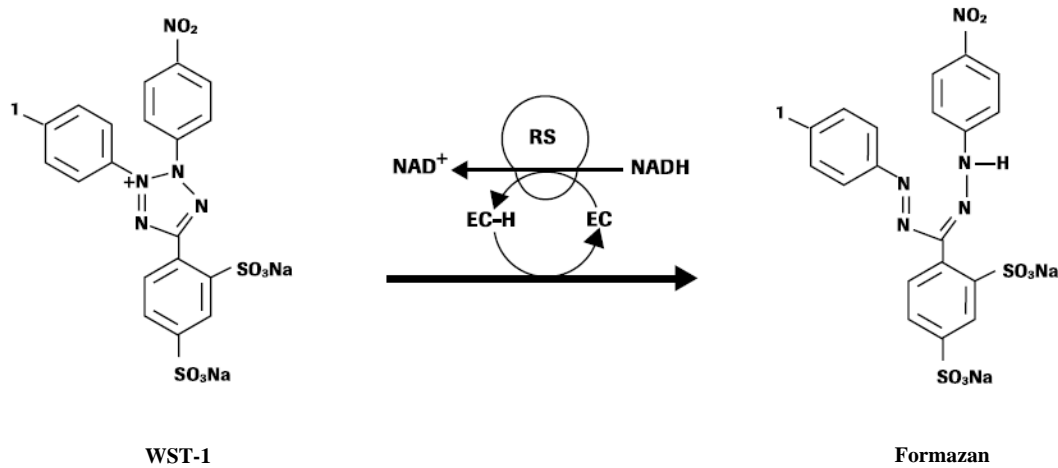


Abbildung 2.1: Spaltung des Tetrazoliumsals WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonat) in Formazan. EC = Elektronen-koppelndes Reagenz RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase System

sung der Lebensfähigkeit wie unter 2.9 beschrieben kultiviert und mit unterschiedlichen siRNA Konzentrationen (10 nM, 50 nM und 100 nM) transfiziert. Nach 42 h Inkubation wurde die Zellebensfähigkeit mit Hilfe des WST-1 Assays nach den Angaben des Herstellers spektrophotometrisch gemessen.

2.16 cDNA Microarray-Technologie

2.16.1 Herstellung von humanen, genomweiten cDNA-Microarrays

Im Rahmen dieser Dissertation wurden genomweite cDNA-Microarrays (DeRisi et al. [1996], Schena et al. [1995, 1996], Shalon et al. [1996]) auf Basis des

RZPD Unigene 3.1 cDNA Satz hergestellt. Der RZPD Unigene 3.1 cDNA Satz enthält 37500 annotierte Gene und EST. Vorbereitend für das Spotting der cDNA-Microarrays wurden Hochdurchsatz-PCRs der Klone durchgeführt und die aufgereinigten PCR Produkte für das Spotting vorbereitet. Anschließend wurden die in Spottingpuffer (3x SSC, 1,5 M Betain) gelösten PCR-Produkte mittels des VersArray ChipWriterTM Pro Arrayer (Bio-Rad, München) nach einem programmierten Verfahren auf mit Epoxysilan beschichtete Nexterion E Slides (Schott, Jena) transferiert. Die einzelnen PCR-Produkte wurden dabei parallel mit 48 Split-Pin ArrayIt 946 MP3 Spotting Nadeln (ArrayIt, Sunnyvale, Kalifornien, USA) auf insgesamt 108 Slides übertragen. Die Spottingnadeln besaßen ein Aufnahmevolumen von 0,35 μ l und ein Abgabevolumen von 0,7 nl was zu einem Spottedurchmesser von ca 90 μ m führte. Pro Nadel wurde ein Grid von 28x29 Spots produziert, was zu einer maximalen Zahl von 38976 Spots auf einem Array führte. Vor jedem Spottingdurchlauf wurde überschüssiges PCR-Produkt auf einem Blottingpad entfernt um gleichmässige Spots auf allen Slide-replikaten zu erhalten. Nach jedem Spottingzyklus wurden die Nadeln einem intensiven Wasch- und Sonifizierprogramm unterzogen um eine Kreuzkontamination der einzelnen PCR-Produkte zu verhindern. Die gesamte Spottingprozedur wurde bei 22°C Raumtemperatur und einer Luftfeuchte von 42% unter staubfreien Bedingungen durchgeführt.

2.16.2 Nachbehandlung der gespotteten cDNA-Microarrays

Vor einer Verwendung der gespotteten cDNA-Microarrays zur Hybridisierung mussten diese einer speziellen Nachbehandlung unterzogen werden, wobei nicht gebundenes PCR Produkt entfernt und die DNA denaturiert wurde. Zu Beginn der Nachbehandlung wurden die Arrays in einem ersten Schritt für eine Minute mit Wasserdampf bei 37°C rehydriert und anschließend sofort mit der Rückseite für 10 sec auf eine 100°C Ceranheizplatte gelegt. Durch diese Prozedur wurden die Nukleinsäuren kovalent an die Epoxysilanoberfläche der Glasslides gebunden (Chiu et al. [2003], Conzone and Pantano [2004]). Nach vollständigem Trocknen wurden die Chips 2 min in 0,2% (w/v) SDS-Lösung und anschließend 2 min in aqua bidest gewaschen (beide Waschschrte erfolgten bei Raumtemperatur). Zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Spots auf den DNA-Chips wurden diese für 1,5 min in 95 °C heißem Wasser inkubiert und die danach vorliegenden Einzelstränge durch sofortige Inkubation in kaltem Ethanol (absolut)

fixiert. Anschließend wurden die Chips durch Zentrifugation (50 x *g*, 6 min, RT) in einer Eppendorf 5810R Zentrifuge getrocknet und bis zur weiteren Verwendung staubfrei gelagert.

2.16.3 Lineare Amplifikation isolierter mRNA

Zur linearen Amplifikation der isolierten mRNA aus den MCF-7 Zellen wurde das Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 1,5 - 2 μg isolierte und aufgereinigte total RNA aus 2.12.2 in einem ersten Schritt revers transkribiert. Anschließend erfolgte die lineare Amplifikation der erstellten cDNA durch zweistündige Inkubation. Nach erfolgter Amplifikation wurden die überschüssigen, nicht eingebauten Nukleotide durch Grössenausschluss entfernt und das Eluat einer Nukleinsäurepräzipitation unterzogen (s. Abschnitt 2.12.2). Alle amplifizierten RNA Proben wurden vor der Fluoreszenzmarkierung einer Qualitätskontrolle unterzogen (s. Abschnitt 2.12.4). Nur aRNA hoher Qualität wurde für die weiteren Schritte verwendet. Abschnitt A.2 zeigt ein Messdiagramm einer amplifizierten RNA hoher Integrität. Die aufgereinigte und amplifizierte RNA konnte anschließend direkt zur Fluoreszenzmarkierung (s. Abschnitt 2.16.4) eingesetzt werden.

2.16.4 Fluoreszenzmarkierung amplifizierter RNA

Vor einer Hybridisierung der in 2.16.3 erstellten aRNA muss diese in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden, wobei zeitgleich fluoreszenzmarkierte Cytidin-Derivate (Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP) in die neu synthetisierte, einzelsträngige cDNA eingebaut wurden. Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des Enzyms SuperScriptTM III (Invitrogen, Karlsruhe). Dabei wurden jeweils gleiche Mengen der zu vergleichenden aRNA-Proben eingesetzt. Für die Reaktion wurden 2 μg aRNA zusammen mit 500 μg Random Hexamer Primer (MWG, Ebersberg) in einem Gesamtvolumen von 6,25 μl gelöst, für 10 min bei 70°C zur Denaturierung inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach vollständiger Abkühlung der Proben wurden mit 2,5 μl 5x RT-Erststrangpuffer, 1,25 μl 0,1 M DTT, 0,5 μl RNasin (20 U), 0,5 μl SuperScriptTM III Reverse Transkriptase (100 U), 1 μl Nukleotidmix (dATP,

dGTP, dTTP; jeweils 5 mM) und 1 μ l 3 mM dCTP hinzugefügt. Zusätzlich wurde zur Fluoreszenzmarkierung jeweils 0,5 μ l dCTP-Cy3 bzw. dCTP-Cy5 zugesetzt. Die Reaktion erfolgte durch Inkubation für 60 min bei 42°C und wurde durch Zugabe von 1,25 μ l 50 mM EDTA pH 8 beendet. Durch Hinzufügen von 5 μ l 1 M Natronlauge, Inkubation für 10 min bei 60°C und anschließender Neutralisation mit 1 μ l 5M Essigsäure wurde die aRNA hydrolysiert. Die Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten cDNA erfolgte über YM-30 Zentrifugationssäulchen (Millipore), wobei die zu vergleichenden Proben in ein Endvolumen von 15 μ l eluiert wurden. Die Proben wurden anschließend direkt zur Hybridisierung der cDNA-Microarrays eingesetzt (s. 2.16.5)

2.16.5 Hybridisierung von cDNA-Microarrays

Die in 2.16.4 hergestellten Cy3- und Cy5-markierten cDNA-Sonden wurden zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel gleichzeitig auf einen DNA-Chip gebracht und mit der dort vorhandenen DNA der PCR-Produkte hybridisiert. Dazu wurden die fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben mit aqua bidest auf ein Volumen von 25 μ l aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen 2x Hybridisierungspuffer auf ein Endvolumen von 50 μ l verdünnt. Die Hybridisierungssonden wurden für 2 min bei 65°C denaturiert und nach Abkühlen auf den Microarray pipettiert. Die Sonde wurde dabei zwischen den Glasobjektträger mit der immobilisierten cDNA und einem speziellen Deckgläschen (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA) blasenfrei pipettiert und der Microarray zur Inkubation im Wasserbad (37°C, über Nacht) in eine Hybridisierungskammer (Corning, New York, USA) verbracht. Nach der Hybridisierung erfolgte ein stringentes Waschen in 1x SSC mit 1% SDS, 0,1x SSC mit 0,1% SDS und daran anschließend in 0,05x SSC zum Entfernen unspezifisch gebundener fluoreszenzmarkierter cDNA. Nach Trocknung des Chips durch Zentrifugation (5 min, 50 x g) wurde die Fluoreszenz der einzelnen DNA-Spots auf der Microarray Oberfläche durch laserinduzierte Anregung der fluoreszenzmarkierten dCTP-Analoga bestimmt.

2.16.6 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenzsignale von hybridisierten cDNA-Microarrays

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Spiegel wurden die Fluoreszenzintensitäten der Cy3 und Cy5 markierten, hybridisierten cDNA-Sonde auf dem cDNA-

Microarray nach Laseranregung gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Menge an gebundener, fluoreszenzmarkierter cDNA. Die Messung der orts aufgelösten Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung und stringentem Waschen der Chips erfolgte mit einem GenePix 4000B Microarray Laserscanner (Axon Inc., Union City, Kalifornien, USA). Die Anregung von Cy3-dCTP erfolgte mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 532 nm (Messung der Emission bei 570 nm), die Anregung von Cy5-dCTP mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 635 nm (Emission bei 670 nm); die Detektion der Fluoreszenz erfolgte geräteintern über lichtempfindliche Kathoden. Im Rahmen der Messung wird das Bild in Bildpunkte der Größe $10 \times 10 \mu\text{m}$ bezogen auf die Originalgröße des gescannten Microarray unterteilt. Die Datenaufnahme erfolgte in Form einer 16-bit-TIFF-Datei und die aufgezeichneten Fluorogramme wurden mit der GenePix Software (GenePix Pro 6.0 Software, Axon Inc.) quantitativ analysiert. Als Maß für das Verhältnis der roten zur grünen Fluoreszenz wurde dabei der Quotient der Mediane (med in Gl. (2.4)) errechnet. Zur Berechnung des Quotienten der Signalemediane aller Pixel eines Spots wird vor der Bildung des Cy5/Cy3- Fluoreszenzverhältnisses die Hintergrundfluoreszenz (I_{B,λ_2} und I_{B,λ_1} aus Gl. (2.4), $I \equiv$ Intensität) von der Signalfluoreszenz (I_{P,λ_2} und I_{P,λ_1} aus Gl. (2.4)) bei der entsprechenden Wellenlänge subtrahiert (s. Gl. (2.4)).

$$\frac{\langle (I_{P,\lambda_2})_n \rangle_{med} - \langle (I_{B,\lambda_2})_m \rangle_{med}}{\langle (I_{P,\lambda_1})_n \rangle_{med} - \langle (I_{B,\lambda_1})_m \rangle_{med}} \quad \text{Gl. (2.4)}$$

Die Quantifizierung der Hybridisierungssignal-Fluoreszenz erfolgte wie in Abb. 2.3 dargestellt. Die Bildpunkte des inneren Kreises bilden das Hybridisierungssignal, die lokale Hintergrundfluoreszenz wird vom zweifachen Radius des Hybridisierungssignals gebildet (weißer Kreis), wobei die Bereiche der lokalen Hintergrundfluoreszenz, die auf dem Hybridisierungssignal des nächsten Spots liegen, aus der Berechnung der Hintergrundfluoreszenz ausgeschlossen werden.

2.17 Statistische Auswertung der genomweiten Expressionsanalysen

Vor einer statistischen Analyse der Mediane der Fluoreszenzen wurden präprozessierende Schritte durchgeführt. Zunächst wurden Klone, die zur Spottingkon-

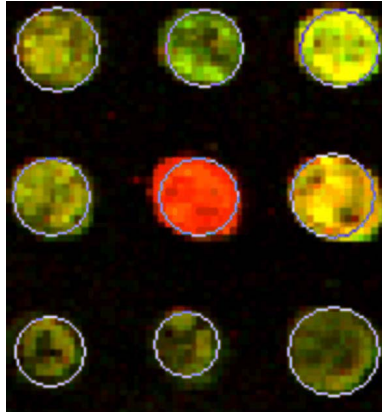


Abbildung 2.2: Ausschnitt aus einem Fluorogramm mit identifizierten Signalen

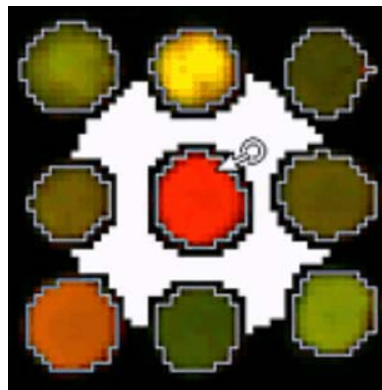


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Quantifizierung der Fluoreszenzsignale

trolle verwendet wurden entfernt. Anschließend wurden die einzelnen Expressionswerte mit Hilfe des *vsn* Modells (Huber et al. [2002]) normalisiert, um Unterschiede in den Gesamtintensitäten von Cy3 und Cy5 sowie intensitätsabhängige Abweichungen im Verhältnis Cy3/Cy5 auszugleichen. Dieser Präprozessierung der Messdaten folgte die statistische Auswertung der relativen Expressionslevel der einzelnen auf den Microarrays verfügbaren Klonen innerhalb eines einzelnen Experiments. Dazu wurden die Messdaten mit Hilfe des *limma*-Algorithmus (Smyth [2004]) statistisch ausgewertet. Alle Auswerteschritte wurden mit Hilfe der Statistikumgebung R durchgeführt.

2.18 Netzwerkrekonstruktion durch Nested Effects Model Algorithmus

Die aus Abschnitt 2.17 erhaltenen Daten der statistischen Auswertung der Microarray Hybridisierungen wurden zur Rekonstruktion von Gen-Interaktionsnetzwerken mit dem Nested Effects Model Netzwerk Algorithmus (Fröhlich et al. [2007, 2008]) verwendet. Bei dem NEM-Algorithmus (basierend auf Markowitz et al. [2005]) wird prinzipiell zwischen zwei Variablen unterschieden, den Signalen (\mathcal{S}) und den Effekten (\mathcal{E}). Bezogen auf ein RNA-Interferenz Experiment entspricht ein Signal \mathcal{S} der post-transkriptionellen Genstilllegung eines spezifischen Gens, wogegen ein Effekt \mathcal{E} einer mRNA mit veränderter Expression entspricht. Es wird angenommen, dass jeder Effekt an ein stromaufwärts liegendes Signal gekoppelt ist, wobei eine Störung des Signals \mathcal{S}_k eine Änderung des Signalfusses in dem zugrundeliegenden Netzwerk zur Folge hat. Demnach wird ein Einfluss auf die Effekte, die von \mathcal{S}_k beeinflusst werden, erwartet. Abb. 2.4 zeigt schematisch den Zusammenhang zwischen Signalen und Effekten innerhalb eines Netzwerks. Bei einer Störung des Signales \mathcal{S}_2 (Abb. 2.4)

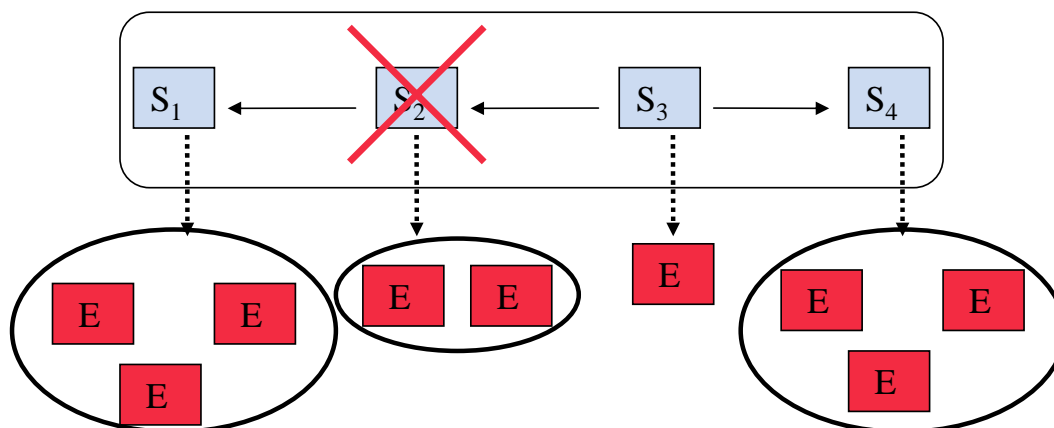


Abbildung 2.4: Grundidee des NEM-Algorithmus. Eine Netzwerkhypothese ist ein gerichteter Graph zwischen Signalen mit unterschiedlichen angehängenen Effekten. Eine Störung von Signal \mathcal{S}_2 verändert den Signalfluss des stromabwärts liegenden Signalwegs, was zu einem Einfluss auf die mit \mathcal{S}_2 und \mathcal{S}_1 verknüpften Effekte erwarten lässt.

würden Änderungen der Effekte der Signale \mathcal{S}_1 und \mathcal{S}_2 erwartet. Die Verknüpfung von Effekten mit Signalen kann formell durch eine binäre $|\mathcal{S}| \times |\mathcal{E}|$ Matrix $\Theta = (\theta_{sk})$ dargestellt werden, mit $\theta_{sk} = 1$ wenn der Effekt k mit dem Signal

s verknüpft ist, ansonsten gilt $\theta_{sk} = 0$. Die Verknüpfung von Signalen (in diesem Fall entsprechend der Netzwerkhypothese) wird durch die binäre Matrix $\Phi = (\phi_{ij})$, mit $\phi_{ij} = 1$ vorausgesetzt, dass ein Signal i ein Signal j impliziert und die Bedingung $\phi_{ii} = 1$ für alle $i \in \mathcal{S}$ gilt. Das Nested Effects Model sagt einen Effekt von $s \in \mathcal{S}$ auf einen Effekt k immer genau dann voraus, wenn ein Signal $t \in \mathcal{S}$ stromabwärts von s existiert und k verknüpft mit t ist (Fröhlich et al. [2008]). Diese Bedingung wird genau dann erfüllt, wenn gilt $\phi_{st} = 1$ und $\theta_{tk} = 1$.

Bei einem gegebenen Datensatz D besteht das Ziel darin, Rückschlüsse auf den Signalgraphen Φ zu ziehen. Dies erfolgt dadurch, dass zunächst ein hypothetischer Signalweg Φ angenommen wird, für den eine Likelihood berechnet wird. Die Likelihood entspricht dabei einem Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Datensatz D unter Annahme eines hypothetischen Netzwerks Φ beobachtet werden kann. Eine hohe Likelihood entspricht daher einer guten Übereinstimmung der beobachteten Daten D mit der errechneten Netzwerkhypothese Φ . Markowitz et al. (Markowitz et al. [2005]) haben a priori die Likelihood für alle denkbaren Netzwerkhypothesen Φ berechnet, um anschließend die Übereinstimmungen der Hypothesen mit dem gemessenen Datensatz zu vergleichen. De facto ist diese Berechnung für große Netzwerke auch mit leistungsstarken Computersystemen nicht durchführbar, da die Anzahl der hypothetischen Netze sehr schnell wächst. Für ein Netzwerk mit zehn Signalen (\mathcal{S}) existieren bereits 10^{27} mögliche Signalgraphen. Daher entwickelten Fröhlich et al. (Fröhlich et al. [2007, 2008]) heuristische Algorithmen, um näherungsweise eine Netzwerkhypothese zu generieren, die eine besonders hohe Likelihood für einen gegebenen Datensatz aufweist. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse beziehen sich dabei insbesondere auf eine Methode, in der, ausgehend von einem leeren Signalgraphen, sukzessive die Kante in das Signalnetz integriert wird, die den maximalen Gewinn in der Likelihood verspricht. Das Verfahren endet, sobald durch ein Kante keine Steigerung der Likelihood mehr erzielt werden kann.

3 Ergebnisse

Zur Rekonstruktion von Gen-Gen Interaktionsnetzwerken wurden insgesamt 13 Gene, die eng mit dem Estrogenrezeptor Signalweg verknüpft sind (s. Abschnitt 1.3), post-transkriptionell durch die Verwendung von sequenzspezifischen siRNAs in ihrer Expression reduziert. Die resultierenden Effekte der post-transkriptionellen Reduktion der mRNA Konzentration wurde mit genomweiten cDNA-Microarrays gemessen. Die Daten aus den statistischen Auswertungen der durchgeführten Microarray Experimente wurden anschließend mit dem „Nested Effects Model“ Algorithmus (Fröhlich et al. [2007, 2008], s. Abschnitt 2.18) einer weiteren statistischen Analyse unterzogen und in Form eines Interaktionsnetzwerks grafisch dargestellt. Zur weiteren Validierung des berechneten Netzwerks wurden neben dem Silencing von einzelnen Genen zusätzlich kombinatorische post-transkriptionelle Genstilllegungen von ausgesuchten Genpaaren aus der Liste der 13 Gene des Einzelsilencings durchgeführt. Die RNA Interferenz Experimente wurden nach einem standardisierten Schema durchgeführt, was zu einer höheren Konsistenz der Daten für die spätere Netzwerkrekonstruktion führte. Für jedes Experiment wurden mindestens zwei spezifische siRNAs mit unterschiedlichen Antisense-Sequenzen pro Gen im Duplikat in einer Endkonzentration von 50 nM (soweit nicht anders angegeben) eingesetzt (s. Abschnitt 2.9). Zusätzlich wurden vier unabhängige Transfektionen mit einer „non-silencing control“ siRNA (Qiagen, Hilden) sowie eine Mock-Transfektion (enthielt nur Transfektionsmedium und Transfektionsreagenz) parallel durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass für jedes siRNA-Experiment eine genomweite Expressionsanalyse von acht biologischen Ansätzen mit vier cDNA-Microarrays im sogenannten Dye-Swap Design durchgeführt werden konnte.

3.1 Auswahl der Gene für die post-transkriptionelle Genstilllegung

Im Rahmen dieser Arbeit war das Interesse auf Gene fokussiert, die im direkten Zusammenhang mit estrogenabhängigen Mammakarzinomen stehen. Dazu wurden zum einen gezielt Gene ausgewählt, die bekanntermaßen dem Estrogenrezeptor Signalweg zuzuordnen sind (s. Abschnitt 1.3). Des Weiteren wurden Gene ausgewählt, denen in vorherigen Studien eine klare Assoziation zu estrogenabhängigen Brustkrebserkrankungen zugeschrieben werden konnte, Gene, welche einen direkten Einfluss auf den Estrogenrezeptor Signaltransduktionsweg ausüben, bzw. Gene, die im direkten Einfluss des Estrogenrezeptor Signaltransduktionswegs stehen. Tabelle 3.1 zeigt die Auflistung der im Folgenden beschriebenen Gene, die für die post-transkriptionellen Genstilllegungsexperimente ausgewählt wurden. Grundsätzlich muss bei dem Estrogenrezeptor

Tabelle 3.1: Ausgewählte Gene für die post-transkriptionelle Genstilllegung

Gen Symbol	Beschreibung
<i>AKT1</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<i>AKT2</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
<i>CCNG2</i>	cyclin G2
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1
<i>FOXA1</i>	forkhead box A1
<i>HSPB8</i>	heat shock 22kDa protein 8
<i>MAPK1</i>	mitogen-activated protein kinase 1
<i>STAT5B</i>	signal transducer and activator of transcription 5B
<i>STC2</i>	stanniocalcin 2
<i>TMEM45B</i>	transmembrane protein 45B
<i>TP53</i>	tumor protein p53
<i>XBP1</i>	X-box binding protein 1

tor Signalweg zwischen den beiden in Abschnitt 1.3 beschriebenen Effekten der Estradiolbindung unterschieden werden. Wie beschrieben, haben eine Reihe von Genen einen direkten Einfluss auf den Signaltransduktionsweg des ER α bzw. werden in direkter Weise von dessen Expression beeinflusst. Dabei trennt sich die Funktionalität des ER α in die genomische und die nicht-genomische Ak-

3.1 Auswahl der Gene für die post-transkriptionelle Genstilllegung

tivität (s. Abschnitt 1.4.1 und 1.4.2). Die Expression und Aktivität der Gene *AKT1*, *AKT2*, *MAPK1* und *STAT5B* sind direkt durch die nicht-genomische Aktivität des ER α reguliert (Björnstrom and Sjöberg [2005]). Die Aktivität der einzelnen Signaltransduktionskaskaden kann steroidabhängig, aber auch steroidunabhängig erfolgen. Eine Interaktion des 17 β -Estradiol mit der membranständigen Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) ErbB2 resultiert in einer Aktivierung des Akt Signaltransduktionswegs ohne den Einfluss des ER α (Stoica et al. [2003b]). Gleichzeitig kann durch die Serin/Threonin Protein-Kinase Akt die Aktivität des Estrogenrezeptors durch Interaktion mit der N-terminalen Aktivierungsfunktion AF-1 (s. Abschnitt 1.3) erhöht werden. Demnach stellen die Gene *AKT1* und *AKT2* durch ihre weitreichenden Interaktionen mit dem ER α sehr interessante Ziele zur Aufklärung von Gen-Gen Interaktionen im Estrogenrezeptor Signaltransduktionsweg dar.

Neben den beiden genannten Akt Kinasen werden auch die „mitogen-activated protein kinase 1“ (*MAPK1*) sowie der „signal transducer and activator of transcription 5b“ (*STAT5B*) direkt von der nicht-genomischen Aktivität des ER α beeinflusst. Membranständige ER α Rezeptoren werden nach Bindung von 17 β -Estradiol durch Konformationsänderung aktiviert, wodurch die Src/Ras/Raf/Mek Kaskade aktiviert wird, was in einer Aktivierung von Mapk1 resultiert (Klinge et al. [2005]). Der Einfluss von 17 β -Estradiol vermittelt eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von *STAT5B* (Björnstrom and Sjöberg [2002]). Abb. 3.1 zeigt grafisch die Zusammenhänge der Gene im Estrogenrezeptor Signalweg.

Unabhängig von den direkten Einflüssen (genomisch und nicht-genomisch) des ER α auf die Aktivität der oben aufgezählten Gene konnte in zahlreichen Studien die Expression vieler Gene mit dem Estrogenrezeptorstatus von Mammakarzinomen assoziiert werden. Diese Gene stellen demnach ebenfalls sehr interessante Ziele zur Identifizierung von Gen-Gen Interaktionen dar.

Durch die Kombination des Estrogenrezeptorstatus mit der Expression von *BCL2* wurde ein Zusammenhang mit der Prognose bei Patientinnen mit invasiv ductalem Karzinom (IDC) gezeigt (Park et al. [2002]). Die persistente Expression von *BCL2* ist signifikant mit der Expression des ER α assoziiert. Eine signifikante Reduktion in der Expression von *BCL2* ist stark mit der fehlenden Expression des ER α korreliert. *BCL2* codiert für einen negativen Regulator der Apoptose und verhindert durch seine Expression die Bildung von Kanälen in der Mitochondrienmembran durch das Protein BAX. Dies verhindert die Frei-

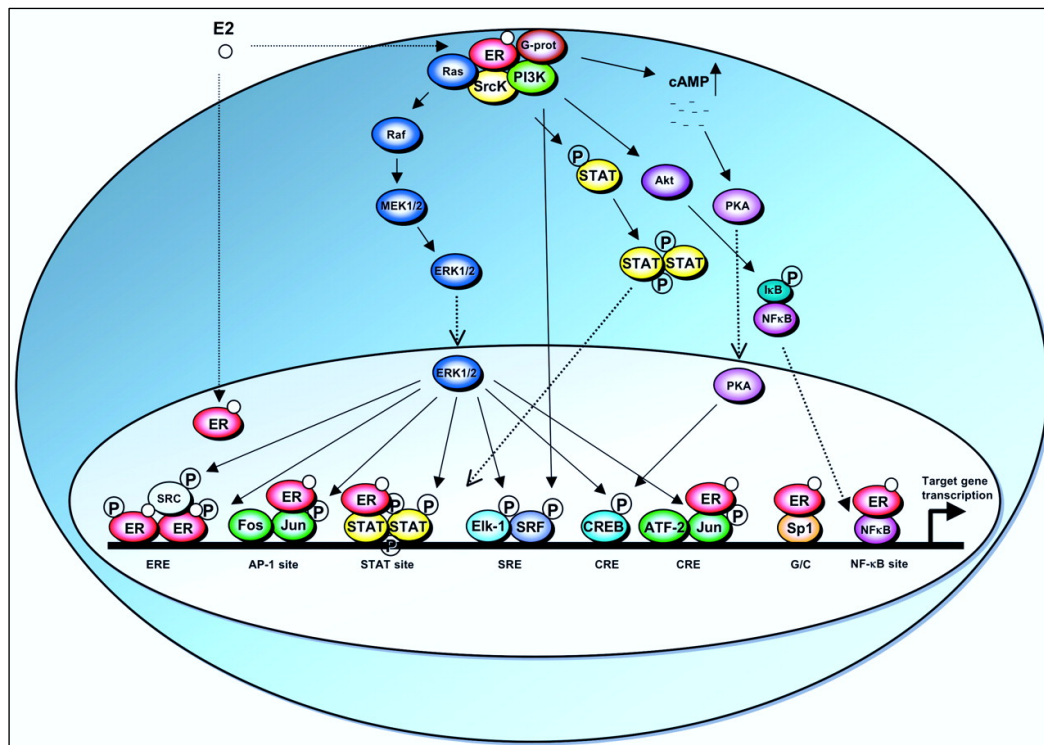


Abbildung 3.1: Schematisch Darstellung der Zusammenhänge der Gene im Estrogenrezeptor Signaltransduktionsweg (aus Björnstrom and Sjöberg [2005])

setzung von Cytochrom C und damit die Fortsetzung der Reaktionskaskade zur Ausführung der Apoptose. Die beiden Proteine BCL2 und BAX stehen bei der Regulation in einem Gleichgewicht, wobei die Fähigkeit von BCL2 die Apoptose zu verhindern von der Fähigkeit der Heterodimerenbildung zwischen BCL2 und BAX abhängt (Teixeira et al. [1995]).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Genen wird die Expression des Gens *CCNG2* negativ durch den, durch 17β -Estradiol aktivierten, $ER\alpha$ reguliert. Die Fähigkeit des 17β -Estradiol, die Expression von *CCNG2* (einem negativen Regulator des Zellzyklus) zu reprimieren, könnte eine maßgebende Rolle in der verstärkten Beförderung von tumorösen Zellen durch den Zellzyklus darstellen (Stossi et al. [2006]). Die Bindung des durch 17β -Estradiol aktivierten Estrogenrezeptors an die Estrogen Responsive Element in Brustkrebszellen wird u. a. durch das Gen *FOXA1* hergestellt, wobei gleichzeitig eine Abhängigkeit der Estrogenrezeptorexpression an das Vorhandensein von *FOXA1* gekoppelt ist (Carroll et al. [2005]).

HSPB8, ein Mitglied der Superfamilie „der small heat shock proteins“ (sHSP), ist in estrogenabhängigen Mammakarzinomen eng mit der Expression des ER α verknüpft. In MCF-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 17 β -Estradiol zu einem erhöhten Level an *HSPB8* mRNA und damit auch zu einem erhöhten Level an Protein führte (Sun et al. [2007]). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Gen *STC2* positiv mit der Expression des ER α korreliert ist und estrogenabhängig exprimiert wird (Charpentier et al. [2000]). Die enge Verknüpfung der Überexpression von *STC2* mit dem Estrogenrezeptorstatus führte zur Entwicklung von *STC2* zu einem prognostischen Marker bei ER α -positiven Mammakarzinomen. Dabei wurde eine verlängerte krankheitsfreie Überlebenszeit bei Patientinnen mit *STC2* Expression berichtet (Esseghir et al. [2007]).

Das Gen *TMEM45B*, welches für ein transmembranes Protein codiert (Lian et al. [2006]), zeigt ein verändertes Expressionsniveau in globalen Expressionsanalysen von estrogenabhängigen Mammakarzinomen (Daten unveröffentlicht). Der schnelle Abbau des Estrogenrezeptors bei 17 β -Estradiol Behandlung wird über die proteasomale Degradation reguliert. Dazu bilden der ER α und die Proteine MDM2 und TP53 einen ternären Komplex und regulieren somit die zur Verfügung stehende Konzentration von ER α (Duong et al. [2007]).

Der Transkriptionsfaktor *XBP1* (Clauss et al. [1996], Liou et al. [1990]) wurde ebenfalls als positiv korreliert in Bezug auf den Estrogenrezeptorstatus gefunden (West et al. [2001]) und verstärkt die transkriptionelle Aktivität des ER α ligandenunabhängig (Lacroix and Leclercq [2004]). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Protein- sowie die mRNA Konzentration von *XBP1* in Tumoren mit Antiestrogen-resistenten Zellen erhöht ist (Gomez et al. [2007]). *XBP1* könnte demnach ein Schlüsselfaktor in Bezug auf das Ansprechen auf antiestrogene Therapien sein (Romero-Ramirez et al. [2004]).

3.2 Etablierung des Messprinzips

Um das geplante Messprinzip zu Beginn dieser Arbeit zu etablieren, wurde eine Testtransfektion der sequenzspezifischen siRNA gegen das Gen *TP53* in der epithelialen Cervix-Adenokarzinom Zelllinie HeLa durchgeführt. Dabei wurden insgesamt zwei siRNAs unterschiedlicher Sequenz einzeln in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt und für 42 h inkubiert (s. Abschnitt 2.9). HeLa Zellen

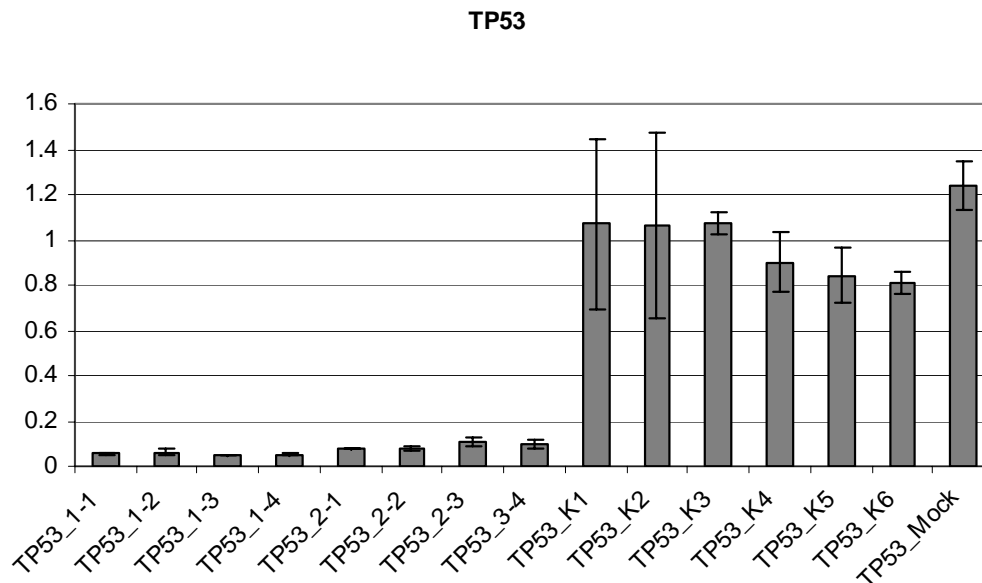


Abbildung 3.2: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von *TP53* in HeLa Zellen

zeichnen sich durch ihre einfache Handhabbarkeit aus und werden von den kommerziellen Anbietern von RNA-Interferenz Produkten als Standard verwendet. Aus diesen Gründen wurde dieses System zur Etablierung des experimentellen Designs (erfolgreiche post-transkriptionelle Genstilllegung, validiert mit qRT-PCR, gefolgt von globaler Expressionsanalyse mit cDNA-Microarrays) verwendet. Da für die gezielte Stilllegung des Gens *TP53* insgesamt zwei validierte (vom Hersteller auf Funktion überprüft) siRNAs vorlagen, wurde dieses Gen für die Etablierung des Messprinzips verwendet. Gleichzeitig sind das Gen und seine Interaktionen sehr gut beschrieben ([Agarwal et al. \[1998\]](#), [Levine \[1997\]](#), [Prives and Hall \[1999\]](#)), wodurch die Interpretation des zu messenden Expressionsprofils nach erfolgter Genstilllegung vereinfacht wurde. Abb. 3.2 zeigt das Ergebnis der post-transkriptionellen Genstilllegung von *TP53* in HeLa Zellen. Die Quantifizierung erfolgte in diesem Experiment auf Basis der Konzentration der zur cDNA Synthese eingesetzten RNA. Alle Kontrollen zeigten ein wenig variables und kaum verringertes Expressionsniveau von *TP53*. Die Varianzen und die relativ große Standardabweichung bei den Kontrolltransfektionen sind auf Pipettierschwankungen zurückzuführen. Bei den mit spezifischer siRNA gegen *TP53* transfizierten Zellen konnte eine Reduktion der relativen mRNA Konzentration von 90 - 95 % erzielt werden. Die Fehlerbalken entsprechen der Stan-

dardabweichung der Messwerte der Triplikate aus den jeweiligen Messungen. Hiermit konnte der erste Teil des Messprinzips etabliert werden.

3.3 Genomweite Expressionsanalyse des Etablierungsexperimentes

Nachdem, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, die post-transkriptionelle Genstilllegung von *TP53* in HeLa Zellen etabliert werden konnte, wurde ein genomweites Expressionsprofil der HeLa Zellen nach siRNA Transfektion gegen *TP53* erstellt. Dazu wurden insgesamt acht cDNA Microarrays im Dye-Swap Design erstellt und anschließend, wie in Abschnitt 2.17 beschrieben, einer statistischen Analyse unterzogen. Aufgrund des Silencing von *TP53* wurden in den HeLa Zellen 575 Gene signifikant (adjustierter p-Wert ≤ 0.05) dereguliert. Aus diesen Genen sind fünf zur Validierung des mRNA Silencings exemplarisch mit den zugehörigen p-Werten und Expressionsänderungen in Tabelle 3.2 aufgeführt. Zur Validierung der globalen Expressionsanalyse wurde die Liste der signifikant deregulierten Gene mit der Literaturdatenbank Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems[®], <http://www.ingenuity.com>) verglichen und die Übereinstimmungen in Form eines Netzwerks dargestellt (s. Abschnitt 3.3). Die Transkrip-

Tabelle 3.2: Resultate *TP53* Knockdown HeLa

Gen Symbol	Beschreibung	p-Wert	FoldChange
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	2.32×10^{-5}	0.164
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5	1.19×10^{-3}	2.012
<i>GDF15</i>	growth differentiation factor 15	1.83×10^{-2}	0.568
<i>BTG2</i>	BTG family, member 2	1.7×10^{-2}	0.680
<i>MAPK14</i>	mitogen-activated protein kinase 14	4.7×10^{-2}	1.277

tion von *CDKN1A* (p21) wird von *TP53* aktiviert (Xiong et al. [1993]), folglich führt ein Silencing von *TP53* zu einer Reduktion der mRNA von *CDKN1A*. *BIRC5* (*survivin*) hingegen wird durch *TP53* inhibiert. Eine Reduktion der mRNA von *TP53* führt demnach zu einer Überexpression von *BIRC5* (Hoffman et al. [2002], Mirza et al. [2002]). Albertoni et al., Kannan et al. und Tan et al. (Albertoni et al. [2002], Kannan et al. [2000], Tan et al. [2000]) konnten

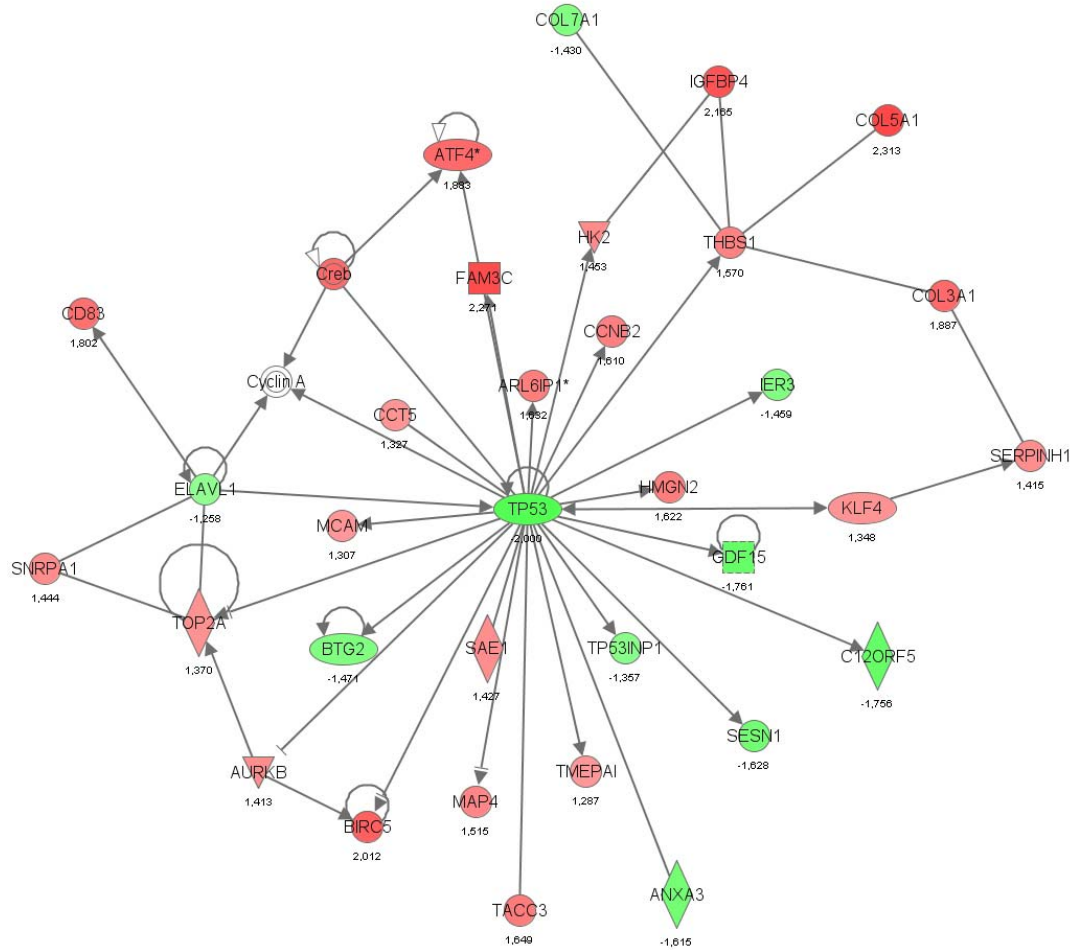


Abbildung 3.3: Validierung der genomweiten Expressionsanalyse nach TP53 Silencing. Nur direkte Interaktionen wurden gewählt. Rote Knoten entsprechen Genen mit gesteigerter mRNA Expression in den experimentellen, sowie den Literaturdaten. Grüne Knoten entsprechen Genen mit verringerter mRNA Expression in Folge des Silencings von *TP53*. Unter den Knoten sind die jeweiligen Fold Changes verzeichnet ($FC \geq 1 \equiv \text{Überexpression}$, $FC \leq -1 \equiv \text{Repression}$). Aus: Ingenuity: IPA 6.3 - 1402 Build: 54960

zeigen, dass *TP53* direkt an der Expression des Gens *GDF15* (MIC-1) beteiligt ist. Ein Silencing der mRNA von *TP53* führt demnach ebenfalls zu einer Reduktion der Expression von *GDF15*. Das Silencing von *TP53* führte desweiteren zu einer Repression der mRNA von *BTG2*. Wie Daoud et al. (Daoud et al. [2003]) beschrieben, ist *TP53* notwendig für die Expression der *BTG2* mRNA. Die „mitogen-aktiviertes Protein Kinase 14“ (*MAPK14*) verstärkt die Aktivierung von *TP53* durch Phosphorylierung (Bulavin et al. [1999]) indem sie selbst durch Phosphorylierung über den Ras-Raf-Mek-Erk Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Dieser Signaltransduktionsweg kann über *WIP1*, einem *TP53* regulierten Gen, durch Bildung einer negativen autoregulatorischen feedback Schleife inaktiviert werden (Takekawa et al. [2000]). Die Reduktion der *TP53* mRNA selbst konnte im Rahmen der genomweiten Expressionsanalyse mit cDNA Microarrays nicht verifiziert werden, da der zur Herstellung der Microarrays verwendete RZPD Unigene 3.1 cDNA Satz lediglich einen Klon schlechter Qualität für das Gen *TP53* beinhaltet.

3.4 Überprüfung der Zell-Lebensfähigkeit nach Transfektionen mit hohen siRNA Konzentrationen

Da die Rekonstruktion der Gen-Gen Interaktionsnetzwerke auf spezifische Fragestellungen in Brustkrebs angewandt werden sollte, mussten die experimentellen Konditionen aus Abschnitt 3.2 auf die Besonderheiten der MCF-7 Zellen angepasst werden. Hauptsächlich war eine Erhöhung der Konzentration der eingesetzten siRNA notwendig, da bei niedrigen Konzentrationen (10 nM) keine adäquate post-transkriptionelle Genstilllegung in den MCF-7 Zellen möglich war (Daten nicht gezeigt). In mehreren Konzentrationsreihenexperimenten wurden siRNA Konzentrationen von 10 nM bis 100 nM exemplarisch für die Gene *AKT1*, *AKT2*, *FOXA1* und *HSPB8* auf ihren Einfluss auf die Lebensfähigkeiten der Zellen unter Verwendung des in Abschnitt 2.15.1 beschriebenen WST-1 Cell-Viability Assays getestet. Abb. 3.4 und 3.5 zeigen die Einflüsse der Transfektion der siRNAs gegen die oben genannten Gene in den Konzentrationen 10 nM, 50 nM und 100 nM. Die Transfektionen wurden über einen Zeitraum von 42 h durchgeführt und die Auswertung anschließend auf die Lebensfähigkeit der Zellen in der Mock-Transfektion bezogen. Bei den Transfektionen der in Abb. 3.4

3 Ergebnisse

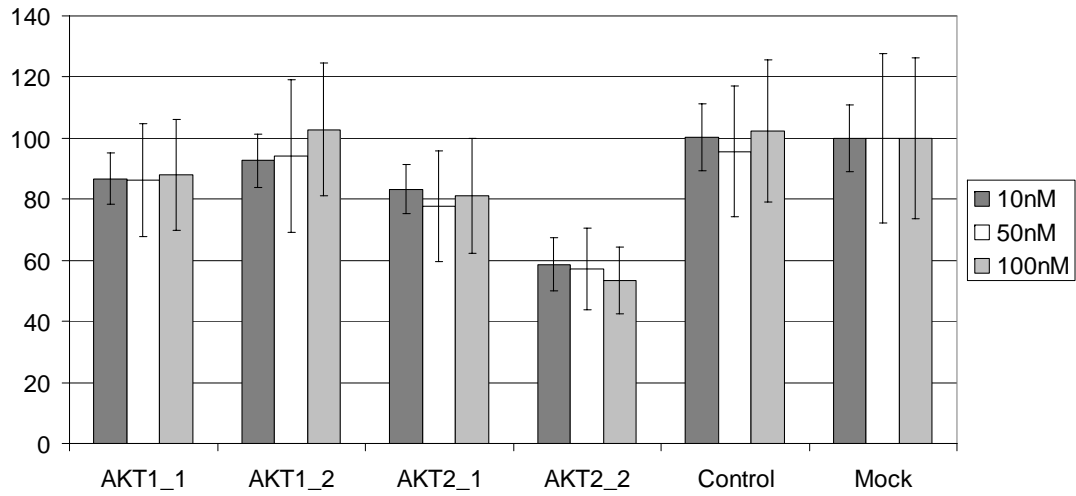


Abbildung 3.4: Lebensfähigkeiten der MCF-7 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen *AKT1* und *AKT2* in unterschiedlichen Konzentrationen

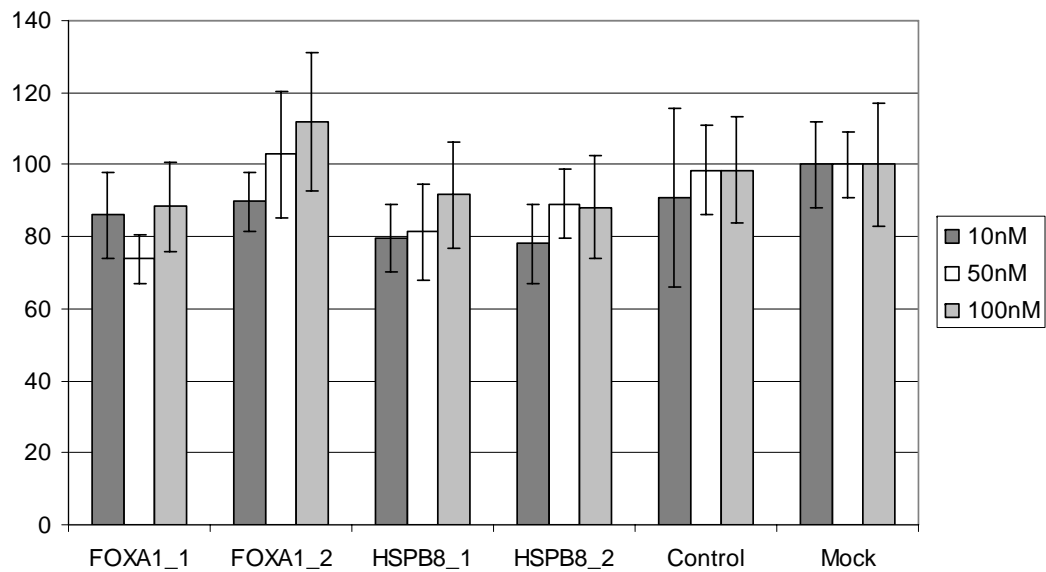


Abbildung 3.5: Lebensfähigkeiten der MCF-7 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen *FOXA1* und *HSPB8* in unterschiedlichen Konzentrationen

und 3.5 dargestellten siRNAs war kein starker Einfluss der siRNA Konzentration auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu erkennen. Daher wurde als Grundansatz in den nachfolgenden Experimenten stets eine siRNA Konzentration von 50 nM verwendet. Die Ergebnisse des Cell-Viability Assays ließen dennoch die Möglichkeit der Verwendung höherer siRNA Konzentrationen ohne negativen Einfluss auf die Zellebensfähigkeit zu. Demnach wurde immer dann, wenn mit einer Konzentration von 50 nM keine adäquaten post-transkriptionellen Genstilllegungen möglich waren, die siRNA Konzentration auf 100 nM erhöht (jeweils im Text angegeben).

3.5 Post-Transkriptionelle Genstilllegung durch RNA Interferenz

Die Untersuchungen in Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.3 zeigten die Etablierung des erarbeiteten Messprinzips. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen selektiven post-transkriptionellen Genstilllegungen aufgeführt. Exemplarisch sei hier nur das Ergebnis für den Knock-down des Gens *AKT1* grafisch dargestellt. Die Graphen der anderen 12 Experimente finden sich im Anhang (A.2 - A.14). Die relativen Konzentrationen der jeweiligen mRNAs wurden mit der in Abschnitt 2.14 beschriebenen TaqMan qRT-PCR Methode quantifiziert und die Messergebnisse grafisch dargestellt. Die Zusammenfassung der einzelnen Messungen ist in Tabelle 3.3 auf Seite 51 zu finden.

3.5.1 *AKT1*

Abb. 3.6 zeigt das Ergebnis der Behandlung der MCF-7 Zellen mit siRNA gegen das Gen *AKT1*. Auf der Ordinate sind die jeweiligen Replikate mit den zugehörigen siRNA Bezeichnungen verzeichnet. Die Abzisse entspricht der relativen mRNA Expression, normalisiert auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH. Die Proben zeigten eine selektive Reduktion der mRNA Konzentration des Gens *AKT1* von 58 - 65 %, wobei die Replikate der jeweiligen siRNAs nur gering voneinander abwichen. Die Kontrollen wiesen geringfügige Varianzen auf, die auf die quantitativen *realtime*-PCR zurückzuführen sind. Eine zufriedenstellende Reduktion der mRNA konnte für das Gen *AKT1* nur mit einer

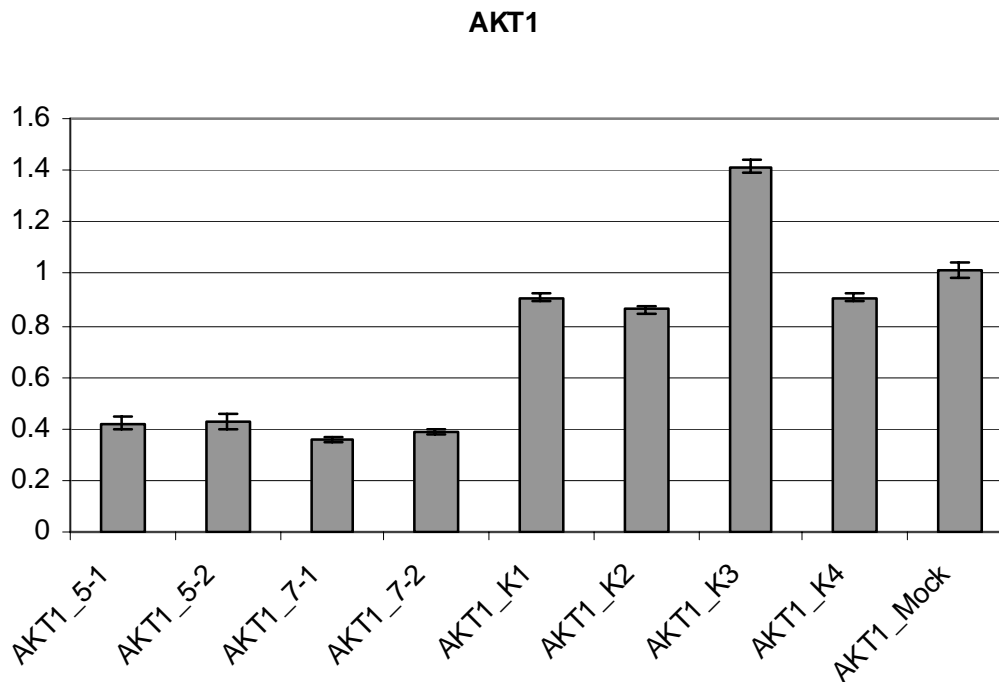


Abbildung 3.6: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von *AKT1*

siRNA Endkonzentration von 100 nM erzielt werden. Da alle vier Replikate der Transfektion eine ausreichende Reduktion der mRNA Konzentration ergaben, konnten die Proben für die nachfolgenden Expressionsanalysen vorbereitet werden.

3.5.2 *AKT2*

Wie in [A.3](#) abgebildet, zeigte die Transfektion der MCF-7 Zellen mit zwei sequenzspezifischen siRNAs gegen *AKT2* eine Reduktion der *AKT2* mRNA von 77 - 88 %. Die Kontrollen wiesen nur geringe Schwankungen und keine Reduktion der mRNA Konzentration von *AKT2* auf. Abweichend von den in [Abschnitt 2.9](#) angegebenen Bedingungen wurden die siRNA gegen *AKT2* in diesem Experiment in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Alle vier Transfektionen resultierten in einer ausreichenden Reduktion der mRNA von *AKT2*; somit konnten die Proben zur weiteren Analyse verwendet werden.

3.5.3 *BCL2*

Die Behandlung der MCF-7 Zellen mit siRNAs gegen *BCL2* führte zu einer Reduktion der mRNA von *BCL2* um 71 - 78 % (s. Abb. A.4). Eine Reduktion der mRNA in diesem Maße war nur durch eine siRNA-Endkonzentration von 100 nM möglich. Die Kontrollen zeigten eine gleichmäßige, nicht reduzierte Expression des Gens *BCL2*. Daher konnten alle Proben aus dieser Transfektion für die genomweite Expressionsanalyse und spätere Rekonstruktion des Interaktionsnetzwerks verwendet werden.

3.5.4 *CCNG2*

Für die gezielte Verringerung der mRNA des Gens *CCNG2* standen insgesamt drei verschiedene siRNAs unterschiedlicher Sequenz zur Verfügung. Alle siRNAs wurden einzeln in einer Endkonzentration von 50 nM wie in Abschnitt 2.9 beschrieben für die Transfektionen eingesetzt. Dabei konnten Verringerungen der mRNA von *CCNG2* um 71 - 82 % erzielt werden (s. Abb. A.5). Die Kontrollen zeigten ein durchweg stabiles und nicht vermindertes Expressionslevel der mRNA von *CCNG2*. Da alle sechs Replikate der Transfektionen eine Verringerung der mRNA Konzentration von mehr als 70% zeigten, konnten für dieses Experiment insgesamt sechs genomweite cDNA Microarrays im Dye-Swap-Design hybridisiert werden.

3.5.5 *ESR1*

Die spezifische Verringerung der mRNA Konzentration des Gens *ESR1* ist in Abb. A.6 dargestellt. In diesem Experiment wurden, abweichend von Abschnitt 2.9, keine einzelnen siRNAs eingesetzt. Um eine ausreichende Verringerung der mRNA Konzentration zu erreichen, mussten im Falle des Gens *ESR1* siRNA Gemische verwendet werden. Dabei wurden für beide Replikate jeweils ein Mix aus drei siRNAs unterschiedlicher Sequenz erstellt und in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Durch den Einsatz von drei verschiedenen siRNAs pro Mix gegen das Gen *ESR1* wurde eine deutlich höhere Effizienz in der Verringerung der mRNA Konzentration erzielt. Die vier Replikate des Experiments zeigten eine Verringerung der mRNA Konzentration um 67 - 76 % bezogen auf die Expression des Gens in den Kontrollen.

3.5.6 *FOXA1*

Abb. A.7 stellt die Ergebnisse des mRNA Silencing für das Gen *FOXA1* dar. Die Kontrollen zeigten eine gleichmäßige und nicht reduzierte Expression der mRNA. Die Konzentration der mRNA von *FOXA1* wurde durch die Behandlung mit zwei unterschiedlichen siRNAs in einer Konzentration von 100 nM um 71 - 85 % reduziert. Transfektionen mit einer geringeren Konzentration der siRNA führten zu keiner adäquaten Reduktion der mRNA Konzentration.

3.5.7 *HSPB8*

Das in Abb. A.8 aufgeführte Diagramm zeigt die mRNA Reduktion nach der Behandlung mit siRNAs gegen das Gen *HSPB8*. In diesem Experiment wurden die siRNAs in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Nach 42 h Inkubation war die Expression der mRNA von *HSPB8* um 82 - 87 %, bei gleichbleibender, nicht veränderter Expression der Kontrollen, reduziert. Die Schwankungen der Replikate untereinander war ebenfalls sehr gering.

3.5.8 *MAPK1*

Eine Behandlung der MCF-7 Zellen mit siRNAs gegen das Gen *MAPK1* führte zu einer Reduktion der mRNA von *MAPK1* von 54 - 83 %. Das Expressionsniveau von *MAPK1* war in den Kontrollen ebenfalls weitestgehend konstant (s. Abb. A.9). Die Transfektion wurde anhand der Angaben in Abschnitt 2.9 durchgeführt. Da alle Proben eine ausreichende Reduktion der mRNA aufwiesen, konnten die Proben für die Hybridisierung auf cDNA Microarrays verwendet werden.

3.5.9 *STAT5B*

Abb. A.10 zeigt die Verringerung der mRNA Konzentration des Gens *STAT5B* nach Inkubation mit drei siRNAs unterschiedlicher Sequenz. Alle siRNAs wurden dabei in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Die Transfektionen führten zu einer Reduktion der mRNA Konzentration von *STAT5B* um 62 - 69 %. Da die Transfektion nur bei den Replikaten von zwei siRNAs zu einer adäquaten Verringerung der mRNA Konzentration führte, wurden zu diesem Experiment vier unabhängige cDNA-Microarrays erstellt.

3.5 Post-Transkriptionelle Genstilllegung durch RNA Interferenz

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der post-transkriptionellen Einzelgenstilllegungen

Gen Symbol	Anzahl siRNA	siRNA Konzentration	% mRNA Reduktion
<i>AKT1</i>	2	100 nM	58 - 65
<i>AKT2</i>	2	100 nM	88 - 77
<i>BCL2</i>	2	100 nM	71 - 78
<i>CCNG2</i>	3	50 nM	71 - 82
<i>ESR1</i>	2*	50 nM	67 - 76
<i>FOXA1</i>	2	100 nM	71 - 85
<i>HSPB8</i>	2	100 nM	82 - 87
<i>MAPK1</i>	2	50 nM	54 - 83
<i>STAT5B</i>	3	50 nM	62 - 69
<i>STC2</i>	3	50 nM	81 - 90
<i>TMEM45B</i>	2	50 nM	79 - 83
<i>TP53</i>	2	50 nM	68 - 87
<i>XBP1</i>	2	50 nM	62 - 65

* Bei der Transfektion mit *ESR1* siRNA wurden anstatt der einzelnen siRNAs zwei unterschiedliche Gemische bestehend aus jeweils drei unterschiedlichen siRNA verwendet.

3.5.10 *STC2*

Die in Abb. A.11 dargestellte Transfektion von drei siRNAs gegen das Gen *STC2* zeigte eine Reduktion der mRNA Konzentration von *STC2* um 81 - 90 %. Für das Silencing von *STC2* standen in diesem Experiment drei siRNAs unterschiedlicher Sequenz zur Verfügung. Alle Replikate wiesen eine adäquate und gleichmäßige Reduktion der mRNA Konzentration von *STC2* auf und konnten demnach für die folgenden genomweiten Expressionsanalysen eingesetzt werden.

3.5.11 *TMEM45B*

Die Effizienz der post-transkriptionellen mRNA Reduktion des Gens *TMEM45B* ist in Abb. A.12 dargestellt. Dabei zeigten alle Replikate der siRNA Behandlung eine sehr gute Reduktion der relativen mRNA Konzentration (79 - 83 %). Die Kontrollen wiesen eine ausgeglichene und nicht verminderte Expression der mRNA des Gens *TMEM45B* auf.

3.5.12 *TP53*

Abb. A.13 zeigt die relativen Expressionsniveaus des Gens *TP53* nach 42 h Transfektion mit siRNA gegen dieses Gen. Die mRNA Konzentration wurde dabei in den Proben um 79 - 83 % reduziert, wogegen die mRNA des Gens in den Kontrollen nicht beeinflusst und gleichmäßig exprimiert wurden. Die Proben konnten demnach alle für die folgenden genomweiten Expressionsanalysen verwendet werden.

3.5.13 *XBP1*

Abb. A.14 stellt grafisch die selektive Reduktion der mRNA Konzentration von *XBP1* nach Behandlung mit zwei siRNAs unterschiedlicher Sequenz in einer Konzentration von 50 nM dar. Die Transfektion zeigte eine Reduktion der mRNA von *XBP1* um 62 - 65 % in den Proben, bei gleichbleibender Expression in den Kontrollen. Die Proben waren demnach für eine genomweite Expressionsanalyse verwendbar.

3.6 Kombinatorische post-transkriptionelle Genstilllegungen

Neben den Silencingexperimenten (s. Abschnitt 3.5.1 - 3.5.13), in denen jeweils ein Gen selektiv post-transkriptionell stillgelegt wurde, wurden zusätzlich kombinatorische Transfektionen durchgeführt. Dabei wurden siRNAs gegen zwei Gene parallel transfiziert und die Effizienz der Transfektion anschließend für beide Gene überprüft. Durch die Auswahl der Genpaare wurde zum einen versucht, den Estrogenrezeptor Signaltransduktionsweg an zwei unterschiedlichen Punkten zu beeinflussen (*ESR1* und *MAPK1* bzw. *MAPK1* und *STAT5B*). Zum anderen wurde das Genpaar (*CCNG2* und *ESR1*) ausgewählt, da die Expression der beiden Gene voneinander abhängig ist (Bennin et al. [2002]). Somit konnte eine Anknüpfung an die Kontrolle des Zellzyklus hergestellt werden.

3.6.1 *CCNG2* und *ESR1*

Die Ergebnisse der parallelen Transfektion mit siRNAs gegen die Gene *CCNG2* und *ESR1* sind in Abb. A.15 dargestellt. Dabei zeigte die mRNA von *ESR1* eine Reduktion von 54 - 62 % bezogen auf die Expression in den Kontrollen. Die Kontrollen wiesen für beide Gene ein ausgeglichenes Expressionsniveau auf. Obwohl, wie bereits in Abschnitt 3.5.4 präsentiert, die siRNAs gegen *CCNG2* in den Einzeltransfektionen eine adäquate Reduktion der mRNA zeigten, kam es im Fall des parallelen Silencings zu einer Überexpression von 34 - 60 % von *CCNG2* trotz Anwesenheit der spezifischen siRNAs gegen dieses Gen. Zum gezielten Silencing der mRNA von *ESR1* wurden, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, Gemische von jeweils drei siRNAs gegen *ESR1* verwendet. Diese Gemische wurden in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen mit einer siRNA gegen *CCNG2* (ebenfalls 50 nM) transfiziert. Die Transfektion der Kontrollen erfolgte daher mit non-silencing control siRNA (Qiagen, Hilden) in einer Konzentration von 100 nM.

3.6.2 *ESR1* und *MAPK1*

Analog zu Abschnitt 3.6.1 wurden die MCF-7 Zellen mit siRNAs gegen die Gene *ESR1* und *MAPK1* parallel transfiziert und die resultierenden Expressionsänderungen der spezifischen mRNA mit TaqMan qRT-PCR gemessen (s. Abb. A.16). Die mRNA von *ESR1* zeigte in den transfizierten Zellen eine Reduktion von 53 - 66 % gegenüber der Expression in den Kontrollen, welche ein konstantes und unverändertes Expressionsniveau zeigten. Gleichzeitig führte die Transfektion der siRNAs gegen *ESR1* und *MAPK1* zu einer Reduktion der mRNA Konzentration von *MAPK1* um 29 - 42 % für die erste siRNA, aber zu keiner Verringerung der mRNA Konzentration bei der Transfektion mit der zweiten siRNA. Trotz einer nur unzureichenden Verringerung der mRNA Konzentration von *MAPK1* im Falle der zweiten eingesetzten siRNA wurden die Proben für die weiterführenden Experimente verwendet.

3.6.3 *MAPK1* und *STAT5B*

Abb. A.17 zeigt das Ergebnis des kombinatorischen Silencings der Gene *MAPK1* und *STAT5B* in einer Konzentration von jeweils 50 nM. Dabei ist eine Verringerung der mRNA von *MAPK1* von 76 - 90 % im Falle der ersten siRNA zu

erkennen. Die zweite siRNA gegen *MAPK1* zeigte lediglich eine Verringerung der mRNA Konzentration von 46 - 48 %. Die reduzierte Effizienz der zweiten siRNA gegen *MAPK1* in kombinatorischen Transfektionen entsprach dem kombinatorischen Silencing Experiment in Abschnitt 3.6.2. Die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen *STAT5B* führte zu einer Verringerung der mRNA von *STAT5B* um 65 - 86 %. Analog zu Abschnitt 3.6.2 wurden die Proben, trotz geringer Reduktion der mRNA von *MAPK1* für den Fall der zweiten siRNA, für die genomweiten Expressionsanalysen verwendet.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der kombinatorischen post-transkriptionellen Genstilllegungen

Kombination	Gen Symbol	Anzahl siRNA	% mRNA Reduktion
<i>CCNG2/ESR1</i>	<i>CCNG2</i>	2	134 - 160**
	<i>ESR1</i>	2*	54 - 62
<i>ESR1/MAPK1</i>	<i>ESR1</i>	2*	53 - 66
	<i>MAPK1</i>	2	29 - 42
<i>MAPK1/STAT5B</i>	<i>MAPK1</i>	2	76 - 79
	<i>STAT5B</i>	2	46 - 48

* Bei der Transfektion mit *ESR1* siRNA wurden anstatt der einzelnen siRNAs zwei unterschiedliche Gemische, bestehend aus jeweils drei unterschiedlichen siRNAs, verwendet.

** Im Falle von *CCNG2* war eine Überexpression der mRNA zu verzeichnen.

3.7 Stimulation und Inhibition des Estrogenrezeptors

Neben den Effekten aufgrund eines Silencings des Estrogenrezeptors (s. Abschnitt 3.5.5), waren die Entschlüsselung der Effekte aufgrund einer gezielten Stimulation bzw. Inhibition des Estrogenrezeptors Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit. Dazu wurden kommerziell verfügbare Varianten des humanen Steroidhormons 17 β -Estradiol, sowie des Selektiven Estrogen Rezeptor Modulators Tamoxifen in physiologischen bzw. therapeutischen Konzentrationen verwendet.

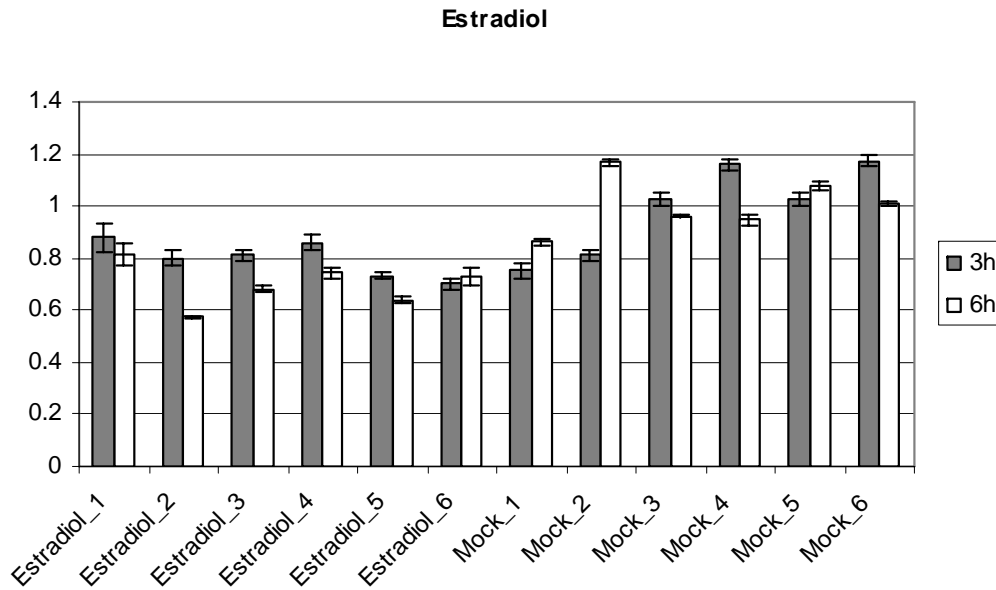


Abbildung 3.7: Relative Expressionsniveaus von *ESR1* nach Behandlung mit 17β -Estradiol

3.7.1 Gezielte Stimulation des Estrogenrezeptors mit 17β -Estradiol

Zur gezielten Stimulation des Estrogenrezeptors wurden die MCF-7 Zellen, wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, für drei, bzw. sechs Stunden mit dem endokrinen Steroidhormon 17β -Estradiol stimuliert und anschließend aus diesen Zellen die RNA isoliert. Abb. 3.7 zeigt die relativen Expressionsniveaus des Estrogenrezeptors nach einer Stimulation mit 17β -Estradiol. Die Kontrollen zeigten für beide Zeitpunkte eine ausgeglichene und nicht reduzierte Expression des Estrogenrezeptors. Eine dreistündige Inkubation der Zellen mit 17β -Estradiol führte zu einer Reduktion der mRNA von *ESR1* von 15 - 30 %, welche sich durch Verlängerung der 17β -Estradiol Exposition auf 6 h auf bis zu 43 % erhöhte. Diese feedback-Regulation des Estrogenrezeptors durch 17β -Estradiol stellt ein bereits bekanntes Phänomen dar (Cidlowski and Muldoon [1978], Saceda et al. [1988, 1989]). Da 17β -Estradiol einen direkten Einfluss auf die Expression des Estrogenrezeptors ausübt, ist mit einer Änderung der Expression von stromabwärts liegenden Genen zu rechnen. Die Proben wurden daher für eine anschließende genomweite Expressionsanalyse weiterverarbeitet.

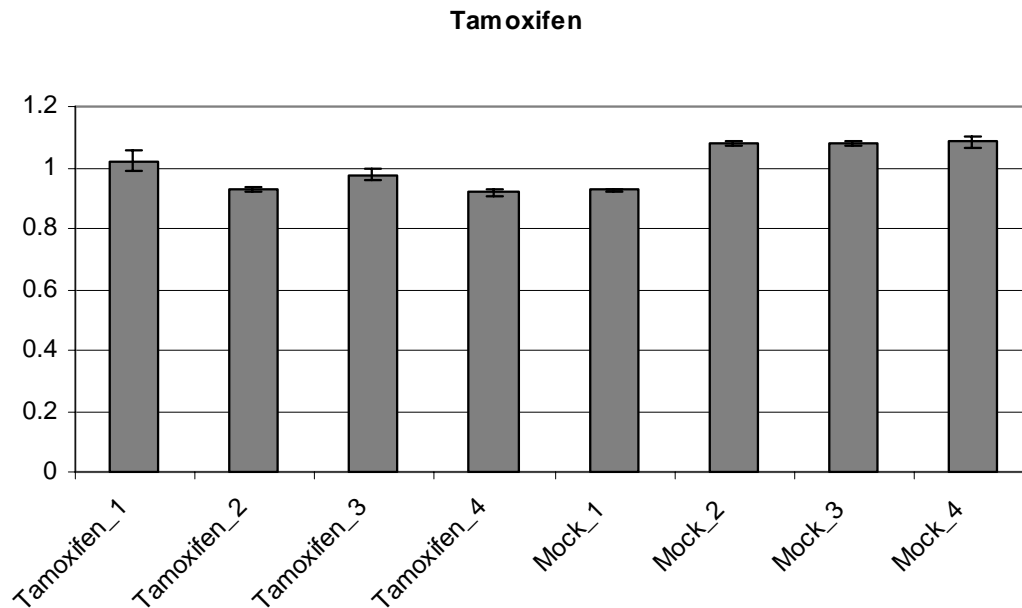


Abbildung 3.8: Relative Expressionsniveaus von *ESR1* nach Behandlung mit Tamoxifen

3.7.2 Gezielte Inhibition des Estrogenrezeptors mit Tamoxifen

Abb. 3.8 zeigt die relativen Expressionsniveaus der mRNA des Estrogenrezeptors (*ESR1*) nach einer 48-stündigen Inkubation der MCF-7 Zellen mit dem Selektiven **E**strogen **R**ezeptor **M**odulator (SERM) Tamoxifen. Dabei wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.11 beschrieben, nach 24-stündiger Präinkubation für 48 h mit 100 nM Tamoxifen behandelt und anschließend die relativen Expressionsniveaus in vier biologischen Replikaten bestimmt. Die vier Replikate der Tamoxifen Behandlung sowie die unbehandelten Kontrollen zeigten ein ausgeglichenes und nicht verändertes Expressionsniveau der mRNA von *ESR1*. Die Bindung von Tamoxifen an den Estrogenrezeptor induziert eine strukturelle Änderung in der räumlichen Struktur des Estrogenrezeptors (Dutertre and Smith [2000]), wodurch die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen (z.B. Koaktivatoren oder Korepressoren) gestört wird. Da Tamoxifen keinen Einfluss auf die Expression des Estrogenrezeptors an sich besitzt, ist mit keiner Veränderung der mRNA Konzentration nach Behandlung mit Tamoxifen zu rechnen. Die hier gezeigten Daten entsprechen dieser Erwartung. Aufgrund von Interaktionsstörungen des Estrogenrezeptors mit anderen Proteinen als Folge der

Tamoxifenbindung, ist mit Änderungen des Expressionsverhaltens von stromabwärts liegenden Genen aus dem Estrogenrezeptor Signaltransduktionsweg zu rechnen. Aus diesem Grund wurden anschließend die Proben für eine genomweite Expressionsanalyse aufbereitet.

3.8 Genomweite Expressionsanalysen der post-transkriptionellen Genstilllegungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalysen des mRNA Silencings für die unter Abschnitt 3.1 angegebenen 13 Gene (3.5.1 - 3.5.13), des kombinatorischen Silencings (3.6.1 - 3.6.3) und der Behandlung mit den endokrinen Substanzen 17β -Estradiol (3.7.1) und Tamoxifen (3.7.2) aufgeführt. Die Ergebnisse stammen aus den statistischen Analysen der cDNA Microarrays (s. Abschnitt 2.17) in der Statistikumgebung R mittels der Pakete *vsn* (Huber et al. [2002]) und *limma* (Smyth [2004]). Die ausgewerteten Daten wurden in Form einer .RData Datei abgespeichert. Die für diese Dissertation verwendeten Daten sind in Form der Rohdaten unter der GEO-ID: GSE12291 öffentlich zugänglich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE12291>). Tabelle 3.5 zeigt eine Zusammenfassung der statistischen Auswertung aller genomweiten Expressionsanalysen.

Im Folgenden werden die einzelnen Expressionsprofile der jeweiligen post-transkriptionellen Genstilllegungen erläutert und, soweit vorhanden, die Expressionsänderungen der 13 Gene aus Abschnitt 3.1 tabellarisch aufgeführt. Die Einträge der Tabellen 3.6 - 3.12 sind nach der Signifikanz der einzelnen Gene geordnet. Signifikante Expressionsänderungen wiesen einen p -Wert ≤ 0.05 auf. Zusammenfassend wurden die Expressionsänderungen der 13 stillgelegten Gene in den durchgeführten globalen Expressionsanalysen grafisch in Form einer hierarchischen Clusteranalyse dargestellt (Abb. 3.9). Die Ordinate der hierarchischen Clusteranalyse zeigt die 13 für die post-transkriptionelle Genstilllegung ausgewählten Gene. Auf der Abzisse sind die 17 im folgenden beschriebenen genomweiten Expressionsanalysen aufgeführt. Durch die Clusteranalyse wird demnach die Expression der 13 selektierten Gene in jeder der durchgeführten genomweiten Expressionsanalysen angezeigt. In den Expressionsprofilen ähnliche Experimente, bzw. Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten sind in der Clusteranalyse räumlich nah zueinander angeordnet. Die hierarchische Cluster-

3 Ergebnisse

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der genomweiten Expressionsprofile

Gen Symbol	p-Wert < 0.05	FC > 1	FC < 1	% FC > 1	% FC < 1
<i>AKT1</i>	23	11	12	48	52
<i>AKT2</i>	1291	892	399	69	31
<i>BCL2</i>	3	1	2	33	67
<i>CCNG2</i>	1680	430	1250	26	74
<i>ESR1</i>	228	92	136	40	60
<i>ESR1/CCNG2</i>	20	2	18	10	90
<i>ESR1/MAPK1</i>	3037	2137	900	70	30
<i>FOXA1</i>	26	17	9	65	35
<i>HSPB8</i>	0	0	0	-	-
<i>MAPK1</i>	1	0	1	0	100
<i>MAPK1/STAT5B</i>	36	17	19	47	53
<i>STAT5B</i>	113	32	81	28	72
<i>STC2</i>	6	4	2	67	33
<i>TMEM45B</i>	5	2	3	40	60
<i>TP53</i>	2	2	0	100	0
<i>XBP1</i>	2	0	2	0	100
17 β -Estradiol	117	88	29	75	25
Tamoxifen	2937	957	1980	33	67

Legende: FC = fold change, *ESR1/CCNG2*, *ESR1/MAPK1* und *MAPK1/STAT5B* stehen für die kombinatorischen Genstilllegungen der angegebenen Gene.

analyse läßt deutlich erkennen, dass in den meisten Experimenten eine Reduktion der relativen mRNA Konzentration der selektierten Gene erfolgte. Diese Beobachtung geht einher mit der Tatsache, dass die Gene eine enge Verknüpfung mit dem Estrogenrezeptor Signaltransduktionsweg aufweisen und bei einer Störung dieses Systems hauptsächlich eine Repression der Expression zu erwarten ist.

3.8.1 Expressionsprofil *AKT1* Silencing

Das Silencing von *AKT1* ergab insgesamt 23 signifikante Gene mit verändertem Expressionsverhalten. Darunter das Gen *STC2* mit einer Reduktion der

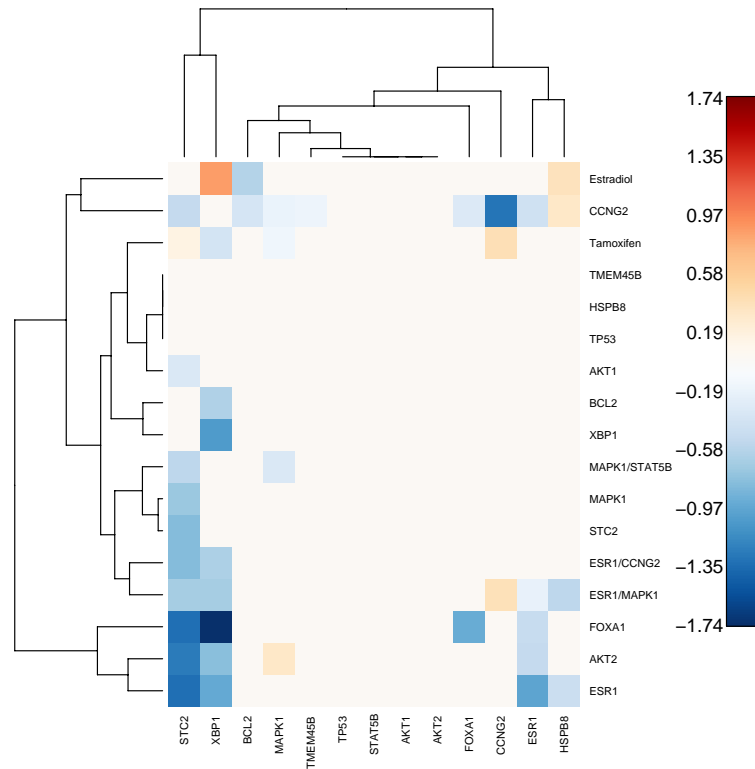


Abbildung 3.9: Hierarchische Clusteranalyse der post-transkriptionellen Genstilllegungen und der gemessenen Effekte.

Das Clustering erfolgte sowohl für die Behandlungen als auch für die gemessenen Effekte. Ordinate: Expressionswerte der einzelnen Experimente
 Abzisse: Effekt der einzelnen Experimente auf die Expression des angegebenen Gens

relativen mRNA Konzentration ($p\text{-Wert} = 2.87 \times 10^{-2}$, $FC = 0.709$). Das Verhältnis zwischen Überexpression und Repression war ausgeglichen. Die Expressionsänderung von *AKT1* selbst konnte in der genomweiten Expressionsanalyse nicht dargestellt werden, wurde jedoch über die qRT-PCR Analyse nachgewiesen (s. Abschnitt 3.5.1).

3.8.2 Expressionsprofil *AKT2* Silencing

Durch die post-transkriptionelle Verringerung der mRNA Konzentration von *AKT2* zeigten insgesamt 1291 Gene eine signifikante Änderung ihres Expressionsverhaltens, wobei eine leichte Tendenz zur Überexpression der Gene aufgrund des Silencings zu erkennen ist. Tabelle 3.6 zeigt einen Ausschnitt der signifikant regulierten Gene nach Silencing von *AKT2*. Eine Verringerung der Expression

3 Ergebnisse

von *AKT2* konnte durch die cDNA Microarrays nicht, jedoch durch die qRT-PCR Analyse (s. Abschnitt 3.5.2), nachgewiesen werden.

Tabelle 3.6: Expressionswerte einzelner Gene nach *AKT2* Silencing

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>STC2</i>	1.87×10^{-5}	0.281
<i>XBP1</i>	9.51×10^{-3}	0.454
<i>ESR1</i>	1.95×10^{-2}	0.591
<i>MAPK1</i>	4.85×10^{-2}	1.356

Legende: FC = fold change

3.8.3 Expressionsprofil *BCL2* Silencing

Die Behandlung der MCF-7 Zellen mit siRNA gegen das Gen *BCL2* ergab drei Gene mit signifikant veränderter Expression. Die stärkste Expressionsänderung zeigte dabei das Gen *XBP1* (p-Wert = 6×10^{-3} , FC = 0.533). *XBP1* wird als einer der Schlüsselfaktoren für eine antiestrogene Therapie betrachtet (Gomez et al. [2007]) und ist sehr eng verknüpft mit der Expression des Estrogenrezeptors (Lacroix and Leclercq [2004]). Die Reduktion der mRNA Expression von *BCL2* konnte durch die Microarrayanalyse nicht bestätigt werden. Die qRT-PCR Analyse zeigte jedoch eine klare Reduktion von 71 - 78 % (s. Abschnitt 3.5.2).

3.8.4 Expressionsprofil *CCNG2* Silencing

Das Silencing von *CCNG2* ergab 1680 signifikant veränderte Gene. *CCNG2* ist in die Regulation des Zellzyklus involviert, woraus mit einer großen Anzahl an deregulierten Genen nach einem Silencing zu rechnen ist. Unter den Genen mit signifikant veränderter Expression waren auch acht Gene der zu Beginn aller Arbeiten ausgewählten Zielgene (s. Abschnitt 3.1). Tabelle 3.7 zeigt die korrespondierenden Expressionsänderungen der Gene nach Silencing von *CCNG2*. Außer dem Gen *HSPB8* zeigten alle Gene eine positive Korrelation in Bezug auf die Expression von *CCNG2*. Das Gen *CCNG2* selbst zeigte die größte Signifikanz und die stärkste Änderung der relativen mRNA Konzentration in der genomweiten Expressionsanalyse.

Tabelle 3.7: Expressionswerte einzelner Gene nach *CCNG2* Silencing

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>CCNG2</i>	5.99×10^{-7}	0.274
<i>STC2</i>	2.10×10^{-3}	0.595
<i>ESR1</i>	2.43×10^{-3}	0.651
<i>BCL2</i>	3.32×10^{-3}	0.690
<i>HSPB8</i>	6.04×10^{-3}	1.344
<i>FOXA1</i>	9.85×10^{-3}	0.716
<i>MAPK1</i>	4.40×10^{-2}	0.818
<i>TMEM45B</i>	4.62×10^{-2}	0.835

Legende: FC = fold change

3.8.5 Expressionsprofil *ESR1* Silencing

Aufgrund der Genstilllegung von *ESR1* änderte sich bei 228 Genen signifikant die relative mRNA Konzentration. Tabelle 3.8 zeigt die Expressionswerte der zur post-transkriptionellen Genstilllegung ausgewählten Gene nach durchgeführtem Silencing von *ESR1*. Die in der Literatur beschriebenen Abhängigkeiten der Expression von *STC2* (Bouras et al. [2002]) und *XBP1* (Lacroix and Leclercq [2004]) konnten im Rahmen der Messung klar dargestellt werden. Ebenso konnte die Co-expression von *HSPB8* mit *ESR1* (Charpentier et al. [2000], Sun et al. [2007]) durch die Messung validiert werden.

Tabelle 3.8: Expressionswerte einzelner Gene nach *ESR1* Silencing

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>STC2</i>	6.11×10^{-8}	0.262
<i>XBP1</i>	4.66×10^{-6}	0.389
<i>ESR1</i>	2.92×10^{-6}	0.370
<i>HSPB8</i>	6.25×10^{-2}	0.631

Legende: FC = fold change

3.8.6 Expressionsprofil *ESR1/CCNG2* Silencing

Durch die kombinatorische post-transkriptionelle Genstilllegung von *ESR1* und *CCNG2* wurden insgesamt 20 Gene signifikant in ihrer Expression verändert.

Dazu zählten *STC2* (p-Wert = 2.79×10^{-2} , FC = 0.443) sowie *XBP1* (p-Wert = 4.18×10^{-2} , FC = 0.53). Die gemessenen Daten entsprechen den in Abschnitt 3.8.5 dargestellten Literaturdaten. Bei einem Vergleich des Expressionsprofils nach kombinatorischem Silencing mit dem Expressionsprofil nach *ESR1*-Silencing wurden zehn Gene ermittelt, die in beiden Experimenten den gleichen Effekt zeigten. Ein Vergleich des Expressionsprofils mit dem Expressionsprofil des *CCNG2*-Silencing ergab eine Schnittmenge von sechs Genen. Zur Visualisierung und für spätere Auswertungen sind diese Ergebnisse unter Abschnitt 3.11.1 näher besprochen.

3.8.7 Expressionsprofil *ESR1/MAPK1* Silencing

Unter den 3037 signifikant regulierten Genen in Folge des kombinatorischen Silencings der Gene *ESR1* und *MAPK1* befanden sich die in Tabelle 3.9 aufgelisteten Gene. Ein Vergleich der signifikant differentiell regulierten Gene des

Tabelle 3.9: Expressionswerte einzelner Gene nach kombinatorischem *ESR1/MAPK1* Silencing

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>XBP1</i>	5.40×10^{-9}	0.514
<i>STC2</i>	5.40×10^{-9}	0.509
<i>HSPB8</i>	1.03×10^{-7}	0.577
<i>CCNG2</i>	4.54×10^{-6}	1.438
<i>ESR1</i>	9.21×10^{-4}	0.798

Legende: FC = fold change

kombinatorischen Silencings von *ESR1* und *MAPK1* mit dem Expressionsprofil des *ESR1* Silencings ergab eine gemeinsame Schnittmenge von 155 Genen, wohingegen der Vergleich des kombinatorischen Silencings mit der Stilllegung von *MAPK1* lediglich ein gemeinsam signifikant reguliertes Gen ergab. Eine weitere Darstellung erfolgte im Rahmen der Epistaseanalyse (s. Abschnitt 3.11.2).

3.8.8 Expressionsprofil *FOXA1* Silencing

Tabelle 3.10 zeigt die Änderungen der Expressionen der ausgewählten Gene nach Silencing des Gens *FOXA1*. Durch das Silencing des „Forkhead Box1“ Gens

FOXA1 wird die Fähigkeit des ER α zur Assoziation mit Chromatin unterbunden und somit die 17 β -Estradiol induzierte Genexpression unterdrückt (Carroll et al. [2005]). Das Silencing von *FOXA1* führt demnach zu einem ähnlichen Expressionsprofil wie des Silencing des ER α selbst.

Tabelle 3.10: Expressionswerte einzelner Gene *FOXA1* Silencing

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>XBP1</i>	1.71×10^{-5}	0.175
<i>STC2</i>	2.00×10^{-4}	0.262
<i>FOXA1</i>	5.94×10^{-4}	0.393
<i>ESR1</i>	3.23×10^{-2}	0.606

Legende: FC = fold change

3.8.9 Expressionsprofil *HSPB8* Silencing

Das Silencing von *HSPB8* wies keine signifikante Veränderung im Expressionsverhalten der auf dem verwendeten cDNA Microarray vorhandenen Gene auf. Die qRT-PCR Messungen (s. Abschnitt 3.5.7) zur relativen Quantifizierung der mRNA Konzentration des Gens *HSPB8* zeigte jedoch eine Reduktion der mRNA von 82 - 87 %. Die Verwendung der Messdaten der globalen Expressionsanalyse können dennoch für weitere Analysen verwendet werden, da die Rekonstruktion der Gen-Interaktionsnetzwerke nicht die Signifikanz der Expressionsänderung als Auswahlkriterium zu grunde legt (Fröhlich et al. [2007, 2008]).

3.8.10 Expressionsprofil *MAPK1* Silencing

Durch die post-transkriptionelle Stilllegung von *MAPK1* wurde lediglich das Gen *STC2* signifikant dereguliert (p-Wert = 4.59×10^{-2} , FC = 0.486). Die Verteilung der p-Werte aller Gene innerhalb dieses Experiments entsprach jedoch den Anforderungen von Fröhlich et al. zur Inferenz von Gen-Interaktionsnetzwerken aus Microarray Experimenten (Fröhlich et al. [2007, 2008]). Die Verringerung der relativen mRNA Konzentration konnte durch die Expressionsanalyse nicht gemessen werden, jedoch wurden durch die qRT-PCR Analyse aus 3.5.8 eine Reduktion der mRNA von 54 - 83 % ermittelt.

3.8.11 Expressionsprofil *MAPK1/STAT5B* Silencing

Die statistische Analyse der Microarraydaten nach kombinatorischem Silencing von *MAPK1* und *STAT5B* ergab 36 signifikant differentiell regulierte Gene, darunter *MAPK1* (p-Wert = 6.97×10^{-3} , FC = 0.712) und *STC2* (p-Wert = 5.87×10^{-3} , FC = 0.579). Zusätzlich wurde das zum Mapk-Signaltransduktionsweg gehörende Gen *RAC1* als signifikant überexprimiert (p-Wert = 6.97×10^{-3} , FC = 1.481) ermittelt. Ein Vergleich des kombinatorischen Silencings von *MAPK1* und *STAT5B* mit den korrespondierenden Einzelgenstilllegungen ergab eine gemeinsam Schnittmenge von einem Gen im Fall von *MAPK1* und 16 Genen bei Silencing des Gens *STAT5B*.

3.8.12 Expressionsprofil *STAT5B* Silencing

Das Silencing von *STAT5B* ergab insgesamt 113 signifikant differentiell exprimierte Gene, wobei die Gene *STC2* (p-Wert = 7.37×10^{-5} , FC = 0.586) und *XBP1* (p-Wert = 7.28×10^{-3} , FC = 0.753) aus der Liste der ausgesuchten Gene für die post-transkriptionelle Genstilllegung ebenfalls als differentiell reguliert gefunden wurden. Die Schnittmenge des Expressionsprofils mit dem Expressionsprofil des kombinatorischen Silencings von *MAPK1* und *STAT5B* wurde bereits in Abschnitt 3.8.11 erläutert.

3.8.13 Expressionsprofil *STC2* Silencing

Insgesamt wurden durch das Silencing von *STC2* sechs Gene signifikant dereguliert. Die Reduktion der relativen mRNA Konzentration von *STC2*, wie sie bereits durch die qRT-PCR Analyse (s. Abschnitt 3.5.10) gezeigt wurde, konnte durch die globale Expressionsanalyse durch Verwendung von cDNA Microarrays bestätigt werden (p-Wert = 2.32×10^{-2} , FC = 0.442).

3.8.14 Expressionsprofil *TMEM45B* Silencing

Die post-transkriptionelle Stilllegung von *TMEM45B* ergab insgesamt fünf signifikant deregulierte Gene. Das Silencing von *TMEM45B* selbst konnte nur durch die qRT-PCR Messungen aus Abschnitt 3.5.11, nicht jedoch durch die

cDNA Microarray Analyse, als signifikant reguliert bestätigt werden. Durch die Microarray Analyse stellte sich das Gen zwar als reprimiert dar, jedoch mit einem nicht signifikanten p-Wert = 7.22×10^{-2} .

3.8.15 Expressionsprofil *TP53* Silencing

Das Silencing von *TP53* konnte durch die cDNA Microarray Analyse nicht gemessen werden. Durch Qualitätskontrolle der zur Chipproduktion verwendeten cDNA wurde festgestellt, dass die cDNA des verwendeten Klons für *TP53* lediglich in unzureichender Qualität vorhanden war, was das Fehlen einer signifikanten Deregulation dieses Gens erklärt. Insgesamt zeigten zwei Gene ein signifikant verändertes Expressionsverhalten nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *TP53*. Die Verringerung der relativen mRNA Konzentration von *TP53* konnte durch die qRT-PCR Analyse nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.5.12).

3.8.16 Expressionsprofil *XBP1* Silencing

Die statistische Analyse der Microarray Daten nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *XBP1* ergab zwei signifikant regulierte Gene, darunter das Gen *XBP1* (p-Wert = 7.27×10^{-4} , FC = 0.349). Dieses Messergebnis steht im Einklang mit den in Abschnitt 3.5.13 erhaltenen Messergebnissen der qRT-PCR nach erfolgter Genstilllegung.

3.9 Netzwerkrekonstruktion aus den Literaturdaten

Abb. 3.10 zeigt die bisher in der Literaturdatenbank Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems®, <http://www.ingenuity.com>) bekannten Interaktionen zwischen den 13, zur post-transkriptionellen Genstilllegung ausgewählten Genen. Zur Rekonstruktion dieses Netzwerks wurden ausschließlich die direkten Interaktionen der Gene verwendet. Diese Interaktionen beinhalten Aktivierung, Expression, Phosphorylierung, Protein-DNA Interaktion, Protein-Protein Interaktion und Transkription. Grau hinterlegte Knoten entsprechen den zur Rekonstruktion vorgegebenen Genen, transparente Knoten den durch das Programm

3.10 Netzwerkrekonstruktion aus den genomweiten Expressionsanalysen

hinzugefügten Genen. Die Rekonstruktion von literaturbekannten Interaktionen zwischen einzelnen Genen mit Hilfe des Ingenuity Pathway Analysis Systems stellt kein vollständiges Bild aller literaturbekannten Interaktionen dar. Als Basis für Ingenuity dient eine manuell kuriierte Literaturdatenbank, welche einen Großteil der PubMed gelisteten Literatur enthält. In Abb. 3.10 ist eindeutig die sehr zentrale Stellung der Gene *ESR1* und *TP53*, sowie die enge Verknüpfung des *ESR1* zu den in dieser Arbeit ausgewählten Genen zu erkennen. Die Darstellung der literaturbekannten Interaktionen dient im Weiteren zur Validierung der konstruierten Netzwerkhypothese durch den „Nested Effects Model“ Algorithmus (Fröhlich et al. [2007, 2008]).

3.10 Netzwerkrekonstruktion aus den genomweiten Expressionsanalysen

Die Rekonstruktion der Gen-Gen Interaktionsnetze erfolgte durch den „Nested Effects Model“ Network Algorithm (s. Abschnitt 2.18) basierend auf den Veröffentlichungen von Fröhlich et al. [2007, 2008]. Für die Rekonstruktion wurden aus den einzelnen globalen Expressionsanalysen jeweils die ersten 100 Gene der statistischen Auswertung mit *limma* verwendet. Die Signifikanz der veränderten Genexpression war für die Rekonstruktion der Interaktionen durch den NEM-Algorithmus nicht von Relevanz. Durch die Verwendung der gleichen Anzahl deregulierter Gene für jedes Experiment wird eine Verzerrung der folgenden statistischen Auswertung in Bezug auf Experimente mit vielen signifikant deregulierten Genen vermieden. Abb. 3.11 zeigt die grafische Visualisierung des Gen-Interaktionsnetzwerks durch Berechnung der indirekten Effekte nach dem Prinzip des „Nested Effects Model“ Network Algorithmus. Die Kanten zwischen den einzelnen Knoten im Netzwerk sind anhand der Pfeilsymbole gerichtet, geben jedoch keine Auskunft über die Art der Interaktion (Expression, Transkription, Protein-Protein, Protein-DNA) oder den Effekt der Interaktion (aktivierend oder inaktivierend). Durch Doppelpfeile miteinander verbundene Knoten sind durch den Algorithmus nicht zu unterscheiden und demnach gleichwertig positioniert. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass der Estrogenrezeptor *ESR1* nicht, wie in Abb. 3.1 beschrieben, als Eintrittspunkt für die estrogenabhängige Signaltransduktionskaskade dient. Vielmehr scheinen die Gene *AKT2*, *CCNG2* und *XBP1* aufgrund der statistischen Analysen der Expressionsprofile nach post-

transkriptioneller Genstilllegung oberhalb des Estrogenrezeptors zu liegen und damit einen direkten oder indirekten Einfluss auf dessen Aktivität zu besitzen.

3.11 Epistaseanalyse der kombinierten Silencing Experimente

In der klassischen Epistaseanalyse wird ein Doppeldeletionsstrang des zu untersuchenden Organismus hergestellt und der auftretende Phänotyp dieser Doppeldeletion mit den beiden Phänotypen der korrespondierenden Einzeldelationen verglichen. Der synthetische Effekt definiert die epistatische Mutation ([Avery and Wasserman \[1992\]](#)). Ein genomweites Expressionsprofil kann dabei weniger objektive Phänotypen, wie z. B. die Morphologie, zur Erkennung epistatischer Verbindungen ersetzen. Vergleicht man die globalen Expressionsprofile einer kombinatorischen Behandlung von Zelllinien mit zwei siRNAs mit den globalen Expressionsprofilen der korrespondierenden Einzelbehandlungen, so kann ein zuvor vorhergesagtes Gen-Gen Interaktionsnetzwerk durch die Betrachtung der epistatischen Verknüpfungen validiert werden ([Van Driessche et al. \[2005\]](#)). Zeigen in einem linearen Signaltransduktionsweg zwei separate Deletionen (in diesem Fall post-transkriptionelle Genstilllegungen) zwei unterschiedliche Phänotypen, und der Phänotyp der Doppeldeletion ist einem dieser Phänotypen ähnlicher, so ist der Phänotyp dieser Einzeldelation epistatisch ([Avery and Wasserman \[1992\]](#), [Zupan et al. \[2003\]](#)).

Die Abbildungen [3.12](#) - [3.14](#) zeigen die Expressionsprofile der Epistaseanalyse von drei kombinatorischen post-transkriptionellen Genstilllegungen mit den Expressionsprofilen der korrespondierenden Einzelbehandlungen grafisch in Form von hierarchischen Clusteranalysen. Bei den Clusteranalysen wurden alle Gene, die in mindestens einem der beiden Einzelsilencing Experimente eine signifikante Expressionsänderung gezeigt haben, verwendet. Die Werte der jeweiligen Gene aus den korrespondierenden Experimenten wurden sukzessive zur Analyse hinzugefügt. Neben den hierarchischen Clusteranalysen wurden die Wahrscheinlichkeiten der Epistase durch zwei unterschiedliche Methoden berechnet und neben den Clusteranalysen in Form von Dendrogrammen dargestellt. Für diese statistischen Analysen wurde das Paket *pvclust* ([Suzuki and Shimodaira \[2006\]](#)) in der Statistikumgebung R verwendet. Dabei entspricht die Höhe des Dendrogramms der euklidischen Distanz der beiden Cluster. Die Werte für „au“

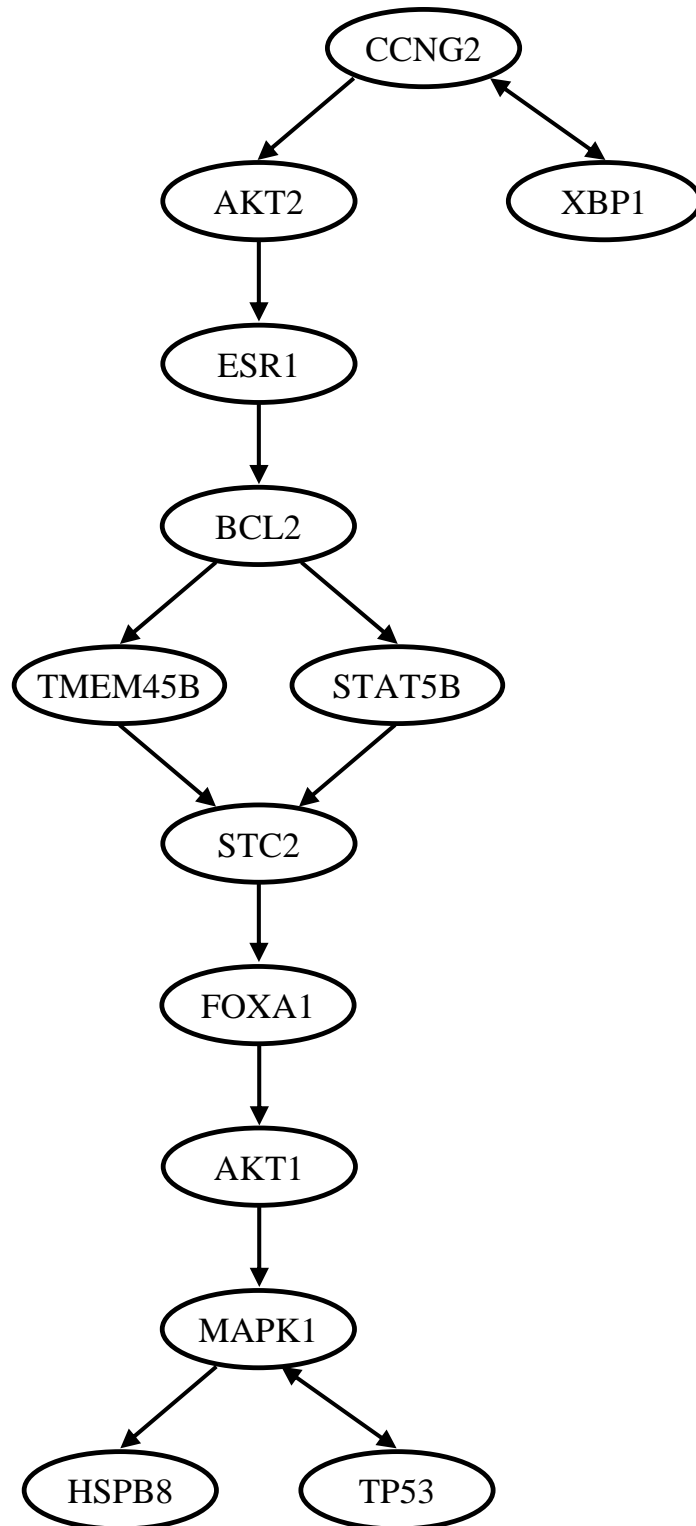
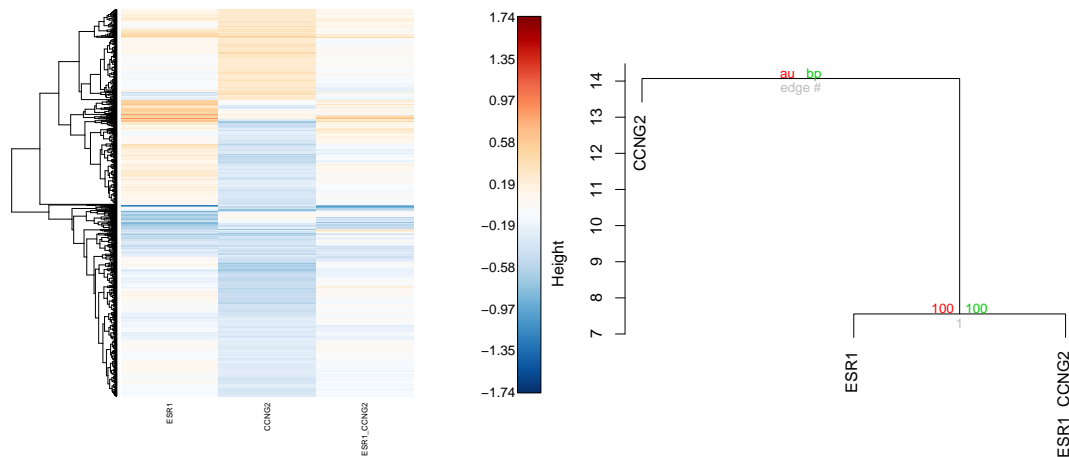


Abbildung 3.11: Inferriertes Netzwerk anhand des p-Wert Profils

3 Ergebnisse



(a) hierarchische Clusteranalyse der Epistaseanalyse (b) Dendrogramm der Epistaseanalyse

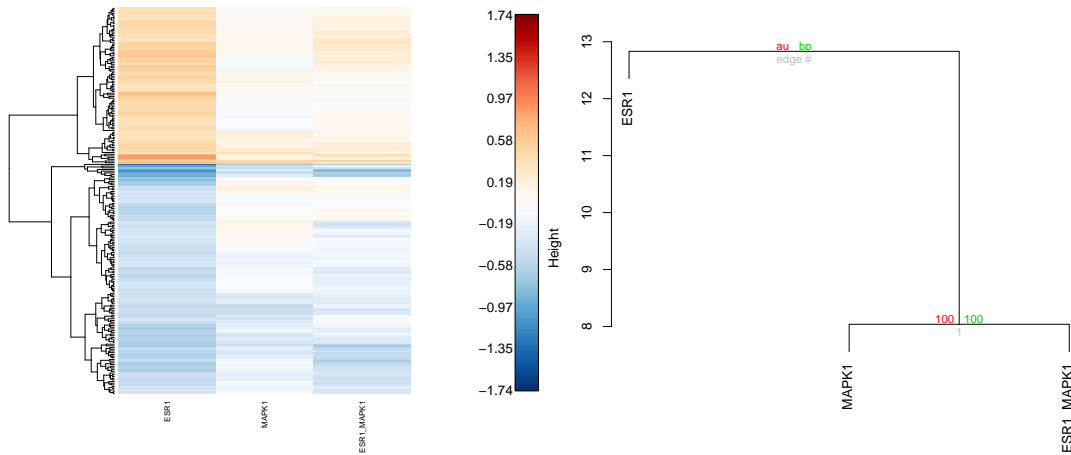
Abbildung 3.12: Epistaseanalyse der post-transkriptionellen Genstilllegung von *ESR1* und *CCNG2*

(approximated unbiased probability sowie „bp“ (bootstrap probability) stellen zwei Wahrscheinlichkeitsmaße dafür dar, dass die Gene, entsprechend den jeweiligen Abbildung, zusammen clustern (s. Abb. 3.12 - 3.14).

3.11.1 Epistaseanalyse von *ESR1* und *CCNG2*

Abb. 3.12 zeigt die Epistaseanalyse des kombinatorischen Silencings von *ESR1* und *CCNG2*, sowie der Einzelsilencings von *ESR1* und *CCNG2*. Die hierarchische Clusteranalyse (Abb. 3.12 (a)) ergab eine deutliche Ähnlichkeit des globalen Expressionsprofils des Silencings von *ESR1* und dem Expressionsprofil der kombinatorischen Behandlung. Das Expressionsprofil von *CCNG2* wies hingegen eine geringere Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil des kombinatorischen Silencings auf. Die Wahrscheinlichkeitsmaße für die Bildung des Clusters wie in der Abbildung dargestellt betrug 1 (Abb. 3.12 (b)), demnach ist *ESR1* epistatisch auf *CCNG2*. Weiterhin ist in der Clusteranalyse zu erkennen, dass Gene, die aufgrund des Silencings von *CCNG2* reprimiert wurden, im Falle des Silencings von *ESR1* aktiviert wurden. Gleiches galt für den umgekehrten Fall. Daraus lässt sich ableiten, dass das Gen *CCNG2* im Signaltransduktionsweg oberhalb von *ESR1* liegen muss.

3.11 Epistaseanalyse der kombinierten Silencing Experimente



(a) hierarchische Clusteranalyse der Epistaseanalyse (b) Dendrogramm der Epistaseanalyse

Abbildung 3.13: Epistaseanalyse der post-transkriptionellen Genstilllegung von *ESR1* und *MAPK1*

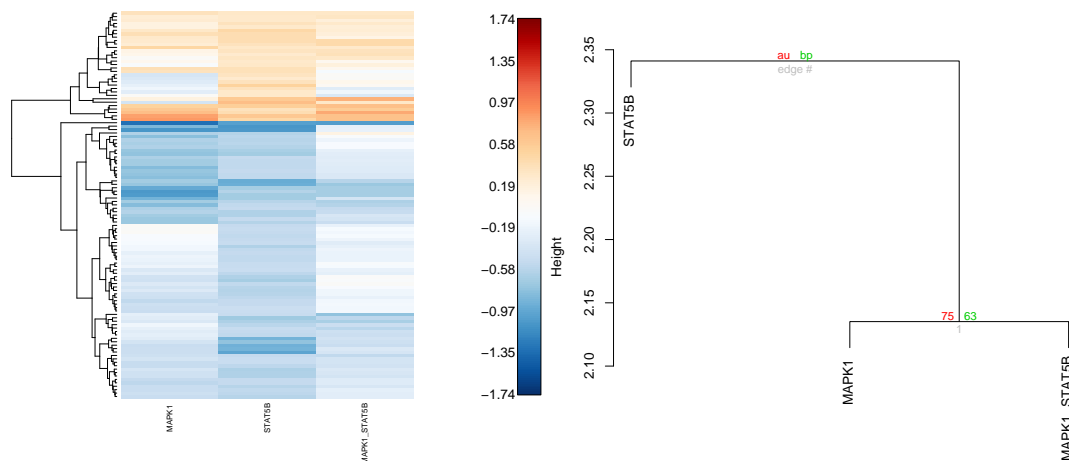
3.11.2 Epistaseanalyse von *ESR1* und *MAPK1*

Die Epistaseanalyse der Einzelsilencingexperimente der Gene *ESR1* und *MAPK1*, sowie dem korrespondierenden kombinatorischen Silencing ist in Abb. 3.13 in Form einer hierarchischen Clusteranalyse dargestellt. Aus Abb. 3.13 (a) ist deutlich zu erkennen, dass das Expressionsprofil der post-transkriptionellen Genstilllegung von *MAPK1* dem Profil des kombinatorischen Silencings ähnlicher ist, als das Expressionsprofil des *ESR1* Silencings. Daraus folgt, mit einem Wahrscheinlichkeitsmaß von 1 (Abb. 3.13 (b)), dass *MAPK1* epistatisch auf *ESR1* ist. In diesem Fall wurden Gene, die in Folge des Silencings von *ESR1* reprimiert wurden, bei der post-transkriptionellen Genstilllegung von *MAPK1* aktiviert. Demnach wirkt *ESR1* aktivierend auf *MAPK1* und liegt daher oberhalb von *MAPK1*.

3.11.3 Epistaseanalyse von *MAPK1* und *STAT5B*

Abb. 3.14 (a) zeigt die hierarchische Clusteranalyse zwischen den Silencingexperimenten der Gene *MAPK1* und *STAT5B*, sowie der korrespondierenden kombinatorischen Genstilllegung. Das Expressionsprofil des *MAPK1* Silencings entspricht dabei mehr dem Profil des kombinatorischen Silencings, woraus folgt,

3 Ergebnisse



(a) hierarchische Clusteranalyse der Epistaseanalyse (b) Dendrogramm der Epistaseanalyse

Abbildung 3.14: Epistaseanalyse der post-transkriptionellen Genstilllegung von *MAPK1* und *STAT5B*

dass *MAPK1* epistatisch auf *STAT5B* ist. Gene, die aufgrund des Silencings von *MAPK1* aktiviert werden, werden beim Silencing von *STAT5B* reprimiert. Demnach wirkt *STAT5B* inhibierend auf *MAPK1*. *STAT5B* liegt daher oberhalb von *MAPK1*. Die Wahrscheinlichkeitsmaße des Clusters liegen, in Abhängigkeit von der verwendeten Methode, bei 0.63 (bootstrap probability) bzw. 0.75 (approximated unbiased probability) (s. Abb. 3.14 (b)).

3.12 Genomweite Expressionsanalysen der Behandlung mit endokrinen Substanzen

Neben den globalen Expressionsanalysen nach gezielter post-transkriptioneller Genstilllegung von einzelnen Genen, oder nach kombinatorischem Silencing von zwei Genen, wurden ebenfalls genomweite Expressionsanalysen nach Behandlung der Zellen mit endokrinen Substanzen durchgeführt. Dabei erfolgte die Behandlung der Zellen mit 17β -Estradiol bzw. Tamoxifen anhand der in Abschnitt 2.10 und 2.11 beschriebenen Vorschrift. Die Auswertung der cDNA Microarrays erfolgte, analog zu den bereits erläuterten Expressionsanalysen, mit Hilfe der Statistikumgebung R (*vsn* und *limma*, Huber et al. [2002], Smyth [2004]).

Tabelle 3.11: Signifikant veränderte Expressionswerte nach 17β -Estradiol Behandlung

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>CCNG2</i>	1.77×10^{-3}	0.546
<i>XBP1</i>	4.76×10^{-3}	2.332
<i>HSPB8</i>	1.30×10^{-2}	1.426

Legende: FC = fold change

3.12.1 Expressionsanalyse der 17β -Estradiol Behandlung

Durch die dreistündige Inkubation der MCF-7 Zellen mit 10 nM 17β -Estradiol reagierten insgesamt 117 Gene mit einer signifikanten Änderung ($p - Wert \leq 0.05$) in ihrem Expressionsverhalten. Tabelle 3.11 zeigt die Expressionswerte der zum Silencing ausgewählten Gene aus Abschnitt 3.1. Die Reduktion der Expression von *CCNG2* aufgrund der Behandlung mit 17β -Estradiol spiegelt die in der Literatur bekannten Daten wider (Stossi et al. [2006]). Die Aktivierung der Expression von *XBP1* und *HSPB8* durch eine gesteigerte Aktivierung des $ER\alpha$ in Folge der Bindung von 17β -Estradiol wurde bereits in der Literatur (Lacroix and Leclercq [2004], Sun et al. [2007], West et al. [2001]) ausführlich beschrieben. Ein Vergleich der Expressionsprofile zwischen der Stimulation des $ER\alpha$ mit 17β -Estradiol und der Inhibition des $ER\alpha$ durch Tamoxifen, bzw. Silencing durch siRNA ist in den Abschnitten 3.13.2 und 3.13.3 erläutert.

3.12.2 Expressionsanalyse der Tamoxifen Behandlung

Die Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen anhand der in Abschnitt 2.11 beschriebenen Methode ergab bei 2937 Genen eine signifikante Veränderung ($p - Wert \leq 0.05$) der relativen mRNA Konzentration. Unter den signifikant regulierten Genen befinden sich auch die in Tabelle 3.12 aufgeführten Gene. Das Expressionsprofil der Tamoxifen Behandlung deckt sich in einem großen Bereich mit dem Expressionsprofil der post-transkriptionellen Genstilllegung von *ESR1* (s. Abschnitt 3.8.5 und 3.13.1). Das Profil der globalen Expressionsanalyse nach einer Behandlung mit Tamoxifen wurde in den Abschnitten 3.13.1 und 3.13.2 mittels hierarchischer Clusteranalyse mit den Expressionsprofilen der Microarrayanalysen des *ESR1* Silencings und nach *ESR1*-Stimulation durch 17β -Estradiol verglichen.

Tabelle 3.12: Signifikant veränderte Expressionswerte nach Tamoxifen Behandlung

Gen Symbol	p-Wert	FC
<i>CCNG2</i>	9.46×10^{-3}	1.471
<i>XBP1</i>	1.70×10^{-2}	0.675
<i>MAPK1</i>	2.59×10^{-2}	0.844
<i>STC2</i>	3.00×10^{-2}	1.158

Legende: FC = fold change

3.13 Vergleich der Expressionsanalysen durch hierarchische Clusteranalysen

Ein Vergleich von globalen Expressionsprofilen kann mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse nach Eisen et al. visualisiert werden (Eisen et al. [1998]). Dabei werden unter Verwendung von statistischen Algorithmen die Gene innerhalb von globalen Expressionsprofilen anhand der Ähnlichkeit ihrer Expression angeordnet und in einem Dendrogramm grafisch dargestellt. Innerhalb eines Vergleichs zwischen verschiedenen globalen Expressionsanalysen werden stets die Gene in der hierarchischen Clusteranalyse dargestellt, die in beiden Experimenten ein signifikant verändertes Expressionsverhalten zeigen. Abb. 3.15 zeigt die hierarchische Clusteranalyse zwischen allen drei im Folgenden aufgeführten Experimenten. Zur Berechnung dieser Clusteranalyse wurden alle Gene verwendet, die in mindestens zwei der u. a. Experimenten signifikant differentiell exprimiert waren. Die separate grafische Darstellung der hierarchischen Clusteranalysen der nachfolgenden Vergleiche sind im Anhang Abb. A.18, Abb. A.19 und Abb. A.20 zu finden.

3.13.1 Vergleich ER α Silencing und Tamoxifen Behandlung

Die Behandlung von Patientinnen mit ER-positiven Mammakarzinomen sieht in der Regel eine bis zu fünf Jahre dauernde adjuvante Therapie mit dem SERM Tamoxifen vor. Durch den Einsatz von Tamoxifen wird versucht, die Bindung des 17 β -Estradiol an den ER α zu verhindern und damit die Signaltransduktionskaskaden der Proliferation und Migration zu unterbinden. Zumeist gelingt die Inaktivierung des Estrogenrezeptor Signals durch diese Behandlung, jedoch

stellt der Estrogenrezeptor Signalweg ein sehr komplexes und verzweigtes, regulatorisches System dar. Um die Unterschiede zwischen einer vollständigen Inaktivierung des ER α durch gezieltes Silencing und einer Inhibition durch Tamoxifen darzustellen, wurden die globalen Expressionsanalysen dieser beiden Experimente miteinander verglichen. Insgesamt wurden 45 Gene ermittelt, die in beiden Experimenten eine signifikante Änderung in ihrer Expression zeigten. Innerhalb dieser 45 Gene zeigten jedoch 13 Gene eine gegenläufige Expressi-

Tabelle 3.13: Gegenläufig exprimierte Gene nach *ESR1* Silencing und Tamoxifen Behandlung

Gen Symbol	p-Wert (<i>ESR1</i>)	FC (<i>ESR1</i>)	p-Wert (TAM)	FC (TAM)
<i>STC2</i>	6.11×10^{-8}	0.262	3.00×10^{-2}	1.158
<i>HIST1H2BD</i>	1.77×10^{-4}	2.343	3.63×10^{-2}	0.885
<i>FHL2</i>	5.89×10^{-4}	0.534	2.10×10^{-2}	1.388
<i>KPNA2</i>	6.39×10^{-4}	0.527	4.14×10^{-2}	1.121
<i>SEMA3C</i>	4.11×10^{-3}	0.589	2.22×10^{-2}	1.178
<i>DEK</i>	4.99×10^{-3}	0.617	2.22×10^{-2}	1.227
<i>ABAT</i>	6.71×10^{-3}	0.599	2.43×10^{-2}	1.162
<i>AGR2</i>	8.04×10^{-3}	0.638	3.54×10^{-2}	1.304
<i>SNX24</i>	9.44×10^{-3}	0.654	1.10×10^{-2}	1.384
<i>MGC21644</i>	2.49×10^{-2}	0.651	2.24×10^{-2}	1.204
<i>GDAP1</i>	3.49×10^{-2}	0.690	4.51×10^{-2}	1.171
<i>TGFB2</i>	3.98×10^{-2}	0.699	1.25×10^{-2}	1.477
<i>TXNRD1</i>	4.60×10^{-2}	0.701	2.22×10^{-2}	1.192

Legende: FC = fold change, ESR1 = Silencing ESR1, TAM = Tamoxifen.

on in beiden Experimenten (Tabelle 3.13). Bei 12 dieser gegenläufig regulierten Gene kam es im Fall der Tamoxifen Behandlung zu keiner Reduktion in der Expression, jedoch im Fall des *ESR1* Silencings. Die vergleichende Darstellung der beiden Expressionsprofile ist in Form einer hierarchischen Clusteranalyse (Eisen et al. [1998]) in Abb. A.18 aufgeführt. Abb. A.18 und Abb. 3.15 zeigen deutlich die Abspaltung der 13 gegenläufig exprimierten Gene innerhalb der hierarchischen Clusteranalyse.

3.13.2 Vergleich Estrogenrezeptorstimulation mit 17β -Estradiol und Tamoxifen Behandlung

Abb. A.19 zeigt die hierarchische Clusteranalyse der Expressionsprofile nach dreistündiger 17β -Estradiol Stimulation (s. Abschnitt 3.7.1) und der Behandlung mit dem SERM Tamoxifen (s. Abschnitt 3.7.2). Vergleichend zeigen 38 Gene eine signifikante Expressionsänderung in beiden Experimenten. Aus der hierarchischen Clusteranalyse ist jedoch eindeutig ersichtlich, dass ein Teil der signifikant veränderten Gene im gleichen Maße von 17β -Estradiol und Tamoxifen beeinflusst wurden. Tabelle 3.14 zeigt die Liste dieser 15 Gene. Die nicht erfolgte Repression einzelner Gene, deren Expression vom Estrogenrezeptor abhängig sind, kann damit erklärt werden, dass Tamoxifen lediglich den Bereich des ER α blockiert, der mit der Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) interagiert und somit nicht die ligandenunabhängige transkriptionelle Aktivität über die Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) des ER α beeinflusst (Robertson [2002]). Von besonderem Interesse ist in diesem Fall das Gen *FHL2*, welches für einen induzierbaren Koaktivator des AP-1 (Jun) codiert (Morlon and Sassone-Corsi [2003]). Die Expression dieses Gens wurde durch die Behandlung von Tamoxifen nicht reprimiert, jedoch durch die post-transkriptionelle Genstilllegung des ER α (s. Tabelle 3.13). Gleichzeitig war eine Aktivierung der Expression durch die Stimulation mit 17β -Estradiol zu verzeichnen (s. Tabelle 3.14).

3.13.3 Vergleich Estrogenrezeptorstimulation mit 17β -Estradiol und ER α Silencing

Abb. A.20 zeigt die hierarchische Clusteranalyse der Experimente für das Silencing des ER α durch RNA Interferenz und der Stimulation des ER α durch Applikation von 17β -Estradiol. Die klar gegensätzlichen regulatorischen Effekte in Folge der jeweiligen Experimente sind deutlich aus der Clusteranalyse ersichtlich. Dabei zeigte das Gen *TGFB2* in beiden Experimenten eine verringerte Expression. *TGFB2* codiert für den „transforming growth factor, beta 2“ und stellt einen molekularen Biomarker für die antiproliferativen Effekte von Tamoxifen und dessen Derivaten dar (Buck et al. [2008]). Die Expression von *TGFB2* wird durch den Einfluss von Tamoxifen erhöht, jedoch nicht durch ein Silencing des ER α bzw. die Stimulation des ER α mit 17β -Estradiol beeinflusst (s. Abschnitt 3.13.1 und 3.13.2).

Tabelle 3.14: Gleichartig regulierte Gene nach *ESR1*-Stimulation und Tamoxifen Behandlung

Gen Symbol	p-Wert (E2)	FC (E2)	p-Wert (TAM)	FC (TAM)
<i>FHL2</i>	1.40×10^{-3}	1.930	2.10×10^{-2}	1.388
<i>MXD1</i>	4.76×10^{-3}	1.698	3.23×10^{-2}	1.331
<i>C12orf41</i>	4.95×10^{-3}	1.455	2.39×10^{-2}	1.196
<i>SLC25A25</i>	4.95×10^{-3}	1.530	3.19×10^{-2}	1.131
<i>ULK1</i>	1.65×10^{-2}	1.593	2.22×10^{-2}	1.293
<i>SNX24</i>	1.68×10^{-2}	1.419	1.10×10^{-2}	1.384
<i>RHOBTB1</i>	1.68×10^{-2}	1.353	1.15×10^{-2}	1.323
<i>KIAA0182</i>	2.13×10^{-2}	1.402	2.22×10^{-2}	1.236
<i>ITGA6</i>	2.39×10^{-2}	1.324	2.22×10^{-2}	1.336
<i>DLG5</i>	2.60×10^{-2}	1.447	2.22×10^{-2}	1.223
<i>SH3BP5</i>	2.63×10^{-2}	1.427	2.41×10^{-2}	1.181
<i>EXOC2</i>	2.96×10^{-2}	1.334	2.43×10^{-2}	1.163
<i>SBDS</i>	3.05×10^{-2}	1.536	2.22×10^{-2}	1.208
<i>FOSL2</i>	3.61×10^{-2}	1.341	9.99×10^{-3}	1.423
<i>ZNF185</i>	4.04×10^{-2}	1.338	4.04×10^{-2}	1.224

Legende: FC = fold change, E2 = 17 β -Estradiol, TAM = Tamoxifen.

3.14 Connectivity Map Vergleich

Die in den Abschnitten 3.8.5, 3.12.1 und 3.12.2 aufgeführten genomweiten Expressionsanalysen nach Silencing von ER α , bzw. Behandlung mit den endokrinen Substanzen 17 β -Estradiol und Tamoxifen, können durch einen Datenabgleich mit der Connectivity Map Datenbank (<http://www.broad.mit.edu/cmap>) validiert werden. Die Connectivity Map Datenbank enthält die Expressionsprofile von ca. 550 Genexpressionsanalysen (Stand: Juni 2008) von *in vitro* kultivierten humanen Zellen nach Behandlung mit reaktiven Substanzen (Lamb [2007], Lamb et al. [2006]). Die gemessenen Expressionsprofile aus den posttranskriptionellen Genstilllegungen werden, getrennt nach überexprimierten und reprimierten mRNAs, mit den Expressionsprofilen der einzelnen Behandlungen mit reaktiven Substanzen statistisch verglichen und durch einen Algorithmus mit einem Ähnlichkeitswert versehen. Bei einer größtmöglichen Ähnlichkeit des Expressionsprofils eines Silencing Experimentes mit dem Expressionsprofil eines Behandlungsexperimentes aus der Datenbank wird ein Ähnlichkeitswert nahe 1

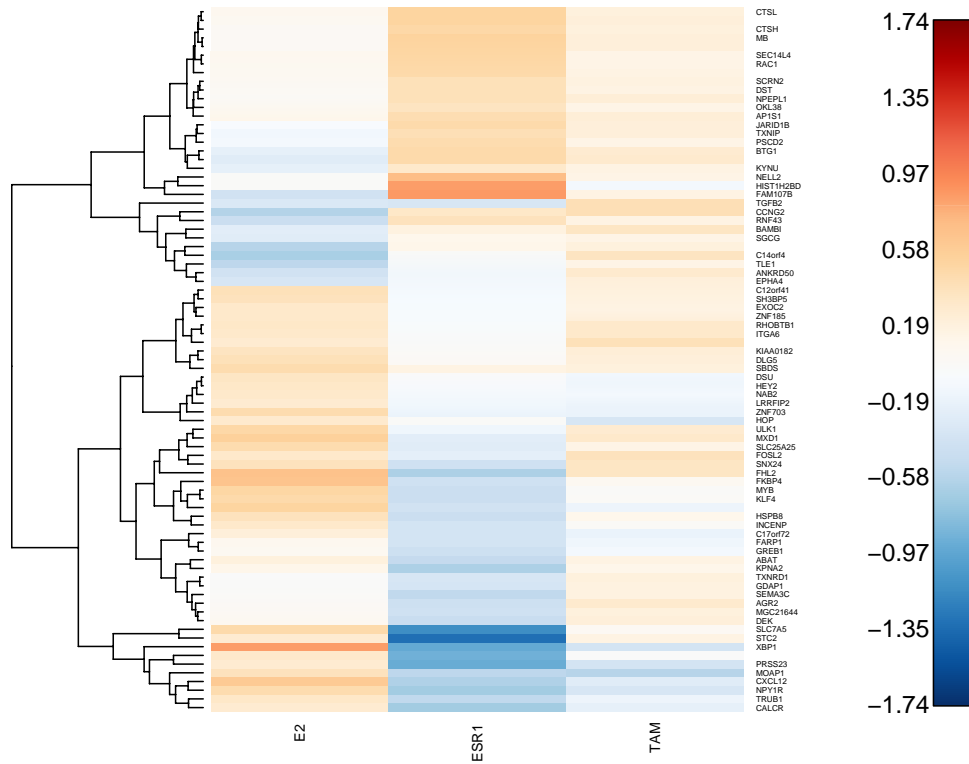


Abbildung 3.15: Hierarchische Clusteranalyse der genomweiten Expressionsanalysen nach Stimulation des $ER\alpha$, nach Silencing von *ESR1* und Tamoxifen Behandlung

angegeben. Das Experiment mit der größtmöglichen Verschiedenheit wird mit einem Ähnlichkeitswert nahe -1 versehen. Die Tabellen 3.15 - 3.17 zeigen Ausschnitte aus den Datenabgleichen mit der Connectivity Map Datenbank. Der angegebene Rang ist dabei ein Maß für die relative Positionierung des jeweiligen Experiments.

Anhand des durch den „Nested Effekts Model“ Algorithmus errechneten Netzwerks, dargestellt in Abb. 3.11 auf Seite 69, wurden die Gene *AKT2*, *CCNG2* sowie *XBP1* anhand ihrer Expressionsprofile nach post-transkriptioneller Genstilllegung oberhalb vom Estrogenrezeptor positioniert. Daher wurden für diese genannten Gene ebenfalls Vergleiche der jeweiligen Expressionsprofile mit der Connectivity Map Datenbank errechnet. Die Tabellen 3.18 - 3.20 zeigen die Auflistungen dieser Vergleiche. Durch den Abgleich der gemessenen Expressionsprofile mit den Einträgen der Connectivity Map Datenbank kann eine indirekte Validierung des errechneten Gen-Interaktionsnetzwerks erfolgen.

3.14.1 Connectivity Map Vergleich *ESR1* Silencing

Tabelle 3.15 zeigt den Vergleich des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung des ER α mit den gespeicherten Expressionsprofilen nach Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen aus der Connectivity Map Datenbank. Das Expressionsprofil des *ESR1* Silencing zeigte die größte Übereinstimmung mit dem Expressionsprofil nach einer Behandlung von MCF-7 Zellen mit 10 nM Wortmannin, einem Inhibitor der PI3K (Creemer et al. [1996]). Die PI3K ist in die nicht-genomische Aktivität des Estrogenrezeptors involviert (Björnstrom and Sjöberg [2005]) und vermittelt die schnellen regulatorischen Einflüsse der Estrogenbindung (s. Abschnitt 1.4.2). Des Weiteren zeigte das Expressionsprofil des *ESR1* Silencing eine sehr hohe Ähnlichkeit zu dem Expressionsprofil nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit dem SERM Fulvestrant (Buzdar [2004], Robertson [2004]). Die geringste Ähnlichkeit, und demnach einen Wert nahe -1, war zwischen dem Expressionsprofil nach Silencing des Estrogenrezeptors und einer Stimulation mit Estradiol und Genistein zu verzeichnen. Genistein, einem Sekundärmetabolit aus Pflanzen (aus Leguminosen, Papilionoiden, Rosaceen etc.), wird eine leicht estrogene Wirkung zugeschrieben (Hsieh et al. [1998]). Aus den gezeigten Daten ist eindeutig erkennbar, dass eine post-transkriptionelle Genstilllegung in MCF7 Zellen ein sehr ähnliches Expressionsprofil wie nach einer Behandlung mit einem spezifischen PI3K Inhibitor, bzw. einem SERM ergibt. Umgekehrt ist das gemessene Expressionsprofil maximal unterschiedlich zu einem Expressionsprofil nach Stimulation der MCF-7 Zellen mit dem Steroidhormon Estradiol.

3.14.2 Connectivity Map Vergleich *ESR1* Stimulation mit 17 β -Estradiol

Der Vergleich des gemessenen Expressionsprofils nach Stimulation des *ESR1* mit 17 β -Estradiol und der Connectivity Map Datenbank ist in Tabelle 3.16 aufgeführt. Demnach zeigte das Expressionsprofil die größte Übereinstimmung mit der Behandlung mit 10 nM Estradiol in MCF-7 Zellen aus der Connectivity Datenbank. Des Weiteren wurde eine sehr große Übereinstimmung mit der Behandlung von MCF-7 mit 10 μ M Genistein (s. Abschnitt 3.14.1, Hsieh et al. [1998]) und dem Phytoalexin Resveratrol gefunden. Resveratrol gehört zur Gruppe der

Tabelle 3.15: Vergleich des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *ESR1* mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank.

Rang	Substanz	Dosis	Zelllinie	score
2	Wortmannin	10 nM	MCF7	0.99
3	Fulvestrant	1 μ M	MCF7	0.989
8	Wortmannin	1 μ M	MCF7	0.941
9	Resveratrol	10 μ M	MCF7	0.928
449	Genistein	10 μ M	MCF7	-0.709
450	alpha-Estradiol	10 nM	MCF7	-0.719
451	Estradiol	100 nM	MCF7	-0.801
452	Estradiol	10 nM	MCF7	-0.82

Hydroxystilbene, kommt u. a. in Weinreben vor und ist hauptsächlich als ein durch Pilzinfektionen induzierbarer Abwehrstoff von Bedeutung. Gehm et al. konnten eine agonistische Interaktion des Estrogenrezeptors mit Resveratrol in MCF-7 Zellen nachweisen (Gehm et al. [1997]). Der maximale Unterschied zu dem Expressionsprofil nach Stimulation des *ESR1* mit 17β -Estradiol zeigten die Experimente nach Behandlung mit den beiden SERM Fulvestrant und Tamoxifen (s. Abschnitt 3.16). Dieser Abgleich mit der Connectivity Datenbank validiert plattformübergreifend das gemessene Expressionsprofil der Stimulation des $ER\alpha$ mit 17β -Estradiol.

Tabelle 3.16: Vergleich des Expressionsprofils nach Stimulation des *ESR1* mit 17β -Estradiol mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank.

Rang	Substanz	Dosis	Zelllinie	score
1	Estradiol	10 nM	MCF7	1
2	Phenanthridinon	51 μ M	MCF7	0.882
4	Genistein	10 μ M	MCF7	0.824
12	Resveratrol	50 μ M	MCF7	0.763
429	Tamoxifen	1 μ M	MCF7	-0.459
451	Fulvestrant	1 μ M	MCF7	-0.909
452	Fulvestrant	1 μ M	MCF7	-0.945
453	Fulvestrant	10 nM	MCF7	-1

3.14.3 Connectivity Map Vergleich *ESR1* Inhibition mit Tamoxifen

Die in Tabelle 3.17 angegebenen Daten zeigen den Vergleich der globalen Expressionsanalyse nach Behandlung der MCF-7 Zellen mit 100 nM Tamoxifen (s. Abschnitt 2.11) und der Connectivity Map Datenbank. Der größte Ähnlichkeitswert wurde dabei mit den Behandlungen von MCF-7 Zellen mit den Substanzen Vorinostat, Genistein und Fulvestrant errechnet. Die Wirkungsweise von Genistein und Fulvestrant wurden bereits in Abschnitt 3.14.1 und 3.14.2 beschrieben. Vorinostat, ein Histon-Deacetylase Hemmer, ist zur Behandlung des cutanen T-Zelllymphoms zugelassen, vermittelt eine Hyperacetylierung der Histone und damit einen kontrollierten Eintritt von Tumorzellen in die Apoptose (Xu et al. [2006]). Den kleinsten Ähnlichkeitswert, und demnach die maximale Verschiedenheit der globalen Expressionsanalyse nach Tamoxifenbehandlung der MCF-7 Zellen, wurde für die Behandlung von MCF-7 Zellen mit Estradiol errechnet (s. Tabelle 3.17). Die Expressionsanalysen, denen die Einträge der Connectivity Map Datenbank zugrunde liegen, beruhen auf Behandlungen der Zellen mit den verschiedenen angegebenen Substanzen über einen Zeitraum von 6 Stunden. Die Expressionsanalyse nach Behandlung der MCF7 Zellen mit Tamoxifen in dieser Arbeit wurde nach einem Einwirkungszeitraum von 24 Stunden erstellt. Daraus ist zu erklären, dass ein Vergleich dieser Expressionsanalyse mit den Einträgen der Connectivity Map Datenbank keinen direkten Bezug zu einer Behandlung mit Tamoxifen aufweist. Dennoch entsprach das genomweite Profil einer gezielten Perturbation des Estrogenrezeptors.

3.14.4 Connectivity Map Vergleich *AKT2* Silencing

Tabelle 3.18 listet die Ergebnisse der vergleichenden Analyse des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *AKT2* und den Expressionsprofilen der Connectivity Map auf. Das Expressionsprofil des *AKT2* Silencings zeigte dabei eine sehr hohe Übereinstimmung zu den Expressionsprofilen nach Behandlung von MCF7 Zellen mit den Selektiven Estrogenrezeptor Modulatoren Fulvestrant (Buzdar [2004], Robertson [2004]) und Tamoxifen (Osborne and Schiff [2005]), bzw. der Behandlung mit Inhibitoren der Phosphatidylinositol 3-Kinase Wortmannin (Creemer et al. [1996]) und LY-294002 (Vlahos et al.

Tabelle 3.17: Vergleich des Expressionsprofils nach Inhibition des *ESR1* mit Tamoxifen mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank

Rang	Substanz	Dosis	Zelllinie	score
14	Vorinostat	10 μ M	MCF7	0.691
15	Genistein	10 μ M	MCF7	0.688
17	Fulvestrant	1 μ M	MCF7	0.663
22	Imatinib	10 μ M	MCF7	0.636
408	Estradiol	100 nM	MCF7	-0.512
435	alpha-Estradiol	10 nM	MCF7	-0.671
441	alpha-Estradiol	10 nM	MCF7	-0.688
452	alpha-Estradiol	10 nM	MCF7	-0.915

[1994]). Diese Ergebnisse deckten sich mit den in 3.14.1 dargestellten Ergebnissen des Connectivity Map Vergleichs nach Silencing von *ESR1*. Analog zu dem Expressionsprofil nach Silencing des Estrogenrezeptors, zeigte das Silencing von *AKT2* eine maximale Verschiedenheit zu den Expressionsprofilen von MCF7 Zellen nach Behandlung mit dem Steroidhormon Estradiol und dem Isoflavon Genistein aus der Connectivity Map Datenbank (s. Abschnitt 3.14.1).

Tabelle 3.18: Vergleich des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *AKT2* mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank

Rang	Substanz	Dosis	Zelllinie	score
13	Wortmannin	10 nM	MCF7	0.824
15	Fulvestrant	10 nM	MCF7	0.8
28	LY-294002	10 μ M	MCF7	0.695
40	Tamoxifen	1 μ M	ssMCF7	0.505
407	alpha-Estradiol	10 nM	MCF7	-0.538
430	Estradiol	10 nM	ssMCF7	-0.701
450	Genistein	10 μ M	MCF7	-0.957
453	Estradiol	100 nM	MCF7	-1

3.14.5 Connectivity Map Vergleich *CCNG2* Silencing

Anhand des Expressionsprofils der post-transkriptionellen Genstilllegung von *CCNG2* wurde das Gen durch die statistische Analyse des NEM Algorithmus oberhalb des Estrogenrezeptors innerhalb des rekonstruierten Netzwerkes positioniert (s. Abb. 3.11). Tabelle 3.19 listet den Vergleich des Expressionsprofils mit den Expressionsprofilen der Connectivity Map Datenbank auf. Dabei zeigte das Expressionsprofil die größten Übereinstimmungen mit den Expressionsprofilen nach Behandlung von MCF7 Zellen mit Substanzen, die direkt den Estrogenrezeptor beeinflussen (Resveratrol und Fulvestrant), bzw. Substanzen, die als PI3K-Inhibitoren bekannt sind (LY-294002 und Wortmannin). Die wenigsten Übereinstimmungen zeigten sich mit den Expressionsprofilen nach endokriner Stimulation des Estrogenrezeptors mit Estradiol, bzw. Genistein. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen des Connectivity Map Vergleichs nach post-transkriptioneller Stilllegung des Estrogenrezeptors (s. Abschnitt 3.14.1).

Tabelle 3.19: Vergleich des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *CCNG2* mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank

Rang	Substanz	Dosis	Zelllinie	score
3	Resveratrol	10 μ M	MCF7	0.885
37	Fulvestrant	1 μ M	ssMCF7	0.628
38	LY-294002	10 μ M	MCF7	0.628
45	Wortmannin	10 nM	MCF7	0.606
432	Estradiol	10 nM	MCF7	-0.67
440	Genistein	1 μ M	MCF7	-0.703
450	Estradiol	10 nM	MCF7	-0.857
451	Genistein	10 μ M	MCF7	-0.898

3.14.6 Connectivity Map Vergleich *XBP1* Silencing

Der Vergleich des Expressionsprofils nach *XBP1* Silencing und den Einträgen der Connectivity Map Datenbank sind in Tabelle 3.20 dargestellt. Analog zu den bereits beschriebenen Vergleichen in den Abschnitten 3.14.1, 3.14.3, 3.14.4 und

Tabelle 3.20: Vergleich des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *XBP1* mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank

Rang	Substanz	Dosis	Zelllinie	score
12	Resveratrol	50 μ M	MCF7	0.635
38	Fulvestrant	1 μ M	MCF7	0.524
63	Wortmannin	10 nM	MCF7	0.482
66	LY-294002	10 μ M	MCF7	0.476
396	Genistein	1 μ M	MCF7	-0.502
404	Estradiol	10 nM	ssMCF7	-0.529
428	Estradiol	100 nM	MCF7	-0.663
436	Genistein	1 μ M	MCF7	-0.741

3.14.5 zeigte das Expressionsprofil die größten Ähnlichkeiten mit den Expressionsprofilen nach Behandlungen von MCF7 Zellen mit Inhibitoren des Estrogenrezeptors (Resveratrol und Fulvestrant), bzw. PI3K-Inhibitoren (Wortmannin und LY-294002). In Einklang mit den bereits beschriebenen Vergleichen (3.14.1, 3.14.3, 3.14.4 und 3.14.5), stellte sich das Expressionsprofil von *XBP1* als besonders gering korreliert mit den Expressionsprofilen aus der Connectivity Map Datenbank nach Behandlungen der Zellen mit direkten Stimulationen des Estrogenrezeptors (Estradiol und Genistein) dar.

4 Diskussion

Nach der Präsentation der gemessenen Daten im vorangegangenen Kapitel soll das hier folgende Kapitel einen Überblick über die erlangten Ergebnisse, sowie Diskussionen für Anwendungen in der Zukunft bieten. Dazu erfolgt eine ausführliche Interpretation der Messdaten sowie eine Darlegung und Diskussion der Zusammenhänge.

4.1 Validierung der konstruierten Netzwerkhypothese

Durch den „Nested Effects Model“ Algorithmus (Fröhlich et al. [2007, 2008]) wurde anhand einer statistischen Analyse der globalen Expressionsanalysen nach post-transkriptioneller Genstilllegung von insgesamt 13 Genen das in Abb. 3.11 (Seite 69) dargestellte Gen-Interaktionsnetzwerk rekonstruiert. Die Kanten zwischen den einzelnen Knoten entsprechen dabei direkten, sowie indirekten Verbindungen zwischen den Genen. Die Richtung der Effekte ist durch die Pfeilspitze angezeigt. Der Effekt der Interaktion (aktivierend oder deaktivierend) kann im Fall des verwendeten Algorithmus nicht dargestellt werden. Eine Kante zwischen zwei Knoten stellt keine zwingende Notwendigkeit einer direkten Interaktion dieser beiden Gene dar. Die Ausgabe der statistischen Analyse durch den NEM Algorithmus erfolgt in Form eines transitiv reduzierten Graphen mit gerichteten Kanten. Dabei werden indirekte Kanten zwischen zwei Knoten sukzessive entfernt, sofern die Interaktion zwischen diesen beiden Knoten durch andere Kanten erklärt werden kann. Schlussendlich erfolgt durch den Netzwerkalgorithmus eine Einstufung der 13 Gene in Bezug auf ihre relative Lage in diesem gerichteten, transitiv reduzierten Graph zueinander (anhand der Betrachtung gemessenen Expressionsprofile). Die Validierung des rekonstruierten Netzwerks kann dabei

durch einen Abgleich mit literaturbekannten Interaktionen, durch Epistaseanalyse von kombinatorischen Genstilllegungen und durch Vergleich der gemessenen Expressionsprofile mit Expressionsprofilen der Connectivity Map Datenbank erfolgen.

4.1.1 Vergleich mit literaturbekannten Interaktionen

In Abschnitt 3.9 wurden die in der Literaturdatenbank Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems[®], <http://www.ingenuity.com>) bekannten direkten Interaktionen zwischen den 13 zur post-transkriptionellen Genstilllegung ausgewählten Genen grafisch in Form eines Interaktionsnetzwerks dargestellt. Durch einen sukzessiven Vergleich des Netzwerks der literaturbekannten Interaktionen mit dem rekonstruierten Netzwerk können die inferierten Interaktionen, und damit der NEM Algorithmus, validiert werden. Im Folgenden werden die jeweiligen Interaktionen der Gene im NEM-Netzwerk (Abb. 3.11) durch Vergleich mit Literaturdaten (Abb. 3.10) erläutert und diskutiert.

Einfluss von *XBP1* bzw. *CCNG2* auf die Expression von *ESR1* Gomez et al. [2007] haben den Einfluss von *XBP1* auf die Expression von *ESR1* sowie die Überexpression in Antiestrogen-resistenten Tumoren beschrieben. Die Expression von *XBP1* korreliert mit einem Verlust der Sensitivität der Zellen gegenüber den antiproliferativen Effekten von Antiestrogenen (Gomez et al. [2007]). Zusätzlich ist die Expression von *XBP1* in Antiestrogen-resistenten Brustkrebszelllinien erhöht (Gu et al. [2002]), was folgern läßt, dass die Resistenz von Estrogenrezeptor positiven Mammakarzinomen gegenüber antiestrogener Therapie (z. B. mit Tamoxifen) von der Expression dieses Gens begünstigt wird. *XBP1* aktiviert die ligandenunabhängige Aktivität des Estrogenrezeptors durch Interaktion mit der Aktivierungs Funktion-1 des ER α (Ding et al. [2003]), welche durch eine Behandlung mit Tamoxifen nicht blockiert wird. Durch diesen Zusammenhang und aufgrund der Tatsache, dass die Expression von *XBP1* einen direkten Einfluss auf die Expression von *ESR1* ausübt, stellt dieses Gen ein bereits neu diskutiertes therapeutisches Ziel, vornehmlich bei der Behandlung von Antiestrogen-resistenten Mammakarzinomen, dar. Die Relevanz von *XBP1* als mögliches therapeutisches Ziel lässt sich durch die oberhalb von *ESR1* liegende Positionierung des Gens im inferierten Netzwerk bestätigen.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionsprofile in Folge des Silencings der Gene *CCNG2* und *XBP1*, sind diese beiden Gene durch die statistische Analyse mit dem NEM Algorithmus nicht voneinander zu unterscheiden. Daher erfolgt im vorhergesagten Netzwerk eine Verknüpfung mit einem Doppelpfeil. Die Positionen der beiden Gene sind folglich untereinander austauschbar. Der reprimierende Effekt von *ESR1* auf die Expression von *CCNG2* wurde bereits von [Stossi et al. \[2006\]](#) nachgewiesen und konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Stimulation des *ESR1* durch 17β -Estradiol experimentell bestätigt werden (s. 3.12.1). Gleichzeitig konnte bei Inhibition des Estrogenrezeptors durch eine Behandlung mit Tamoxifen die reprimierende Wirkung von *ESR1* auf *CCNG2* aufgehoben werden (s. Abschnitt 3.12.2). Eine Interpretation des inferierten Netzwerks aus Abb. 3.11 zeigt jedoch deutlich einen Einfluss von *CCNG2* auf die Expression von *ESR1* anhand der genomweiten Expressionsprofile. Die Auswirkungen des Silencings von *CCNG2* führen zu einer eindeutigen Repression von *ESR1*. Anhand der hier aufgezeigten Daten kann demnach ein aktivierender Effekt der Expression von *CCNG2* auf die *ESR1* Expression beschrieben werden (s. Abb. 4.1). Bisher wurde lediglich der inaktivierende Effekt der *ESR1* Expression auf die Expression von *CCNG2* beschrieben ([Stossi et al. \[2006\]](#)). Der hier dargestellte neue Effekt der Aktivierung von *ESR1* durch die Expression von *CCNG2* überwiegt in den Experimenten dabei den bereits in der Literatur bekannten inaktivierenden Effekt der *ESR1* Expression auf die Expression von *CCNG2*. Daher erfolgte anhand der statistischen Auswertung eine Positionierung von *CCNG2* oberhalb des Estrogenrezeptors.

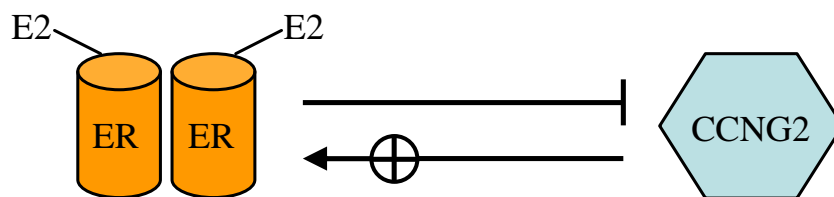


Abbildung 4.1: Aus den Ergebnissen erstelltes Modell der Aktivierung der *ESR1* Expression durch *CCNG2*. Die Inaktivierung von *CCNG2* durch den aktivierten Estrogenrezeptor ([Stossi et al. \[2006\]](#)) ist ebenfalls gezeigt.

Verknüpfung zwischen *AKT2* und *ESR1* Im inferierten Netzwerk aus Abb. 3.11 wurde das Gen *ESR1* oberhalb von *AKT2* positioniert und wird demnach direkt oder indirekt reguliert. Sun et al. [2001] konnten zeigen, dass konstitutiv aktiviertes AKT2 die transkriptionelle Aktivität von *ESR1* unterstützt. Stoica et al. [2003a] und Campbell et al. [2001] konnten ebenfalls eine Aktivierung des Estrogenrezeptors durch den PI3K/AKT Signaltransduktionsweg darstellen. Dabei aktiviert AKT2 ausschließlich die estrogenunabhängige Funktion des Estrogenrezeptors (Aktivierung der AF-2 (s. Abb. 1.5)). Die posttranskriptionelle Genstilllegung von *AKT2* führte zur Repression von *ESR1* (s. Tabelle 3.6). Diese bisher in der Literatur dargestellten Zusammenhänge konnten korrekt durch den NEM Algorithmus anhand der globalen Expressionsprofile rekonstruiert werden.

Interaktion zwischen *ESR1* und *BCL2* van 't Veer et al. [2002] und Park et al. [2002] konnten zeigen, dass die Expression von *BCL2* positiv mit der Expression des Estrogenrezeptors korreliert. Teixeira et al. [1995] postulierten einen Mechanismus, in dem das estrogenabhängig exprimierte Proto-Onkogen *BCL2* an der Entwicklung von therapeutisch resistenten Mammakarzinomen beteiligt ist. Durch die statistische Analyse der genomweiten Expressionsanalysen nach post-transkriptioneller Genstilllegung wurde das Gen *BCL2* unterhalb des Estrogenrezeptors positioniert, was im Einklang mit den Daten aus der Literaturdatenbank Ingenuity steht und damit die vorhergesagte Verknüpfung bestätigt.

Verknüpfung zwischen *BCL2* und *TMEM45B* Das Gen *TMEM45B* wurde in globalen Genexpressionsanalysen von Mammakarzinomen als dereguliert in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus gefunden (Daten nicht gezeigt). In der Literatur sind jedoch keine Informationen zu den Funktionen dieses Gens beschrieben (Nemeth et al. [2007]). Folglich beinhaltet die Ingenuity Pathway Datenbank keine Einträge zu diesem Gen. Das Interaktionsnetzwerk aus Literaturdaten enthält dieses Gen demnach nicht (s. Abb. 3.10). Die durch den NEM Algorithmus vorhergesagte Interaktion der Gene *BCL2* und *TMEM45B* kann hier nur postuliert werden. Die Robustheit und Stabilität des NEM Algorithmus wurden anhand der korrekten Rekonstruktion der bisher diskutierten Interaktionen sowie auf statistischer Ebene in Fröhlich et al. [2007, 2008] gezeigt. Durch den Algorithmus vorhergesagte neue Interaktionen (Abb. 3.11), die bisher nicht

durch Literaturdaten belegt wurden, können daher als sehr wahrscheinlich angesehen werden.

Einfluss von *BCL2* auf *STAT5B* Die Kante zwischen den Genen *BCL2* und *STAT5B* aus den beiden Netzwerken zeigt in entgegengesetzte Richtungen. Nach den Angaben des Netzwerks aus den Daten der Ingenuity Pathway Datenbank hat *STAT5B* einen Einfluss auf die Expression von *BCL2* (Kelly et al. [2003]). Diese Interaktion wurde lediglich in Mäusen beobachtet und kann daher nicht zur Validierung von Gen-Interaktionen in einem humanen Zellsystem herangezogen werden. Die gezeigte Interaktion stellt jedoch eine, aufgrund der gemessenen Daten, statistisch stabile Kante dar.

Interaktion von *STAT5B* mit *STC2* Eine direkte Interaktion des Gens *STAT5B* mit *STC2* kann im Falle des literaturgestützten Netzwerks aus der Ingenuity Pathway Datenbank nicht bestätigt werden. Vielmehr kann eine Verbindung dieser Gene über zwei intermediäre Gene *ARRB2* und *HSP90* erklärt werden. Gleichzeitig steht *HSP90* in Interaktion mit dem Estrogenrezeptor (Jiang et al. [2004]). Demnach wird die abwärts von *STAT5B* liegende Position von *STC2* durch einen Vergleich mit Literaturdaten unterstützt. Eine Erklärung von vorhergesagten Interaktionen innerhalb des postulierten NEM Netzwerks über Gene bzw. Proteine, die nicht im Rahmen der Experimente post-transkriptionell stillgelegt wurden, ist möglich. Die vorhergesagten Interaktionen werden aufgrund der statistischen Analyse der beeinflussten Gene eines jeden einzelnen Silencings vorhergesagt. Daher entspricht eine Kante zwischen zwei Genen nicht notwendig einer direkten Interaktion dieser beiden Gene. Vielmehr weist ein Expressionsprofil eines weiter oben liegenden Gens im NEM Netzwerk auf einen Einfluss auf das Expressionsprofil eines weiter abwärts liegenden Genes.

Interaktion von *STC2* und *FOXA1* Eine direkte Verknüpfung zwischen *STC2* und *FOXA1* konnte mit einer Netzwerkrekonstruktion durch Ingenuity nicht dargestellt werden. Aufgrund der oben angegebenen Zusammenhänge innerhalb des rekonstruierten Netzwerks und den Eigenschaften des NEM Algorithmus kann auch hier die Verknüpfung dieser beiden Gene über zusätzliche Zwischenpunkte ($STC2 \rightarrow ARRB2 \rightarrow HSP90 \rightarrow TP53 \rightarrow HistonH3 \rightarrow FOXA1$) anhand von Literaturdaten erklärt werden.

Verknüpfung von *FOXA1* und *AKT1* Die Gene *FOXA1* und *AKT1* sind im literaturbasierten Netzwerk aus Ingenuity über das Histon H3 miteinander verknüpft. Jedoch wurde die Interaktion zwischen *AKT1* und dem Histon H3 lediglich in Mäusen beschrieben (He et al. [2003]) und kann demnach nicht für einen Vergleich in humanen Zellsystemen verwendet werden. Auch diese Kante zwischen den Genen *FOXA1* und *AKT1* stellt eine statistisch stabile Kante dar.

Interaktion von *AKT1* und *MAPK1* bzw. *TP53* Die Analyse der genomweiten Expressionsdaten durch den NEM Algorithmus sagt eine statistisch stabile Verbindung zwischen den Genen *AKT1* und *MAPK1* vorher (s. Abb. 3.11). Dabei liegt *AKT1* oberhalb von *MAPK1*. Beide Gene sind Bestandteil des nicht-genomischen Signaltransduktionswegs des Estrogenrezeptors (s. Abschnitt 1.4.2) und demnach gemeinsam unterhalb von *ESR1* anzusiedeln. Eine direkte Interaktion dieser beiden Gene konnte durch das literaturbasierte Netzwerk aus Ingenuity nicht dargestellt werden, jedoch kann ein indirekter Weg über $AKT1 \rightarrow Hsp90 \rightarrow PP2A \rightarrow MAPK1$ beschrieben werden (s. Abb. 3.10).

Knoten, die durch einen Doppelpfeil im NEM Netzwerk miteinander verbunden sind, können durch den Algorithmus nicht voneinander unterschieden werden und sind daher gleich zu gewichten. Folglich kann bei einem Vergleich mit dem literaturunterstützten Netzwerk aus Ingenuity eine Interaktion zwischen *AKT1* und *TP53* über die Kanten $AKT1 \rightarrow Hsp90 \rightarrow TP53$ und $AKT1 \rightarrow Hsp70 \rightarrow TP53$ dargestellt werden.

Interaktion von *MAPK1* und *TP53* bzw. *HSPB8* Aufgrund der Bedingungen des NEM Algorithmus sind die Positionen der Gene *MAPK1* sowie *TP53* nicht voneinander zu unterscheiden und demnach miteinander durch einen Doppelpfeil verbunden. Daher muss sowohl eine Interaktion zwischen *MAPK1* und *HSPB8* als auch zwischen *TP53* und *HSPB8* diskutiert werden.

Das Protein HSPB8 (HSP22) selbst ist nicht im literaturbasierten Netzwerk aus Ingenuity verzeichnet, befindet sich aber laut einer weiteren Analyse mit Ingenuity in der Familie der Heatshock-Proteine HSP22/HSP40/HSP90. HSP90 selbst steht direkt in Verbindung mit *TP53*, bzw. über das Gen *PP2A* indirekt mit *MAPK1*. Folglich konnten auch in diesem Fall die Kanten, die durch den NEM Algorithmus vorhergesagt wurden, durch Vergleiche mit den

literaturbekannten Interaktionen bestätigt werden.

Neben der Validierung des „Nested Effects Model“ Algorithmus auf theoretischer Ebene durch die Verwendung von Simulationsdaten (Fröhlich et al. [2007, 2008]), konnten durch die oben diskutierten Validierungen die Funktionalität des Algorithmus bei der Verwendung von biologischen Messdaten bestätigt werden. Aufgrund der Vorhersage von bereits bekannten Interaktionen bzw. Einflüssen einzelner Gene untereinander durch die statistische Analyse der aufgezeichneten Daten stellt die ausgearbeitete Methodik ein sehr robustes Werkzeug für die Rekonstruktion von Gen-Interaktionsnetzwerken dar.

Einige der im rekonstruierten Netzwerk dargestellten Interaktionen konnten durch einen Vergleich mit den Literaturdaten über intermediäre Gene erklärt werden. Dies ist auf die transitive Reduktion des rekonstruierten Interaktionsnetzwerks zurückzuführen, bei der alle zusätzlichen Kanten zwischen Genen entfernt werden, sofern die entfernte Kante über direkte Kanten erklärt werden können.

4.1.2 Validierung durch Epistaseanalysen

Durch spezielle statistische Analysen von genomweiten Expressionsprofilen nach Microarrayanalysen können, basierend auf die Prinzipien der klassischen Epistaseanalyse (Avery and Wasserman [1992]), Beziehungen zwischen einzelnen Genen ermittelt (Van Driessche et al. [2005]) und dadurch ein Interaktionsnetzwerk rekonstruiert werden (Zupan et al. [2003]). In dieser Arbeit diente die Methode der Epistaseanalyse zur Überprüfung der vorhergesagten Kanten im, durch den NEM Algorithmus rekonstruierten, Gen-Interaktionsnetzwerk (s. Abb. 3.11). Neben dem Vergleich mit dem durch Ingenuity rekonstruierten Netzwerk, bietet die Epistaseanalyse eine zweite und unabhängige Möglichkeit der Validierung des vorhergesagten Netzwerks.

In Abschnitt 3.11 sind die Ergebnisse der Epistaseanalyse der kombinatorischen post-transkriptionellen Genstilllegungen von *CCNG2* und *ESR1*, *ESR1* und *MAPK1* sowie *MAPK1* und *STAT5B* aufgeführt. Die Analysen aller drei Experimente ergaben eine eindeutige Übereinstimmung mit der Aussage des rekonstruierten Gen-Interaktionsnetzwerks in Abb. 3.11. Die relative Reihenfolge der jeweiligen Gene aus den kombinatorischen Genstilllegungen konnte bestätigt werden. Aus den Ergebnissen ging eindeutig hervor, dass *CCNG2* oberhalb von

ESR1 liegt. Ebenso konnte die Position von *MAPK1* unterhalb des Estrogenrezeptors und von *STAT5B* durch eine Epistaseanalyse der Expressionsprofile der kombinatorischen Genstilllegungen bestätigt werden (s. 3.11).

Zusätzlich konnte der neu postulierte aktivierende Effekt der Expression von *CCNG2* auf die Expression des Estrogenrezeptors aus 4.1.1 durch die Epistaseanalyse bestätigt werden. Dieser aktivierende Effekt überwiegt den in Stossi et al. [2006] gezeigten inaktivierenden Einfluss des aktivierten Estrogenrezeptors auf die Expression von *CCNG2*. Sowohl die Netzwerkrekonstruktion als auch die Epistaseanalyse ergaben eine Positionierung von *CCNG2* oberhalb des Estrogenrezeptors.

4.2 Validierung der Expressionsprofile durch Connectivity Map Vergleich

Durch einen Vergleich der gemessenen Expressionsprofile nach selektivem Silencing der 13 in Abschnitt 3.8 aufgeführten Gene mit den Datenbankeinträgen der Connectivity Map Datenbank (s. Abschnitt 3.14, Lamb [2007], Lamb et al. [2006]), konnten die experimentell ermittelten Daten plattformübergreifend validiert werden.

Der Vergleich bietet eine sehr potente und einfache Möglichkeit der plattformübergreifenden Validierung von genomweiten Expressionsprofilen. Besonders geeignet war diese Methode aufgrund der Tatsache, dass der Großteil der unterschiedlichen Experimente in MCF-7 Zellen durchgeführt wurde, was zu einer sehr guten Vergleichbarkeit zu den hier durchgeführten Experimenten führte. Dazu wurden die Einträge der Connectivity Map Datenbank verwendet, um die Expressionsprofile der Stimulation- bzw. Inhibitionsexperimente nach der Behandlung mit 17β -Estradiol bzw. Tamoxifen qualitativ zu überprüfen. Weiterhin wurden alle Expressionprofile der Gene, die im rekonstruierten NEM Netzwerk oberhalb des Estrogenrezeptors liegen, mit den Profilen der Connectivity Map Datenbank verglichen. Dabei wurden sehr hohe Übereinstimmungen zwischen den Expressionsprofilen nach Stimulation des Estrogenrezeptors mit 17β -Estradiol bzw. der Inhibition mit Tamoxifen und den Expressionsprofilen der korrespondierenden Experimente der Connectivity Map Datenbank erzielt (s. 3.14). Die durchgeführten Vergleiche mit den in der Connectivity Map Datenbank verzeichneten Genexpressionsprofilen (basierend auf Affymetrix High

Throughput Array (HTA)) zeigten alle große Übereinstimmungen mit den korrespondierenden Experimenten dieser Arbeit.

Zusätzlich wurden die Expressionsprofile der Silencingexperimente von *AKT2*, *CCNG2* und *XBP1* mit den Connectivity Map Datenbankeinträgen verglichen. Durch den NEM Algorithmus wurden diese Gene oberhalb des Estrogenrezeptors angesiedelt. Demnach ist eine starke Korrelation zu den Expressionsprofilen, die nach einer Behandlung mit antiestrogenen Therapeutika gemessen wurden, zu erwarten. Entsprechend wird eine maximale Verschiedenheit zu den Expressionsprofilen nach Stimulation des Estrogenrezeptors erwartet. Die Ergebnisse in 3.14 bestätigten eindeutig diese Erwartungen. Die durchgeführten Analysen lassen einen qualitativen Vergleich der aufgezeichneten Expressionsprofile mit den Expressionsprofilen aus der Connectivity Map Datenbank zu. Eine Überprüfung der relativen Position der Gene innerhalb des rekonstruierten Netzwerks ist durch diesen Vergleich nicht möglich.

4.3 Einfluss endokriner Substanzen auf die globale Genexpression

Nach Behandlung der MCF-7 Zellen mit 17β -Estradiol bzw. Tamoxifen und anschließender globaler Genexpressionsanalyse konnten die jeweiligen Expressionsprofile mit dem globalen Expressionsprofil nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *ESR1* durch hierarchische Clusteranalysen verglichen werden (s. Abschnitt 3.13). Dadurch konnten die spezifischen Einflüsse auf die Expression analysiert und mögliche Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede dargestellt werden. Zusätzlich zeigte das Gen *TGFB2* nur bei der Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen eine Überexpression. Diese Beobachtung deckte sich mit den Informationen aus der Literatur (Buck et al. [2008]), wonach eine Überexpression von *TGFB2* nach Therapie mit Tamoxifen erfolgt und als molekularer Marker für die korrekte Wirkung von Tamoxifen angesehen wird. Bei einer gezielten Stilllegung von *ESR1* bzw. einer Stimulation des Estrogenrezeptors mit 17β -Estradiol war hingegen eine signifikante Repression von *TGFB2* zu verzeichnen. Tamoxifen blockiert die AF-2 Domäne des Estrogenrezeptors (s. Abb. 1.5) durch Bindung an die Ligand Binding Domain, ohne eine Konformationsänderung des Estrogenrezeptors zu vermitteln. Durch diese Blockade wird die ligandenabhängige Aktivität des Estrogenrezeptors unterdrückt. Die

ligandenunabhängige Aktivität (vermittelt über AF-1, s. Abb. 1.5) wird durch eine Therapie mit Tamoxifen nicht beeinflusst. Hingegen führt ein Silencing des Estrogenrezeptors zum Verlust der ligandenabhängigen, als auch der ligandenunabhängigen Funktion des Estrogenrezeptors. Daraus ist der Unterschied im Expressionsverhalten des Gens *TGFB2* bei Inhibition bzw. Silencing des Estrogenrezeptors begründet. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Wirkungsweise von Tamoxifen auf Mammakarzinomzellen innerhalb von *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten vergleichbar ist. Gleichzeitig wurde ein klarer Unterschied der Wirkung auf das globale Expressionsprofil zwischen der partiellen Inhibition des Estrogenrezeptors durch Tamoxifen und dem gezielten Silencing des Estrogenrezeptors aufgezeigt.

Tamoxifen wird als „Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator“ bei der Behandlung von post-menopausalen Frauen mit ER-positiven Mammakarzinomen therapeutisch eingesetzt. Dabei ist die selektive Modulierung bzw. Blockierung des Estrogenrezeptors von großer Bedeutung. Durch die Blockierung der Ligandenbindetasche im Estrogenrezeptor (AF-2, s. Abb. 1.5) werden die Einflüsse des 17β -Estradiol auf die Proliferation und Migration der Zellen unterbunden. Die wichtigen kardioprotektiven (Barrett-Connor and Grady [1998]) und osteosynthetischen (Riggs et al. [1998]) Funktionen der Estrogene werden dabei nicht beeinflusst. Ein selektives Silencing des Estrogenrezeptors deaktiviert, neben den ligandenabhängigen Funktionen des Estrogenrezeptors, auch die ligandenunabhängigen Funktionen des Estrogenrezeptors, woraus die gleichgerichteten Effekte in der Expression einiger Gene bei einer Stimulation des Estrogenrezeptors mit 17β -Estradiol und der Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen zu erklären sind. Der gleiche Effekt, in diesem Fall jedoch unterschiedliche Regulationen bei der Expression einiger Gene, ist bei dem Vergleich des *ESR1* Silencings und der Tamoxifenbehandlung zu erkennen. Dort zeigten 13 Gene eine gleichgerichtete differentielle Expression beim Silencing des *ESR1* und der Tamoxifenbehandlung (s. 3.13.1 und Tabelle 3.13). Ein Vergleich dieser Schnittmenge aus Tabelle 3.13 und den gleichartig regulierten Genen nach *ESR1*-Stimulation und Tamoxifen Behandlung aus Tabelle 3.14 ergibt eine Schnittmenge von zwei Genen, *FHL2* und *SNX24*. Das Gen *SNX24* ist derzeit lediglich als „sorting nexin 24“ annotiert und nicht weiter in der Literatur beschrieben. Einige Sorting Nexine (z. B. *SNX1*) wurden mit der Progression und Aggressivität von Tumoren (Nguyen et al. [2006]), sowie einem Einfluss auf den *EGFR* Signaltransduktionsweg assoziiert (Gullapalli et al. [2004]). Demnach kann ein

Zusammenhang zwischen der Expression von *SNX24* und der Progression von Brustkrebs, bzw. der Wirkung von Tamoxifen postuliert werden.

Die Überexpression von *FHL2*, einem transkriptionellen Koaktivator des Onkoproteins JUN (AP-1, Morlon and Sassone-Corsi [2003]), wurde bereits mit Brustkrebs (Gabriel et al. [2006]) und anderen Krankheiten (Johannessen et al. [2006]) assoziiert. Analog zu Coser et al. [2003] konnte eine Induktion der *FHL2* Expression durch eine gezielte Stimulation des ER α mit 17 β -Estradiol gezeigt werden (s. Abschnitt 3.13). Durch die Interaktion von *FHL2* mit *JUN* ist das Gen eng mit der ERE-unabhängigen genomischen Aktivität des Estrogenrezeptors verbunden.

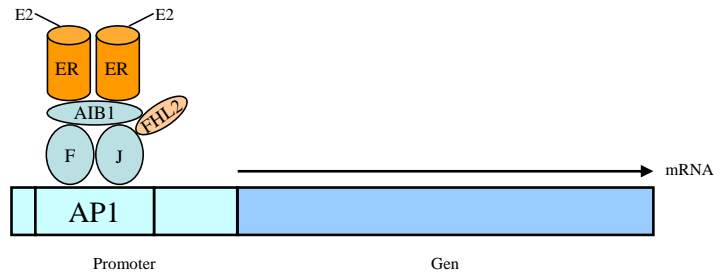
4.4 Vorschlag neuer therapeutischer Ziele

Eines der Ziele der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation war die Prädiktion neuer therapeutischer Ziele für die Behandlung von estrogenabhängigen Mammakarzinomen. Die durchgeführten Experimente führten anhand der beschriebenen Methoden zur Rekonstruktion eines Interaktionsnetzwerks von Mammakarzinom-relevanten Genen, die zu Beginn aller Arbeiten anhand der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Kriterien ausgewählt wurden. Aus der Fachliteratur sind genaue Beschreibungen des Estrogenrezeptor Signaltransduktionswegs sowie der Wirkung von 17 β -Estradiol bekannt und ausführlich beschrieben (Björnstrom and Sjöberg [2005], Dudek and Picard [2008], Klinge [2001], Levin [2005], Marino et al. [2006], Nilsson and Gustafsson [2000], Nilsson et al. [2001], O'Lone et al. [2004], Osborne and Schiff [2005]). Aus allen Literaturdaten geht grundsätzlich hervor, dass der Estrogenrezeptor, aktiviert durch die Bindung von 17 β -Estradiol, als Startpunkt für eine genomische bzw. nicht-genomische transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen gilt (s. Abschnitt 1.4). Durch die Rekonstruktion eines Gen-Interaktionsnetzwerks (Abb. 3.11) aufgrund von gezielten post-transkriptionellen Genstilllegungen und anschließender genomweiter Expressionsanalyse wurden eindeutig Gene identifiziert, die einen Einfluss auf die Expression und damit die Aktivität des Estrogenrezeptors haben. Ausgehend von der Theorie, dass eine Inhibition des Estrogenrezeptors zu einer Repression der Estrogenrezeptoraktivität, und damit zu einem verminderten Tumorstromwachstum führt, können Gene, die durch den NEM Algorithmus oberhalb des Estrogenrezeptors positioniert wurden, potentiell als neue therapeutische Ziele

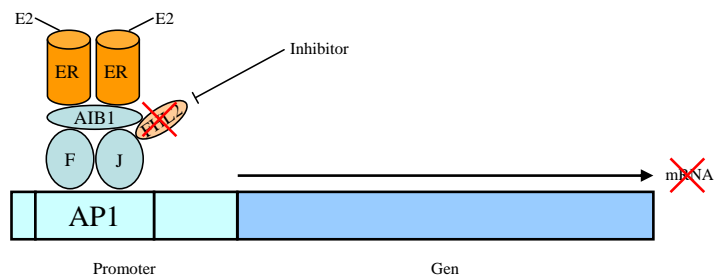
diskutiert werden. Demnach stellen die Gene *AKT2*, *CCNG2* sowie *XBP1* potentielle Kandidaten für einen therapeutischen Ansatzpunkt dar.

CCNG2 (cyclin G2) ist in den Zellzyklus involviert und ist demnach ubiquitär exprimiert. Die Inhibition von *CCNG2* führte zwar zu einer Repression der *ESR1* Expression, jedoch ist die Expression von *CCNG2* mit einer Inhibition des Zellzyklus korreliert (Arachchige Don et al. [2006]). Bisher ist nur der Einfluss der *ESR1* Expression auf die Expression von *CCNG2* in der Literatur bekannt (Stossi et al. [2006], s. Abschnitt 3.12.1). Die in den Experimenten gemessene Feedbackschleife ist derzeit in der Literatur nicht beschrieben. Trotz des reprimierenden Einflusses des *CCNG2* Silencings auf die Expression von *ESR1* bietet sich *CCNG2*, aufgrund seiner zentralen Stellung im Zellzyklus, nicht als therapeutisches Ziel an. Eine Inhibition von *CCNG2* würde wahrscheinlich zu einer Beschleunigung des Zellzyklus in allen Zellen führen.

Anhand der statistischen Auswertung der gemessenen genomweiten Expressionsprofile mit dem NEM Algorithmus wurde *AKT2* ebenfalls oberhalb des Estrogenrezeptors positioniert und kann somit als potentielles therapeutisches Ziel diskutiert werden. In der Literatur wird eine Inhibition des PI3K/AKT Signaltransduktionsweges zur Therapie verschiedener Tumorerkrankungen diskutiert (Bellacosa et al. [2005], Fresno Vara et al. [2004], Hill and Hemmings [2002]). Dabei wird *AKT2* u. a. die Aktivierung von verschiedenen Zellüberlebensmechanismen (Testa and Bellacosa [2001]) sowie der Zellzyklusprogression und dem Zellwachstum (Blume-Jensen and Hunter [2001]) zugeschrieben. Demnach stellt dieser sehr gut beschriebene PI3K/Akt Signaltransduktionsweg ein potentielles therapeutisches Ziel dar, gegen welches bereits Therapeutika (Wortmannin und LY294002) verfügbar sind (Fresno Vara et al. [2004]). Ein therapeutischer Effekt des *AKT2* Silencings wurde bereits im Vergleich des gemessenen Expressionsprofils mit den Einträgen der Connectivity Map Datenbank (s. Abb. 3.14.4) durch eine sehr große Ähnlichkeit zu einer Behandlung mit Wortmannin bzw. LY294002 bestätigt. Beide PI3K Inhibitoren befinden sich derzeit in der präklinischen Studienphase. *AKT2* aktiviert ausschließlich die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion-2 des Estrogenrezeptors, welche nicht durch eine Bindung von Tamoxifen an die „Ligand Binding Domain“ des Estrogenrezeptors blockiert wird (Stoica et al. [2003a]). Durch eine Inhibition von *AKT2* in Kombination mit einer Tamoxifenbehandlung ist eine verbesserte Inhibition des Estrogenrezeptors und damit eine Verringerung der Tumorprogression zu erwarten. Durch Auswertung der Expressionsdaten mittels des NEM Algorithmus wurde



(a) Schematische Darstellung der ERE-unabhängigen genomischen Aktivität des *ESR1*



(b) Schematische Darstellung mit Inhibition des transkriptionellen Kofaktors *FHL2*

Abbildung 4.2: Schematische Darstellungen der ERE-unabhängigen genomischen Aktivität des *ESR1* ohne *FHL2* Inhibition (a) und mit Inhibition (b). Estrogen-aktivierter ER vermittelt die Bindung von Koaktivator-komplexen (AIB1) an weitere Transkriptionsfaktoren (z. B. Fos (F) und Jun (J)) zur Aktivierung der Transkription an Promotoren ohne ERE-Sequenzen (AP1)

das Gen *XBP1* oberhalb von *ESR1* positioniert und stellt demnach ein weiteres potentielles Ziel für eine Inhibition der Aktivität des Estrogenrezeptors dar. Der Vergleich des Expressionsprofils nach post-transkriptioneller Genstilllegung von *XBP1* mit der Connectivity Map Datenbank zeigte große Übereinstimmungen mit den Behandlungen von MCF-7 Zellen mit Inhibitoren des Estrogenrezeptors (Resveratrol und Fulvestrant) bzw. mit Inhibitoren des PI3K/Akt Signaltransduktionswegs (Wortmannin und LY294002). In der Literatur wird *XBP1* ebenfalls bereits als mögliches Ziel einer Therapie von Tumorerkrankungen diskutiert (Koong et al. [2006]), was zur Entwicklung eines ersten potentiellen Inhibitors geführt hat (Tashiro et al. [2007]).

Durch den Vergleich der globalen Expressionsanalysen nach Behandlung der

MCF-7 Zellen mit 17β -Estradiol bzw. Tamoxifen und dem Silencing des Estrogenrezeptors mittels hierarchischer Clusteranalyse, wurde das Gen *FHL2* als potentiell therapeutisches Ziel ermittelt. Das Gen wird durch den aktivierten Estrogenrezeptor, sowie durch die Behandlung mit Tamoxifen überexprimiert (s. Tabelle 3.14). In Folge des ER α Silencings kommt es zu einer Repression von *FHL2* (s. Tabelle 3.13). *FHL2* codiert für einen transkriptionellen Kofaktor des AP-1 (Morlon and Sassone-Corsi [2003]) und ist demnach eng an der ERE-unabhängigen genomischen Aktivität des Estrogenrezeptors beteiligt. Durch Zusammenlagerung verschiedener Transkriptionsfaktoren mit dem dimersierten und aktivierten Estrogenrezeptor wird die Transkription verschiedener Zielgene aktiviert (Abb. 4.2(a)). Eine Störung der Zusammenlagerung der Transkriptionsfaktoren könnte demnach zu einer Minimierung bzw. Inhibition der Transkription führen. Aufgrund der hier ermittelten Messdaten kann demnach *FHL2* als ein potentiell neues Ziel für eine adjuvante Therapie von estrogenabhängigen Mammakarzinomen postuliert werden. Abb. 4.2(b) zeigt die schematische Darstellung einer möglichen Wirkung eines *FHL2* Inhibitors. Durch die Inhibition würde eine Störung der Ausbildung des aktiven Transfektionskomplexes erfolgen, was schlussendlich zu einem Ausbleiben der mRNA Synthese führen würde. *FHL2* wurde ebenfalls in Prostatageweben als transkriptioneller Kofaktor eines ligandenaktivierten Transkriptionsfaktors, in diesem Fall des Androgenrezeptors, beschrieben (Muller et al. [2000]). In Prostatakrebs ist der Androgenrezeptor, vergleichbar zum Estrogenrezeptor in Brustkrebs, in die Progression der Erkrankung involviert (Suzuki et al. [2003]) und stellt demnach ein therapeutisches Ziel der adjuvanten Hormontherapie bei Patienten mit Prostatakarzinomen dar.

Problematisch bei einer Inhibition von *FHL2* könnte die Expression dieses Gens im Myokardmuskel (Chan et al. [1998]) sein. Eine Inhibition von *FHL2* könnte demnach zur Ausbildung von Myokardanomalien führen und dadurch die Leistung des Herzens negativ beeinflussen. Da *FHL2* durch die Wirkung von 17β -Estradiol in Mammakarzinomen überexprimiert wird, würde eine Inhibition vermehrt die Aktivität von *FHL2* innerhalb des Tumors beeinflussen. Die gewebeübergreifende Expression von möglichen therapeutischen Zielen stellt ein grundsätzliches Problem einer Inhibition dieser Ziele dar. Herceptin, ein monoklonare Antikörper gegen *HER2/neu*, wird in der Therapie von metastasierenden Mammakarzinomen eingesetzt (Baselga et al. [2005], Gonzalez-Angulo et al. [2006], Vogel et al. [2002]), trotz einer bekannten Expression von *HER2/neu* im

Myokardmuskel (Olayioye et al. [2000]). In diesen Fällen ist eine sorgfältige Abwägung aller positiven sowie negativen Effekte notwendig.

Die hier diskutierten Ergebnisse zeigen, dass die erarbeitete Methodik der gezielten post-transkriptionellen Genstilllegung und genomweiter Expressionsanalyse für die Rekonstruktion von Interaktionsnetzwerken eine geeignete Plattform zur Vorhersage potentieller neuer therapeutischer Ziele darstellt. Besonders im Fall von ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren können durch diese Methodik neue Erkenntnisse in den Interaktionen von einzelnen Genen erlangt werden, was die Möglichkeit einer detaillierten Evaluierung neuer therapeutischer Ziele bietet. Die Prädiktion von *FHL2* als potentielles therapeutisches Ziel zeigt, dass die Methodik nicht nur auf Fragestellungen in Mammakarzinomen angewendet werden kann, sondern auch Gültigkeit für weitere Tumorentitäten besitzt.

A Anhang

A.1 Qualitätskontrolle isolierter total und amplifizierter RNA

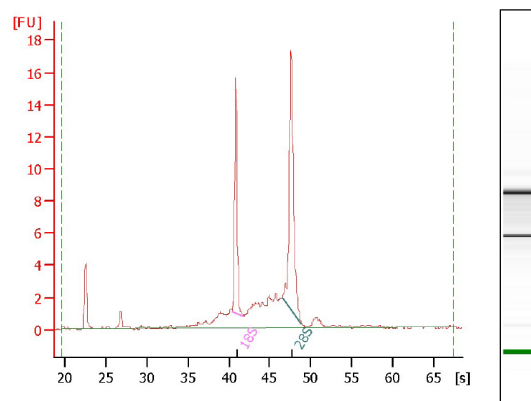


Abbildung A.1: total RNA Probe hoher Integrität

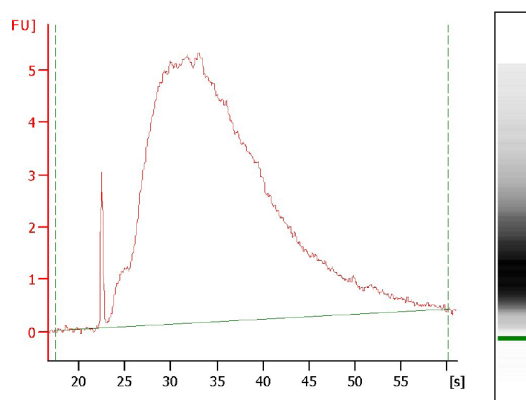


Abbildung A.2: amplifizierte RNA Probe hoher Integrität

A.2 Graphen der selektiven mRNA Reduktion

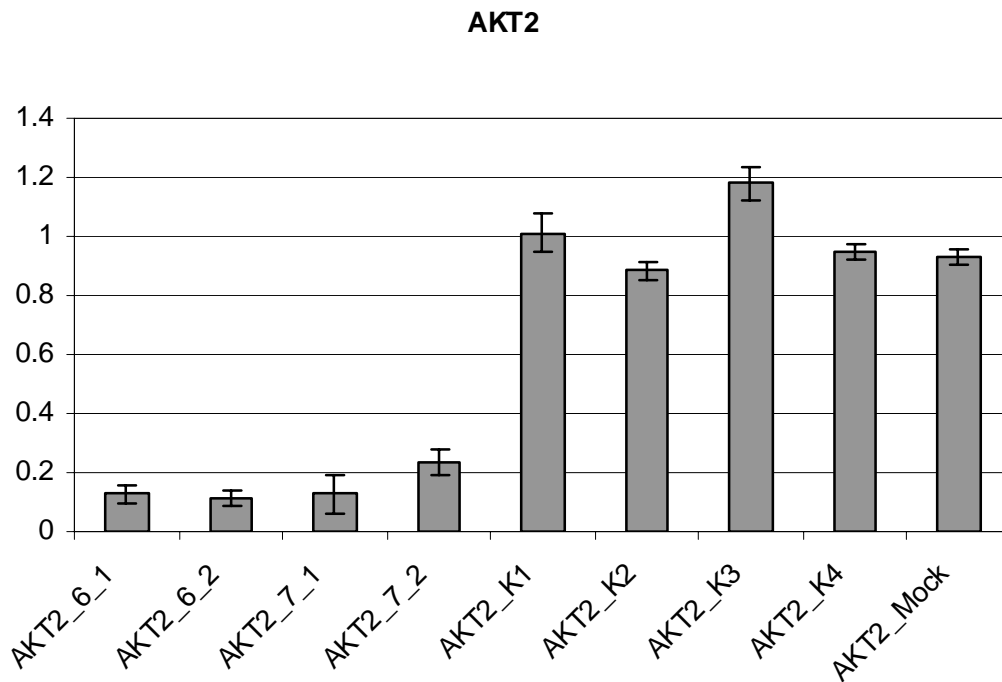


Abbildung A.3: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von AKT2

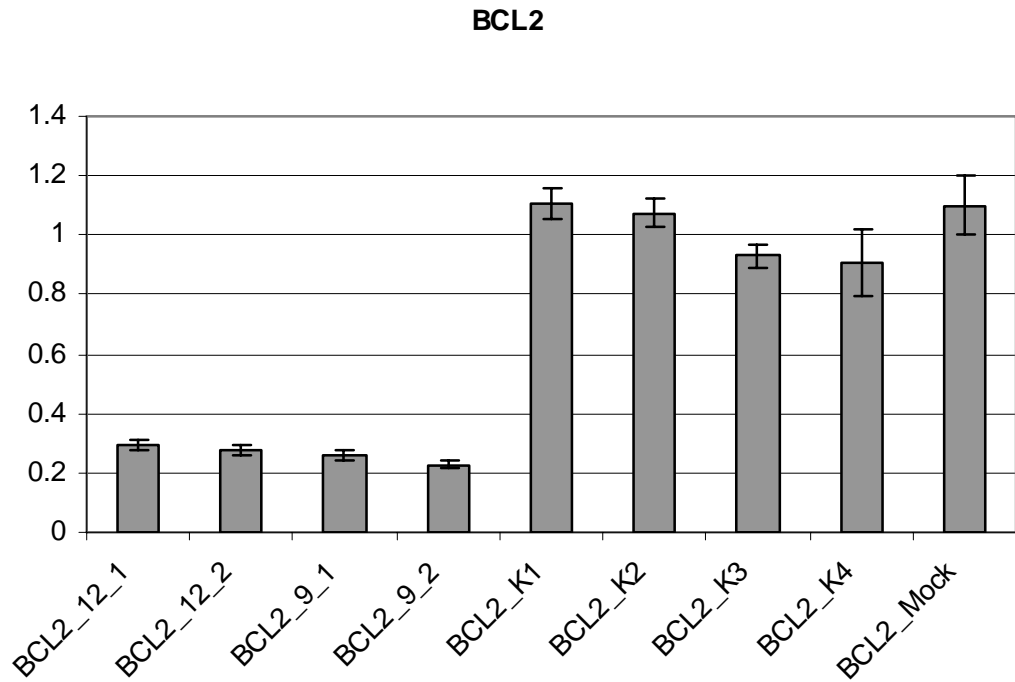


Abbildung A.4: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von BCL2

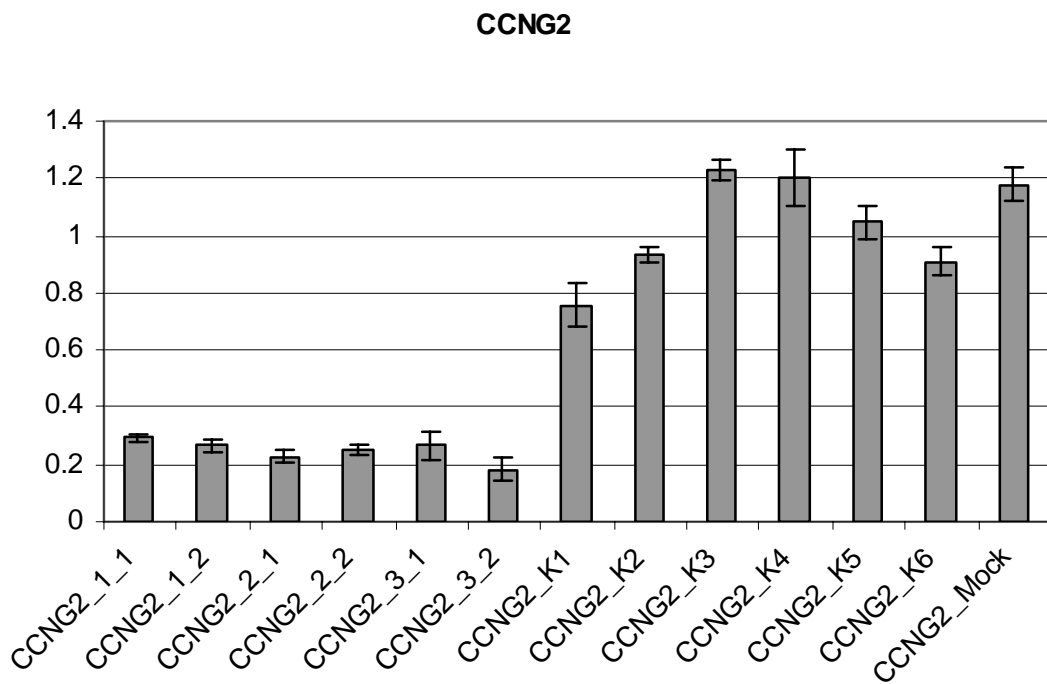


Abbildung A.5: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von CCNG2

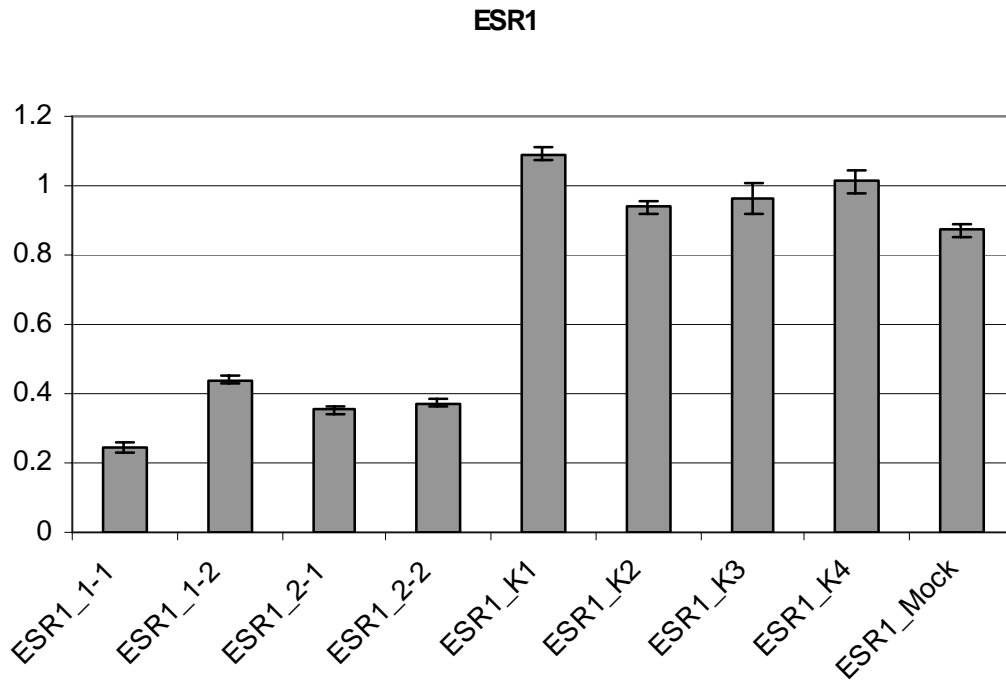


Abbildung A.6: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von ESR1

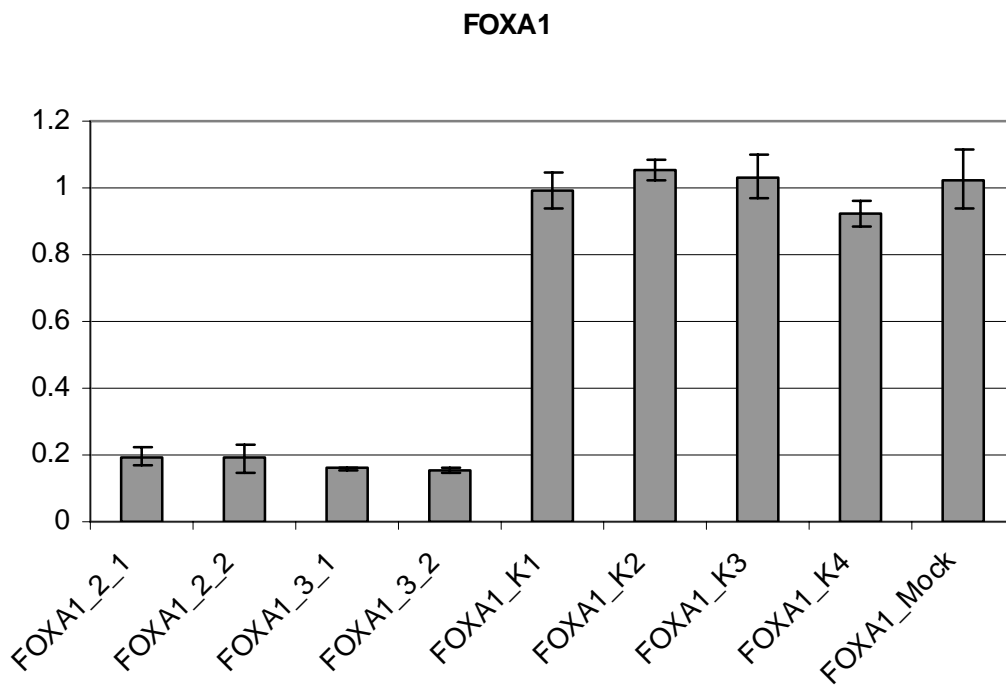


Abbildung A.7: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von FOXA1

A.2 Graphen der selektiven mRNA Reduktion

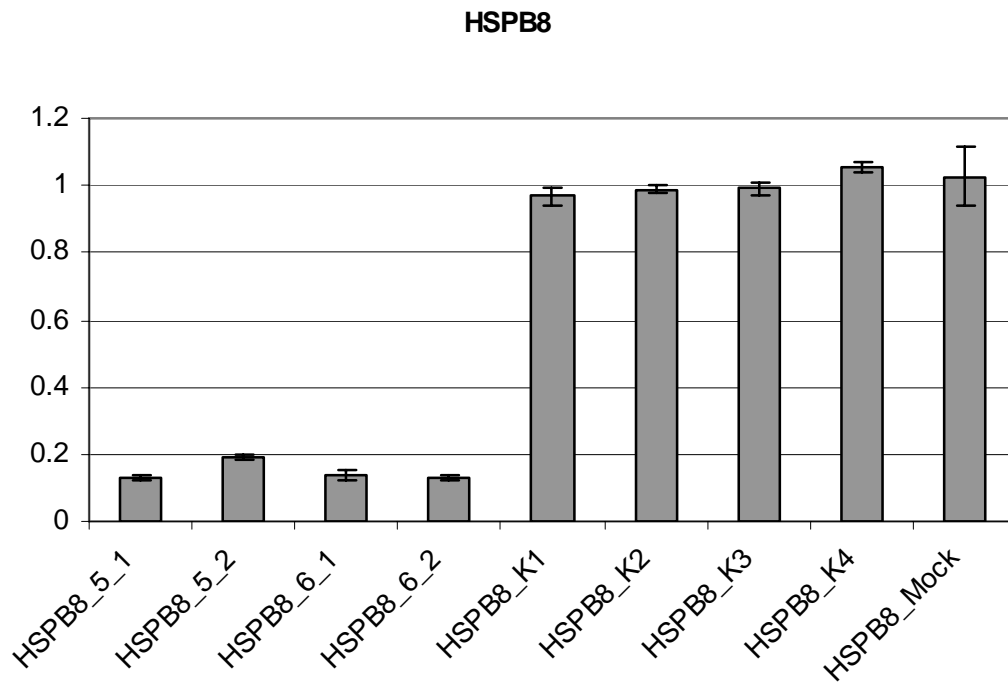


Abbildung A.8: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von HSPB8

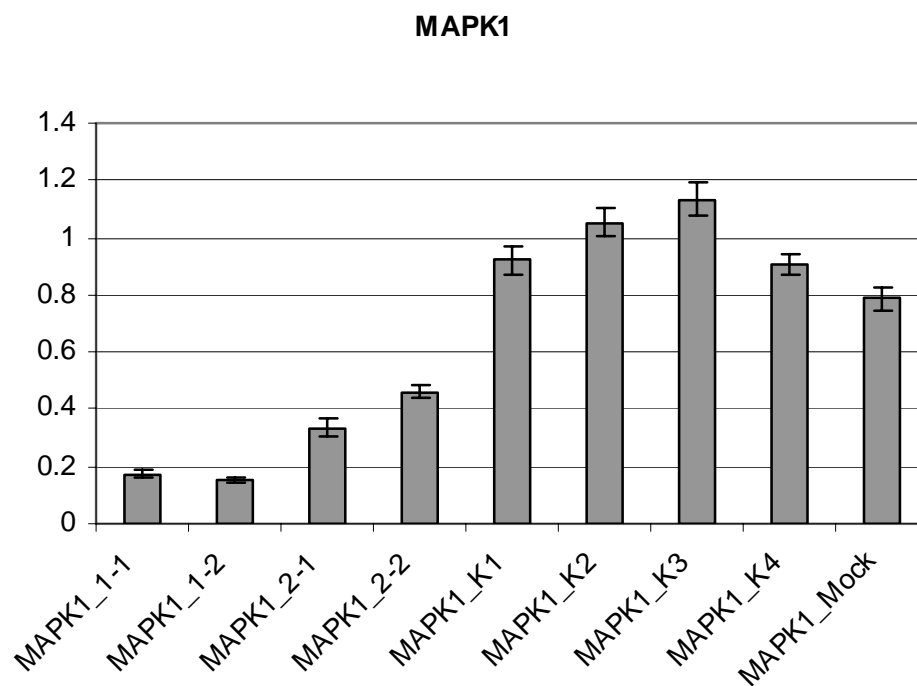


Abbildung A.9: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von MAPK1

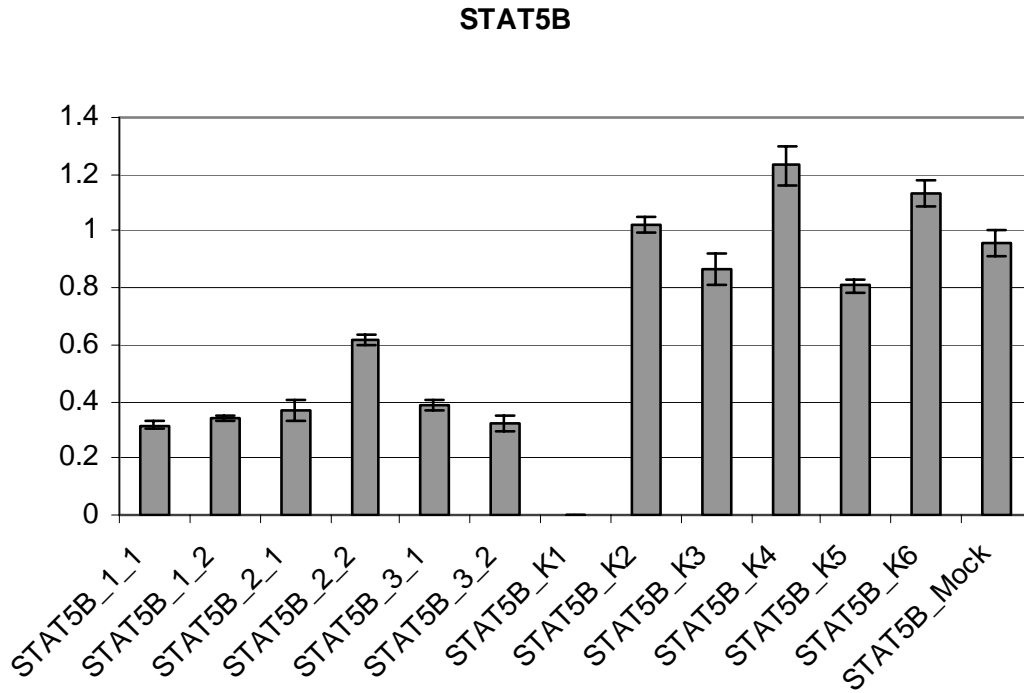


Abbildung A.10: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von STAT5B

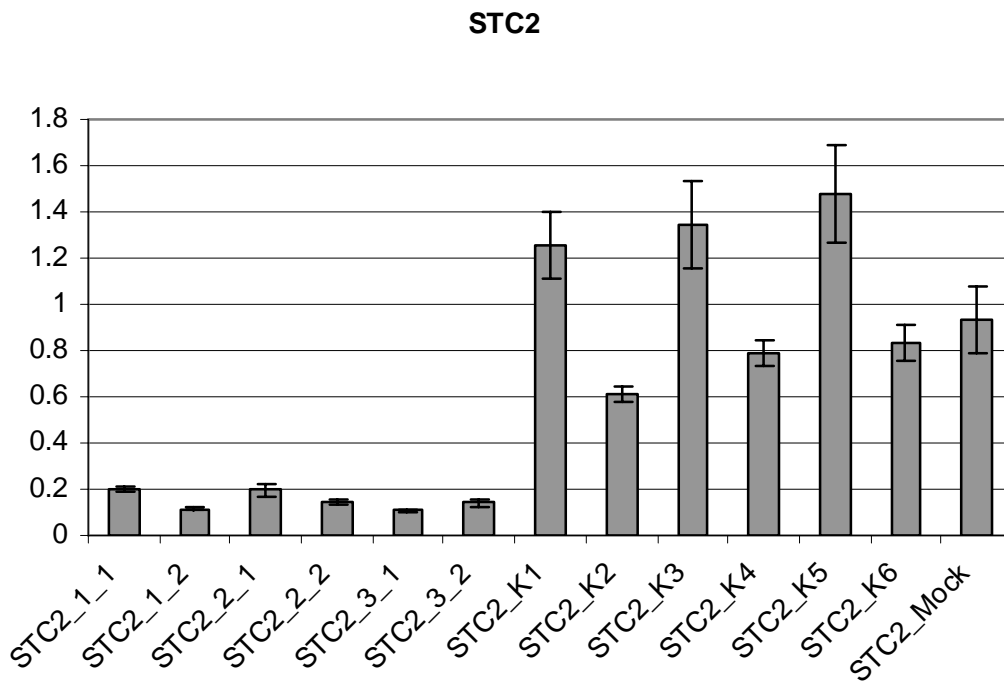


Abbildung A.11: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von STC2

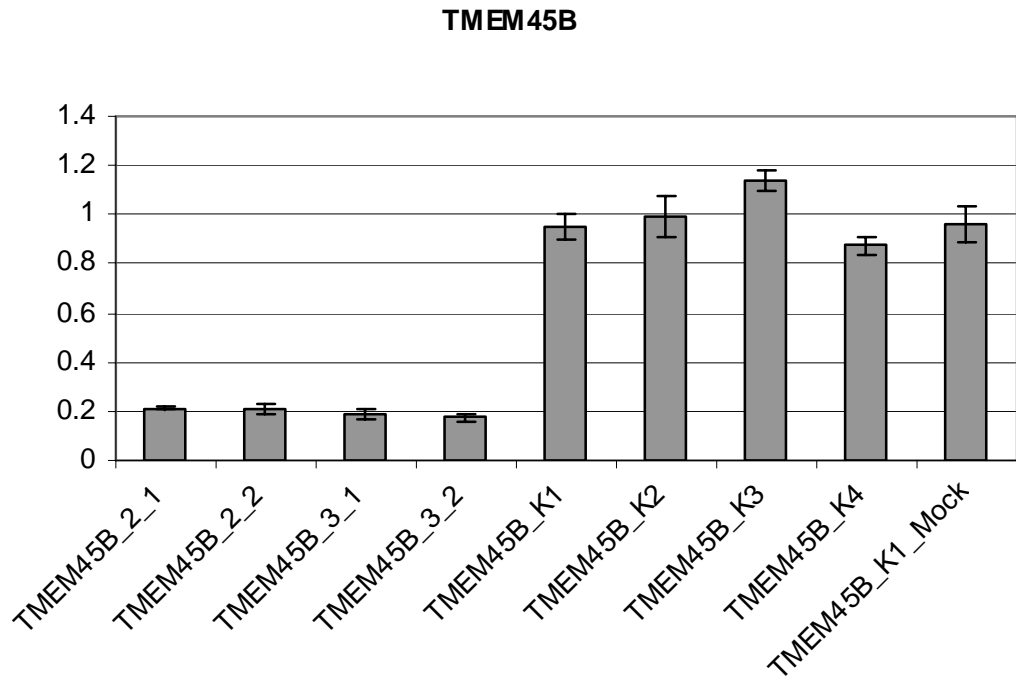


Abbildung A.12: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von TMEM45B

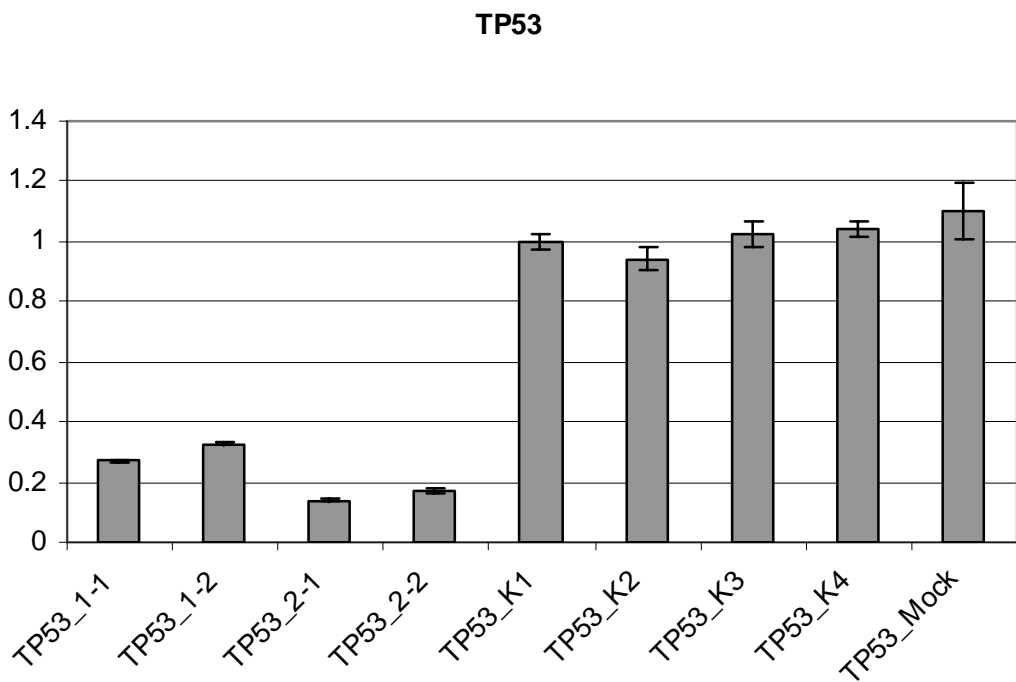


Abbildung A.13: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von TP53

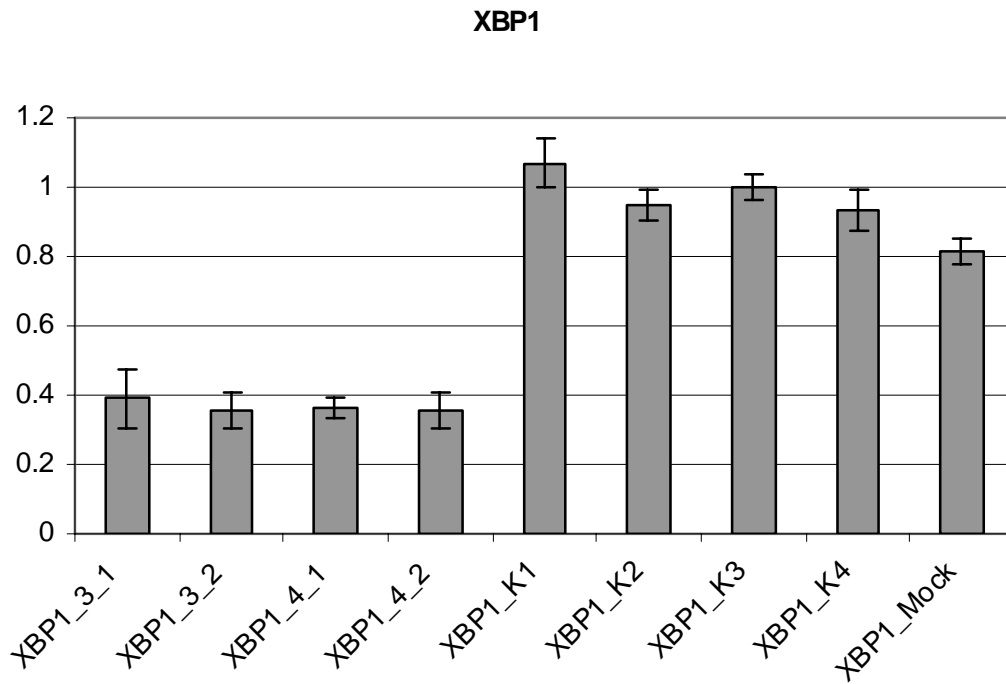


Abbildung A.14: Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von XBP1

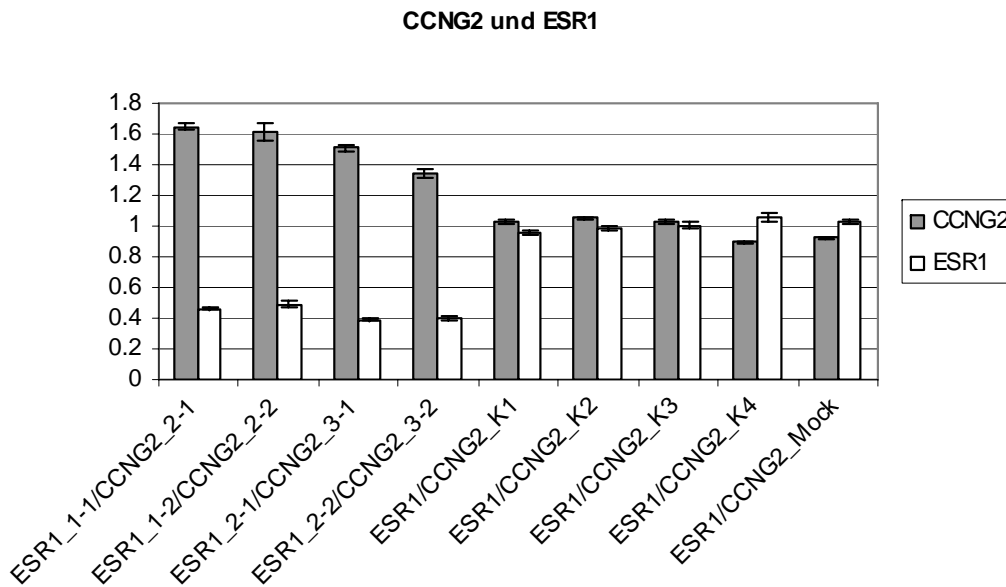


Abbildung A.15: Parallele Reduktion der mRNA Konzentration von CCNG2 und ESR1

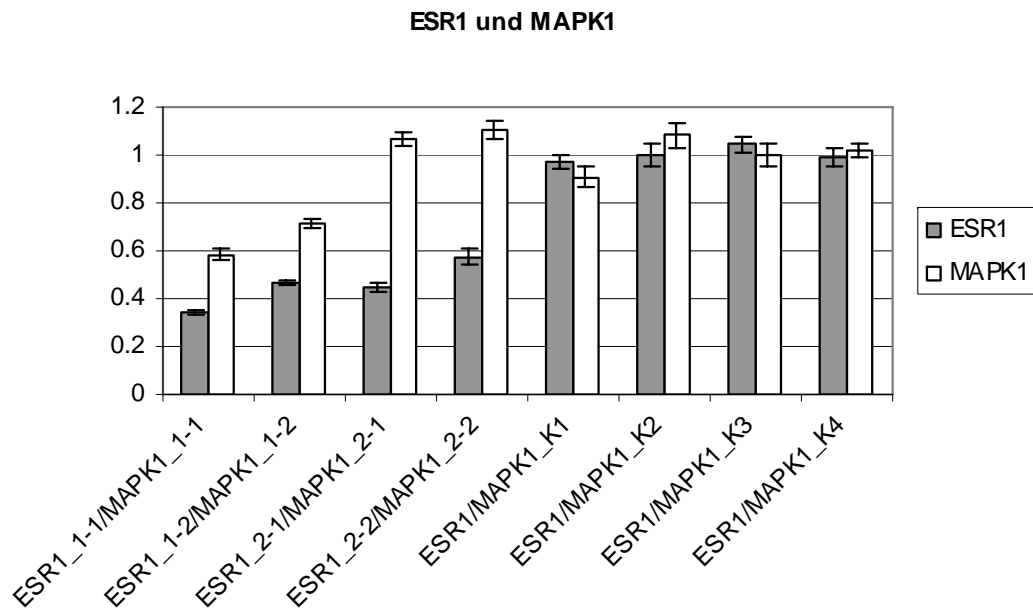


Abbildung A.16: Parallele Reduktion der mRNA Konzentration von ESR1 und MAPK1

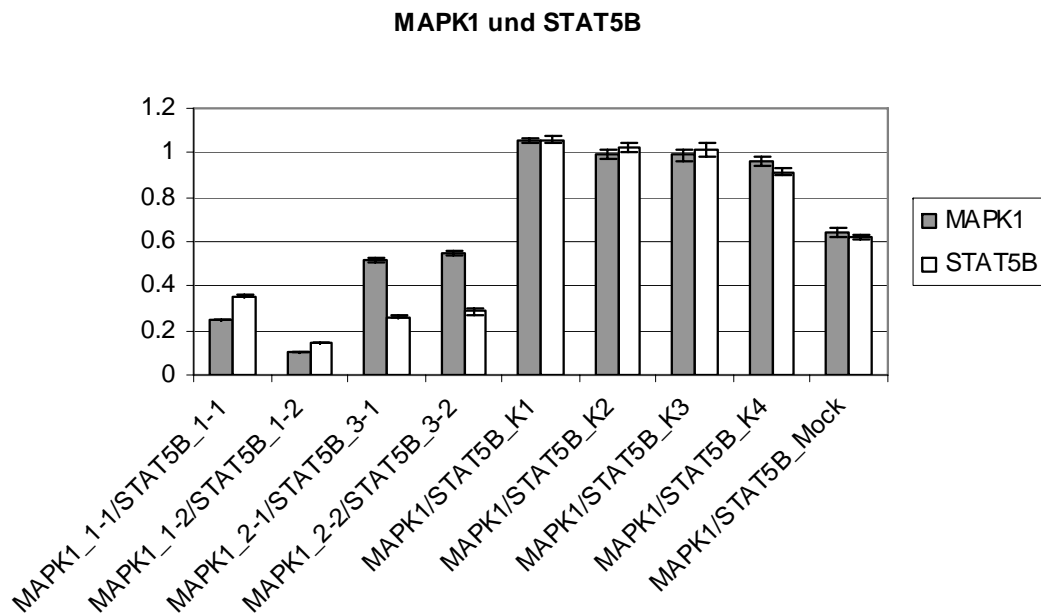


Abbildung A.17: Parallele Reduktion der mRNA Konzentration von MAPK1 und STAT5B

A.3 Hierarchische Clusteranalysen

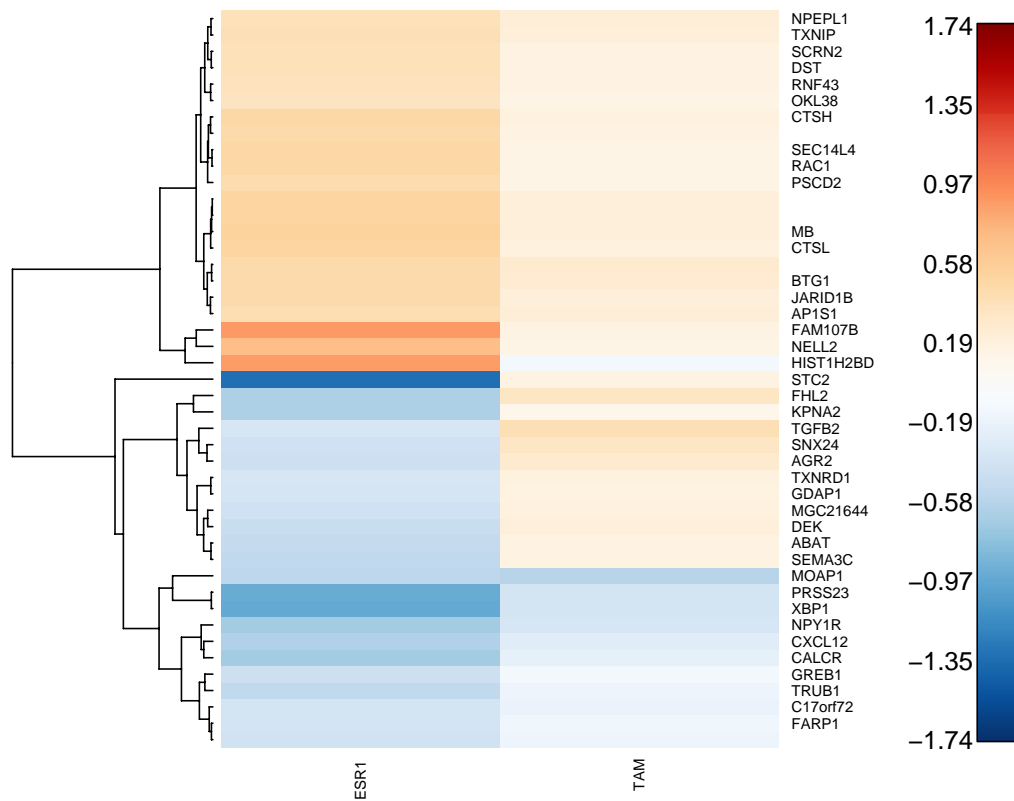


Abbildung A.18: Hierarchische Clusteranalyse der genomweiten Expressionsanalyse nach *ESR1* Silencing und nach Tamoxifen Behandlung

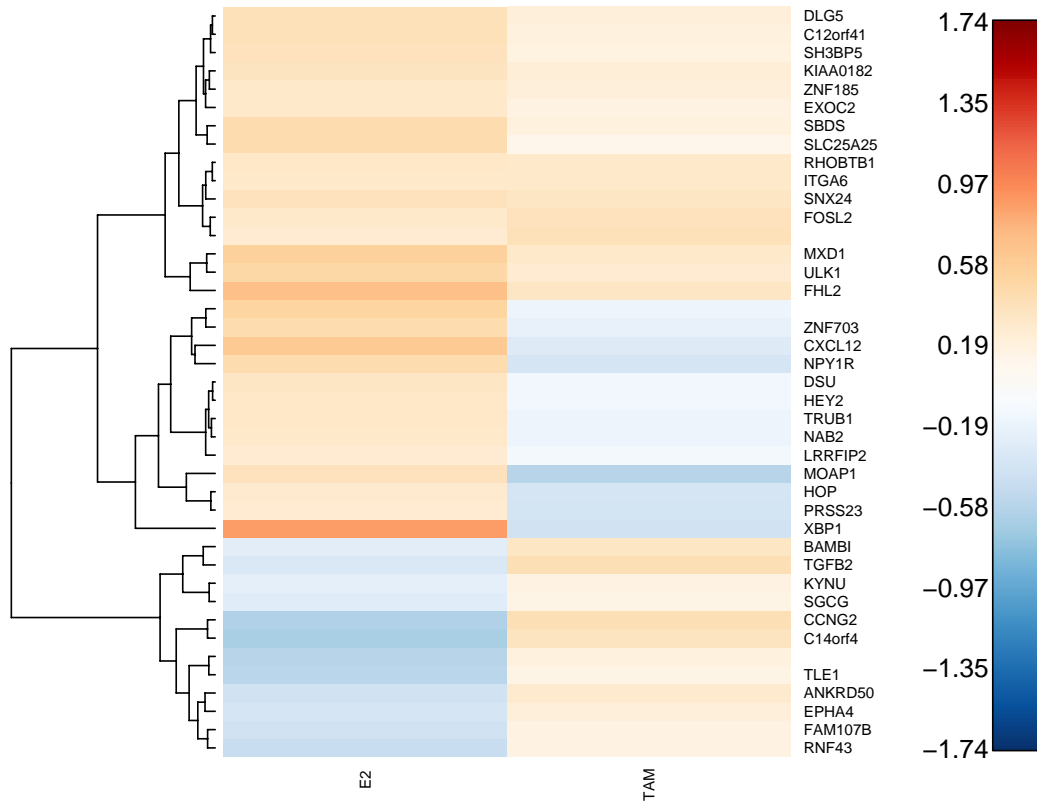


Abbildung A.19: Hierarchische Clusteranalyse der genomweiten Expressionsanalyse nach Stimulation des ER α und nach Tamoxifen Behandlung

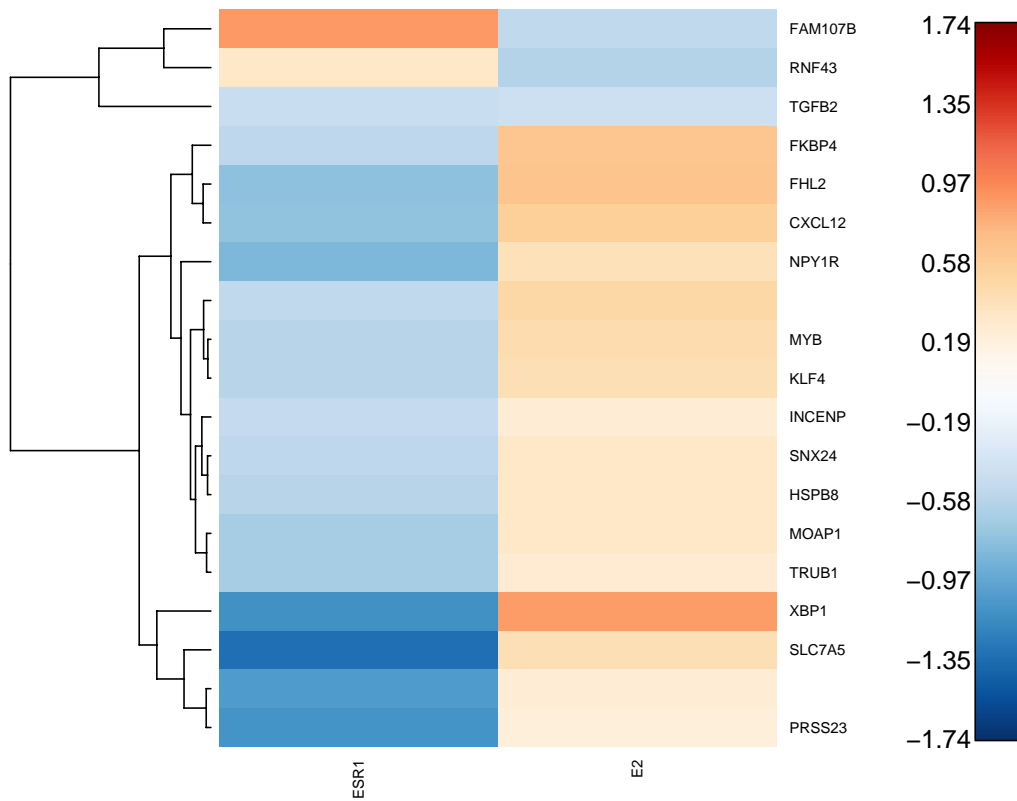


Abbildung A.20: Hierarchische Clusteranalyse der genomweiten Expressionsanalyse nach *ESR1*-Silencing und Stimulation des ER α

Literaturverzeichnis

- Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. R. (1998). The p53 network. *J Biol Chem*, 273(1):1–4. [42](#)
- Albertoni, M., Shaw, P. H., Nozaki, M., Godard, S., Tenan, M., Hamou, M. F., Fairlie, D. W., Breit, S. N., Paralkar, V. M., de Tribolet, N., Van Meir, E. G., and Hegi, M. E. (2002). Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene*, 21(27):4212–9. [43](#)
- Ali, S. and Coombes, R. C. (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2(2):101–12. [3](#), [4](#), [5](#)
- Arachchige Don, A. S., Dallapiazza, R. F., Bennin, D. A., Brake, T., Cowan, C. E., and Horne, M. C. (2006). Cyclin G2 is a centrosome-associated nucleocytoplasmic shuttling protein that influences microtubule stability and induces a p53-dependent cell cycle arrest. *Exp Cell Res*, 312(20):4181–204. [96](#)
- Avery, L. and Wasserman, S. (1992). Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies. *Trends Genet*, 8(9):312–6. [68](#), [91](#)
- Badve, S., Turbin, D., Thorat, M. A., Morimiya, A., Nielsen, T. O., Perou, C. M., Dunn, S., Huntsman, D. G., and Nakshatri, H. (2007). FOXA1 expression in breast cancer—correlation with luminal subtype A and survival. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1):4415–21. [1](#)
- Barrett-Connor, E. and Grady, D. (1998). Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health*, 19:55–72. [94](#)
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–97. [12](#), [14](#)
- Baselga, J., Carbonell, X., Castaneda-Soto, N. J., Clemens, M., Green, M., Harvey, V., Morales, S., Barton, C., and Ghahramani, P. (2005). Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*, 23(10):2162–71. [7](#), [98](#)

- Beatson, G. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mammary. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*, 2(104-107):162–165. [5](#)
- Bellacosa, A., Kumar, C. C., Di Cristofano, A., and Testa, J. R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*, 94:29–86. [96](#)
- Bennin, D. A., Don, A. S., Brake, T., McKenzie, J. L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A. A., and Horne, M. C. (2002). Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem*, 277(30):27449–67. [52](#)
- Berridge, M., Tan, A., McCoy, K., and Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4:14–19. [28](#)
- Björnstrom, L. and Sjöberg, M. (2002). Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol Endocrinol*, 16(10):2202–14. [39](#)
- Björnstrom, L. and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*, 19(4):833–42. [7](#), [8](#), [9](#), [10](#), [39](#), [40](#), [79](#), [95](#)
- Block, G. E., Jensen, E. V., and Polley, T. Z. (1975). The prediction of hormonal dependency of mammary cancer. *Ann Surg*, 182(3):342–52. [1](#)
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835):355–65. [96](#)
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2):185–91. [13](#)
- Bouras, T., Southey, M. C., Chang, A. C., Reddel, R. R., Willhite, D., Glynne, R., Henderson, M. A., Armes, J. E., and Venter, D. J. (2002). Stanniocalcin 2 is an estrogen-responsive gene coexpressed with the estrogen receptor in human breast cancer. *Cancer Res*, 62(5):1289–95. [61](#)

- Buck, M. B., Collier, J. K., Murdter, T. E., Eichelbaum, M., and Knabbe, C. (2008). TGFbeta2 and TbetaRII are valid molecular biomarkers for the anti-proliferative effects of tamoxifen and tamoxifen metabolites in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 107(1):15–24. [76](#), [93](#)
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., and Fornace, A. J., J. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J*, 18(23):6845–54. [45](#)
- Buzdar, A. U. (2004). Fulvestrant: a new type of estrogen receptor antagonist for the treatment of advanced breast cancer. *Drugs Today (Barc)*, 40(9):751–64. [79](#), [81](#)
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*, 276(13):9817–24. [88](#)
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17):9742–7. [1](#), [22](#)
- Carroll, J. S., Liu, X. S., Brodsky, A. S., Li, W., Meyer, C. A., Szary, A. J., Eeckhoutte, J., Shao, W., Hestermann, E. V., Geistlinger, T. R., Fox, E. A., Silver, P. A., and Brown, M. (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*, 122(1):33–43. [40](#), [63](#)
- Castagnetta, L. A., Lo Casto, M., Granata, O. M., Polito, L., Calabro, M., Lo Bue, A., Bellavia, V., and Carruba, G. (1996). Estrogen content and metabolism in human breast tumor tissues and cells. *Ann N Y Acad Sci*, 784:314–24. [6](#)
- Chan, K. K., Tsui, S. K., Lee, S. M., Luk, S. C., Liew, C. C., Fung, K. P., Waye, M. M., and Lee, C. Y. (1998). Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart. *Gene*, 210(2):345–50. [98](#)
- Charpentier, A. H., Bednarek, A. K., Daniel, R. L., Hawkins, K. A., Laffin, K. J., Gaddis, S., MacLeod, M. C., and Aldaz, C. M. (2000). Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res*, 60(21):5977–83. [41](#), [61](#)

- Chiu, S. K., Hsu, M., Ku, W. C., Tu, C. Y., Tseng, Y. T., Lau, W. K., Yan, R. Y., Ma, J. T., and Tzeng, C. M. (2003). Synergistic effects of epoxy- and amine-silanes on microarray DNA immobilization and hybridization. *Biochem J*, 374(Pt 3):625–32. [29](#)
- Cidlowski, J. A. and Muldoon, T. G. (1978). The dynamics of intracellular estrogen receptor regulation as influenced by 17 β -estradiol. *Biol Reprod*, 18(2):234–46. [55](#)
- Claessens, F. and Gewirth, D. T. (2004). DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem*, 40:59–72. [7](#)
- Clauss, I. M., Chu, M., Zhao, J. L., and Glimcher, L. H. (1996). The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core. *Nucleic Acids Res*, 24(10):1855–64. [41](#)
- Conzone, S. D. and Pantano, C. G. (2004). Glass slides to DNA microarrays. *Materials Today*, 7(3):20–26. [29](#)
- Coser, K. R., Chesnes, J., Hur, J., Ray, S., Isselbacher, K. J., and Shioda, T. (2003). Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24):13994–9. [95](#)
- Creemer, L. C., Kirst, H. A., Vlahos, C. J., and Schultz, R. M. (1996). Synthesis and in vitro evaluation of new wortmannin esters: potent inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Med Chem*, 39(25):5021–4. [79](#), [81](#)
- Daoud, S. S., Munson, P. J., Reinhold, W., Young, L., Prabhu, V. V., Yu, Q., LaRose, J., Kohn, K. W., Weinstein, J. N., and Pommier, Y. (2003). Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study. *Cancer Res*, 63(11):2782–93. [45](#)
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., and Trent, J. M. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*, 14(4):457–60. [1](#), [28](#)
- Ding, L., Yan, J., Zhu, J., Zhong, H., Lu, Q., Wang, Z., Huang, C., and Ye, Q. (2003). Ligand-independent activation of estrogen receptor alpha by XBP-1. *Nucleic Acids Res*, 31(18):5266–74. [86](#)

- Dudek, P. and Picard, D. (2008). Genomics of signaling crosstalk of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 3(3):e1859. [95](#)
- Duong, V., Boulle, N., Daujat, S., Chauvet, J., Bonnet, S., Neel, H., and Cavailles, V. (2007). Differential regulation of estrogen receptor alpha turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer Res*, 67(11):5513–21. [41](#)
- Dutertre, M. and Smith, C. L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther*, 295(2):431–7. [56](#)
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14863–8. [74](#), [75](#)
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836):494–8. [14](#)
- Esseghir, S., Kennedy, A., Seedhar, P., Nerurkar, A., Poulsom, R., Reis-Filho, J. S., and Isacke, C. M. (2007). Identification of NTN4, TRA1, and STC2 as prognostic markers in breast cancer in a screen for signal sequence encoding proteins. *Clin Cancer Res*, 13(11):3164–73. [1](#), [41](#)
- Farach-Carson, M. C. and Davis, P. J. (2003). Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(3):839–45. [10](#)
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–11. [1](#), [12](#)
- Fliss, A. E., Benzeno, S., Rao, J., and Caplan, A. J. (2000). Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 72(5):223–30. [9](#)
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30(2):193–204. [96](#)

- Fröhlich, H., Fellmann, M., Sueltmann, H., Poustka, A., and Beissbarth, T. (2007). Large scale statistical inference of signaling pathways from RNAi and microarray data. *BMC Bioinformatics*, 8:386. [1](#), [34](#), [35](#), [37](#), [63](#), [67](#), [85](#), [88](#), [91](#)
- Fröhlich, H., Fellmann, M., Sueltmann, H., Poustka, A., and Beissbarth, T. (2008). Estimating Large Scale Signaling Networks through Nested Effect Models with Intervention Effects from Microarray Data. *Bioinformatics*. [1](#), [34](#), [35](#), [37](#), [63](#), [67](#), [85](#), [88](#), [91](#)
- Gabriel, B., Fischer, D. C., Orłowska-Volk, M., zur Hausen, A., Schule, R., Müller, J. M., and Hasenburger, A. (2006). Expression of the transcriptional coregulator FHL2 in human breast cancer: a clinicopathologic study. *J Soc Gynecol Investig*, 13(1):69–75. [95](#)
- Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., and Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell*, 63(6):1267–76. [10](#)
- Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y., and Jameson, J. L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25):14138–43. [80](#)
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14(2):121–41. [9](#)
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286(5439):531–7. [1](#)
- Gomez, B. P., Riggins, R. B., Shajahan, A. N., Klimach, U., Wang, A., Crawford, A. C., Zhu, Y., Zwart, A., Wang, M., and Clarke, R. (2007). Human X-box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *FASEB J*, 21(14):4013–27. [41](#), [60](#), [86](#)
- Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi, G. N., and Esteva, F. J. (2006). Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist*, 11(8):857–67. [7](#), [98](#)
- Gosden, J. R., Middleton, P. G., and Rout, D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24—q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 43(3-4):218–20. [7](#)

- Gottlicher, M., Heck, S., and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*, 76(7):480–9. [10](#)
- Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(5):361–70. [7](#)
- Gu, Z., Lee, R. Y., Skaar, T. C., Bouker, K. B., Welch, J. N., Lu, J., Liu, A., Zhu, Y., Davis, N., Leonessa, F., Brunner, N., Wang, Y., and Clarke, R. (2002). Association of interferon regulatory factor-1, nucleophosmin, nuclear factor-kappaB, and cyclic AMP response element binding with acquired resistance to Faslodex (ICI 182,780). *Cancer Res*, 62(12):3428–37. [86](#)
- Gullapalli, A., Garrett, T. A., Paing, M. M., Griffin, C. T., Yang, Y., and Trejo, J. (2004). A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. *Mol Biol Cell*, 15(5):2143–55. [94](#)
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775):293–6. [13](#)
- He, Z., Ma, W. Y., Liu, G., Zhang, Y., Bode, A. M., and Dong, Z. (2003). Arsenite-induced Phosphorylation of Histone H3 at Serine 10 Is Mediated by Akt1, Extracellular Signal-regulated Kinase 2, and p90 Ribosomal S6 Kinase 2 but Not Mitogen- and Stress-activated Protein Kinase 1. *J Biol Chem*, 278(12):10588–93. [90](#)
- Hill, M. M. and Hemmings, B. A. (2002). Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 93(2-3):243–51. [96](#)
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., and Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic *survivin* gene by wild type p53. *J Biol Chem*, 277(5):3247–57. [43](#)
- Howell, A., Cuzick, J., Baum, M., Buzdar, A., Dowsett, M., Forbes, J. F., Hoctin-Boes, G., Houghton, J., Locker, G. Y., and Tobias, J. S. (2005). Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*, 365(9453):60–2. [6](#)

- Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z., and Helferich, W. G. (1998). Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 58(17):3833–8. [79](#)
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., and Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18 Suppl 1:S96–104. [33](#), [57](#), [72](#)
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531):834–8. [13](#)
- Jakacka, M., Ito, M., Weiss, J., Chien, P. Y., Gehm, B. D., and Jameson, J. L. (2001). Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem*, 276(17):13615–21. [10](#)
- Jiang, Y., Liu, Y. E., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2004). Gamma synuclein, a novel heat-shock protein-associated chaperone, stimulates ligand-dependent estrogen receptor alpha signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 64(13):4539–46. [89](#)
- Johannessen, M., Moller, S., Hansen, T., Moens, U., and Van Ghelue, M. (2006). The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci*, 63(3):268–84. [95](#)
- Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., and Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, 275(24):18447–53. [12](#)
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., and Givol, D. (2000). Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the tgfbeta family. *FEBS Lett*, 470(1):77–82. [43](#)
- Kelly, J., Spolski, R., Imada, K., Bollenbacher, J., Lee, S., and Leonard, W. J. (2003). A role for stat5 in CD8(+) T cell homeostasis. *J Immunol*, 170(1):210–7. [89](#)

- Klijn, J. G., Blamey, R. W., Boccardo, F., Tominaga, T., Duchateau, L., and Sylvester, R. (2001). Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol*, 19(2):343–53. [7](#)
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*, 29(14):2905–19. [1](#), [95](#)
- Klinge, C. M., Blankenship, K. A., Risinger, K. E., Bhatnagar, S., Noisin, E. L., Sumanasekera, W. K., Zhao, L., Brey, D. M., and Keynton, R. S. (2005). Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem*, 280(9):7460–8. [10](#), [39](#)
- Koch-Institut, R. (2008). Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Überarbeitete Auflage. [2](#), [3](#)
- Koong, A. C., Chauhan, V., and Romero-Ramirez, L. (2006). Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. *Cancer Biol Ther*, 5(7):756–9. [97](#)
- Kumar, R., Johnson, B. H., and Thompson, E. B. (2004). Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem*, 40:27–39. [7](#)
- Lacroix, M. and Leclercq, G. (2004). About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor-alpha gene (ESR1) in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 219(1-2):1–7. [41](#), [60](#), [61](#), [73](#)
- Lamb, J. (2007). The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer*, 7(1):54–60. [77](#), [92](#)
- Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., Lerner, J., Brunet, J. P., Subramanian, A., Ross, K. N., Reich, M., Hieronymus, H., Wei, G., Armstrong, S. A., Haggarty, S. J., Clemons, P. A., Wei, R., Carr, S. A., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2006). The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, 313(5795):1929–35. [77](#), [92](#)
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415–9. [13](#)

- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17):4663–70. [13](#)
- Levin, E. R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*, 19(8):1951–9. [95](#)
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3):323–31. [42](#)
- Lian, Z., De Luca, P., and Di Cristofano, A. (2006). Gene expression analysis reveals a signature of estrogen receptor activation upon loss of Pten in a mouse model of endometrial cancer. *J Cell Physiol*, 208(2):255–66. [41](#)
- Liou, H. C., Boothby, M. R., Finn, P. W., Davidon, R., Nabavi, N., Zeleznik-Le, N. J., Ting, J. P., and Glimcher, L. H. (1990). A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 247(4950):1581–4. [41](#)
- Losel, R. and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1):46–56. [10](#)
- Mackay, A., Jones, C., Dexter, T., Silva, R. L. A., Bulmer, K., Jones, A., Simpson, P., Harris, R. A., Jat, P. S., Neville, A. M., Reis, L. F. L., Lakhani, S. R., and O’Hare, M. J. (2003). cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2//neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene*, 22(17):2680–2688. [1](#)
- Marino, M., Acconcia, F., and Ascenzi, P. (2005). Estrogen receptor signalling: bases for drug actions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5(3):305–14. [10](#)
- Marino, M., Acconcia, F., Bresciani, F., Weisz, A., and Trentalance, A. (2002). Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell*, 13(10):3720–9. [10](#)
- Marino, M., Galluzzo, P., and Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*, 7(8):497–508. [95](#)
- Markowitz, F., Bloch, J., and Spang, R. (2005). Non-transcriptional pathway features reconstructed from secondary effects of RNA interference. *Bioinformatics*, 21(21):4026–32. [1](#), [34](#), [35](#)

- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5):563–74. [14](#)
- Martinez, J. and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, 18(9):975–80. [14](#)
- McKenna, N. J. and O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108(4):465–74. [9](#)
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006):343–9. [12](#)
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S. F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Nielsen, L. L., Pickett, C. B., and Liu, S. (2002). Human *survivin* is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, 21(17):2613–22. [43](#)
- Morley, P., Whitfield, J. F., Vanderhyden, B. C., Tsang, B. K., and Schwartz, J. L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*, 131(3):1305–12. [10](#)
- Morlon, A. and Sassone-Corsi, P. (2003). The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7):3977–82. [76](#), [95](#), [98](#)
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 16(6):720–8. [13](#)
- Muller, J. M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R., and Schule, R. (2000). FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J*, 19(3):359–69. [98](#)
- Nemeth, A. L., Medveczky, P., Toth, J., Siklodi, E., Schlett, K., Patthy, A., Palkovits, M., Ovadi, J., Tokesi, N., Nemeth, P., Szilagyi, L., and Graf, L. (2007). Unconventional translation initiation of human trypsinogen 4 at a CUG codon with an N-terminal leucine. A possible means to regulate gene expression. *FEBS J*, 274(6):1610–20. [88](#)

- Nguyen, L. N., Holdren, M. S., Nguyen, A. P., Furuya, M. H., Bianchini, M., Levy, E., Mordoh, J., Liu, A., Guncay, G. D., Campbell, J. S., and Parks, W. T. (2006). Sorting nexin 1 down-regulation promotes colon tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 12(23):6952–9. [94](#)
- Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res*, 2(5):360–6. [95](#)
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 81(4):1535–65. [7](#), [8](#), [95](#)
- Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3):309–21. [14](#)
- Oh, D. S., Troester, M. A., Usary, J., Hu, Z., He, X., Fan, C., Wu, J., Carey, L. A., and Perou, C. M. (2006). Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol*, 24(11):1656–64. [1](#)
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19(13):3159–67. [99](#)
- O’Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*, 18(8):1859–75. [1](#), [9](#), [95](#)
- Osborne, C. K. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 339(22):1609–18. [6](#)
- Osborne, C. K. and Schiff, R. (2005). Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol*, 23(8):1616–22. [6](#), [81](#), [95](#)
- Park, S. H., Kim, H., and Song, B. J. (2002). Down regulation of bcl2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen- and progesterone-receptor dependent and associated with poor prognostic factors. *Pathol Oncol Res*, 8(1):26–30. [1](#), [39](#), [88](#)
- Pasqualini, J. R., Chetrite, G., Blacker, C., Feinstein, M. C., Delalonde, L., Talbi, M., and Maloche, C. (1996). Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(4):1460–4. [5](#)

- Perou, C. M., Jeffrey, S. S., van de Rijn, M., Rees, C. A., Eisen, M. B., Ross, D. T., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Zhu, S. X., Lee, J. C., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P. O., and Botstein, D. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16):9212–7. [1](#)
- Philips, A., Teyssier, C., Galtier, F., Rivier-Covas, C., Rey, J. M., Rochefort, H., and Chalbos, D. (1998). FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 12(7):973–85. [10](#)
- Picotto, G., Massheimer, V., and Boland, R. (1996). Acute stimulation of intestinal cell calcium influx induced by 17 beta-estradiol via the cAMP messenger system. *Mol Cell Endocrinol*, 119(2):129–34. [10](#)
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., and Safe, S. (1997). Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, 11(11):1569–80. [10](#)
- Prives, C. and Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol*, 187(1):112–26. [42](#)
- Razandi, M., Alton, G., Pedram, A., Ghonshani, S., Webb, P., and Levin, E. R. (2003). Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol*, 23(5):1633–46. [12](#)
- Riggs, B. L., Khosla, S., and Melton, L. J., r. (1998). A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res*, 13(5):763–73. [94](#)
- Robertson, J. F. (2002). Estrogen receptor downregulators: new antihormonal therapy for advanced breast cancer. *Clin Ther*, 24 Suppl A:A17–30. [76](#)
- Robertson, J. F. (2004). Selective oestrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. *Cancer Treat Rev*, 30(8):695–706. [79](#), [81](#)
- Romero-Ramirez, L., Cao, H., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A. H., Yoshida, H., Mori, K., Glimcher, L. H., Denko, N. C., Giaccia, A. J., Le, Q. T., and Koong, A. C. (2004). XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*, 64(17):5943–7. [41](#)

- Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*, 276(40):36865–8. [8](#)
- Russo, J. and Russo, I. H. (1994). Toward a physiological approach to breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 3(4):353–64. [3](#)
- Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., and Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20):11217–22. [10](#)
- Saceda, M., Lippman, M. E., Chambon, P., Lindsey, R. L., Ponglikitmongkol, M., Puente, M., and Martin, M. B. (1988). Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Mol Endocrinol*, 2(12):1157–62. [9](#), [55](#)
- Saceda, M., Lippman, M. E., Lindsey, R. K., Puente, M., and Martin, M. B. (1989). Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. *Mol Endocrinol*, 3(11):1782–7. [55](#)
- Sagara, Y., Mimori, K., Yoshinaga, K., Tanaka, F., Nishida, K., Ohno, S., Inoue, H., and Mori, M. (2004). Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer*, 91(5):959–65. [1](#)
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235):467–70. [1](#), [28](#)
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O., and Davis, R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20):10614–9. [28](#)
- Schmitt, M., Bausero, P., Simoni, P., Queuche, D., Geoffroy, V., Marschal, C., Kempf, J., and Quirin-Stricker, C. (1995). Positive and negative effects of nuclear receptors on transcription activation by ap-1 of the human choline acetyltransferase proximal promoter. *J Neurosci Res*, 40(2):152–64. [10](#)
- Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., and Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75(3):567–78. [9](#)

- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2):199–208. [14](#)
- Shalon, D., Smith, S. J., and Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, 6(7):639–45. [28](#)
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M., and Davis, S. (2000). The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab*, 11(5):184–8. [5](#)
- Simpson, E. R. and Davis, S. R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—some new perspectives. *Endocrinology*, 142(11):4589–94. [5](#)
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D., and et al. (1994). Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 15(3):342–55. [6](#)
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785):177–82. [7](#)
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905):707–12. [7](#)
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3:Article3. [33](#), [57](#), [72](#)
- Stewart, B. W. and Kleihues, P. (2003). World Cancer Report. *IARC Press*. [2](#)
- Stoica, G. E., Franke, T. F., Moroni, M., Mueller, S., Morgan, E., Iann, M. C., Winder, A. D., Reiter, R., Wellstein, A., Martin, M. B., and Stoica, A. (2003a). Effect of estradiol on estrogen receptor-alpha gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene*, 22(39):7998–8011. [88](#), [96](#)

- Stoica, G. E., Franke, T. F., Wellstein, A., Czubayko, F., List, H. J., Reiter, R., Morgan, E., Martin, M. B., and Stoica, A. (2003b). Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway. *Mol Endocrinol*, 17(5):818–30. [39](#)
- Stossi, F., Likhite, V. S., Katzenellenbogen, J. A., and Katzenellenbogen, B. S. (2006). Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J Biol Chem*, 281(24):16272–8. [8](#), [40](#), [73](#), [87](#), [92](#), [96](#)
- Sun, M., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y. Y., Shelley, S. A., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. (2001). Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and pi3k. *Cancer Res*, 61(16):5985–91. [88](#)
- Sun, X., Fontaine, J. M., Bartl, I., Behnam, B., Welsh, M. J., and Benndorf, R. (2007). Induction of Hsp22 (HspB8) by estrogen and the metalloestrogen cadmium in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cell Stress Chaperones*, 12(4):307–19. [41](#), [61](#), [73](#)
- Suzuki, H., Ueda, T., Ichikawa, T., and Ito, H. (2003). Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 10(2):209–16. [98](#)
- Suzuki, R. and Shimodaira, H. (2006). Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 22(12):1540–2. [68](#)
- Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., and Imai, K. (2000). p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J*, 19(23):6517–26. [45](#)
- Tan, M., Wang, Y., Guan, K., and Sun, Y. (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1):109–14. [43](#)
- Tashiro, E., Hironiwa, N., Kitagawa, M., Futamura, Y., Suzuki, S., Nishio, M., and Imoto, M. (2007). Trierixin, a novel Inhibitor of ER stress-induced XBP1 activation from *Streptomyces* sp. 1. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 60(9):547–53. [97](#)

- Teixeira, C., Reed, J. C., and Pratt, M. A. (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 55(17):3902–7. [40](#), [88](#)
- Testa, J. R. and Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):10983–5. [96](#)
- Tijsterman, M., Ketting, R. F., and Plasterk, R. H. (2002). The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet*, 36:489–519. [12](#)
- Ullu, E., Tschudi, C., and Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, 6(6):509–19. [12](#)
- Umayahara, Y., Kawamori, R., Watada, H., Imano, E., Iwama, N., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., and Kamada, T. (1994). Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem*, 269(23):16433–42. [10](#)
- Van Driessche, N., Demisar, J., Booth, E. O., Hill, P., Juvan, P., Zupan, B., Kuspa, A., and Shaulsky, G. (2005). Epistasis analysis with global transcriptional phenotypes. *Nat Genet*, 37(5):471–7. [68](#), [91](#)
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., and Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871):530–6. [1](#), [88](#)
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., and Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, 269(7):5241–8. [81](#)
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S. J., and Press, M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 20(3):719–26. [7](#), [98](#)
- Wagner, A. (2001). How to reconstruct a large genetic network from n gene perturbations in fewer than n(2) easy steps. *Bioinformatics*, 17(12):1183–97. [1](#)

- Wagner, A. (2002). Estimating coarse gene network structure from large-scale gene perturbation data. *Genome Res*, 12(2):309–15. [1](#)
- Wagner, A. (2004). Reconstructing pathways in large genetic networks from genetic perturbations. *J Comput Biol*, 11(1):53–60. [1](#)
- Ward, H. W. (1973). Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J*, 1(5844):13–4. [6](#)
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411(6839):834–42. [12](#)
- Webb, P., Lopez, G. N., Uht, R. M., and Kushner, P. J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*, 9(4):443–56. [10](#)
- West, M., Blanchette, C., Dressman, H., Huang, E., Ishida, S., Spang, R., Zuzan, H., Olson, J. A., J., Marks, J. R., and Nevins, J. R. (2001). Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):11462–7. [1](#), [41](#), [73](#)
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366(6456):701–4. [43](#)
- Xu, W., Ngo, L., Perez, G., Dokmanovic, M., and Marks, P. A. (2006). Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(42):15540–5. [81](#)
- Yager, J. D. and Davidson, N. E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*, 354(3):270–82. [5](#)
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2):127–37. [7](#)
- Zhang, D. and Trudeau, V. L. (2006). Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 144(3):306–15. [9](#)
- Zupan, B., Demsar, J., Bratko, I., Juvan, P., Halter, J. A., Kuspa, A., and Shaulsky, G. (2003). GenePath: a system for automated construction of genetic networks from mutant data. *Bioinformatics*, 19(3):383–9. [68](#), [91](#)

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2004	2
1.2	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1980-2004	3
1.3	Schematischer Aufbau der Brustdrüse	4
1.4	Schematischer Aufbau eines Milchganges im Querschnitt	5
1.5	Organisation der funktionellen Domänen des ER α	8
1.6	Bindung des ER α an die DNA	9
1.7	Schematische Darstellung der verschiedenen Aktivitäten im ER α -Signalweg	11
1.8	Mechanismus der RNA Interferenz	14
2.1	Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1	28
2.2	Ausschnitt aus einem Fluorogramm mit identifizierten Signalen	33
2.3	Schematische Darstellung der Quantifizierung der Fluoreszenzsignale	33
2.4	Grundidee des NEM-Algorithmus	34
3.1	Schematisch Darstellung der Zusammenhänge der Gene im Estrogenrezeptor Signalweg	40
3.2	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>TP53</i> in HeLa	42
3.3	Validierung der genomweiten Expressionsanalyse nach TP53 Silencing	44
3.4	Lebensfähigkeit der Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen siRNA Konzentrationen (<i>AKT1</i> und <i>AKT2</i>)	46
3.5	Lebensfähigkeit der Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen siRNA Konzentrationen (<i>FOXA1</i> und <i>HSPB8</i>)	46
3.6	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>AKT1</i>	48
3.7	Relative Expressionsniveaus von <i>ESR1</i> nach Behandlung mit 17 β -Estradiol	55

3.8	Relative Expressionsniveaus von <i>ESR1</i> nach Behandlung mit Tamoxifen	56
3.9	Hierarchische Clusteranalyse der post-transkriptionellen Genstilllegungen und der gemessenen Effekte	59
3.10	Literaturnetzwerk der ausgewählten Gene	66
3.11	Inferriertes Netzwerk anhand des p-Wert Profils	69
3.12	Epistaseanalyse von <i>ESR1</i> und <i>CCNG2</i>	70
3.13	Epistaseanalyse von <i>ESR1</i> und <i>MAPK1</i>	71
3.14	Epistaseanalyse von <i>MAPK1</i> und <i>STAT5B</i>	72
3.15	Hierarchische Clusteranalyse E2, <i>ESR1</i> -Silencing, Tamoxifen	78
4.1	Modell der Aktivierung des Estrogenrezeptors durch <i>CCNG2</i>	87
4.2	Schematische Darstellungen der ERE-unabhängigen genomischen Aktivität des Estrogenrezeptors	97
A.1	total RNA Probe hoher Integrität	101
A.2	amplifizierte RNA Probe hoher Integrität	101
A.3	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>AKT2</i>	102
A.4	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>BCL2</i>	103
A.5	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>CCNG2</i>	103
A.6	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>ESR1</i>	104
A.7	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>FOXA1</i>	104
A.8	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>HSPB8</i>	105
A.9	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>MAPK1</i>	105
A.10	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>STAT5B</i>	106
A.11	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>STC2</i>	106
A.12	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>TMEM45B</i>	107
A.13	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>TP53</i>	107
A.14	Selektive Reduktion der mRNA Konzentration von <i>XBP1</i>	108
A.15	Reduktion der mRNA Konzentration von <i>CCNG2</i> und <i>ESR1</i>	108
A.16	Reduktion der mRNA Konzentration von <i>ESR1</i> und <i>MAPK1</i>	109
A.17	Reduktion der mRNA Konzentration von <i>MAPK1</i> und <i>STAT5B</i>	109
A.18	Hierarchische Clusteranalyse <i>ESR1</i> gegen Tamoxifen	110
A.19	Hierarchische Clusteranalyse <i>ESR1</i> -Stimulation gegen Tamoxifen	111
A.20	Hierarchische Clusteranalyse <i>ESR1</i> gegen <i>ESR1</i> -Stimulation	112

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete TaqMan-Assays	20
2.2	Verwendete siRNA von Qiagen und Dharmacon	20
3.1	Ausgewählte Gene für die post-transkriptionelle Genstilllegung .	38
3.2	Resultate <i>TP53</i> Knockdown HeLa	43
3.3	Zusammenfassung der post-transkriptionellen Genstilllegungen .	51
3.4	Zusammenfassung der kombinatorischen post-transkriptionellen Genstilllegungen	54
3.5	Zusammenfassung der genomweiten Expressionsprofile	58
3.6	Expressionswerte einzelner Gene nach <i>AKT2</i> Silencing	60
3.7	Expressionswerte einzelner Gene nach <i>CCNG2</i> Silencing	61
3.8	Expressionswerte einzelner Gene nach <i>ESR1</i> Silencing	61
3.9	Expressionswerte einzelner Gene nach kombinatorischem <i>ESR1/MAPK1</i> Silencing	62
3.10	Expressionswerte einzelner Gene <i>FOXA1</i> Silencing	63
3.11	Signifikant veränderte Expressionswerte nach 17β -Estradiol Be- handlung	73
3.12	Signifikant veränderte Expressionswerte nach Tamoxifen Behand- lung	74
3.13	Gegenläufig exprimierte Gene nach <i>ESR1</i> Silencing und Tamoxi- fen Behandlung	75
3.14	Gleichartig regulierte Gene nach <i>ESR1</i> -Stimulation und Tamoxi- fen Behandlung	77
3.15	Vergleich <i>ESR1</i> Silencing mit Connectivity Map Daten	80
3.16	Vergleich <i>ESR1</i> -Stimulation mit Connectivity Map Daten	80
3.17	Vergleich <i>ESR1</i> -Inhibition mit Connectivity Map Daten	82
3.18	Vergleich <i>AKT2</i> -Silencing mit Connectivity Map Daten	82
3.19	Vergleich <i>CCNG2</i> -Silencing mit Connectivity Map Daten	83
3.20	Vergleich <i>XBP1</i> -Silencing mit Connectivity Map Daten	84

Abkürzungsverzeichnis

μ	micro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AF-1	Activation Function 1
AF-2	Activation Function 2
AP-1	Activator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
DBD	DNA Binding Domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	double stranded RNA
DTT	1,4-Bis(sulfanyl)butan-2,3-diol
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogenrezeptor
ER α	Estrogenrezeptor alpha
ER β	Estrogenrezeptor beta
ERE	Estrogen Response Elements
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fold Change
g	Gramm; Erdbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

GEO	Gene Expression Omnibus
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunden
ICD	International Classification of Diseases
l	Liter
LBD	Ligand Binding Domain
LH	luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinizing-Hormone-Releasing hormone
M	Mol
M	molar
m	milli
MCF	Michigan Cell Foundation
miRNA	micro RNA
miRNP	micro Ribonuclear Particle
n	nano
NEM	Nested Effects Model
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	quantitative realtime PCR
raRNA	repeat-associated RNA
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNI	RNA Integrity Number
SDS	Sodium Dodecylsulfatae
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
siRNA	small interfering RNA
Sp-1	Stimulating Protein 1
SSC	Standard Saline Citrate
U	Units
u. a.	unten angegeben
UTR	Untranslated Region
v/v	volume per volume

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Heidelberg, den 26.08.2008

Mark Fellmann