

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie

**Untersuchung zu dem Einfluss von Onkogenen und
proteotoxischem Stress auf das Wachstum von Aml12 Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität**

vorgelegt von

Kohlenbach, Oliver Georg

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. N. P. Malek

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

Tag der Disputation: 08.09.2025

Inhalt

1. Einleitung	6
1.1. Karzinogenese	6
1.2. Aml12 Zellen.....	7
1.3. Onkogene.....	8
1.3.1. Akt (Proteinkinase B)	8
1.3.2. Myc	10
1.4. Die ER-Stressantwort	11
1.4.1. Proteinbiosynthese und <i>unfolded protein response</i>	12
1.4.2. PERK	14
1.4.3. ATF6.....	15
1.4.4. IRE1	16
1.5. Die ER-Stressoren und Modulatoren.....	17
1.5.1. Salubrinal.....	17
1.5.2. Tunicamycin.....	19
1.6 Ziel der Arbeit	20
2. Materialien und Methoden	22
2.1. Materialien.....	22
2.1.1. Zellmedien	22
2.1.2. ER-Stressoren und ER-Stress-Modulatoren.....	22
2.1.3. Chemikalien und Materialien	23
2.1.4. Bakterien.....	27
2.1.5. Enzyme	27
2.1.6. Weitere Maschinen.....	27
2.1.7. Weitere Chemikalien.....	28
2.1.8. Antikörper.....	28

2.1.9. Primer.....	29
2.1.10. Basensequenzen der Plasmide und Onkogene	30
2.1.11. Zelllinien und Produktion der Zelllinien	33
2.1.12. Kits	33
2.1.13. Puffer.....	34
2.2. Methoden.....	35
2.2.1. Klonieren	35
2.2.2. Zellen splitten	39
2.2.3. Western Blot.....	39
2.2.4. Soft Agar Assay	41
2.2.5. Kristallviolett Assay.....	42
2.2.6. Auswertung Soft Agar Assay und Kristallviolett Experiment	42
3. Ergebnisse.....	44
3.1. Generierung und Charakterisierung der Aml12-Derivate	44
3.2. Bestimmung der zellspezifischen Wachstumseigenschaften	45
3.3. Resistenz gegenüber ER-Stress.....	54
3.4. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens der Zelllinien unter zweidimensionalen Bedingungen durch Salubrinal unter normalen und gestressten Bedingungen.....	62
3.5. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens der Zelllinien unter dreidimensionalen Bedingungen durch Salubrinal	64
4. Diskussion	67
4.1. Generierung der Aml12-Derivate	67
4.2. Wachstumsverhalten.....	68
4.3. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens durch ER-Stress Induktoren.....	70
4.4. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens durch ER-Stress Modulatoren.....	71
5. Zusammenfassung.....	74

6. Repräsentative Bilder der Experimente	76
6.1. Soft Agar Assays	76
6.2. Salubrial Langzeitbehandlung.....	78
6.3. Tunicamycin Behandlung mit unterschiedlichen Dosierungen	79
7. Abbildungsverzeichnis	80
8. Tabellenverzeichnis	82
9. Abkürzungsverzeichnis.....	83
10. Literaturverzeichnis	87
11. Eigenständigkeitserklärung	98
12. Danksagung.....	99

1. Einleitung

1.1. Karzinogenese

Die Karzinogenese beschreibt die Entstehung einer malignen Neoplasie aus einer Zelle. Dabei handelt es sich um einen komplexen und mehrstufigen Prozess. Durch Analysen des Exoms von hepatozellulären Karzinomen konnten *Cécile et. al.* 994 verschiedene genetische Mutationen finden, welche einen erwartbaren Einfluss auf die Entstehung von Karzinomen haben [1]. Die Anzahl der Mutationen variierte dabei in einer Zelle zwischen 5 bis 124 [1]. Diese Mutationen treten in der Zelle nicht von einem Moment auf den anderen auf, sondern werden in langwierigen Abläufen und Zellteilungen erworben und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Erkrankung „Krebs“ ist somit nicht die Ursache einer Mutation, sondern die Ansammlung verschiedenster Mutationen, welche in ihrer Gesamtheit diese Erkrankung verursachen. Zusätzlich muss jedoch beachtet werden, dass z.B. im Falle eines hepatozellulären Karzinoms nicht jedes dieser Karzinome die exakt gleichen genetischen Mutationen aufweist. Hierbei müssen die *passenger* Mutationen von den sogenannten *driver* Mutationen unterschieden werden [2]. *Passenger* Mutationen haben keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Zellen oder deren Potential, zu entarten, allerdings werden diese Mutationen ebenso wie *driver* Mutationen an die Tochterzellen weitergegeben [2]. Die *driver* Mutationen hingegen sind Mutationen an zentralen Schaltmechanismen und Sicherheitsschleifen der Zellen, welche bei einer Mutation direkte Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen haben [2]. *Hanahan und Weinberg* formulierten in ihrer Veröffentlichung „Hallmarks of cancer: The next generation“ im Zuge dieses Prozesses zehn zentrale Schaltstellen für Mutationen, welche die Entstehung eines Karzinoms vorantreiben. Dies wären die Selbstversorgung mit Wachstumsfaktoren, die Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem, die Aktivierung einer dauerhaften Replikation, die Einleitung einer tumorbedingten Entzündung, die Invasion und Metastasierung, die Angiogenese, die Instabilität des Genoms mit darauffolgenden Mutationen, das Vermeiden des Zelltodes, die Deregulation des Stoffwechsels und das Vermeiden von wachstumshemmenden Substanzen. Diese Fähigkeiten werden von Karzinomzellen durch die Mutation von z.B. Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen erreicht, wobei als wohl bekanntestes Tumorsuppressorgen hier das Protein p53 zu nennen ist, welches im Falle einer Mutation im Genom den

Zellzyklus zur Reparatur anhält oder die Apoptose einleitet. Ebenfalls können Mutationen einer Zelle die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass sie nicht vom Immunsystem erkannt wird und in der Folge bekämpft wird. *Bissel und Hines* beschreiben in ihrer Arbeit, dass z.B. bedingt durch Strahlung und einen ungesunden Lebensstil eines Menschen jeden Tag Mutationen in diversen Zellen des Menschen entstehen, welche die Grundlage für die Entwicklung eines Karzinoms bilden [3]. Die regelmäßige Entstehung von Krebszellen wird jedoch durch das Immunsystem kontinuierlich bekämpft, wodurch die Wahrscheinlichkeit und die Frequenz des Auftretens von Karzinomen deutlich reduziert wird [4]. Alles in allem lässt sich somit sagen, dass eine maligne Neoplasie eine Formation von Zellen ist, welche über mehrere Zellteilungen hinweg an essentiellen Schaltstellen liegende Mutationen gesammelt hat. Hierbei muss es sich jedoch nicht um eine bestimmte Kombination der *driver* Mutationen handeln, sondern diverse Mutationen haben die Möglichkeit, eine bestimmte Krebserkrankung auszulösen [5].

1.2. Aml12 Zellen

Bei Aml12 Zellen handelt es sich um genetisch modifizierte Leberzellen der Maus, welche *transforming growth factor alpha (TGF- α)* überexprimieren. Bei Aml12 Zellen handelt es sich ebenso wie bei Aml14 Zellen um Zelllinien, welche sich in Untersuchungen von *Wu et. al.* über 1,5 Jahre in Kultur halten ließen und dabei ihr Wachstumsverhalten nicht veränderten [6]. Dies wiederum gibt ihnen bei der Durchführung von Experimenten einen großen Vorteil gegenüber unveränderten Leberzellen der Maus. Diese sind nur schwer in der Lage, sich in Zellkulturen zu vervielfältigen, überleben in Kultur nur für einen kurzen Zeitraum und verlieren sehr schnell ihre leberspezifischen Eigenschaften. Ebenfalls weisen Aml12 Zellen ähnliche Zellbestandteile (z.B. Peroxisomen) und einen vergleichbaren zellulären Aufbau (z.B. gallenkanalartige Strukturen) wie unveränderte Leberzellen auf. Zudem ist die Mengenverteilung ihrer Proteinproduktion vergleichbar mit normalen Leberzellen [7]. Aml12 Zellen produzieren dabei große Mengen an Albumin, α 1-Antitrypsin und Transferrin. Auch weisen sie über die Produktion der *gap junction* Proteine Connexin 26 und 32 und des Isotyps 5 der Laktatdehydrogenase eine große Ähnlichkeit zu nativen Leberzellen auf. Dazu kommt noch, dass sie wie auch unveränderte Leberzellen nicht in der Lage sind, in einem dreidimensionalen Soft Agar Medium zu wachsen [8].

1.3. Onkogene

In den folgenden Kapiteln werden zwei Onkogene beschrieben, welche dafür bekannt sind, in diversen gastrointestinalen Tumoren in veränderter Form gefunden zu werden und welche in dieser Arbeit genauer untersucht wurden. Die vermehrte Aktivität von Myc und von Akt sind in verschiedensten humanen Karzinomen vorhanden. Dies wird in den Zelllinien sowohl durch eine Überexpression von Myc, als auch durch Expression von Akt mit einem die Aktivität von Akt steigernden Lipidanker erreicht. Auf die konkreten Funktionen und die Frequenz des Vorkommens in humanen Karzinomen wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

1.3.1. Akt (Proteinkinase B)

Die Signalkaskade von Akt (auch Proteinkinase B genannt) beginnt mit einer Aktivierung von einem der verschiedenen Rezeptoren des *human epidermal growth factor receptor (HER)* [9]. Wird dieser Rezeptor durch einen entsprechenden Liganden wie z.B. Neuregulin (*NRG*) aktiviert, kommt es zur Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptor [9]. Möglichkeiten der Dimerisierung bestehen dabei aus der Homodimerisierung mit einem identischen Rezeptor und der Heterodimerisierung mit einem anderen Rezeptor der EGFR-Familie [10]. Als weitere Liganden der EGFR-Familie können zum Beispiel der *epidermal growth factor (EGF)* oder *TGF α* dienen [10]. Über eine regulatorische Untereinheit bindet nach der Aktivierung die PI3K an den dimerisierten Rezeptor. Die katalytische Untereinheit der PI3K phosphoryliert daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (*PIP2*) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (*PIP3*). *PIP3* wird in der Konsequenz von Akt gebunden [11]. Durch die Bindung an *PIP3*, welches sich an der Zellmembran befindet, gelangt Akt in direkte Nähe zur *3-phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK1)*. Auch *PDK1* bindet *PIP3*, was zu einer räumlichen Nähe von *PDK1* zu Akt führt und eine Konformationsänderung bedingt, wodurch *PDK1* erst in der Lage ist, Akt zu phosphorylieren [10,12].

Die Aktivierung von Akt durch *PDK1* an der Zellmembran wiederum führt zu seiner Translokation von der Zellmembran in das Zellplasma. In der Folge ist Akt in der Lage diverse nachgeschaltete Proteine, wie z.B. das in der Abbildung 1.1 dargestellte Glykogensynthasekinase-3- β (*GSK3 β*) zu phosphorylieren und somit zu inhibieren. Dadurch ist *GSK3 β* nicht mehr in der Lage, nachfolgende Substrate zu phosphorylieren

und somit ihre Hemmung oder ihren Abbau zu fördern [13]. Auch wenn GSK3 β in der Lage ist, mehr als 100 Substrate zu phosphorylieren, wird aus Gründen der Übersichtlichkeit stellvertretend in der Abbildung 1.1 nur Cyclin D1 aufgeführt, wodurch die relevante Regulationsstellung der GSK3 β und des gesamten Signalweges für den Zellzyklus ersichtlich wird [14,15]. Die Nutzung der myristoylierten Form erlaubt die Verwendung einer dauerhaft aktiven Form von Akt [16]. Die Myristoylierung bedingt in diesem Fall eine Bindung von Akt an die Zellmembran, wodurch eine dauerhafte räumliche Nähe zur PDK1 geschaffen wird [16,17]. Dies führt zu einem vermehrten Vorhandensein von phosphoryliertem Akt, was laut *Nakanishi et. al.* mit einer höheren Rezidivrate und einer schlechteren Prognose im weiteren Krankheitsverlauf bei einem hepatozellulären Karzinom behaftet ist [18].

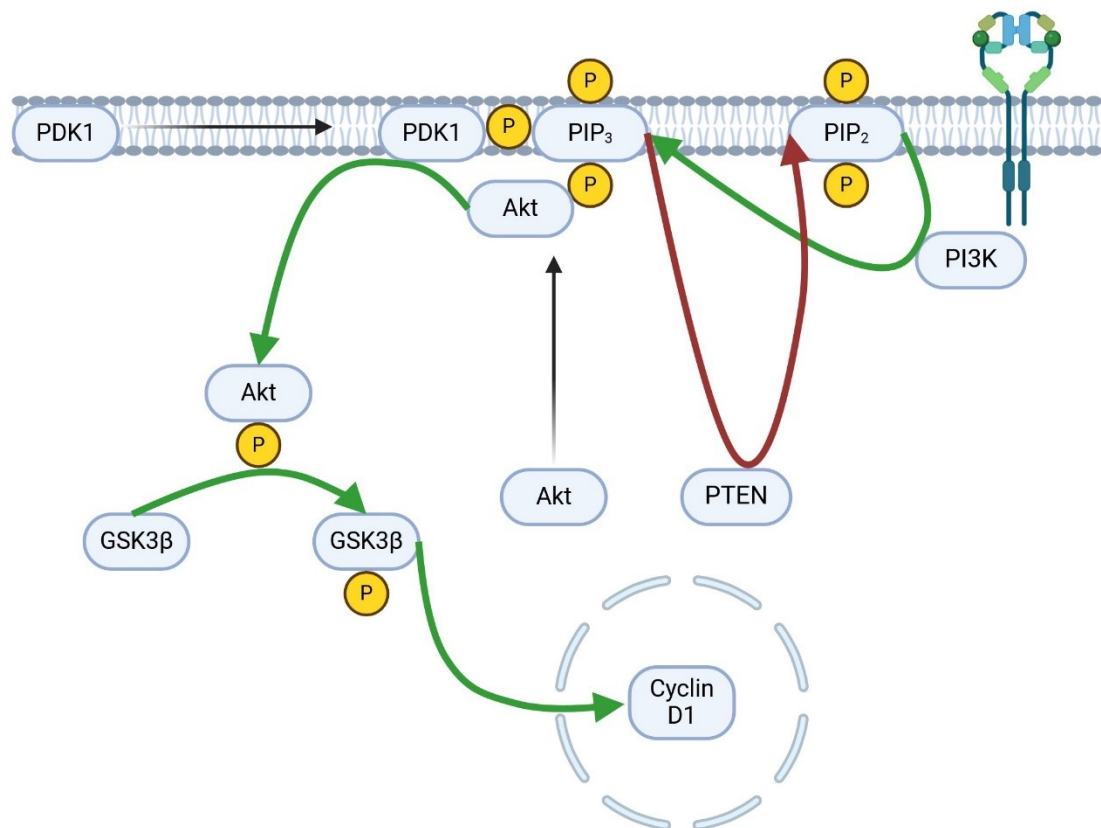


Abbildung 1.1: Akt/PI3K-Signalweg

Eine erhöhte Aktivierung von Akt hat gemäß *Vivanco und Sawyers* eine Beschleunigung des Zellwachstums, eine Zunahme der Zellgröße, eine Hemmung der Apoptose und eine

Steigerung der Angiogenese zur Folge. Eine Deregulierung des PI3K-Akt Signalweges lässt sich in vielen humanen Tumoren wie z.B. im Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom oder Kolonkarzinom finden. Wie in Mausmodellen nachgewiesen werden konnte, ermöglicht eine reduzierte Funktion des *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* die Induktion von Karzinomen z.B. in der Leber durch eine Deregulation des PI3K-Akt Signalweges [19].

1.3.2. Myc

Bei Myc handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher bei Überexpression elementare Prozesse der Krebsentwicklung anstößt. *Stasevich et. al.* nennen dahingehend u.a. das unkontrollierte Wachstum, die Vermeidung der Apoptose und die Fähigkeit zur Metastasierung als Prozesse der Krebsentwicklung [20]. Als Transkriptionsfaktor von Cyclin D1 und Cyclin B1 ist es in der Lage den Zellzyklus in seinem Ablauf zu beschleunigen und eine vermehrte Proliferation der Zelle zu verursachen [21]. Zusätzlich zu der einfachen Aktivierung von Cyclinen werden von Myc ebenfalls cyclinabhängige Kinasen und E2F Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität gesteigert. Gleichzeitig werden den Zellzyklus hemmende Proteine wie die Cyclin Kinase Inhibitoren p21 und p27 von Myc inhibiert [22]. Gemäß *Dang et. al* werden bis zu 15% aller Gene des menschlichen Genoms durch Myc reguliert. Neben den bereits vorher genannten Auswirkungen auf den Zellzyklus hat eine veränderte Konstitution von Myc zusätzlich Auswirkungen auf den Metabolismus, die Proteinbiosynthese und die Zelladhäsion und das Zytoskelett [23].

Eine Überexpression der Myc-Proteine kann zum Beispiel durch eine Deregulation der Proteine des Wnt-Signalweges erreicht werden. Sind das APC (*adenomatous polyposis coli*)-Protein, Axin und die Proteinkinase GSK3 β nicht mehr ausreichend in der Lage, β -Catenin zu binden und dadurch seinen Abbau auszulösen, so sorgt eine Akkumulation des β -Catenins für eine Bindung an den *Transkriptionsfaktor 4 (TCF-4)*, was schlussendlich eine Transkription von Myc-Proteinen zur Folge hat [21,24]. Neben dem Wnt-Signalweg führen ebenfalls ein deregulierter PI3K-Akt oder der durch Ras aktivierte MAPK-Signalweg zu einer Steigerung der Aktivität von Myc [22]. Einige der Signalwege, welche die Regulation von Myc beeinflussen, sind vereinfacht in der Abbildung 1.2 dargestellt.

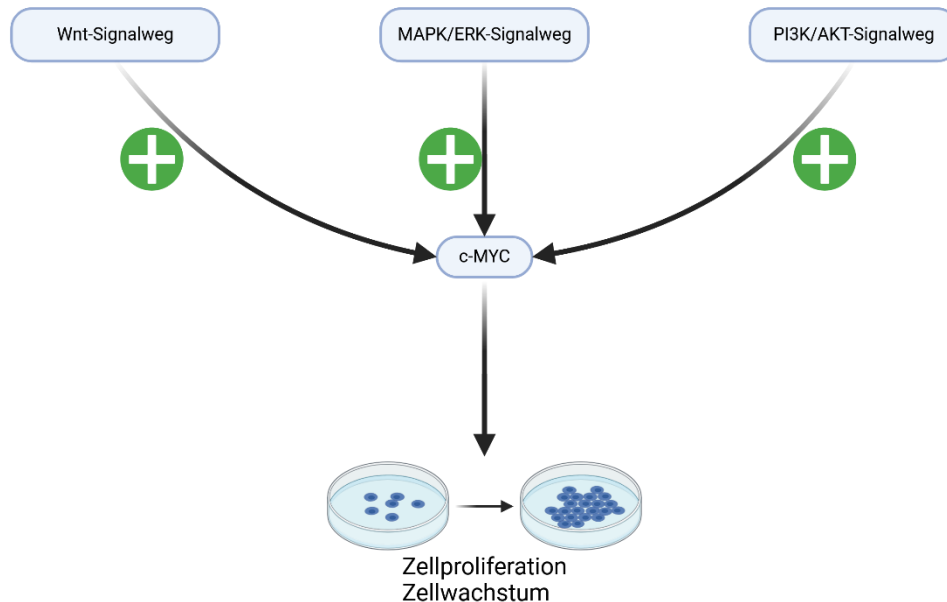


Abbildung 1.2: c-Myc beeinflussende Signalwege und zelluläre Auswirkungen von c-Myc

Niu et al. zeigten ein deutlich höheres Auftreten von Myc im HCC-Gewebe im Vergleich zu gesundem Lebergewebe oder in zirrhotischem Lebergewebe [25]. *Llombart und Mansour* beschreiben, dass die Expression von Myc in 70% der humanen Krebsarten verändert ist [26]. Zusätzlich führen *Nesbit et al.* in ihrer Arbeit unterschiedlichste Krebsarten auf, in denen die geregelte Funktion von Myc gestört ist. Sie nennen dabei u.a. Brustkrebs, diverse hämatologische und gastroenterologische Krebsarten und das Melanom [27].

1.4. Die ER-Stressantwort

Der grundsätzliche Hintergrund der ER-Stressantwort beschreibt die Fähigkeit einer Zelle, sich an das vermehrte Anfallen fehlgefalteter Proteine anzupassen oder aus der Gefahr einer vorliegenden Karzinogenese ein Selbstmordprogramm einzuleiten. Dieses vermehrte Anfallen fehlgefalteter Proteine ist ein Zustand, welcher sich in Zellen mit

hoher Proteinproduktion wie z.B. Karzinomen finden lässt. Abgesehen von den bereits genannten Möglichkeiten der Anpassung an den Stresszustand oder die Einleitung eines Selbstmordprogramms, hat ER-Stress einen großen Einfluss sowohl auf die Entstehung wie auch auf die Behandlung eines Karzinoms [28].

Nakagawa et. al. fanden heraus, dass ER-Stress eine wichtige Rolle in der Entwicklung des HCC spielt. In ihrer Arbeit werden diverse Punkte wie z.B. die Schaffung reaktiver Sauerstoffspezies oder die Schaffung eines inflammatorischen Mikromilieus durch das Zusammenspiel aus ER-Stress und Steatosis als Gründe für die Entstehung eines HCC genannt [29]. *Obeng et. al.* zeigten in ihrer Arbeit mit Zelllinien des Multiplen Myeloms, dass die Verwendung des Proteasom-Inhibitors Bortezomib zu einem vermehrten Anfallen an fehlgefalteten Proteinen und somit zu vermehrtem ER-Stress führt. In der Konsequenz wird durch diesen Prozess vermehrt die Apoptose der behandelten Zellen eingeleitet [30]. *Zhou et. al.* wiederum fanden heraus, dass ER-Stress zusätzlich eine Rolle in der Wirksamkeit erprobter Chemotherapeutika spielt. Sie beschreiben, dass ER-Stress eine große Relevanz in der Resistenz eines HCC gegenüber Sorafenib besitzt [31].

1.4.1. Proteinbiosynthese und *unfolded protein response*

Um aus einer Nucleotidsequenz ein Protein zu produzieren, muss die *desoxyribonucleic acid (DNA)*-Sequenz zunächst in eine RNA-Sequenz übersetzt werden [32]. Dieser Prozess der Transkription findet im Zellkern statt. Das entstandene Produkt – die prä-mRNA – wird im Zellkern von Eukaryoten weiter prozessiert. Dies schließt Vorgänge wie das 5'-Capping, die 3'-Polyadenylierung und das Spleißen mit ein [33,34]. Die cap-Struktur schützt die mRNA vor dem Abbau durch Nucleasen, ermöglicht ihr das Verlassen des Zellkerns und wird von der 40s-Untereinheit eines Ribosoms im Zuge der Translation gebunden [35]. Das Spleißen bezeichnet den Vorgang des Entferns der in der prä-mRNA enthaltenen Introns und das Zusammenfügen der Exons zur reifen mRNA [33,34]. Als letzter Schritt der transkriptionellen Modifizierung der prä-mRNA wird nach Erkennen einer Polyadenylierungssequenz eine Sequenz von ca. 50-200 Adenylresten angehängt. Dies schützt die codierende mRNA vor dem Abbau durch Nucleasen. Ihre Länge ist ein Hinweis auf die ungefähre Halbwertszeit der mRNA [36]. Bindet diese mRNA nun im Zytosol oder am rauen endoplasmatischen Retikulum an ein Ribosom schließt sich der Prozess der Translation an [37]. Dieser dient der Übersetzung des

genetischen Codes der mRNA in ein Protein. Am Ribosom binden dabei Basentriplets der mRNA an komplementäre Basentriplets einer *transfer ribonucleic acid (tRNA)*. Die Initiation der Translation beginnt mit dem Ansetzen einer mit Methionin beladenen tRNA an das Startcodon AUG der zu translatierenden mRNA [38]. In der folgenden Elongation setzen eine beladene tRNA nach der anderen an das Ribosom an, übertragen ihre Aminosäure auf die entstehende Polypeptidkette und lösen sich wieder vom Ribosom [39]. Durch ein Stoppcodon wird die Peptidsynthese terminiert und das naszente Protein aus dem Ribosom entlassen [40]. Bei einem sekretorischen Protein erkennt ein *small recognition particle (SRP)* nach Beginn der Elongation eine Signalsequenz, wodurch die Elongation zwischenzeitlich gestoppt wird. Erst durch die Bindung des SRP an das endoplasmatische Retikulum wird die Elongation fortgesetzt. Dies gewährleistet die Synthese des Proteins und seinen gleichzeitigen Transport in das Innere des endoplasmatischen Retikulums [41].

Die korrekte Faltung des gebildeten Proteins übernehmen Chaperone wie z.B. das *Hitzeschockprotein (Hsp) 70*, welches auch *binding immunoglobulin protein (BiP)* genannt wird [42]. Assistierend stehen den Hsp70 Chaperonen dabei die Hsp40 Cochaperone zur Verfügung. Diese gewährleisten im Falle der Synthese eines Proteins in das ER-Lumen durch ihre Verankerung in der ER-Membran eine direkte Nähe des BiP zu dem Sec61 Kanal, durch welchen die meisten Membranproteine des Endomembransystems in das endoplasmatische Retikulum gelangen [43,44]. Dadurch, dass BiP die Membranproteine *inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)*, *protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase (PERK)* und *activating transcription factor 6 (ATF6)* an der Membran des endoplasmatischen Retikulums bindet, unterdrückt es die Wirkung dieser Proteine [45]. Fallen jedoch vermehrt zu faltende Proteine oder fehlgefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum an, dissoziiert BiP, wodurch die *unfolded protein response (UPR)* aktiviert wird [45], welche in den Kapiteln 1.4.2, 1.4.3 und 1.4.4 näher beschrieben wird.

Posttranslational kommt es im Lumen des endoplasmatischen Retikulums zusätzlich zu verschiedenen Modifikationen der gebildeten Proteine. Diese Modifikationen umfassen u.a. die limitierte Proteolyse und die N-Glykosylierung [46]. Über vesikulären Transport gelangen die modifizierten Proteine in den Golgi-Apparat [47,48]. Dort werden weitere Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen, Sulfatierungen und weitere

Glykosylierungen vollzogen. Von der cis-Golgi Zisterne werden die Proteine die Golgi-Zisternen entlang bis zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Dort werden letzte Modifikationen und die endgültige Festlegung des Zielortes des Proteins vorgenommen [21,47,49].

1.4.2. PERK

PERK ist ein Transmembranprotein, welches mit einer Seite im Lumen des endoplasmatischen Retikulums liegt und mit der anderen Seite in das Zytosol der Zelle reicht [50]. An die im Lumen des endoplasmatischen Retikulums gelegene Seite von PERK bindet BiP, welche wie im Kapitel 1.4.1 beschrieben, für die korrekte Faltung von Proteinen im Inneren des endoplasmatischen Retikulums zuständig ist [51]. Fallen nun vermehrt zu faltende Proteine im Lumen des endoplasmatischen Retikulums an, löst sich BiP von der luminalen Bindungsstelle von PERK. Dies führt zu einer Dimerisierung und Transphosphorylierung von PERK [52]. In dieser Form ist PERK in der Lage, *eukaryotic translation initiation factor 2 α* (*eIF2 α*) zu phosphorylieren, wodurch es inaktiv wird. Da es sich bei *eIF2 α* um einen Translationsfaktor handelt, bewirkt diese Inaktivierung eine Reduzierung der Translationsleistung der Zelle um eine weitere Belastung mit Proteinen zu verhindern [53]. Andere Kinasen, welche in der Lage sind, *eIF2 α* zu phosphorylieren, sind *General Control Nondepressible 2* (*GCN2*), die *Heme-regulated eIF2 α Kinase* (*HRI*) und die *Protein Kinase R* (*PKR*) [54].

Das vermehrte Auftreten von phosphoryliertem *eIF2 α* erhöht die Menge an translatiertem *activating transcription factor 4* (*ATF4*) in der Zelle [55]. Unter ungestressten Zuständen würden Ribosomen am 5'-Ende der mRNA von *ATF4* ansetzen und zunächst auf den *upstream open reading frame* (*uORF*) 1 treffen. Während dieses *uORF1* die Translation von *ATF4* fördert, wird sie von dem nachgelagerten *uORF2* hingegen gehemmt. Eine Translation dieses *uORF2* führt zu einer Dissoziation des Ribosoms von der mRNA. Unter gestressten Zuständen liegt allerdings bedingt durch die erhöhte Menge von phosphoryliertem *eIF2 α* weniger *eIF2-GTP* vor, was wiederum eine geringere Menge an mit Methionin beladener und mit *eIF2-GTP* komplexierter tRNA zur Folge hat. Dadurch wird der Beginn der Translation verzögert, wodurch einige Ribosomen den *uORF2* überspringen, und in der Lage sind die *ATF4*-codierende Region zu erreichen und diese zu translatieren [56,57].

Der Transkriptionsfaktor ATF4 sorgt unter anderem für eine vermehrte Transkription von *C/EBP-homologous protein (CHOP)* [57,58]. CHOP ist einer der zentralen Transkriptionsfaktoren für die Expression von Genen, welche die ER-Stress-vermittelte Apoptose auslösen. Eines dieser Gene ist Bim, ein Vertreter der *BH3-only* Familie, welcher durch die Aktivierung von BAX und BAK die Apoptose einleitet [59,60]. Auch wird das Gen *death receptor 5 (DR5)* durch CHOP transkribiert. Dieses aktiviert die Caspase 8, welche das BH3-only Protein Bid durch Spaltung aktiviert, welches ebenfalls durch BAX und BAK die Apoptose einleitet [61,62]. Zusätzlich wird die Apoptose durch die Transkription von *endoplasmatic reticulum Oxioeductase-1 α (ERO1 α)* eingeleitet. ERO1 α produziert im endoplasmatischen Retikulum H₂O₂, was einen Ausfluss von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und über die *mitochondria-associated endoplasmatic reticulum membranes (MAM)* einen Einstrom von Calcium in das Mitochondrium bedingt, wodurch die Apoptose eingeleitet werden kann [63–65]. Zusätzlich wird das antiapoptotische Protein Bcl2 durch die vermehrte Expression von CHOP in seiner Expression gehemmt [66,67]. Darüber hinaus führt die UPR im Allgemeinen zu einer vermehrten Expression von BiP, um auf die anfallenden fehlgefalteten Proteine zu prozessieren [68,69].

Im Sinne einer negativen Rückkopplung wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP die Expression von *protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A (PPP1R15A oder Gadd34)* angeregt [70]. Gadd34 bildet zusammen mit PP1c einen Komplex, welcher die phosphorylierte Form von eIF2 α dephosphoryliert. Dies hemmt somit die Produktion von ATF4, CHOP und ihren Zielgenen in der UPR [71,72].

1.4.3. ATF6

Ebenso wie PERK besitzt auch *activating transcription factor 6 (ATF6)* einen Anteil im Lumen des endoplasmatischen Retikulums, welcher von BiP gebunden ist [73]. Ähnlich wie bei PERK löst sich BiP von ATF6, wenn zu viele fehlgefaltete Proteine im Lumen des endoplasmatischen Retikulums anfallen. Die luminaire Domäne des ATF6 dient somit als ER-Stress Sensor [74]. Der zytosolische Teil von ATF6 besitzt eine DNA-Bindungsstelle mit einer *basic leucine zipper (bZIP)*-Domäne [75]. Löst sich BiP zur Faltung fehlgefalteter Proteine vom luminalen Anteil von ATF6, löst sich der zytosolische Anteil von ATF6 und wird vesikulär zum Golgi-Apparat transportiert [74].

Dort werden durch die Proteasen *site-1 protease (S1P)* und *site-2 protease (S2P)* Teile von ATF6 abgespalten. Dieser als *regulated intermembrane proteolysis (RIP)* bezeichnete Vorgang reguliert ebenfalls diverse dem ATF6 ähnliche Moleküle wie z.B. das *sterol regulatory element-binding protein (SREBP)* [76]. Nach dieser Prozessierung ist es dem aktivierten ATF6 möglich, in den Zellkern zu gelangen. Dort bindet es die *endoplasmatic reticulum stress response elements (ERSE)*. In der Konsequenz wird die Transkription von z.B. BiP und weiteren Chaperonen gesteigert [77].

1.4.4. IRE1

Ähnlich wie PERK besitzt auch IRE1 einen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums gelegenen Anteil, welcher BiP bindet [78]. Die zytoplasmatische Seite dieses Proteins enthält eine Kinase und eine RNase. Um fehlgefaltete oder noch zu faltende Proteine zu falten, löst sich BiP bei vermehrtem Auftreten dieser von IRE1. Dies führt zu einer Dimerisierung von verschiedenen IRE1-Proteinen, was in der Folge eine Transphosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils bewirkt, wodurch die RNase aktiviert wird. Die RNase spleißt die prä-mRNA von *X-box binding protein 1 (XBP1)* [79,80], welches anschließend in das XBP1s-Protein transkribiert wird. Das somit entstandene XBP1s gelangt in den Nucleus, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert und dadurch an der Ausbildung von Proteinen der ER-Stressantwort beteiligt ist. Dabei werden u.a. Gene des *endoplasmatic reticulum-associated protein degradation (ERAD)* Signalwegs, welche einen vermehrten zytosolischen Abbau fehlgefalteter Proteine herbeiführen und ein vermehrtes Vorkommen von Chaperonen wie z.B. BiP herbeiführen, transkribiert [81].

Zusätzlich zu der RNase- und Kinase-Fähigkeit ist der zytoplasmatische Anteil von IRE1 auch in der Lage, einen Apoptose-auslösenden Signalweg zu starten. Der zytoplasmatische Anteil von IRE1 formt dabei einen Komplex mit *tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 2 (TRAF2)* und der *MAP3K apoptosis signale-regulating kinase (ASK1)* [82]. Dieser Komplex phosphoryliert und aktiviert die proapoptische *c-Jun N-terminal kinase (JNK)* [83,84]. Ebenfalls wird durch den IRE1-TRAF2 Signalweg die Caspase 12, welche essentiell für den ER-Stress vermittelten Zelltod ist, aktiviert [85]. Die Caspase 12 spaltet in der Konsequenz die Procaspase 9 zur

Caspase 9, welche wiederum die Procaspase 3 zur Caspase 3 aktiviert, welche die Apoptose einleitet [86].

Sämtliche der in 1.4.2, 1.4.3 und 1.4.4 erklärten Signalwege sind bildlich in der Abbildung 1.4 dargestellt.

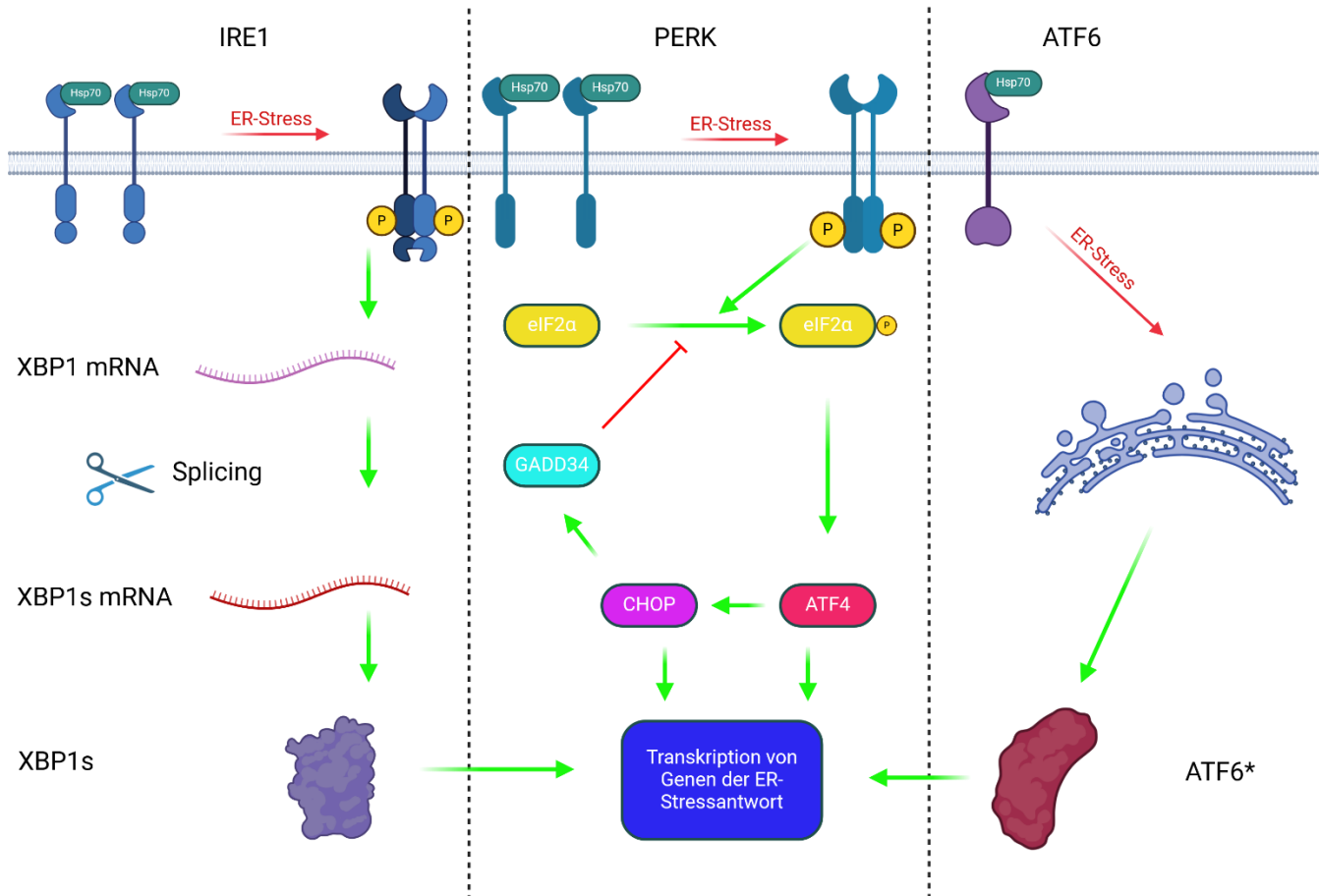


Abbildung 1.3: IRE1-, PERK- und ATF6-Signalweg des ER-Stresses

1.5. Die ER-Stressoren und Modulatoren

1.5.1. Salubrinal

Salubrinal ist ein Inhibitor des Komplexes aus der Serin-Threonin-Phosphatase PP1 und dem Cofaktor GADD34 [87]. GADD34 sorgt in diesem Fall für die spezifische

Dephosphorylierung der phosphorylierten Form von eIF2 α durch die PP1 [71]. eIF2 α -Kinasen oder Anteile des XBP1-Signalweges der endoplasmatischen Stressantwort einer Zelle werden durch Salubrinal nicht beeinflusst [87].

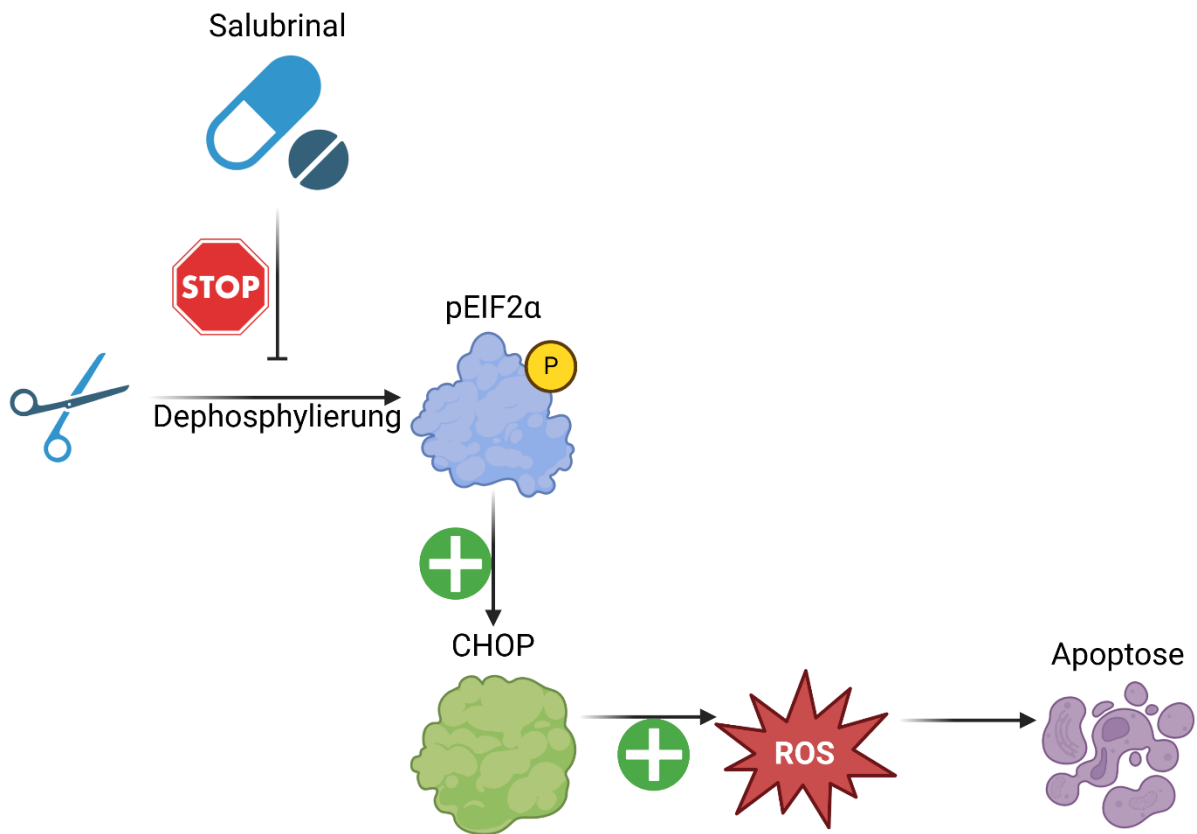


Abbildung 1.4: Graphische Darstellung der Wirkweise von Salubrinal

Die Dephosphorylierung von eIF2 α ist bezogen auf den ER-Stress ein Rückkopplungsmechanismus, welcher von GADD34 durchgeführt wird. Unter physiologischen Zuständen erfolgt die Dephosphorylierung von p-EIF2 α vor allem durch *protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B* (*PPP1R15B* oder *CREP*), wohingegen erhöhter ER-Stress eine gesteigerte Expression von GADD34 und somit eine vermehrte Dephosphorylierung von p-EIF2 α durch GADD34 bedingt [88]. Auch die Dephosphorylierung durch PPP1R115B wird durch Salubrinal gehemmt [89]. Diese Dephosphorylierung von eIF2 α wirkt u.a. protektiv gegen die durch ER-Stress ausgelösten Apoptose [90]. Auch wirkt es protektiv gegen die durch Tunicamycin induzierte Apoptose zur *in vitro* Simulation von ER-Stress [91]. Dem gegenüber zeigten

jedoch *Cnop et. al.*, dass eine Hemmung der Dephosphorylierung von phosphorylierten eIF2 α durch Salubrinal die Apoptose in den β -Zellen des Pankreas steigert [87]. Salubrinal kann somit protektive wie auch destruktive Auswirkungen auf Zellen haben.

Im Falle einer Infektion mit einem *Herpes simplex Virus (HSV)* ist Salubrinal in der Lage, die Replikationsrate einer mit dem Virus infizierten Zelle zu reduzieren. Bei einer regulär ablaufenden Infektion mit einem HSV phosphoryliert die Zelle eIF2 α , um die Proteinsynthese zu hemmen [92]. Dies wird vom Virus dadurch kompensiert, dass es genetische Information zur Produktion von ICP34.5, einem Analogon zu GADD34 in die Zelle einschleust [93].

1.5.2. Tunicamycin

Tunicamycin wurde zuerst in *Streptomyces lysosperficus* und später in *Streptomyces chartreusis* gefunden [94]. Dort ist es durch eine Inhibition der bakteriellen *Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide transferase (MraY)* und *Undecapenyl-phosphate α -N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase (WecA)* tätig. Die Hemmung dieser Enzyme führt u.a. zur Hemmung der Synthese von u.a. Peptidoglykanen und Glykoproteinen [95,96]. Dadurch übt Tunicamycin eine antibakterielle Wirkung aus. In humanen Zellen bewirkt Tunicamycin eine Hemmung der *UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl phosphate N-acetylglucosamine-phosphotransferase (GPT)*. Dies bewirkt eine Hemmung der ersten N-Acetylglukosylierung an Stickstoffatomen bei der posttranslationalen Modifikation [97].

Eine Behandlung humaner Zellen mit Tunicamycin hat durch die Hemmung der *N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase (GlcNAc-1PT)* ein Anstauen nicht endgültig posttranslational modifizierter Proteine zur Folge, wodurch die ER-Stress Signalwege der Zelle getriggert werden [98]. Dies zeigt sich in einem vermehrten Aufkommen von BiP und CHOP in Zellen, welche mit Tunicamycin behandelt wurden. *Abdullahi et. al.* zeigten, dass sich durch die Gabe von Tunicamycin ein ER-Stress Zustand der *in vitro* behandelten Zellen gut simulieren lässt [99].

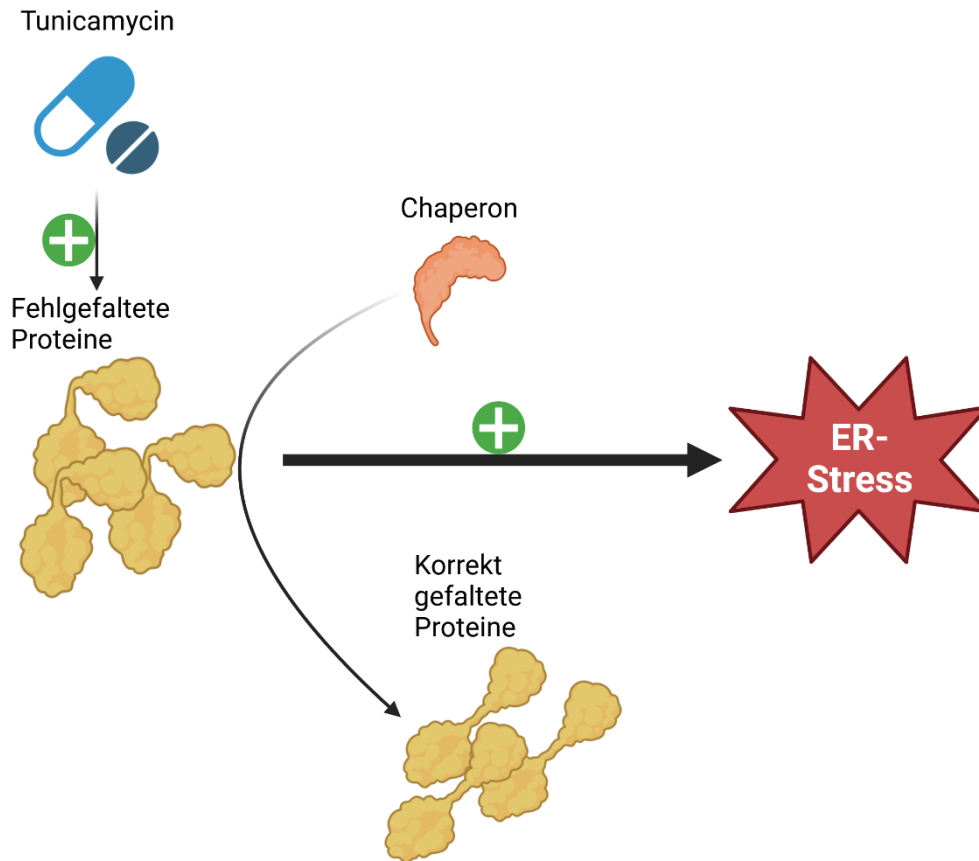


Abbildung 1.5: Graphische Darstellung der Wirkweise von Tunicamycin

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit setzt sich aus drei verschiedenen Aspekten zusammen.

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Beobachtung und Einordnung des Wachstumsverhaltens der verschiedenen produzierten Zelllinien in zwei- und dreidimensionalen Kultursystemen. Es sollten dabei die Auswirkungen einzelner Onkogene sowohl alleinstehend, als auch in Kombination auf das Wachstumsverhalten nativer Aml12 Zellen erforscht werden. Das Ziel dieses Teils der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der einzelnen Onkogene oder deren Kombination auf das Wachstumsverhalten der Zellen.

Der zweite Teil betrachtet das Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien unter dem Vorhandensein des ER-Stressors Tunicamycin. Es soll somit das Wachstum unter ER-Stressbedingungen untersucht werden.

Der dritte Teil wiederum erforscht die Auswirkungen des ER-Stress-Modulators Salubrinal, sowohl unter zwei- als auch unter dreidimensionalen Bedingungen. Die Untersuchung des Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien im zweidimensionalen Medium findet dabei im gestressten Zustand, aber auch unter normalen Bedingungen statt.

Das Ziel des zweiten und dritten Abschnittes der Arbeit bestand darin, ob es ein Onkogen oder die Kombination der beiden Onkogene gibt, welche im Vergleich zu nativen Aml12 Zellen sehr sensibel oder sehr resistent auf ER-Stress-Induktoren oder Modulatoren reagieren.

Das übergeordnete Ziel der Arbeit ist es somit – im Sinne der personalisierten Medizin – das Wachstumsverhalten einzelner Onkogene bzw. deren Kombination und deren Sensibilität gegenüber ER-Stressoren und ER-Stress Induktoren zu untersuchen, um eine möglichst optimale Behandlung einer bestimmten Kombination aus Mutationen zu gewährleisten.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zellmedien

2.1.1.1. Zusammensetzung des Kulturmediums

Name	Hersteller	Katalognummer	Anteil
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	41965-039	250ml
F-12 Nutrient Mixture (Ham) (F-12 Nut Mix + GlutaMax™-I)	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	31765-027	250ml
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich	0001640839	50ml
Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin)	Lonza	DE17-603E	5ml
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS-G) (100x)	Thermo Fisher Scientific	41400045	5ml
Dexamethason (40µg/ml)	Sigma Aldrich	D4902	1ml

2.1.1.2. Bakterielle Medien

Name	Hersteller	Katalognummer
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth	X964.1
Agar-Agar, BioScience	Carl Roth	6494.2

2.1.2. ER-Stressoren und ER-Stress-Modulatoren

Name	Hersteller	Katalognummer
Salubrinal	Tocris	2347
Tunicamycin	Tocris	3516

2.1.3. Chemikalien und Materialien

2.1.3.1. Zellkultur

Name	Hersteller	Katalognummer
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific (Gibco)	14190-094
Trypsin	Lonza	BE02-007E
15ml Röhren	Greiner bio-one	188271
50ml Röhren	Falcon	352070
Pipettenspitze 1000µl	Sarstedt	70.3050.205
Pipettenspitze mit Filter 1000µl	Sarstedt	70.3060.255
Pipettenspitze 200µl	Sarstedt	70.3030.205
Pipettenspitze mit Filter 200µl	Sarstedt	70.760.211
Pipettenspitze 20µl	Sarstedt	70.116.200
Pipettenspitze mit Filter 20µl	Sarstedt	70.1116.210
Glaspipetten (Pasteur capillary pipettes)	WU Mainz	200760
Zellkulturschale TC-Schale 100	Sarstedt	83.3902
Zellkulturschale 150	TPP	93150
2ml Pipetten	Corning	4021
5ml Pipetten	Corning	4051
10ml Pipetten	Corning	4101
25ml Pipetten	Corning	4251
50ml Pipetten	Corning	4501
Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf	0030 120.086
Safe-Lock Tubes 2ml	Eppendorf	0030 120.094
Multipette® M4	Eppendorf	4982000012
Falcon™ Platten für Gewebekulturen (sechs well)	Falcon	10110151
Combitips advanced® 10ml	Eppendorf	0030089677

Heracell™ 150i CO₂-Inkubatoren Thermo Fisher Scientific 51026331
mit Edelstahlkammer, TCD-Sensor, 230V

2.1.3.2. Soft Agar

Name	Hersteller	Katalognummer
Difco™ Agar Noble	BD Biosciences	214220
Iodonitrotetrazoliumchlorid	Sigma Aldrich	I8377-1G

2.1.3.3. Polymerasekettenreaktion

Name	Hersteller	Katalognummer
LiChrosolv® Water for chromatography	Merck	1153332500
Mastercycler® pro S	Eppendorf	6325 000.013

2.1.3.4. Chemikalien und Materialien der Gele des Western Blots

Name	Hersteller	Katalognummer
Rotiphorese Gel® 30 (37,5:1) (Acrylamid)	Carl Roth	3029.1
TEMED	EMD Chemicals	D00108329
Roti®Load 1	Carl Roth	K929.1
Methanol	Honeywell	32213-2.5L
Ethanol	ITW Reagents	A1613
Propanol	Merck	1096342500
Nonfat dried milk powder	ITW Reagents	A0830
Whatman GB003 Gel Blot Paper	Cytiva	10426892
Immobilon®-P Transfer Membranes	Merck	IPVH00010
Tween® 20 for molecular biology	ITW Reagents	A4974
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific	34580

Amersham Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film	GE Healthcare Limited	28906837
AGFA G153 Developer	AGFA	12866532
AGFA G354 Fixer	AGFA	12876532

2.1.3.5. Western Blot

Name	Hersteller	Katalognummer
Mini Gel Holder Cassette	BIO-RAD	1703931
Foam Pads for Mini Trans-Blot® Cell	BIO-RAD	1703933
Mini Trans-Blot Central Core	BIO-RAD	1703812
Bio-Ice Cooling Unit	BIO-RAD	1703934
Mini-PROTEAN® Casting Stand	BIO-RAD	1653303
Mini-PROTEAN® Casting Frame	BIO-RAD	1653304
Mini-PROTEAN® Casting Stand Gaskets	BIO-RAD	1653305
Mini Cell Buffer Dams	BIO-RAD	1653130
Gel Releasers	BIO-RAD	1653320
Mini-PROTEAN® Tetra Electrode Assembly	BIO-RAD	1658037
Buffer Tank	BIO-RAD	1658039
Cell Lid With Power Cables	BIO-RAD	1658041
Glass Plates	BIO-RAD	1702982
Electrophoresis Power Supply Consort EV231	Consort	Z654353
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	BIO-RAD	1645052
Albumin Fraktion V >98% pulv. für die Molekularbiologie	Carl Roth	8076.4
Ammoniumpersulfat	ITW Reagents	A2941,0100

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 bis 250 kDa	Thermo Fisher Scientific	26619
Natriumazid	Carl Roth	4221.1
Protein Assay Kammer/ <i>well</i>	BIO-RAD	2240096

2.1.3.6. Agarose Gel

Name	Hersteller	Katalognummer
SeaKem® LE Agarose	Lonza	50004
Ethidium bromide – Solution 1% BioChemica	ITW Reagents	A1152,0100
Consort E835	Consort	Z337447
GeneRuler 1kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific	SM0311
GeneRuler 50bp DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific	SM0371
Intas Gel iX Imager	Intas	

2.1.3.7. Klonierungsprozess

Name	Hersteller	Katalognummer
S.O.C. Medium	invitrogen	15544-034
Ampicillin Natrium Salz	ITW Reagents	A0839,0025
Heratherm Incubator	Thermo Fisher Scientific	50129111
Model G25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific Co. Inc.	M1024-0000

2.1.3.8. Kristallviolett Assay

Name	Hersteller	Katalognummer
Kristallviolett	Sigma Aldrich	C0775-100G
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich	158127-500G

2.1.4. Bakterien

Name	Hersteller	Katalognummer
Subcloning Efficiency™ DH5α	Thermo Fisher	18265017
Competent Cells	Scientific	

2.1.5. Enzyme

Name	Hersteller	Katalognummer
Alkaline Phosphatase, Calf intestinal (CIP)	NEB®	M0290S
BamHI-HF®	NEB®	R3136M
EcoRI-HF®	NEB®	R3101L
NheI-HF®	NEB®	R3131S
NotI-HF®	NEB®	R3189S

2.1.6. Weitere Maschinen

Name	Hersteller	Katalognummer
Nanodrop2000	Thermo Fischer Scientific	ND-2000
Biofuge Fresco Heraeus	Heraeus	Fabr.-Nr.: 40559124 Bestell-Nr.: 75005521/01 Kin. Energie: 1575Nm Max. 13000rpm
Biofuge Pico Heraeus	Heraeus	Fabr.-Nr.: 247861 Best.-Nr.: 75003280 Kin. Energie: 1650Nm Max. Drehzahl: 13.000rpm
Multifuge 1 L-R Heraeus	Heraeus	Fabr.-Nr.: 40551940 Bestll-Nr.: 75004330 Kin. Energie: 34,3kNm Max. 4700rpm
Blockthermostat	Haep Labor Consult – HLC	Model: HBT-1 131

		Serial-No. H 131 3030
VTX-3000L Mixer Uzusio	LMS	3993
neoLab D-6011	neoLab	D-6011
Magnetrührer		
neoLab Shaker DRS-12	neoLab	7-0952
FVL-2400N Combi-Spin	bioSan	BS-010202-AAA
Minizentrifuge/-Vortex		
ALTO-UF	Ibs tecnomara Hersteller Triple red	A2-11042018-1
Synergy HAT	Biotek	7091000
Magnetrührer mit Heizung	Omnilab	66957
Heidolph MR 2002		

2.1.7. Weitere Chemikalien

Name	Hersteller	Katalognummer
Natriumchlorid	VWR	27810.295
TRIS-Hydrochlorid PUFFERAN® >99%, p.a.	Carl Roth	Art.-Nr. 9090.3
Salzsäure rauchend 37%	Merck	1.00314.2500
SDS ultrapure	AppliChem	A1112,1000
NP-40	AppliChem	A1694,0250
Natriumdesoxycholat	AppliChem	A1531,0100

2.1.8. Antikörper

2.1.8.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnung	Katalognummer
AKT	Cell Technology	Signaling Rabbit	1:2.000 in 2,5% BSA in TBS-T	4685
c-MYC	abcam	Rabbit	1:2.000 in 2,5% BSA in TBS-T	Ab32072

Vinculin	Sigma Aldrich	Mouse	1:10.000 in 5% BSA in TBS-T	V9131
EIF2 α	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:2.000 in 2,5% BSA in TBS-T	9722
p-EIF2 α	Thermo Scientific	Rabbit	1:10.000 in 5% BSA in TBS-T	44-728G
Bip	Cell Signaling Technology	Rabbit	1:2.000 in TBS-T	11815
GADD34	Proteintech	Rabbit	1:3.000 in 5% BSA in TBS-T	10449-1-AP

2.1.8.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-mouse	1:3.000	GE Healthcare	NA931V oder NA934V
Anti-rabbit	1:3.000	Cell Signaling Technology	44125

2.1.9. Primer

Name	Sequenz
Hygro-SnaBI-Kozak-AKT forward	TTTTTACGTAGCCACCATGATGAGCGACGTGGCTA TTG
Hygro-SnaBI-Kozak-MYC forward	TTTTTACGTAGCCACCATGCCCCCTCAACGTGAAC
LNCX-BglIII-Kozak-AKT forward	TTTTAGATCTGCCACCATGATGAGCGACGTGGCTA TTG
LNCX-BglIII-Kozak-MYC forward	TTTTAGATCTGCCACCATGCCCCCTCAACGTGAAC
Sall-MYC reverse	AAAAGTCGACTTATGCACCAGAGTTTCG
Sall-MIA-reverse	AAAAGTCGACAATTCGACAGCGTGGCTTC

2.1.10. Basensequenzen der Plasmide und Onkogene

2.1.10.1. *pBabe-hygro-hTERT*

pBabe-hygro-hTERT (8651 bp)

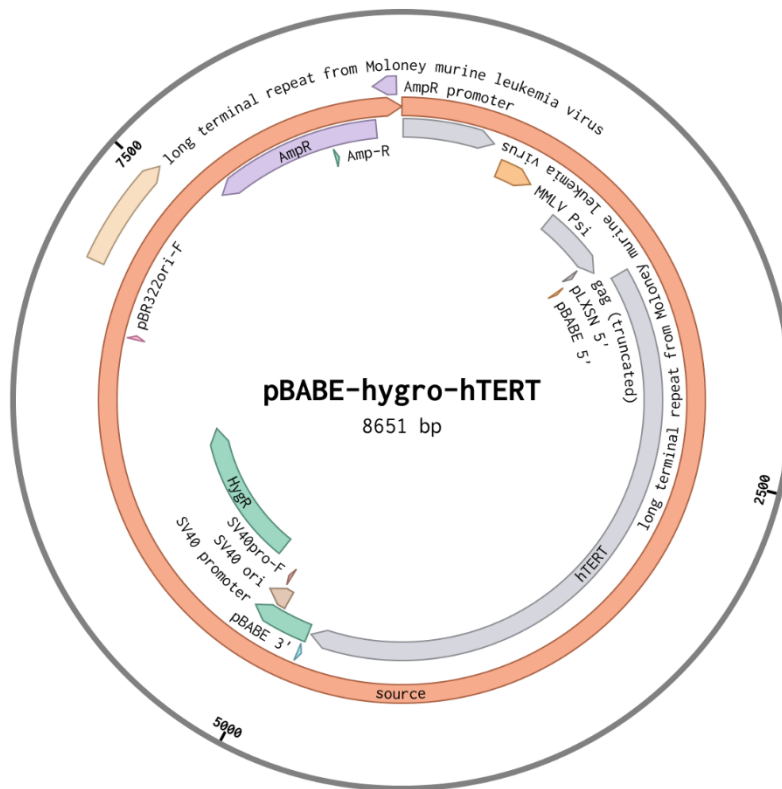


Abbildung 2.1.10.1.1.: Darstellung des pBabe-hygro-hTERT Plasmids

2.1.10.2. pLNCX2

UTF_8_de_pLNCX2_ (6132 bp)

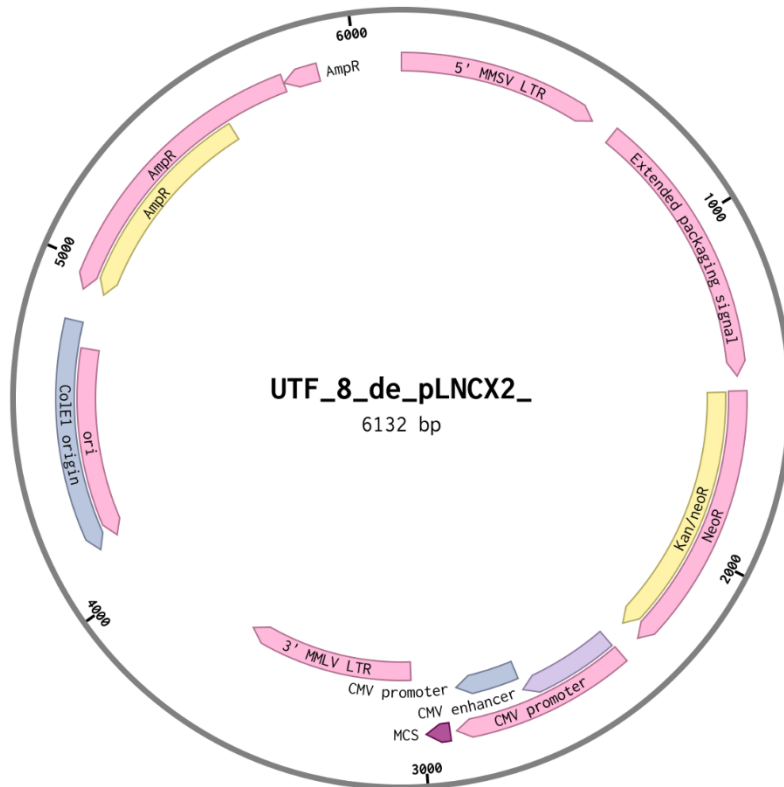


Abbildung 2.1.10.1.2.: Darstellung des UTF_8_de_pLNCX2_ Plasmids

2.1.10.3. Akt

TTTTTACGTAGCCACCATGATGAGCGACGTGGCTATTGtgaaggagggttgctgcacaa
 acgaggggagtacatcaagacctggcggccacgctacttctcctcaagaatgatggcaccttcattggctacaaggagcgg
 ccgcaggatgtggaccaactgaggctcccctcaacaacttctctgtggcgcagtccagctgatgaagacggagcggccc
 cggccaacaccttcatcatccgctgctgcagtggaccactgtcatgaacgcaccttccatgtggagactcctgaggagcgg
 ggaggagtggacaaccgccatccagactgtggctgacggcctcaagaagcaggaggaggaggatggacttccggtcg
 ggctcaccagtgacaactcaggggctgaagagatggagggtgccttgccaagccaagcaccgcgtgacctgaacga
 gtttgagtacctgaagctgctgggcaagggcacttccgcaaggtgatcctggtgaaggagaaggccacaggccgctactac

gcatgaagatcctcaagaaggaagtcacgtggccaaggacgaggtggcccacacactcaccgagaaccgctcctgca
gaactccaggcacccttctcacagccctgaagtactcttccagaccacgaccgcctctgctttgcatggagtacgcaa
cgggggagctgttctccacctgtcccgggaacgtgtgttctccgaggaccggcccgttctatggcgctgagattgtc
agccctggactacctgcactcggagaagaacgtggtgtaccgggacctcaagctggagaacctcatgctggacaaggacgg
gcacattaagatcacagacttcgggctgtgcaaggaggggatcaaggacgggtgccaccatgaagaccttttcggcacacct
gagtacctggccccgaggtgctggaggacaatgactacggccgtgactggactggtgggggctgggctggtcatgtac
gagatgatgtgctgctgctgccccttacaaccaggacctgagaagctttttgagctcatcctcatggaggagatccgcttc
ccgcgcacgcttggctcccaggccaagtccttgccttcagggtgctcaagaaggacccaagcagaggcttggcgggggc
tccgaggacgccaaggagatcatgcagcatcgttcttccgggtatcgtgtggcagcacgtgtacgagaagaagctcagcc
caccctcaagccccaggctcagctcgggagactgacaccagggtatttgatgaggagttcacggcccagatgatcaccatcaca
ccacctgaccaagatgacagcatggagtgtgtggacagcagcgcaggccccacttccccagttctcctactcggccagc
ggcacggcctgagggcggtggactgcgctgacgatagcttgagggatggagaggcgccctcgtgcatgatctgtat
ttaatggtttttatttctcgggtgcattgaGAAGCCACGCTGTCTGAATTGTCGACTTTT

2.1.10.4. Myc

TTTTTACGTAGCCACCATGCCCTCAACGTGAACttaccaacaggaactatgacctgacta
cgactccgtacagccctatttcatctgcgacgaggaagagaatttctaccagcaacagcagagcgcagctgcagccgcc
ggccccagtgaggatctggaagaaatfcagctgcttcccacccggccctgtccccgagccgctccgggctctgct
ctccatcctatgttgcggtcgtacgtccttctccccaaagggaagacgatgacggcgggcgtggcaacttctccaccggc
cagctggagatgatgaccgagttacttgaggagacatggtgaaccagagcttcatctgcgatcctgacgacgagaccttcat
caagaacatcatcatccaggactgtatgtggagcggtttctcagccgctccaagctggtctcggagaagctggcctcctacc
aggctgcgcgcaaagacagcaccagcctgagccccggcgggcacagcgtctgctccacctccagcctgtacctgcag
gacctaccgcccgcgctccgagtgacattgacctcagtggtcttccctaccgctcaacgacagcagctcgcceaate
ctgtacctgctccgattccagccttctctctctcggactcgtgctgctcctccgagctctccccacggccagcctgag
cccctagtgtcatgaggagacaccgcccaccaccagcagcgaactctgaagaagagcaagaagatgaggaagaaattga
tgtggtgtctgtggagaagaggcaaaccctgccaagaggtcggagtcgggctcatctccatcccaggccacagcaaac
tccgcacagcccactggtcctcaagaggtgccacgtctccactcaccagcacaactacgccgacccccctccacaaggaa
ggactatccagctgccaagaggccaagttggacagtggcagggtcctgaagcagatcagcaacaaccgcaagtgtcca
gccccaggtcctcagacacggaggaaaacgacaagaggcggacacacaacgtcttggaacgtcagaggaggaacgagct
gaagcgcagctttttgcccctgctgaccagatccctgaattgaaaacaacgaaaaggcccccaaggtagtgtatcctcaaaa
aagccaccgctacatcctgtccattcaagcagacgagcacaagctcacccttgaaggacttattgaggaaacgacgaga
acagttgaaacaaaactgaaacagcttCGAAACTCTGGTGCATAAAGTCGACTTTT

2.1.11. Zelllinien und Produktion der Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
Aml12	Immortalisierte Hepatozyten einer transgenen Maus, welche die Morphologie und das Wachstumsverhalten unveränderter Hepatozyten behalten haben
Aml12-Myc ^{OE}	Aml12 Zellen, welche per Virus-Transduktion zur Überexpression von Myc angeregt werden
Aml12-Akt ^{Myr}	Aml12 Zellen, welche eine per Virus-Transduktion eingebrachte mRNA von Akt ^{Myr} exprimieren
Aml12-Myc ^{OE} -Akt ^{Myr}	Aml12 Zellen, welche sowohl per Virus-Transduktion zur Überexpression von MYC angeregt werden, als auch eine per Virus-Transfektion eingebrachte mRNA von Akt ^{Myr} exprimieren

Produktion dieser Zelllinien

Die untersuchten Zelllinien wurden durch die virale Transduktion der Onkogene Myc^{OE} und Akt^{Myr} generiert und gegen das entsprechende Resistenzgen selektioniert (pBabe-hygro-hTERT: Hygromycin vgl. Kapitel 2.1.10.1); pLNCX2: Geneticin (vgl. Kapitel 2.1.10.2)). Die Transduktion mit mehreren Onkogenen erfolgte konsekutiv. Die Transduktion wurde dabei von Dr. rer. nat. Mathias Riebold übernommen.

2.1.12. Kits

ACCUZYME TM Polymerase	DNA	BIOLINE	BIO-21052
DC Protein Assay		BIO-RAD	5000114
Isolate II PCR and Gel Kit		BIOLINE	BIO-52058, BIO-52059, BIO-52060
NucleoBond® Xtra Midi		Macherey-Nagel	REF 740410.50
NucleoSpin® EasyPure	Plasmid	Macherey-Nagel	REF 740727.50

Rapid DNA Ligation Kit	Roche	11635379001
------------------------	-------	-------------

2.1.13. Puffer

TBS-(T) (Mengenangaben für 5l)	TBS	<ul style="list-style-type: none"> • 60,57g 100mM Tris pH 7,6 • 438,3g 1,5M NaCl • Beides wird in 3,5l Wasser gelöst und mit 37% HCl (ca. 32,5ml) auf den pH 7,6 eingestellt. • Auffüllen auf 5l mit Wasser.
	TBS-T	<ul style="list-style-type: none"> • 20ml Tween20 werden 1l TBS hinzugefügt.
Upper Tris		1M TRIS bei pH 6,8
Lower Tris		1,5M TRIS bei pH 8,8
RIPA		150mM NaCl 1% NP-40 0,5% Natriumdesoxychololat (Na-DOC) 0,1% SDS 25mM Tris pH 7,4
Transferpuffer		Reagenzien für 10-fach konzentrierten Puffer 720g Glycin 151,5g Trishydroxymethylaminomethan Auf ein Volumen von 5l mit doppelt-destilliertem Wasser auffüllen. Zur Verdünnung auf 1-fach konzentrierten Puffer 100ml 10x Transferpuffer 150ml 100% Methanol 750ml doppelt-destilliertes Wasser
Puffer Gelelektrophorese	zur	Reagenzien für 10-fach konzentrierten Puffer 720g Glycin 151g Trishydroxymethylaminomethan 50g Natriumdodecylsulfat

Auf ein Volumen von 5l mit doppelt-destilliertem Wasser auffüllen

Zur Verdünnung auf 1-fach konzentrierten Puffer

100ml 10x Running buffer

900ml doppelt-destilliertes Wasser

2.2. Methoden

2.2.1. Klonieren

2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion

Zur Durchführung einer *Polymerasekettenreaktion (PCR)* zur Vervielfältigung des genetischen Materials einer bestimmten Sequenz wurden immer die folgenden Reagenzien verwendet:

Auf 5µl PCR Puffer

1µl forward Primer (10µM)

1µl reverse Primer (10µM)

1µl template (100ng ng template)

1µl Nukleosidtriphosphate (10µM each)

1µl hitzebeständige Polymerase

Mit PCR H₂O auf 50µl auffüllen

Die Denaturierung wurde bei 95°C durchgeführt. Die entsprechende Temperatur für die Primerhybridisierung wurde mit Hilfe der Seite „<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>“ berechnet. Die notwendige Zeit der Elongation richtete sich nach der Länge des zu vervielfältigenden Konstrukts und der bei 1,5-2min/kb liegenden Arbeitsgeschwindigkeit der „ACCUZYME DNA Polymerase“ und wurde bei 72°C durchgeführt. Es wurden immer zwischen 30 und 35 Zyklen durchgeführt.

2.2.1.2. Verdau

Zur Durchführung des Verdau eines Plasmids oder eines PCR Amplikons wurden folgende Komponenten verwendet:

1 µg genetisches Material oder 43 µl aufgereinigtes PCR Produkt

1 µl Enzym 1

1 µl Enzym 2

5 µl Puffer

Zur Herstellung eines 50 µl Reaktionsgemisches wurde das Gemisch abhängig vom verwendeten Volumen des genetischen Materials auf 50 µl aufgefüllt

Der Puffer, welcher für beide verwendeten Enzyme die höchste Aktivität gewährleistet wurde mit Hilfe der Seite „<https://nebcloner.neb.com/#/>“ gefunden. Die Dauer des Verdau, welcher bei 37°C durchgeführt wurde, richtete sich nach der Arbeitsrate der verwendeten Enzyme.

Nach dem Verdau des Plasmids, wodurch eine Einlagerung des entsprechenden Inserts gewährleistet wird, wird zum oben genannten Reaktionsgemisch folgendes Reagenz hinzugegeben:

1 µl „Calf intestinal phosphatase“

Dieses Gemisch wurde wiederum 1h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.3. Gelelektrophorese

Zur Kontrolle, ob eine PCR oder ein Verdau erfolgreich war, wurde im Anschluss eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde hierbei ein 1% Agarose Gel, welchem zum Anfärben der Nukleinsäuren Ethidiumbromid zugegeben wurde, verwendet. Nachdem man die jeweiligen Nukleinsäureketten und den Marker für einen entsprechenden Zeitraum unter Spannung im Gel hat laufen lassen, wurden die Nukleinsäuren und der Marker mit UV-Licht dargestellt und das entstandene Bild mit der Kamera festgehalten.

2.2.1.4. Ligation

Für die Ligation wurde das „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Roche verwendet. Hierfür wurde jeweils das folgende Reaktionsgemisch angelegt:

1µl „backbone“ Plasmid

1µl „insert“ Plasmid

4µl „Dilution“ Puffer

10µl „Ligation“ Puffer

4µl PCR H₂O

1µl Ligase

Die Ligase wurde dabei immer als letztes Reagenz dem Gemisch zugeführt. Die Ligation wurde über Nacht auf Eis durchgeführt.

2.2.1.5. Transformation und Retransformation

Zur Durchführung einer Transformation wurde zunächst die entsprechende Menge Aliquots chemokompetenter Zellen in einem mit Eis gefüllten Gefäß langsam aufgetaut. Daraufhin wurde folgendes Reaktionsgemisch angelegt:

Transformation

50µl chemokompetente Zellen

2,5µl Ligationsprodukt

Retransformation

50µl chemokompetente Zellen

0,5µl Plasmid

Dieses Gemisch wurde anschließend 15min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 45 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt, woraufhin das Gemisch erneut für 2min in das mit Eis gefüllte Gefäß gestellt wurde. Anschließend wurde jedem Aliquot 450µl SOC Medium hinzugefügt und für 1h bei 37°C und 950rpm im Shaker inkubiert. Zuletzt wurden 200µl auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6. Plasmidpräparation (Mini Prep)

3ml LB Medium mit Ampicillin 100µg/ml wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden zur Herstellung eines Glycerolstocks 500µl der Lösung entnommen, mit 500µl 100% Glycerol gemischt und bei -20°C gelagert. Die restlichen 2,5ml wurden für 3min bei 3.500g zentrifugiert. Die weitere Plasmidpräparation wurde mit dem „NucleoSpin® Plasmid EasyPure“ Kit von Machery-Nagel durchgeführt, wobei an einigen Punkten von der Vorgehensweise des Kits abgewichen wurde:

In Schritt 2 wurde das Gemisch nicht gevortext, sondern es erfolgte nur ein Resuspendieren.

Beim vorletzten Zentrifugationsschritt wurde immer eine zweite Zentrifugation zur Elimination der Flüssigkeit aus der Säule durchgeführt.

Das Eluieren erfolgte immer mit 30µl doppelt-destilliertem Wasser.

2.2.1.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von „Microsynth Seqlab“ durchgeführt. Dafür wurde der Firma folgendes Reaktionsgemisch zum Sequenzieren geschickt:

1,5µg Plasmid

3µl Sequenzierprimer, sofern kein Primer von der Seqlab Standard Primer Liste genutzt werden konnte

Um ein Gesamtvolumen von 12µl, wenn der Primer noch von „Microsynth Seqlab“ hinzugefügt wird, oder von 15µl, wenn der Primer bereits vorher hinzugegeben wird, zu erreichen, wird das Gemisch mit der entsprechenden Menge doppelt-destilliertem-Wasser aufgefüllt

2.2.1.8. Plasmidpräparation (Midi Prep)

400ml LB Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden mit einer Bakterienkolonie oder 50µl von einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Die weitere Plasmidpräparation wurde mit dem „NucleoBond® Xtra Midi“ Kit von Machery-Nagel durchgeführt, wobei an einigen Punkten von der Vorgehensweise des Kits abgewichen wurde:

Zwischen den Schritten 7 und 8 wurde ein weiteres Mal für 15min bei 4600g zentrifugiert
Das Pellet wurde in 500µl doppelt-destilliertem-Wasser resuspendiert

2.2.2. Zellen splitten

Nach Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 1x Trypsin-EDTA in PBS zugegeben und bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich vollkommen von der Platte abgelöst hatten. Die resuspendierten Zellen wurden gesammelt, bei 150xg abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in neuem vollständigen Kulturmedium (45% DMEM, 45% F12-Medium, 9% FBS, 1% Insulin-Transferrin-Selen, Dexamethason) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und 500.000 Zellen in eine neue Kulturschale überführt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37°C kultiviert.

Für die langfristige Lagerung von Zellen, wurden die restlichen Zellen in vollständigem Aml12 Wachstumsmedium + 10% DMSO resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

2.2.3. Western Blot

2.2.3.1. Zellyse

Die im Medium gelösten Zellen wurden zur Formung eines Pellets 6min lang in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 2500g zentrifugiert und anschließend in je nach Größe des Pellets und der Menge an Western Blots, die durchzuführen waren, zwischen 150µl und 300µl RIPA Puffer gelöst. Daraufhin ließ man das Gemisch für 15min auf Eis inkubieren. Im Anschluss wurde das Gemisch für 30min in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 13000g zentrifugiert. Vom Überstand wurden je 60µl mit 20µl „Roti Load“ gemischt, um die entsprechenden Proben für den Western Blot zu erhalten. Sollte eine Verdünnung der Probe von Nöten gewesen sein, so wurde diese mit einem Gemisch aus $\frac{3}{4}$ Wasser und $\frac{1}{4}$ „Roti Load“ durchgeführt. Damit die Proben bereit waren, um im Western Blot geladen zu werden, wurden diese in einem letzten Schritt für 5min bei 95°C erhitzt.

2.2.3.2. Protein Assay

Gemäß dem Kit „DC Protein Assay“ wurden die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge in eine dafür vorgesehene Kammer hinzugegeben:

5µl Überstand der Lyse

25µl Reagenz A' (Hergestellt aus Reagenz A und Reagenz S in einem Verhältnis von 50:1)

200µl Reagenz B

Es wurden bei jedem Protein Assay jede Probe zweimal geladen und aus den darauf entstehenden zu ladenden Volumina in der späteren Berechnung ein Mittelwert gebildet. Dazu wurde zur Abgleichung der Werte der lysierten Proben eine Reihe von 5 Proben mit bekannten Proteinkonzentrationen (0; 0,2; 0,5; 1; 1,5) geladen.

2.2.3.3. Durchführung des Western Blots

Die Gele wurden mit den folgenden Reagenzien hergestellt, wobei sich die Mengenangaben auf die Herstellung eines Gels beziehen.

Gelektrophorese-Gel („running gel“)

2,4ml doppelt-destilliertes Wasser

1,5ml Unterer Tris-Puffer

2ml 30% Acrylamid

60µl 10% Natriumdodecylsulfat-Puffer

60µl 10% APS

4µl TEMED

Gel zum Einfüllen der Zelllysate in Geltaschen („stacking gel“)

1,1ml doppelt-destilliertes Wasser

190µl Oberer Tris-Puffer

200µl 30% Acrylamid

15µl 10% Natriumdodecylsulfat-Puffer

15µl 10% Ammoniumpersulfat

2,5µl TEMED

Zur Gewährleistung einer geraden Kante an der Obergrenze des Gels wurde auf das noch flüssige Gel 0,5ml Propanol hinzugegeben. Nach der Aushärtung wurde dieses wieder entfernt. Anschließend wurde das „stacking Gel“ in die Kammer gefüllt und je nach Anzahl der benötigten Proben ein Kamm mit 10 oder 15 Zähnen in das noch flüssige Gel eingeführt. Nach der Aushärtung beider Gele wurden diese in eine entsprechende Kammer eingeführt und der Zwischenraum mit „running buffer“ aufgefüllt. Das Einfüllen der Proben wurde in einem mittels „Protein Assay“ errechneten Verhältnis vorgenommen. Zusätzlich wurden entweder 4µl oder 8µl Marker oder 2µl RotiLoad in die noch freien Taschen gefüllt. Die nun angelegte Spannung belief sich auf 120V. Zur Vorbereitung der Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurden pro Gel zwei „Whatman Paper“ mit Transferpuffer befeuchtet und eine Membran zunächst mit Methanol aktiviert, dann mit Wasser abgespült und ebenfalls in Transferpuffer eingelegt. Für die Übertragung der Proben aus dem Gel auf die Membran wurde das Gel in einer Kammer mit Hilfe von Schwämmen an der Membran fixiert und in einer größeren Kammer fixiert. Dieser Kammer wurden sowohl Transferpuffer, als auch ein Eisblock zur Reduktion der Temperatur während des Blottens zugefügt. Das Blotten wurde schlussendlich bei 4°C Außentemperatur und bei einer Stromstärke von 400mA pro zu übertragendes Gel für 1h durchgeführt. Nach Entfernung der Membran aus der Kammer wurde es kurz in TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend 1h lang in TBS-T mit 5% Milchpulver unter ständigem Schwenken eingelegt. Es folgte ein erneutes Waschen mit TBS-T. Im Anschluss daran wurden die Membranen über Nacht bei 4°C Außentemperatur in den Primärantikörpern inkubiert. Es folgte ein dreimaliges über 10 Minuten andauerndes Waschen mit TBS-T, woraufhin die Membran 1h lang in den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert wurde. Daraufhin erfolgte wieder ein dreimalige über jeweils 10 Minuten andauerndes Waschen mit TBS-T. Anschließend wurde die komplette Membran mit einem 1:1 Gemisch aus „luminol enhancer“ und einer Peroxid Lösung benetzt. Das Luminol wurde bei Dunkelheit 5min auf den Membranen belassen. In einer Dunkelkammer färbten die lumineszierenden Membranen Fotopapiere, welche durch „Developer“ und „Fixer“ entwickelt wurden.

2.2.4. Soft Agar Assay

Aus Wasser und „noble Agar“ wurde eine 5% „noble Agar“ Lösung hergestellt, welche mit einem Druckkochtopf auf 350°C erhitzt wurde. Nach kurzem Abkühlen wurde diese

mit auf 45°C erhitztem Aml12 Medium zu einer 1% „noble Agar“ Lösung verdünnt. In jedes *well* einer sechs-*well*-Platte wurden 3ml der 1% „noble Agar“ Lösung gefüllt. Nach dem Abkühlen auf 37°C wurde die 1% „noble Agar“ Lösung mit einem Gemisch aus Zellen und Aml12 Zellmedium im Verhältnis 1:1 gemischt. In jedes *well* einer sechs-*well*-Platte wurden auf die ausgehärteten 3ml 1% „noble Agar“ Lösung nun 3ml der 0,5% „noble Agar“ Lösung hinzugegeben. Zuletzt wurden in jedes *well* 3ml des Aml12 Zellmediums hinzugegeben. Dies konnte je nach Experiment zusätzlich ER-Stressoren oder -Mediatoren beinhalten. Das Zellmedium wurde alle 5 Tage gewechselt.

2.2.5. Kristallviolett Assay

Zur Durchführung eines Kristallviolett Experiments wurden zunächst Zellen in sechs-*well*-Platten ausplattiert, in der man sie einen Tag anwachsen ließ. Am zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und je nach Experiment ER-Stress Modulatoren, ER-Stressoren oder eine Kombination aus beiden hinzugegeben. Um den Einfluss der Stressoren und Mediatoren auf das Zellwachstum optisch darzustellen wurden nach Ablauf des Experiments zunächst das Zellmedium entfernt und die Zellen für 1h mit 2ml 3,7% PFA in Wasser fixiert. Anschließend wurde zur Anfärbung der fixierten Zellen für 1h je 2ml 0,2% Kristallviolett in Wasser gegeben. Zur Entfernung des PFA und des Kristallvioletts wurde jeweils mit 2ml Wasser gewaschen.

2.2.6. Auswertung Soft Agar Assay und Kristallviolett Experiment

Da die Soft Agar Assays und die Kristallviolett Experimente in einer ähnlichen Weise ausgewertet wurden, werden sie hier unter einem Punkt zusammengefasst. Zunächst wurden von sämtlichen *wells*, in denen sich optional angefärbte Zellen oder der Agar mit Zellen befanden, Fotos aus einem definierten Abstand gemacht. Dabei wurde besonders bei den Soft Agar Assays darauf geachtet, dass der Fokus der Kamera auf Höhe der Zellen, also der mittleren Schicht des Soft Agar Assays liegt. Abgesehen davon, dass die digitale Auswertung beider Experimente mit dem Programm ImageJ 1.53a vorgenommen wurde, unterscheidet sie sich voneinander, weswegen sie in der Folge separiert voneinander beschrieben wird.

2.2.6.1 Auswertung des Soft Agar Assays

Mit diesem Programm wurde zunächst aus den Bildern ein Bereich ausgeschnitten, welcher nur den Agar miteinschloss. Im Folgenden wurde ein Bild angefertigt, welches

nur die Kolonien als schwarze Punkte darstellt. In einem letzten Schritt wurde erneut mithilfe des Programms ImageJ die Größe einer jeden Kolonie in Pixeln berechnet und in einer Excel Tabelle aufgelistet.

2.2.6.2 Auswertung des Kristallviolett Experiments

Zunächst wurden mit dem Programm die *wells* der sechs-*well*-Platten mit ihrer gesamten Fläche ausgeschnitten. Anschließend wurde mit dem Programm die Fläche berechnet, welche das gesamte *well* umfasst und welche bewachsen war. Die Größe der bewachsenen Fläche konnte berechnet werden, indem dem Programm vorgegeben wurde, eine bestimmte Intensität an violett-blauer Färbung als bewachsen anzusehen. Man entschied sich in diesem Fall, eine Farbsättigung des blauen Farbanteils von 60% als bewachsen anzusehen. Diese Einteilung bildete die optisch als bewachsen angesehene Fläche des *wells* am besten ab. Aus der Größe des gesamten *wells* und der Größe der bewachsenen Fläche konnte somit der Anteil der bewachsenen Fläche berechnet werden.

2.2.7.1 Statistische Tests

In dieser Arbeit wurden zur Berechnung der Signifikanz der einfaktorielle ANOVA Test und der T-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung und Charakterisierung der Aml12-Derivate

Zur Durchführung der geplanten Experimente wurden Aml12 Zellen verwendet. Bereits in Kapitel 1.2 wurde beschrieben, dass Aml12 Zellen humanen Leberzellen sowohl in ihrem Wachstumsverhalten als auch z.B. in der Produktion ihrer Proteine sehr ähnlich sind [7,8]. Allerdings sind sie in der Lage unter Kulturbedingungen über 100-mal gesplittet zu werden, wodurch es ermöglicht wird, ihr Wachstumsverhalten im Hinblick auf die Auswirkungen durch die Onkogene, die ER-Stress Modulatoren und die ER-Stress Induktoren zu untersuchen.

Bei der Produktion der einzelnen Zelllinien wurden Transgene durch Transduktion in die Aml12 Zellen eingebracht. Im Zuge dieses Verfahrens wurde über Viren genetisches Material mit den Veränderungen Akt^{Myr} und Myc^{OE} in die Zellen eingebracht und mittels Geneticin und Hygromycin selektioniert. Die Sequenzen der Backbones sind in 2.1.10.1. und 2.1.10.2. aufgeführt. In einem zweiten Schritt wurden die einfach infizierten Zelllinien mittels Transduktion erneut mit Viren infiziert, wobei es sich diesmal um das andere Onkogen handelte. Dadurch wurde die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} geschaffen. Durch diese Transduktionsprozesse ergaben sich insgesamt 4 unterschiedliche Zelllinien, welche in der Tabelle 3.1 aufgeführt sind.

Um nachzuweisen, dass es in den unterschiedlichen Zelllinien wirklich zu einer vermehrten Expression der eingebrachten Onkogene kommt, wurden Western Blots zum quantitativen Nachweis der einzelnen Onkogene durchgeführt. Beispielhafte Western Blots, welche die Überexpression der einzelnen Onkogene quantifizieren, sind in Abbildung 3.1.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Auflistung der verschiedenen Zelllinien und deren Kürzel.

Morphologie der Zelllinie	Name der Zelllinie, welcher in der Doktorarbeit verwendet wird
Aml12 Zellen	Aml12
Aml12 Zellen mit Akt ^{Myr}	Akt ^{Myr}
Aml12 Zellen mit Myc ^{OE}	Myc ^{OE}
Aml12 Zellen mit Myc ^{OE} und Akt ^{Myr}	Myc ^{OE} -Akt ^{Myr}

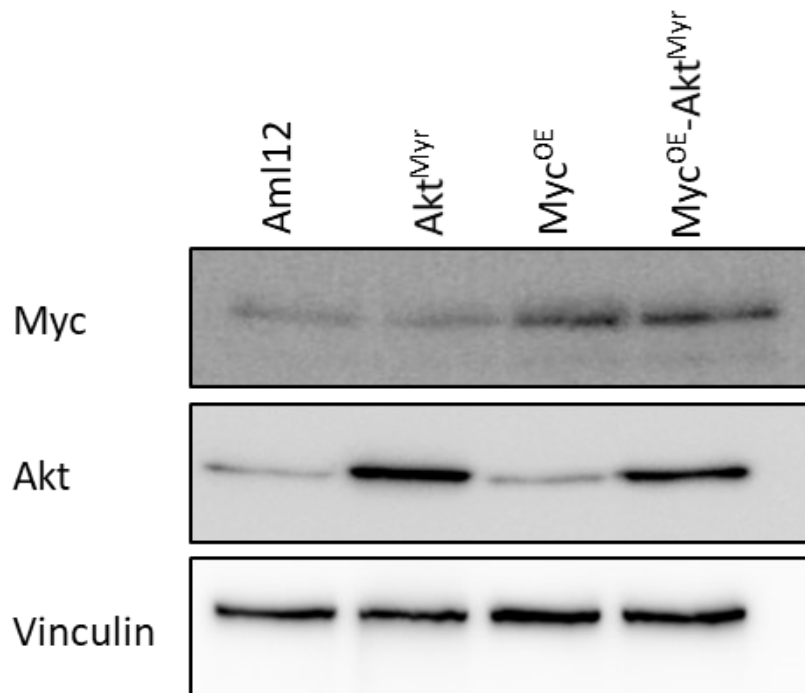


Abbildung 3.1.1: Repräsentativer Immunoblot der Expression der Onkogene in den Aml12-Derivaten. Aus den hier verwendeten Aml12-Derivaten in Kultur wurden Zelllysate hergestellt und mittels Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

3.2. Bestimmung der zellspezifischen Wachstumseigenschaften

Hierbei wurde untersucht, ob eine solitäre Hinzunahme eines der genannten Onkogene oder die Kombination beider Onkogene eine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu unveränderten Aml12 Zellen unter zweidimensionalen Bedingungen bewirkt.

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zellen zu vergleichen, wurde die Verdopplungszeit der Zellen nach der folgenden Formel berechnet:

Wachstumsrate (r):

$$r = \frac{\ln \left(\frac{N(t)}{N(0)} \right)}{t}$$

- $N(t)$ = Menge an Zellen zum Zeitpunkt t (48h)
- $N(0)$ = Menge an ausplattierten Zellen
- t = Zeit (48h)

Verdopplungszeit (T):

$$T = \frac{\ln(2)}{r}$$

Abbildung 3.2.1 zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit sämtlicher Zelllinien unter zweidimensionalen Bedingungen. Als Vergleichswert für die Wachstumsgeschwindigkeit sämtlicher Zelllinien ist hierbei die Wachstumsrate der unveränderten Aml12 Zellen anzusehen.

Die nativen Aml12 Zellen erreichen nach einer ausreichenden Anzahl von Wiederholungen insgesamt eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 16,8h.

Im Falle der Zelllinie Akt^{Myr} zeigt sich eine geringgradig verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber den nativen Aml12 Zellen. Die Verdopplungszeit der Akt^{Myr}-Zelllinie liegt im Durchschnitt bei 18,7h. Die Akt^{Myr}-Zelllinie benötigt somit für eine Verdopplung eine 1,1-fache längere Zeit als die native Aml12 Zelllinie. Dieser Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit ist nicht signifikant.

Im Falle der Zelllinie Myc^{OE} zeigt sich ebenfalls eine leicht verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit gegenüber den nativen Aml12 Zellen. Die Verdopplungszeit der Zelllinie Myc^{OE} liegt im Durchschnitt bei 16,9h. Die Verdopplungszeit der Zelllinie Myc^{OE} ist somit um das 1,01-fache gegenüber der nativen Aml12 Zelllinie verlängert. Auch hierbei handelt es sich um eine nicht signifikante Verlängerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Verglichen mit der Akt^{Myr} Zelllinie wächst die Zelllinie Myc^{OE} geringgradig schneller. Die Verdopplungszeit der Zelllinie Akt^{Myr} ist im Vergleich zur Zelllinie Myc^{OE} um das 1,1-fache verlängert.

Im Gegensatz zu den beiden vorher genannten Zelllinien ist die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} in der Lage, die Wachstumsgeschwindigkeit signifikant gegenüber nativen Aml12 Zellen zu beschleunigen. Das Signifikanzniveau liegt bei einem p-Wert von <0,05. Die

Verdopplungszeit der Zelllinie liegt bei 14,4h. Verglichen mit der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} weisen die nativen Aml12 Zellen eine 1,2-fach verlangsamte Verdopplungszeit auf. Auch gegenüber den Zelllinien Myc^{OE} und Akt^{Myr} weist die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} ein beschleunigtes Wachstum auf.

Wachstumsgeschwindigkeit in 2D-Kultur

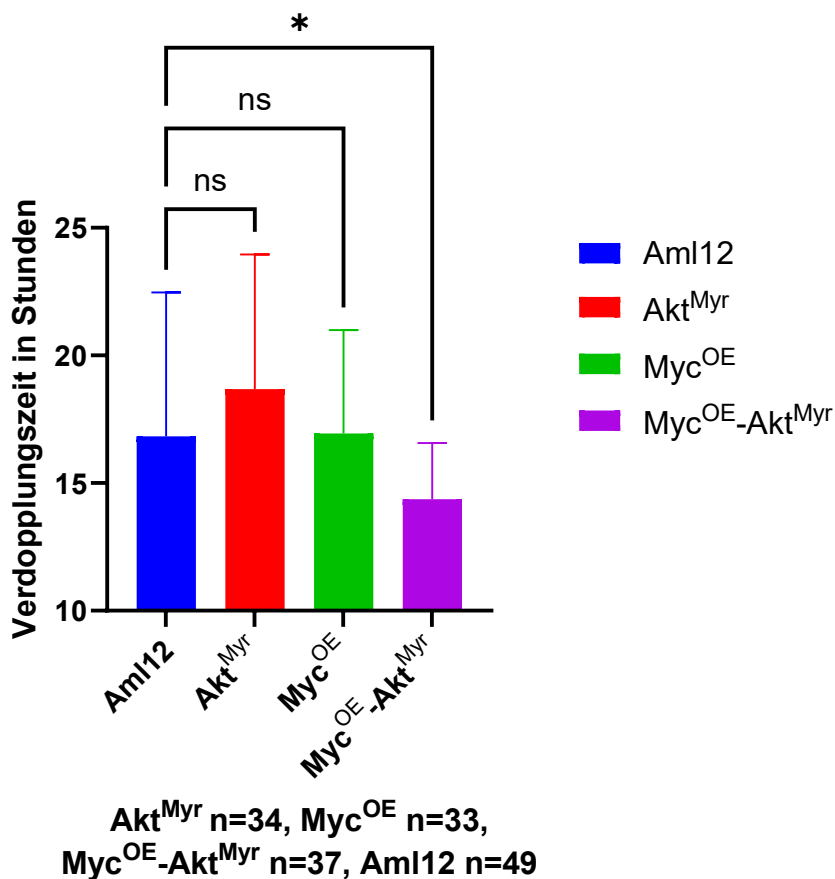


Abbildung 3.2.1: Die durchschnittliche Wachstumsrate aller Zelllinien unter zweidimensionalen Bedingungen. Nach jedem Splitten der einzelnen Zelllinien wurden ca. 400.000 Zellen in eine neue Kulturschale überführt. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, gezählt und erneut ca. 400.000 Zellen in eine neue Kulturschale überführt. Die Abbildung zeigt die Verdopplungszeit also die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien. * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Es zeigt sich somit zusammenfassend, dass lediglich die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} in der Lage ist die Verdopplungszeit im zweidimensionalen Medium signifikant gegenüber nativen Aml12 Zellen zu beschleunigen. Demgegenüber weisen die Zelllinien Myc^{OE} und Akt^{Myr} eine nicht signifikante, leicht verlangsamte Verdopplungszeit gegenüber nativen Aml12 Zellen auf.

Zusätzlich zur Untersuchung des Wachstums unter zweidimensionalen Bedingungen wurde mit der Durchführung diverser Soft Agar Assays ein Wachstum unter dreidimensionalen Bedingungen simuliert. Um die Ergebnisse dieser Experimente der vier Zelllinien in einer übersichtlichen Grafik darzustellen, wurden die angefärbten und vermessenen Kolonien zu Gruppen zusammengefasst. Diese Gruppen beziehen sich auf die Größe einer einzelnen Kolonie in Pixeln, welche gemäß meinen Voreinstellungen von dem Bildauswertungsprogramm ImageJ errechnet wurden. Diese Gruppen sind die folgenden: 50-100 Pixel, 100-200 Pixel und >200. Diese Gruppenverteilung wurde gewählt, um zum einen eine Übersichtlichkeit zu gewährleisten und zum anderen eine Aufteilung in kleine, mittlere und große Kolonien grafisch darzustellen.

Abbildung 3.2.2. zeigt beispielhaft das Auftreten der angefärbten Kolonien im Soft Agar Assay der verschiedenen Zelllinien. Unveränderte Aml12 Zellen geben wie auch bei der Analyse der Wachstumsgeschwindigkeit den Vergleichswert vor. Bereits hier fällt auf, dass die Zelllinie Myc^{OE} als einzige Zelllinie in der Lage ist, Kolonien in einer relevanten Anzahl zu bilden, welche mit dem bloßen Auge ohne Vergrößerung sichtbar sind. Die originalen Bilder der *Soft-Agar-Assays* werden in der Abbildung 6.1.1. dargestellt.

In der ersten Gruppe sind die nativen Aml12 Zelllinien im Durchschnitt in der Lage 1,33 Kolonien zu bilden, welche eine Mindestgröße von 50 Pixeln und eine maximale Größe von 100 Pixeln haben. Maximal schaffen es native Aml12 Zellen drei für diese Gruppe ausreichend große Kolonien zu bilden.

Ähnlich verhält es sich mit der Zelllinie Akt^{Myr}. Auch diese Zelllinie ist lediglich dazu in der Lage durchschnittlich, zwei Kolonien in der Größenordnung zwischen 50-100 Pixeln zu bilden. Damit bildet diese Zelllinie zwar durchschnittlich mehr entsprechend große Kolonien als die Kontrollgruppe, jedoch ist dieser Unterschied weder groß noch ist er signifikant. Diese Zelllinie ist in der Lage, 1,5-mal so viele Kolonien wie die native Aml12 Zelllinie zu bilden.

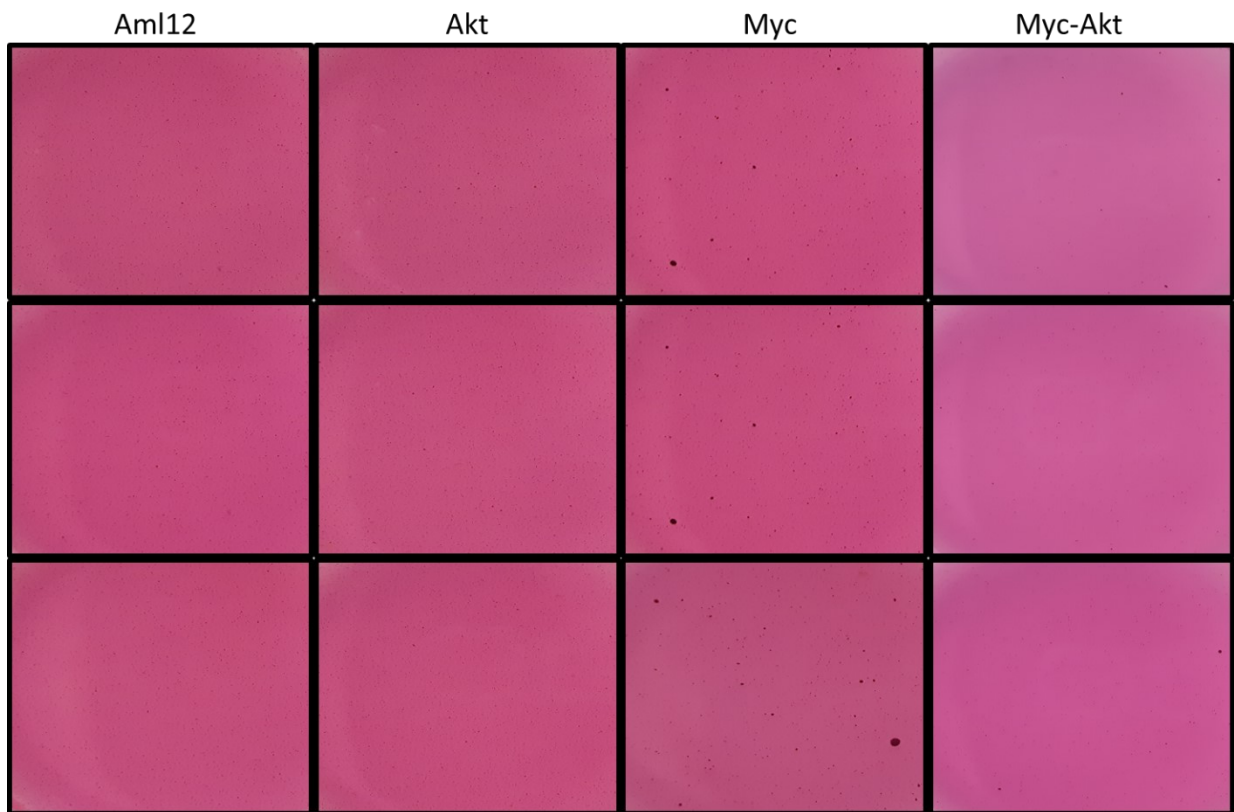


Abbildung 3.2.2: Repräsentative Abbildungen der angefärbten Kolonien in den Soft Agar Assays der verschiedenen Zelllinien. Die gewachsenen Kolonien wurden nach 15 Tagen Wachstumszeit angefärbt und fotografiert. Zur besseren Visualisierung wurden in diesem Bild die *wells* der „Six-well-Platten“ abgeschnitten.

Die Zelllinie Myc^{OE} andererseits bildet entsprechend große Kolonien in deutlich größerer Zahl. In der Gruppe 50-100 Pixel ist es dieser Zelllinie möglich, durchschnittlich 11,8 Kolonien pro *well* zu bilden. Dies ist gegenüber den nativen Aml12 Zellen eine Steigerung um das 8,9-fache. Diese Steigerung der Bildung von Kolonien ist auf eine Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ signifikant. Auch gegenüber der Zelllinie Akt^{Myr} bildet die Zelllinie im Durchschnitt das 5,9-fache an Kolonien.

Die Verbindung der beiden Onkogene Akt^{Myr} und Myc^{OE} in der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} setzt den von Myc^{OE} begonnenen Effekt der Bildung großer Kolonien nicht fort und reiht sich eher in der Größenordnung nativer Aml12 Zellen und der Zelllinie Akt^{Myr} ein. Diese Zelllinie ist in der Lage durchschnittlich, 2,3 Kolonien pro *well* zu bilden. Damit ist es

dieser Zelllinie zwar möglich, 1,7-mal so viele Kolonien wie die nativen Aml12 Zellen zu bilden, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant.

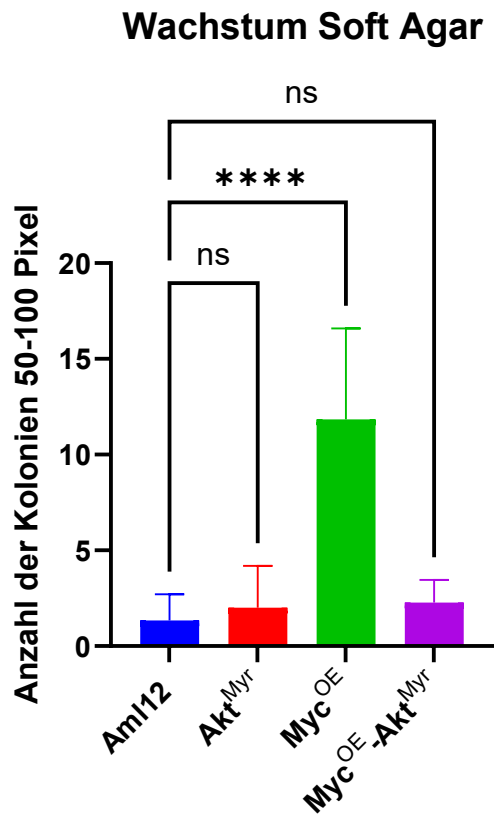


Abbildung 3.2.3: Die Anzahl und die Größe der Kolonien der jeweiligen Zelllinien geordnet in Gruppen zur besseren Visualisierung der Ergebnisse. In dieser Grafik sind die Kolonien einer Größe zwischen 50-100 Pixel dargestellt. Es wurde die gleiche Anzahl von Zellen jeder Zelllinien in ein Soft Agar Assay überführt und darin kultiviert. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Zellen angefärbt und das Bild der nun angefärbten Kolonien in eine digitale Form überführt. Ausgehend von diesem digitalen Bild konnten mit Hilfe des Programms ImageJ die Größe und Menge der Kolonien aufgelistet und mit anderen Zelllinien verglichen werden. (Aml12, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=12, Myc^{OE}, Akt^{Myr} n=6). * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

In der zweiten Gruppe werden die Kolonien einer Größe zwischen 100-200 Pixel ausgewertet. Die Abbildung 3.2.4. zeigt die entsprechende graphische Auswertung der Kolonien der eben genannten Größe.

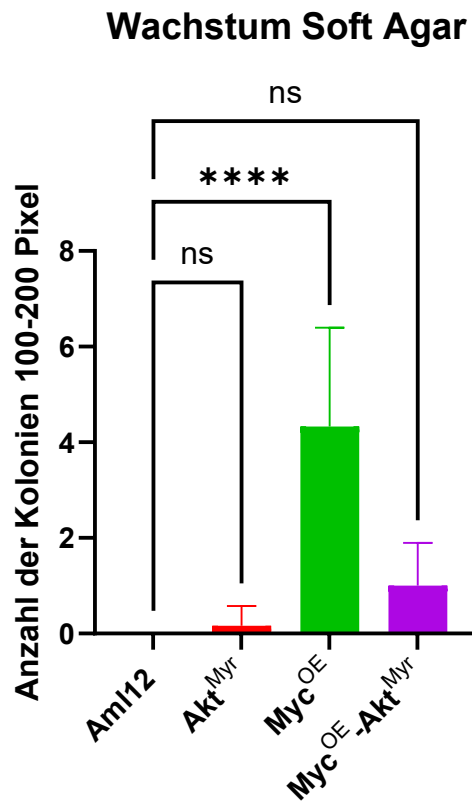


Abbildung 3.2.4: Die Anzahl und die Größe der Kolonien der jeweiligen Zelllinien geordnet in Gruppen zur besseren Visualisierung der Ergebnisse. In dieser Grafik sind die Kolonien einer Größe zwischen 100-200 Pixel dargestellt. Es wurde die gleiche Anzahl von Zellen jeder Zelllinien in ein Soft Agar Assay überführt und darin kultiviert. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Zellen angefärbt und das Bild der nun angefärbten Kolonien in eine digitale Form überführt. Ausgehend von diesem digitalen Bild konnten mit Hilfe des Programms ImageJ die Größe und Menge der Kolonien aufgelistet und mit anderen Zelllinien verglichen werden. (Aml12, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=12, Myc^{OE}, Akt^{Myr} n=6). * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Erneut fungiert die native Aml12 Zelllinie als die Kontrollgruppe. Es zeigt sich, dass Aml12 in keiner der Wiederholungen in der Lage ist, eine Kolonie in dieser Größenordnung zu bilden.

Wie auch in der Gruppe 50-100 Pixel bewegt sich die Menge der von Akt^{Myr} gebildeten Kolonien in der Größenordnung der Kontrollgruppe. Im Durchschnitt ist die Zelllinie Akt^{Myr} in der Lage, 0,17 Kolonien pro *well* zu bilden. Diese bedeutet, dass im Rahmen der sechs Wiederholungen lediglich einmal eine Kolonie dieser Größenordnung durch diese Zelllinie gebildet werden konnte.

Demgegenüber steht wieder die Zelllinie Myc^{OE}, welche deutlich mehr Kolonien einer Größe von 100-200 Pixel als die native Aml12 und Akt^{Myr} Zelllinie bildet. Diese Zelllinie ist in der Lage im Durchschnitt 4,3 Kolonien pro *well* in dieser Größenordnung zu bilden. Dies bedeutet, dass die Zelllinie Myc^{OE} 26-mal so viele Kolonien bilden kann, wie die Zelllinie Akt^{Myr}. Im Vergleich zur Kontrollgruppe Aml12 ist der Unterschied zur Myc^{OE} Zelllinie auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ signifikant.

In der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} ist der durch die Überexpression von Myc begonnene Effekt der Bildung von Kolonien bereits wieder deutlich rückläufig. Diese Zelllinie ist in der Lage im Durchschnitt lediglich eine Kolonie pro *well* zu bilden. Damit bildet sie zwar mehr Kolonien als die Kontrollzelllinie, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant.

In der dritten Gruppe werden die Kolonien einer Größe >200 Pixel behandelt. In der Abbildung 3.2.5. sind die Auswertungen dieser Gruppe graphisch dargestellt.

Die native Aml12 Zelllinie fungiert wieder als Kontrollgruppe. Diese ist in der Lage im Durchschnitt lediglich 0,08 Kolonien pro *well* zu bilden. In zwölf Wiederholungen bildete diese Zelllinie nur einmal eine Kolonie einer Größe von >200 Pixeln.

Die Zelllinie Akt^{Myr} schafft es nicht, eine Kolonie dieser Größe zu bilden.

Wieder bildet die Zelllinie Myc^{OE} einen deutlichen Unterschied zu den vorher genannten Zelllinien. Diese Zelllinie ist in der Lage im Durchschnitt 1,83 Kolonien pro *well* zu bilden. Sie bildet somit 22-mal mehr Kolonien in dieser Größenordnung als native Aml12 Zellen. Dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ signifikant.

Wachstum Soft Agar

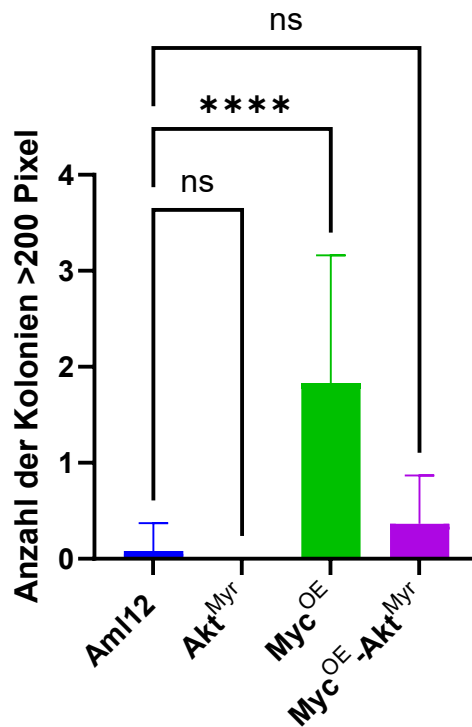


Abbildung 3.2.5: Die Anzahl und die Größe der Kolonien der jeweiligen Zelllinien geordnet in Gruppen zur besseren Visualisierung der Ergebnisse. In dieser Grafik sind die Kolonien einer Größe >200 Pixel dargestellt. Es wurde die gleiche Anzahl von Zellen jeder Zelllinien in ein Soft Agar Assay überführt und darin kultiviert. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Zellen angefärbt und das Bild der nun angefärbten Kolonien in eine digitale Form überführt. Ausgehend von diesem digitalen Bild konnten mit Hilfe des Programms ImageJ die Größe und Menge der Kolonien aufgelistet und mit anderen Zelllinien verglichen werden. (Aml12, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=12, Myc^{OE}, Akt^{Myr} n=6). * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} bildet erneut deutlich weniger Kolonien als die alleinige Überexpression von Myc. Die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} ist lediglich in der Lage, im Durchschnitt 0,36 Kolonien pro *well* zu bilden. Dadurch bildet sie zwar wie in der Gruppe

100-200 Pixel erneut mehr Kolonien als die native Aml12 Zelllinie, jedoch ist dieser Unterschied erneut nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigt sich, dass lediglich die Zelllinie Myc^{OE} in der Lage ist, im Vergleich zu den anderen Zelllinien signifikant mehr Kolonien zu bilden. Die Zelllinie Akt^{Myr} hebt sich in keiner der ausgewerteten Gruppen signifikant von der Kontrollgruppe ab. Die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} wiederum ordnet sich eher in der Größenordnung der Kontrollgruppe und der Zelllinie Akt^{Myr} ein. Die Möglichkeit vermehrt große Kolonien zu bilden, welcher durch die Überexpression von Myc begonnen wurde, wird durch die zusätzliche Expression von Akt^{Myr} wieder inhibiert.

3.3. Resistenz gegenüber ER-Stress

In einem weiteren Experiment soll untersucht werden, ob die veränderten Zelllinien eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber ER-Stress besitzen als die unveränderten Aml12 Zellen. Um in den einzelnen Zellen ER-Stress auszulösen, wurden sie mit Tunicamycin behandelt. Die Behandlung sämtlicher Zelllinien erfolgte mit 125µg/l und 250µg/l Tunicamycin. Da Tunicamycin in DMSO gelöst wurde, wurden die Zellen zur Kontrolle mit 0,1% DMSO behandelt. Diese unterschiedlichen Konzentrationen sollten offenlegen, ob es Unterschiede in der Resistenz gegenüber ER-Stress bei unterschiedlichen Tunicamycin Konzentrationen zwischen den Zelllinien gibt.

In der Abbildung 3.3.1. ist das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zelllinien gemäß dem oben genannten Schema unter dem Einfluss einer 0,1% DMSO-Lösung repräsentativ dargestellt. Sämtliche Zelllinien sind in der Lage, nach einer entsprechenden Wachstumszeit das komplette *well* einer sechs-*well*-Platte auszufüllen.

Die Behandlung der Zelllinien im Falle von Tunicamycin wurde mit einer 1:2 Verdünnungsreihe ausgehend von der maximalen oben genannten Konzentration von 250µg/l durchgeführt. Daraus ergeben sich zusätzlich zu den oben genannten Konzentrationen noch Behandlungen mit 62,5µg/l und 31,25µg/l. Da sich unter diesen Konzentrationen allerdings keine relevanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zelllinien ergaben, sind die Bilder der bewachsenen *wells* lediglich unter der Abbildung 6.3.1. dargestellt.

In der darauffolgenden Gruppe wurden die Zelllinien mit dem ER-Stressor Tunicamycin behandelt. Es wurde dabei eine Konzentration von 125µg/l Tunicamycin verwendet.

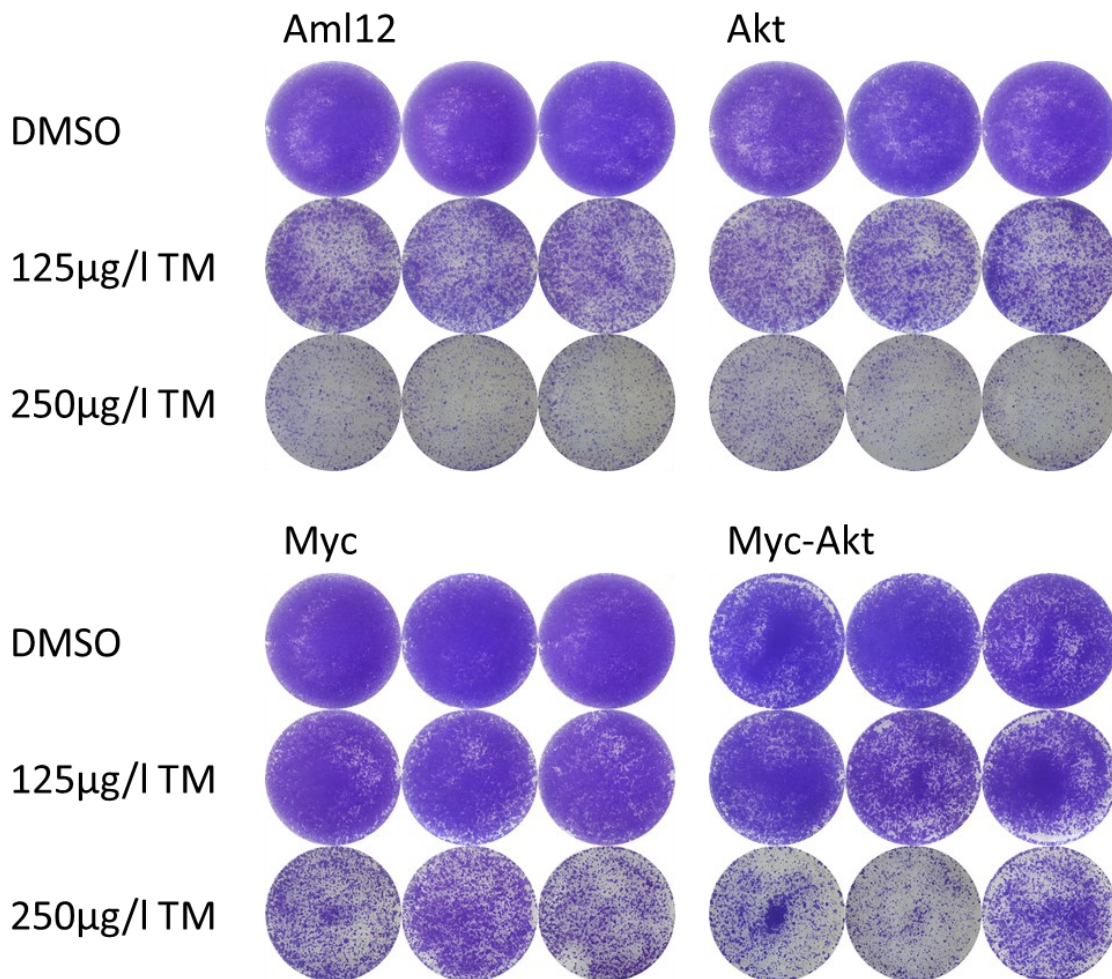


Abbildung 3.3.1.: Repräsentative Abbildung der Kristallviolett-Experimente zur Visualisierung der Auswirkung des ER-Stressors Tunicamycin auf das Wachstum der verschiedenen Zelllinien. In dieser Abbildung wurden die Zelllinien mit einer Dosierung DMSO von 0,1% behandelt, welche aufgrund der Lösung von Tunicamycin in DMSO auch in den folgenden Experimenten angewendet wird. Zusätzlich zeigt die Abbildung die Behandlung mit dem ER-Stressor Tunicamycin in den aufsteigenden Dosierungen 125µg/l und 250µg/l. Aml12 n=8; Myc^{OE}, Akt^{Myr}, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=4.

Unter dieser Konzentration zeigt sich bei nativen Aml12 Zellen bereits eine deutliche Auswirkung des induzierten ER-Stresses. In der Abbildung 3.3.1. zeigt sich, dass der Zellrasen, der durch diese Zelllinie gebildet wird, deutlich lichter erscheint als in der

Kontrolle mit DMSO. In der exakten Auswertung der bewachsenen Fläche, welche in der Abbildung 3.3.2. dargestellt ist, zeigt sich, dass diese Zelllinie unter dem Einfluss von 125µg/l Tunicamycin nur noch in der Lage ist, im Durchschnitt 71% der Fläche eines *wells* zu bewachsen.

Auch die Zelllinie Akt^{Myr} zeigt bereits makroskopisch sichtbare Unterschiede zur Kontrollgruppe unter der Behandlung mit 125µg/l Tunicamycin. Die Fläche erscheint in der Abbildung 3.3.1. ähnlich wie bei den nativen Aml12 Zellen nicht mehr komplett bewachsen. Durchschnittlich ist es dieser Zelllinie möglich, unter dem Einfluss von 125µg/l Tunicamycin 72% der Fläche eines *wells* zu bewachsen. Die durch die Akt^{Myr} Zelllinie bewachsene Fläche ist im Durchschnitt lediglich um das 1,01-fache größer als die der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Die Zelllinie Myc^{OE} weist unter dem Einfluss von 125µg/l Tunicamycin ein ähnliches Bild auf wie unter den Kontrollbedingungen. Wie unter der Behandlung mit DMSO imponiert auch in diesem Fall das *well* als komplett bewachsen. Im Durchschnitt ist diese Zelllinie in der Lage 98,4% des *well* zu bewachsen. Die bewachsene Fläche ist damit um das 1,38-fache höher als die der nativen Aml12 Zelllinie. Dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ signifikant.

Die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} reiht sich in eine ähnliche Größenordnung wie die eben genannte Myc^{OE} Zelllinie ein. Auch diese Zelllinie weist optisch kaum einen Unterschied zwischen der Behandlung mit 125µg/l Tunicamycin und der Kontrolle mit DMSO auf. Durchschnittlich ist es dieser Zelllinie möglich, 95% der Fläche eines *wells* zu bewachsen. Damit liegt die bewachsene Fläche um das 1,33-fache höher als die der nativen Aml12 Zelllinie. Auch dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ signifikant.

Resistenz gegen 125µg/l Tunicamycin

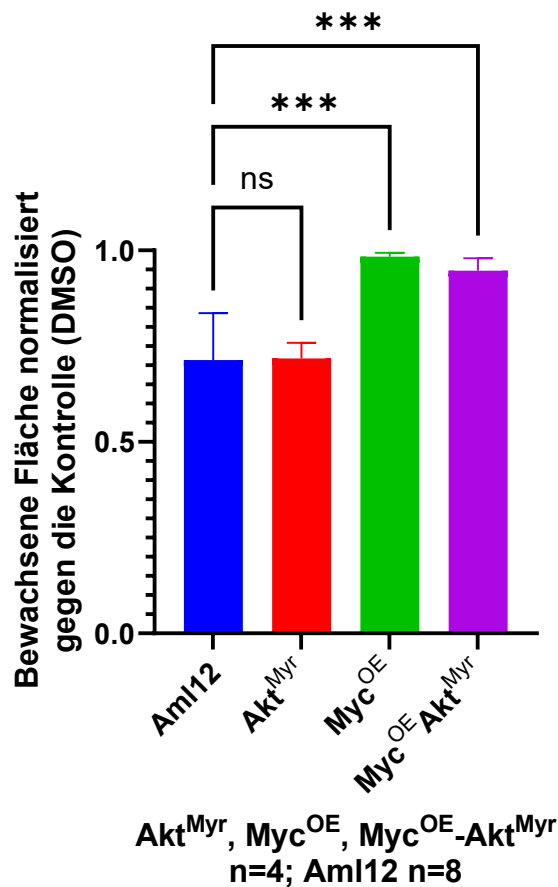


Abbildung 3.3.2. Durchschnittlich bewachsene Fläche eines *wells* nach der Behandlung mit 125µg/l Tunicamycin und der durchschnittlich bewachsenen Fläche eines *wells* nach der Behandlung mit 0,1% DMSO (Akt^{Myr}, Myc^{OE}, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=4, Aml12 n=8). Ähnlich in 3.4.1. wurde eine bestimmte Anzahl an Zellen in *wells* einer sechs-*well*-Platte ausplattiert, kultiviert, nach einiger Zeit die bewachsene Fläche angefärbt und der Anteil der bewachsenen Fläche mit dem der anderen Zelllinien verglichen. Diesmal erfolgte das Wachstum der Zelllinien allerdings unter 125µg/l Tunicamycin. Aml12 n=8; Akt^{Myr}, Myc^{OE}, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=4. * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

In der letzten Gruppe wurden die Zellen der verschiedenen Zelllinien mit einer Tunicamycin Konzentration von 250µg/l behandelt.

Resistenz gegen 250µg/l Tunicamycin

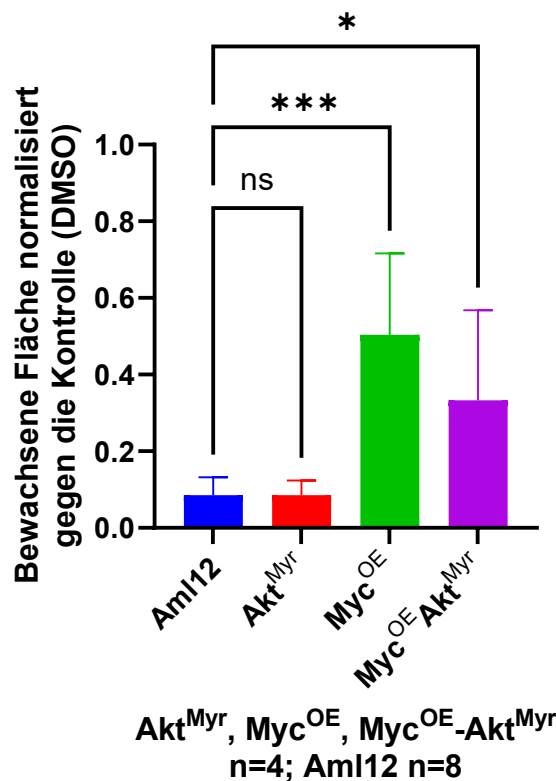


Abbildung 3.3.3.: Durchschnittlich bewachsene Fläche eines *wells* nach der Behandlung mit 250µg/l Tunicamycin und der durchschnittlich bewachsenen Fläche eines *wells* nach der Behandlung mit 0,1% DMSO (Akt^{Myr}, Myc^{OE}, Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=4, Aml12 n=8). Ähnlich in 3.4.1. wurde eine bestimmte Anzahl an Zellen in *wells* einer sechs-*well*-Platte ausplattiert, kultiviert, nach einiger Zeit die bewachsene Fläche angefärbt und der Anteil der bewachsenen Fläche mit dem der anderen Zelllinien verglichen. Diesmal erfolgte das Wachstum der Zelllinien allerdings unter 250µg/l Tunicamycin. * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) **** (p<0,0001).

Im Falle der nativen Aml12 Zelllinie konnten nach Ablauf der Behandlung mit der genannten Konzentration an Tunicamycin kaum Zellen angefärbt werden. Diese Visualisierung ist in der Abbildung 3.3.1. dargestellt. Durchschnittlich ist diese Zelllinie noch in der Lage, 8,6% der Fläche eines *wells* zu bewachsen. Die entsprechende Grafik ist in der Abbildung 3.3.3. abgebildet.

Erneut weist die Akt^{Myr} Zelllinie eine ähnlich hohe Resistenz gegenüber Tunicamycin-induziertem ER-Stress wie die native Aml12 Zelllinie auf. Rein optisch zeigt sich, dass unter dieser Konzentration kaum noch vitale Zellen vorhanden sind. Dieser Zelllinie ist es durchschnittlich lediglich möglich, 8,6% der Fläche eines *wells* zu bewachsen. Die bewachsene Fläche ist damit fast identisch zur Kontrollgruppe und weist keinen signifikanten Unterschied auf.

Die Myc^{OE} Zelllinie wiederum ist auch unter dieser Konzentration in der Lage, rein optisch einen relevanten Anteil des *wells* zu bewachsen. Im Durchschnitt schafft es diese Zelllinie, 50% eines *wells* zu bewachsen. Diese Zelllinie kann somit eine 5,9-mal so große Fläche bewachsen wie die native Aml12 Zelllinie. Dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ signifikant.

Auch im Falle der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} zeigt sich rein optisch ein deutlicher Unterschied in der bewachsenen Fläche zur Aml12 und zur Akt^{Myr} Zelllinie. Durchschnittlich erreicht diese Zelllinie eine bewachsene Fläche von 33% eines *wells*. Diese Zelllinie ist damit in der Lage, eine 3,9-mal so große Fläche wie die native Aml12 Zelllinie zu bewachsen. Dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ signifikant.

Zusammenfassend zeigt sich in der Resistenz gegenüber Tunicamycin-induziertem ER-Stress kein großer Unterschied zwischen der nativen Aml12 Zelllinie und der Akt^{Myr} Zelllinie. Demgegenüber stehen die Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr}, welche beide deutlich resistenter imponieren. Zusätzlich scheint es so, dass der Zugewinn an Resistenz gegenüber ER-Stress, welche durch die Überexpression von Myc erreicht wird, in der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} durch die Hinzunahme einer Myristoylierung von Akt im Vergleich zur alleinigen Überexpression von Myc wieder rückläufig ist.

In der Abbildung 3.3.4. sind die Expressionen relevanter ER-Stress Proteine in den einzelnen Zelllinien dargestellt. Auf der linken Seite sind die Zelllinien unter Kontrollbedingungen und auf der rechten Seite unter dem Einfluss von 100µg/l Tunicamycin abgebildet. Diese Konzentration an Tunicamycin sollte zu einer Induktion an ER-Stress, aber zu keinen massiven Unterschieden im Wachstum der verschiedenen Zelllinien führen.

Das erste von uns beobachtete Protein der ER-Stress Kaskade ist BiP. Dieses Chaperon sorgt für die korrekte Faltung fehlgefalteter Proteine. Unter den Kontrollbedingungen sehen wir im Vergleich zu der Behandlung mit Tunicamycin keine Erhöhung der Expression an BiP in einer der Zelllinien. Unter gestressten Bedingungen wird die Expression von BiP in den nativen Aml12 Zellen und der Zelllinie Akt^{Myr} gegenüber den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} noch stärker induziert. In den Kontrollbedingungen zeigt sich keine ausgeprägte Expression des Proteins.

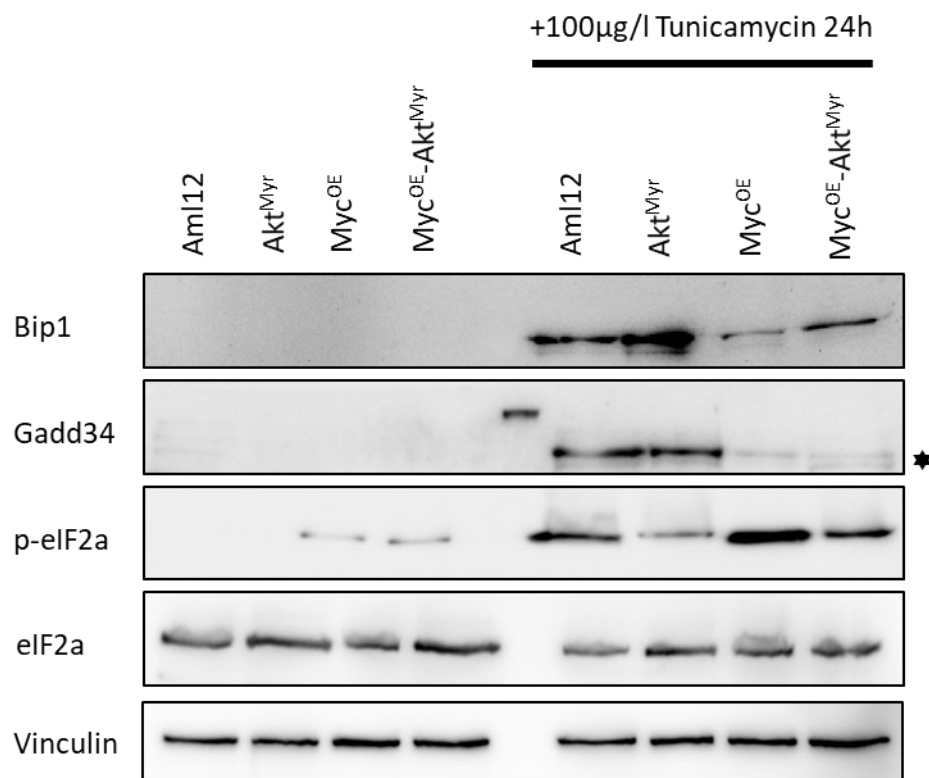


Abbildung 3.3.4.: Repräsentativer Immunoblot durch Darstellung der Expression einiger bekannter Proteine der ER-Stress Kaskade in den verschiedenen Zelllinien unter Kontrollbedingungen und nach der Behandlung mit 100 µg/l Tunicamycin.

Gemäß der in der Einleitung dargestellten ER-Stress Kaskade könnte man bei einer vermehrten Expression von BiP auch von einer vermehrten Aktivierung der ER-Stress Kaskade ausgehen. Dies wiederum müsste in den Zelllinien der nativen Aml12 Zellen und der Zelllinie Akt^{Myr} zu einem vermehrten Vorkommen von p-eIF2α gegenüber den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} führen. Es zeigt sich allerdings, dass es zu einer

vermehrten Phosphorylierung von EIF2 α in den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} kommt. Vor allem in der Zelllinie Myc^{OE} zeigt sich ein vermehrtes Auftreten von p-EIF2 α gegenüber nativen Aml12 Zellen. Auch unter den Kontrollbedingungen mit DMSO Behandlung zeigt sich bereits in den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} eine vermehrte EIF2 α Phosphorylierung. Eine unterschiedliche Expression an EIF2 α zeigt sich weder unter den Kontrollbedingungen noch unter der Behandlung mit Tunicamycin.

In der Folge einer vermehrten p-EIF2 α Produktion müsste es durch das Fortlaufen der ER-Stress Kaskade in eben diesen Zelllinien auch zu einer vermehrten Expression von GADD34 kommen. Die Expression von GADD34 unter gestressten Bedingungen entspricht allerdings ziemlich dem Expressionsmuster von BiP in den verschiedenen Zelllinien. Auch bei diesem Protein zeigt sich eine Überexpression in den nativen Aml12 Zellen und der Zelllinie Akt^{Myr} gegenüber den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr}. Unter den Kontrollbedingungen lässt sich kein Unterschied in der Expression ausmachen.

Als Kontrolle der richtigen Ladung der Gesamtproteinmenge fungierte in diesem Fall das Protein Vinculin.

Fasst man die Expression von BiP und Gadd34 zusammen, zeigt sich, dass die native Aml12 Zelllinie und die Zelllinie Akt^{Myr} unter der Behandlung mit Tunicamycin eine vermehrte Aktivierung der ER-Stress Kaskade zeigen. Dies könnte erklären warum diese Zelllinien sensibler auf eine Behandlung mit Tunicamycin reagieren. Demgegenüber steht eine erhöhte Expression von p-EIF2 α in den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr}. Interessant ist, dass sich diese vermehrte Expression bereits unter den Kontrollbedingungen zeigt. Man könnte somit schlussfolgern, dass die Zelllinien bereits unter den Kontrollbedingungen einem gewissen Maß an ER-Stress ausgesetzt sind. Dies könnte zu einer besseren Adaption an chronischen ER-Stress durch z.B. eine Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums und somit zu einer vermehrten Resistenz gegenüber Tunicamycin-induziertem ER-Stress führen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre allerdings, dass eine der anderen möglichen Kinasen zu einer vermehrten Bildung von p-EIF2 α beiträgt. Daraus könnte man allerdings wiederum folgern, dass auf Grundlage der verminderten Expression von BiP und Gadd34 in den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} deutlich weniger ER-Stress durch Tunicamycin induziert wird und

diese somit unter gestressten Bedingungen besser wachsen können als die anderen beiden Zelllinien.

3.4. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens der Zelllinien unter zweidimensionalen Bedingungen durch Salubrinal unter normalen und gestressten Bedingungen

In dem folgenden Experiment wurden die Zellen sämtlicher Zelllinien über einen Zeitraum von sechs Tagen mit 10mM Salubrinal, behandelt. Da Salubrinal in DMSO gelöst ist, wurde eine Kontrollbehandlung mit 0,1% DMSO durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4.1. dargestellt. Es werden bei der Auswertung die unter der Einwirkung von Salubrinal bewachsene mit der unter Kontrollbedingungen bewachsenen Fläche einer jeden Zelllinie in ein Verhältnis gesetzt, um die Auswirkungen der Behandlung mit Salubrinal quantifizieren zu können. Die Auswirkungen auf die entsprechenden Zelllinien sind bildlich in der Abbildung 6.2.1. dargestellt.

Die Angabe der p-Werte in diesem Experiment bezieht sich auf die Signifikanz der Reduktion des Verhältnisses der bewachsenen Fläche zwischen der Behandlung mit Salubrinal und der Kontrolle mit DMSO im Vergleich zwischen unveränderten Aml12 Zellen und der jeweiligen Zelllinie. Um das Verständnis der Berechnung des p-Wertes zu vereinfachen sind in den folgenden Zeilen die notwendigen Formeln dafür aufgeführt.

Die nativen Aml12 Zellen schaffen es in einem Zeitraum von 6 Tagen unter der Behandlung von Salubrinal 28,5% der Fläche zu bewachsen, die sie unter der Kontrolle mit DMSO bewachsen haben.

Die Zelllinie Akt^{Myr} reiht sich in einer ähnlichen Größenordnung wie die nativen Aml12 Zelllinie ein. Diese Zelllinie ist im Durchschnitt in der Lage unter der Behandlung mit Salubrinal 32,4% der Fläche zu bewachsen, die sie unter der Kontrolle mit DMSO bewachsen haben. Dies bedeutet, das Verhältnis aus bewachsener Fläche unter der Behandlung mit Salubrinal gegenüber der Kontrolle mit DMSO liegt in der Akt^{Myr} Zelllinie lediglich 1,13-mal so hoch wie in der Kontrollgruppe mit nativen Aml12 Zellen. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Behandlung mit 10mM Salubrinal

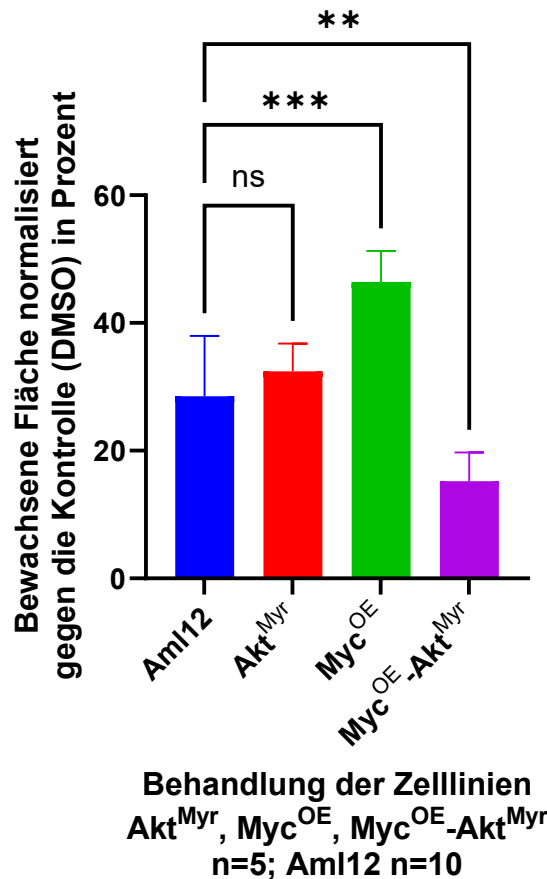


Abbildung 3.4.1.: Durchschnittliches Verhältnis zwischen der bewachsenen Fläche eines *wells* mit 10mM Salubrinal und 0,1% DMSO (sämtliche Zelllinien n=5). Es wurden 2.000 Zellen in *wells* einer sechs-*well*-Platte ausplattiert, kultiviert, nach sechs Tagen angefärbt und der Anteil der bewachsenen Fläche mit dem der anderen Zelllinien verglichen. Die Zellen wurden in der Kontrolle mit 0,1% DMSO behandelt. Die Behandlung im Experiment erfolgt mit 10mM Salubrinal welches in DMSO gelöst war. Die DMSO-Konzentration im Experiment entsprach analog zur Kontrolle 0,1%. Die bewachsene Fläche der Zelllinien, welche unter 10mM Salubrinal bewachsen wurde, mit der bewachsenen Fläche dieser Zelllinie, welche unter 0,1% DMSO bewachsen wurde ins Verhältnis gesetzt. * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Im Falle der Zelllinie Myc^{OE} zeigt sich ein deutlicherer Unterschied gegenüber der nativen Aml12 Zelllinie. Diese Zelllinie schafft es im Durchschnitt unter der Behandlung mit Salubrinal 46,4% der Fläche zu bewachsen, die sie unter der Kontrolle mit DMSO bewachsen hat. Gegenüber nativen Aml12 Zellen steigern sie somit das Verhältnis aus Behandlung zur Kontrolle um das 1,63-fache. Dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ signifikant.

Auch Myc^{OE}-Akt^{Myr} Zelllinie weist einen deutlichen Unterschied in der Sensitivität gegenüber Salubrinal im Vergleich zur nativen Aml12 Zelllinie auf. Die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} ist in der Lage durchschnittlich unter der Behandlung von Salubrinal 15,2% der Fläche zu bewachsen, die sie unter der Kontrolle mit DMSO bewachsen haben. Daraus ergibt sich, dass das Verhältnis aus bewachsener Fläche unter Salubrinal zur Kontrolle in dieser Zelllinie lediglich bei der Hälfte im Vergleich zur nativen Aml12 Zelllinie liegt. Dieser Unterschied ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ signifikant.

Zusammenfassend weisen die Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} keinen signifikanten Unterschied in ihrer Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Salubrinal auf. Die Zelllinie Myc^{OE} hingegen weist eine signifikant höhere Resistenz gegenüber der Behandlung mit Salubrinal auf. Unter der Hinzunahme von Akt^{Myr} zeigt sich in der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} eine signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Salubrinal im Vergleich zur nativen Aml12 Zelllinie. Die höhere Resistenz der Myc^{OE} Zelllinie wird somit nicht nur nivelliert, sondern durch die Hinzunahme des zweiten Onkogens sogar in eine erhöhte Sensitivität umgekehrt.

3.5. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens der Zelllinien unter dreidimensionalen Bedingungen durch Salubrinal

Im folgenden Experiment wurden die Zellen im Soft Agar mit dem ER-Stress Modulator Salubrinal behandelt. Da Salubrinal in DMSO gelöst ist, fungiert eine Behandlung mit 0,1% DMSO als Kontrolle. Die Zellen wurden über einen definierten Zeitraum mit den Substanzen behandelt, angefärbt und anschließend die Fotografien ausgewertet. Die Auswertung ist grafisch in der Abbildung 3.5.1. dargestellt. Die entsprechenden Bilder des Wachstums der Kolonien im Soft Agar unter der Behandlung mit Salubrinal sind in der Abbildung 6.1.2. abgebildet.

Die native Aml12 Zelllinie bildet wie bereits im Abschnitt 3.2 gezeigt kaum Kolonien im Soft Agar. Im Durchschnitt ist diese Kolonie in der Lage 1,42 Kolonien >50 Pixel pro *well* zu bilden. Unter der Behandlung mit Salubrinal reduziert sich die gebildete Anzahl auf 0,17 Kolonien pro *well*. Diese Reduktion ist nicht signifikant.

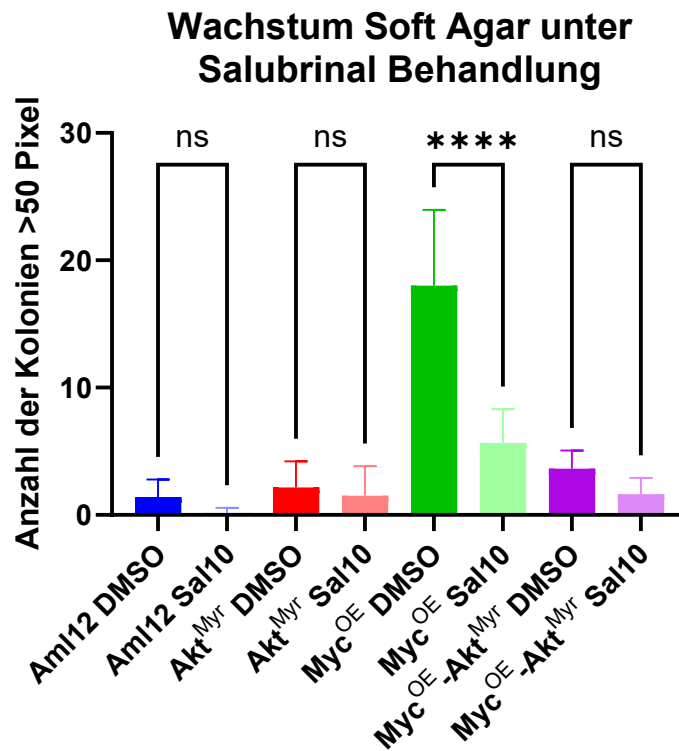


Abbildung 3.5.1.: Darstellung der Anzahl der Kolonien mit einer Größe >50 Pixel unter Kontrollbedingungen mit 0,1% DMSO (z.B. Aml12 DMSO) im Vergleich zur Behandlung mit 10mM Salubrinal (z.B. Aml12 Sal10). Die Zellen wurden während ihres Wachstums im Soft Agar optional mit der DMSO-Kontrolle oder Salubrinal behandelt. Nach einem Wachstum von 15 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien angefärbt und ausgewertet. Aml12 n=12; Myc^{OE}-Akt^{Myr} n=11; Myc^{OE}, Akt^{Myr} n=6. * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001).

Die Zelllinie Akt^{Myr} schafft es ähnlich wie die native Aml12 Zelllinie kaum, Kolonien >50 Pixel zu bilden. Auch diese Zelllinie ist im Durchschnitt lediglich dazu in der Lage

2,17 Kolonien pro *well* zu bilden. Unter der Hinzunahme von Salubrinal sinkt diese Menge auf 1,5 Kolonien pro *well*. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Wie bereits in Abschnitt 3.2 gezeigt ist die Zelllinie Myc^{OE} die einzige Zelllinie, welche es schafft in ausgeprägterem Maße große Kolonien zu bilden. Unter den Kontrollbedingungen mit DMSO bildet diese Zelllinie durchschnittlich 18 Kolonien pro *well*. Unter der Behandlung mit Salubrinal ist diese Menge auf einen Wert von 5,67 Kolonien pro *well* rückläufig. Diese Reduktion ist auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ signifikant.

Die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} wiederum reiht sich erneut eher in der Größenordnung der nativen Aml12 Zelllinie und der Zelllinie Akt^{Myr} ein. Diese Zelllinie bildet im Durchschnitt 3,64 Kolonien pro *well* unter der Behandlung mit DMSO. Im Falle der Behandlung mit Salubrinal reduziert sich die Anzahl der Kolonien pro *well* auf 1,64 Kolonien. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Zusammenfassend sorgt die Behandlung von Salubrinal lediglich bei der Zelllinie Myc^{OE} für eine signifikante Reduktion der Anzahl der Kolonien. Man muss allerdings erwähnen, dass diese Zelllinie als einzige in der Lage war, große Kolonien in einem ausreichenden Maß zu bilden, und dadurch die Aussagekraft gegenüber den anderen Zelllinien eingeschränkt ist.

4. Diskussion

4.1. Generierung der Aml12-Derivate

Jedes Jahr erkranken in Deutschland ca. 6.000 Menschen neu an einem HCC. Das mediane Überleben der Patienten variiert je nach Altersgruppe zwischen 13 Monaten für unter 60-jährige und 8 Monaten für über 75-jährige. Auch die etablierten Therapieoptionen wie z.B. Sorafenib oder Atezolizumab und Bevacizumab zeigen im Durchschnitt lediglich ein progressfreies Überleben von ca. 4,9 Monaten beziehungsweise 6,8 Monaten [100]. Zum besseren Verständnis der Vielfältigkeit des HCC im Sinne der personalisierten Medizin wurde diese Arbeit durchgeführt.

Als Grundlage aller folgenden Experimente fungierte die Generierung der unterschiedlichen Zelllinien. Die Wahl der für die Experimente geeigneten Zelllinie fiel auf die Aml12 Zelllinie. Diese Zelllinie bildet einen leberähnlichen Phänotyp und ist in der Lage, ausreichend lange in Kultur gehalten zu werden, um Experimente durchzuführen. Dies erlaubt es von den generierten Ergebnissen auf das Verhalten von Leberzellen zurückzuschließen. Unter anderem besitzen sie nicht die Fähigkeit in einem dreidimensionalen Medium zu wachsen. Bei der Auswahl der Onkogene entschieden wir uns für Akt und Myc, um ein besseres Verständnis für das onkogene Potential von Akt und Myc zu erlangen. Myc liegt in mutierter Form in ca. 11-15% der menschlichen HCC Proben vor [101]. In Mausexperimenten führte eine Überexpression von Myc in 40% der Fälle zu einer Krebsentwicklung [102]. Der PI3K/Akt/mTOR Signalweg ist in ca. 50% der Fälle in humanem HCC anormal aktiviert [103]. Die erfolgreiche Transduktion wurde mittels Western Blots nachgewiesen. Ein entsprechender Blot ist in der Abbildung 3.1.1 repräsentativ dargestellt. In diesen Blots zeigt sich ein vermehrter Nachweis des Proteins Akt in den Zelllinien Akt^{Myr} und Myc^{OE}-Akt^{Myr}. Die Zelllinie Myc^{OE} und die native Aml12 Zelllinie wiederum weisen keine erhöhte Menge des Proteins Akt auf. Zusätzlich zeigt sich ein vermehrtes Auftreten des Proteins Myc in den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr}. Auch hierbei konnte keine erhöhte Menge des Proteins Myc in den Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} nachgewiesen werden.

Es konnte somit eine erfolgreiche Transduktion der Viren mit den entsprechenden Onkogenen durch ein vermehrtes Auftreten der Proteine in den produzierten Zelllinien nachgewiesen werden.

4.2. Wachstumsverhalten

In einem ersten Experiment wurde das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zelllinien in einem zweidimensionalen Medium untersucht. Es sollte dabei untersucht werden, ob eines der Onkogene alleine oder beide Onkogene zusammen die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien in signifikanter Weise steigert oder senkt.

Die einzige Zelllinie, welche die Wachstumsgeschwindigkeit in einem zweidimensionalen Medium gegenüber den nativen Aml12 Zellen signifikant steigert ist die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr}. Dies ist vor dem Hintergrund interessant, dass beide einzelnen Onkogene nicht in der Lage sind die Wachstumsgeschwindigkeit signifikant zu steigern. Da es sich bei Myc um einen Transkriptionsfaktor handelt, welcher Cycline und Transkriptionsfaktoren aktiviert, wodurch der Zellzyklus direkt angeregt wird und den Zellzyklus hemmende Proteine wie p21 und p27 inhibiert, wäre es nicht verwunderlich, wenn eine alleinige Überexpression von Myc bereits die Generationszeit so weit senkt, dass sie sich von unveränderten Aml12 Zellen abhebt [32,104,105]. Dies konnte jedoch in den Experimenten nicht gezeigt werden. Auch die konstitutiv aktive Form eines myristoylierten Akt sollte die Wachstumsgeschwindigkeit durch die Hemmung der Apoptose und die Steigerung der Proliferation erhöhen [106]. Allerdings reicht auch diese Veränderung der Zelle alleine nicht aus, um die Wachstumsgeschwindigkeit signifikant zu steigern. Erst die Kombination beider Onkogene reicht aus, um die Verdopplungszeit im zweidimensionalen Medium ausreichend zu senken, um sich signifikant von den anderen Zelllinien abzuheben. *Schild et. al.* zeigten, dass eine vermehrte Expression von Akt zu einer Inhibition von GSK3 β und dadurch zu einer erhöhten Myc-Expression und einer erhöhten Myc-abhängigen Proteinproduktion führt [107]. Diese zusätzliche kleine Änderung und der dadurch bedingte kumulative Effekt der beiden Onkogene könnte somit ausreichen, um die Wachstumsgeschwindigkeit noch etwas zu steigern.

In einem dreidimensionalen Medium wiederum ist lediglich die Zelllinie Myc^{OE} fähig große Kolonien in relevanter Menge zu bilden. Dieser durch die alleinige Überexpression von Myc begonnene Effekt wird durch die Hinzunahme des Onkogens Akt^{Myr} wieder

umgekehrt, wodurch diese Zelllinie nicht in der Lage ist, vermehrt makroskopisch sichtbare Kolonien zu bilden. Die Zelllinie Akt^{Myr} bildet gegenüber der nativen Aml12 Zelllinie keine vermehrten Kolonien. *Barr et. al.* beschreiben in ihrer Arbeit über die Veränderung des Wachstumsverhaltens von SCLC-Zelllinien die Veränderung des Wachstums durch die Überexpression von Myc. Die Überexpression von Myc verbessert hierbei die Wachstumsbedingungen unter dreidimensionalen Bedingungen. Als Ursache wird hierbei die Unterdrückung der Expression von $\alpha\beta1$ -Integrin durch die Überexpression von Myc herangezogen. Diese Unterdrückung eines Teils des Zell-Matrix-Systems der Zelle könnte es der Myc^{OE} Zelllinie ermöglichen, sich im Soft Agar zu vermehren [108]. Es verbleibt an dieser Stelle allerdings die Frage, warum die Kombination Myc^{OE}-Akt^{Myr} im Gegensatz zur alleinigen Überexpression von Myc nicht in der Lage ist, große Kolonien zu bilden, obwohl die Generationszeit durch die Kombination aus überexprimiertem Myc und myristoyliertem Akt grundsätzlich gesenkt wird. Dies könnte durch die proapoptotischen Aspekte einer Überexpression von Myc wie z.B. der Induktion von Bax und Bak und einer vermehrten Myc-Induktion durch die Myristoylierung von Akt bedingt sein [109–111]. Auch wenn Akt dafür bekannt ist, in Kombination mit diversen Onkogenen in Mausmodellen solide Lebertumore zu bilden, und sich in diversen humanen Karzinomen des Magen-Darm-Traktes findet, zeigt sich auch, dass in einem Mausmodell eine Überexpression von Myc mit einer vermehrten Induktion der Apoptose einhergeht [112]. *De Salvo et. al.* zeigten, dass durch die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges mittels Temozolomid eine vermehrte Apoptose von Glioblastomzellen durch die Induktion von Myc erreicht wird [113].

Jedoch verbleibt es schlussendlich unklar, warum die Myc^{OE}-Akt^{Myr} Zelllinie in einem dreidimensionalen Medium langsamer wächst, als die Myc^{OE} Zelllinie, während sie im zweidimensionalen Medium signifikant schneller wächst. Dieser Teil Bedarf in der Zukunft einer weiteren Beobachtung.

Aufgrund der immer weiter zunehmenden Individualisierung der Tumorthherapie auf der Basis einer molekularen und zielgerichteten Therapie, wäre ein mögliches weiterführendes Experiment zu untersuchen, ob sich ein Unterschied in der Wirksamkeit der etablierten Tumorthapien unter diesen Zelllinien zeigt. Man könnte analog zu den bereits durchgeführten Kristallviolett Experimenten die Zellen für einen definierten Zeitraum mit z.B. Atezolizumab und Bevacizumab behandeln und anschließend anfärben.

Dadurch könnte man untersuchen, ob bestimmte Mutationen für eine bessere Wirksamkeit bestimmter Therapien prädestinieren würden.

4.3. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens durch ER-Stress

Induktoren

Ein weiteres Experiment untersuchte die Resistenz der verschiedenen Zelllinien gegenüber dem ER-Stress Induktor Tunicamycin. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Zelllinie Myc^{OE}, als auch die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Tunicamycin induziertem ER-Stress im Vergleich zu nativen Aml12 Zellen besitzen. Die alleinige Myristoylierung von Akt wiederum hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten unter diesen Bedingungen.

Bereits in der Abbildung 3.4.4. konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} auf Tunicamycin induzierten ER-Stress mit einer vermehrten Expression von Gadd34 und BIP reagieren. Diese Induktion der ER-Stress Kaskade könnte schlussendlich zu einer vermehrten Expression von Apoptose vermittelnden Proteinen führen [59,60]. Eine solche ER-Stress induzierte Apoptose könnte eine Erklärung für die in geringerem Ausmaß bewachsene Fläche in den Kristallviolett Experimenten der oben genannten Zelllinien darstellen.

Interessant ist, dass in den gezeigten Experimenten eine vermehrte Expression von BiP nicht direkt zu einer vermehrten Expression von p-EIF2 α führt. Unter gestressten Bedingungen besitzen die Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} die größte Menge an Bip1, während die Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} bereits im ungestressten Zustand eine vermehrte Phosphorylierung von EIF2 α aufweisen. An dieser Stelle kommen nun mehrere Aspekte zum Tragen. Wir sehen, dass die Menge an p-EIF2 α in den Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} unter gestressten Bedingungen deutlich zunimmt. Man könnte aus dem unter Abbildung 3.3.4. dargestellten Western Blot auch interpretieren, dass der Unterschied in der Menge an exprimiertem p-EIF2 α zwischen einerseits den Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} und andererseits des Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} vom ungestressten hin zum gestressten Zustand abnimmt. Diese Reduktion des Unterschieds an exprimiertem p-EIF2 α könnte durch eine vermehrte Expression an p-EIF2 α in den Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr} bedingt durch die vermehrte Aktivierung der ER-Stress-Kaskade realisiert werden. Die erhöhte Expression von p-EIF2 α in den Zelllinien Myc^{OE}

und Myc^{OE}-Akt^{Myr} könnte ebenso mehrere Gründe haben. Eine Option wäre, dass diese Zelllinien eine grundsätzlich höhere Proteinproduktion besitzen als die Zelllinien Aml12 und Akt^{Myr}. Diese chronisch vermehrte Proteinproduktion und der chronisch vermehrte geringe ER-Stress könnte dazu führen, dass diese Zelllinien z.B. durch eine Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums mehr Kapazitäten schaffen, um sich an Zustände eines erhöhten ER-Stresses anzupassen, was die Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} somit resistenter gegen einen Tunicamycin-induzierten ER-Stress macht. Eine weitere Option wäre, dass andere Kinasen wie z.B. die GCN2-Kinase oder die HRI-Kinase für die vermehrte Phosphorylierung von EIF2 α in den Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} verantwortlich sind [114, 115].

Um diese Hypothese zu testen, könnte man beispielsweise die anderen Kinasen, welche eIF2 α phosphorylieren (HRI, GCN2 und PKR), mittels siRNA runterregulieren und im Anschluss prüfen, ob die erhöhte Phosphorylierung weiterhin besteht. Dadurch wäre die Phosphorylierung von EIF2 α lediglich auf die Aktivität der ER-Stress abhängigen Kinase PERK zurückzuführen. Zusätzlich könnte man Anpassungsprozesse der Zelllinien wie z.B. die Bildung eines größeren endoplasmatischen Retikulums mit einem entsprechenden Mikroskop dokumentieren und vergleichen.

4.4. Beeinflussbarkeit des Wachstumsverhaltens durch ER-Stress

Modulatoren

Da die Zelllinie, die Myc überexprimiert, als einzige in der Lage ist, in einer Langzeitbehandlung mit Salubrinal unter zweidimensionalen Bedingungen die Wachstumsrate gegenüber Aml12 Zellen auf einem signifikant höheren Niveau zu halten, bedarf es hier eines entsprechenden Erklärungsansatzes. *Friend et al.* konnten in ihrer Arbeit mit embryonalen Stammzellen zeigen, dass eine Behandlung mit Salubrinal zu einer gesteigerten Expression von Myc führt. Sie behandelten dabei Stammzellen mit Salubrinal in steigenden Konzentrationen und konnten dadurch zeigen, dass die Expression von Myc mit steigender Salubrinal Konzentration zunimmt [116]. Die vermehrte Expression dieses Transkriptionsfaktor durch die Verwendung von Salubrinal würde somit das vermehrte Wachstum gegenüber den anderen Zelllinien erklären. Dennoch verbleibt es nach wie vor ein Hemmstoff der Dephosphorylierung von eIF2 α , wodurch die Proliferation der Zellen trotz einer Induktion von Myc dennoch reduziert

werden kann [87-89]. Hierbei wäre es sinnvoll in einem weiterführenden Experiment die Expression von Myc unter einer Behandlung mit Salubrinal mit der unter Kontrollbedingungen zu vergleichen.

Zum aktuellen Zeitpunkt bleibt es unklar, warum die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} sensibler auf die Behandlung des ER-Stress Modulators Salubrinal reagiert als die resistenterere Zelllinie Myc^{OE} und die Zelllinie Akt^{Myr}, welche alleinstehend keinen Unterschied in ihrer Resistenz gegenüber nativen Aml12 Zellen aufweist.

In der Arbeit von *Zhao et. al.* konnte gezeigt werden, dass Salubrinal das Wachstum von CCA-Zelllinien reduziert. Ebenfalls zeigten sie, dass Salubrinal die Phosphorylierung von Akt in diesen Zelllinien reduziert. Auch eine Induktion von phosphoryliertem Akt durch die Behandlung mit Rapamycin wurde durch diese Behandlung rückgängig gemacht [117]. Dies müsste allerdings auch eine Wirkung auf die alleinstehende Akt^{Myr} Zelllinie haben, welche allerdings in ihrem Wachstum durch Salubrinal im Vergleich zur nativen Aml12 Zelllinie nicht beeinflusst wird.

Zusätzlich zeigt die Studie von *Chen et. al.*, dass Salubrinal das Wachstum von sich schnell teilenden Tumorzellen hemmt. Hierbei wird in nährstoffreichen Umgebungen allerdings nur eine Hemmung des schnellen Wachstums und nicht ein vermehrter Zelltod erreicht. Die Hemmung dieses Wachstums wird durch eine Reduktion der Proteinproduktion erreicht. Da es sich bei der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} um die sich am schnellsten teilende Zelllinie handelt, wie man in der Abbildung 3.2.1 sehen kann, ist es nachvollziehbar, dass diese Zelllinie durch die Behandlung mit einem solchen Medikament am meisten beeinträchtigt wird [118].

Insgesamt bleibt somit unklar, warum die Myc^{OE}-Akt^{Myr} Zelllinie durch die Behandlung des ER-Stress Modulators Salubrinal mehr beeinträchtigt wird als die native Aml12 Zelllinie oder die Zelllinie Akt^{Myr}.

Im dreidimensionalen Wachstum zeigt einzig die Zelllinie Myc^{OE} ein Wachstumsverhalten, welches sich von nativen Aml12 Zellen unterscheidet. In diesem bewirkt die Zugabe von Salubrinal eine Reduktion der Größe und der Anzahl der Kolonien. Zwar zeigten Friend et al., dass die Menge an exprimiertem c-Myc durch die Überexpression von p-EIF2 α bedingt durch die Gabe von Salubrinal erhöht wird, jedoch

handelt es sich bei Salubrinal nach wie vor um einen Hemmstoff der Dephosphorylierung von p-EIF2 α [116]. *Chen et. al.* zeigten, dass eine Behandlung mit Salubrinal zu einer Reduktion der Fähigkeit Kolonien zu bilden führen kann. Dies wurde in der genannten Studie u.a. durch eine verminderte Proteinproduktion im Rahmen einer Hemmung der Dephosphorylierung von p-EIF2 α erreicht. Zwar wurden diese Untersuchungen mit Brust-, Magen- und Zungenkrebszelllinien durchgeführt, allerdings sollte die Vergleichbarkeit aufgrund sich standardmäßig schnell teilender Krebszellen gegeben sein [118]. Es wird somit durch die Gabe von Salubrinal die verfügbare Menge eines relevanten Transkriptionsfaktors reduziert. Die reduzierte Translationskapazität der Zellen könnte somit eine verminderte Proteinproduktion und somit ein langsames Wachstum dieser bedingen. Hierdurch würden sich weniger und kleinere Kolonien bilden. Zusätzlich zeigten *Espadas et. al.*, dass sich in vivo wachsende cholangiozelluläre Karzinome durch die Verwendung von Salubrinal in ihrem Wachstum hemmen lassen. Es wurden hierbei im Mausmodell Tiere mit Salubrinal und Rapamycin behandelt. Es zeigte sich, dass Salubrinal die Gesamttumormasse sowohl alleine als auch in Verbindung mit Rapamycin reduziert [119].

5. Zusammenfassung

Grundlage dieser Doktorarbeit bilden die in Tabelle 2.1 aufgeführten und von Dr. rer. nat. Mathias Riebold und mir produzierten Zelllinien. Diese Zelllinien bauen auf der nativen Aml12 Zelllinie auf, bei der es sich um modifizierte Mausleberzellen handelt, welche in ihrer Morphologie und ihrem Wachstumsverhalten vergleichbar mit normalen Leberzellen der Maus sind, allerdings in der Zellkultur über 80-mal gesplittet werden können.

In diese Zelllinien wurden mit Hilfe der Transduktion Onkogene in die Zellen eingebracht. Bei diesen Onkogenen handelt es sich um die Überexpression des Transkriptionsfaktors Myc und die myristoylierte Form von Akt. Diese Onkogene wurden hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Aml12 Zellen sowohl solitär als auch zusammen untersucht. Die untersuchten Auswirkungen umfassen das Wachstumsverhalten der Zelllinien in zwei- und dreidimensionalen Medien, die Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch den ER-Stressor Tunicamycin und die Modifizierbarkeit des Wachstumsverhaltens durch den ER-Stress Modifikator Salubrinal.

Die Wachstumsgeschwindigkeit unter zweidimensionalen Bedingungen konnte einzig die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} in signifikanter Weise gegenüber den nativen Aml12 Zellen steigern. Es bedarf somit der Kombination der Überexpression des Transkriptionsfaktors Myc und der konstitutiv aktiven Form von Akt, um die Wachstumsgeschwindigkeit in einem signifikanten Maße zu steigern.

Unter dreidimensionalen Wachstumsbedingungen war lediglich die Zelllinie Myc^{OE} in der Lage, makroskopisch sichtbare Kolonien in einer relevanten Menge zu bilden. Der durch die Überexpression von Myc ausgelöste Effekt der Ausbildung großer Kolonien wurde hierbei durch die Kombination mit Akt^{Myr} wieder rückgängig gemacht, wodurch die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} nicht in der Lage ist, vermehrt große Kolonien zu bilden. Im Falle dieser Kombinationszelllinie könnte die Kombination von Akt^{Myr} mit einer Überexpression von Myc in Aml12 Zelllinien zu einer Steigerung der apoptotischen Auswirkung von Myc führen, wodurch das dreidimensionale Wachstum gehemmt wird.

Gegenüber des ER-Stressors Tunicamycin zeigten sich bis zu einer Konzentration von ~60µg/l keine relevanten Unterschiede zwischen den Zelllinien. Bei einer Konzentration von 125µg/l und 250µg/l wiesen die Zelllinien Myc^{OE} und Myc^{OE}-Akt^{Myr} eine erhöhte

Resistenz gegenüber Tunicamycin auf. In den durchgeführten Western Blots zeigt sich in beiden Zelllinien eine Erhöhung an p-EIF2 α unter nicht gestressten Bedingungen. Es ist somit möglich, dass beide Zelllinien durch einen basal erhöhten ER-Stress an diesen angepasst sind und z.B. mit einer Vergrößerung ihres endoplasmatischen Retikulums besser auf eine Erhöhung des ER-Stresses reagieren können.

Bei der Behandlung mit dem ER-Stress Modulator Salubrinal zeigt die Zelllinie Myc^{OE} die größte Resistenz gegenüber der Behandlung, während die Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} die höchste Sensitivität gegenüber einer solchen Behandlung aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass Salubrinal v.a. das Wachstum von sich schnell teilenden Zellen beeinflusst. Da es sich bei der Zelllinie Myc^{OE}-Akt^{Myr} um die sich am schnellsten teilende Zelllinie handelt, liefert dies eine Erklärung für die höchste Sensitivität gegenüber Salubrinal.

6. Repräsentative Bilder der Experimente

6.1. Soft Agar Assays

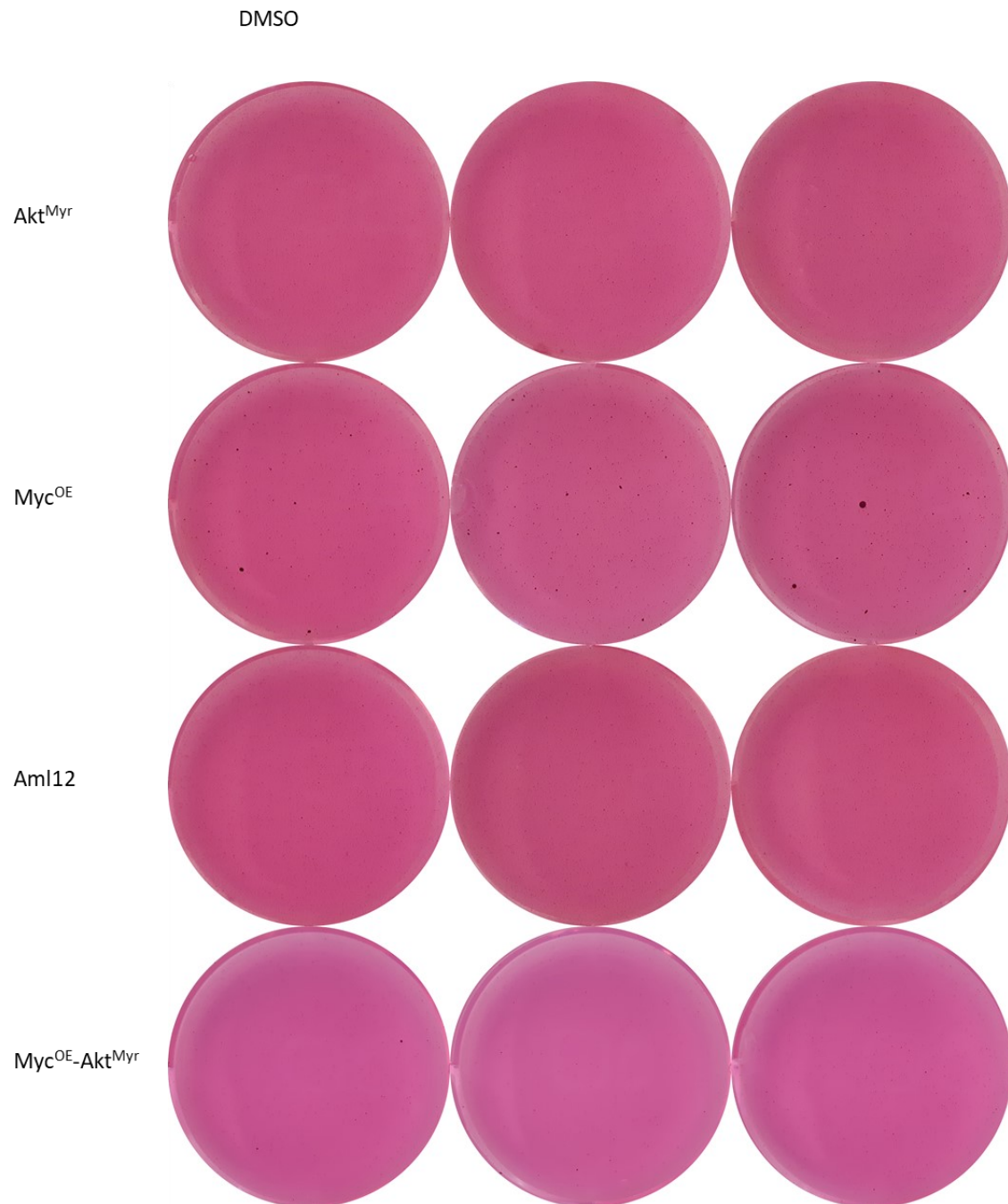


Abbildung 6.1.1: Wachstumsverhalten der Zelllinien im Soft Agar unter Behandlung mit 0,1% DMSO.

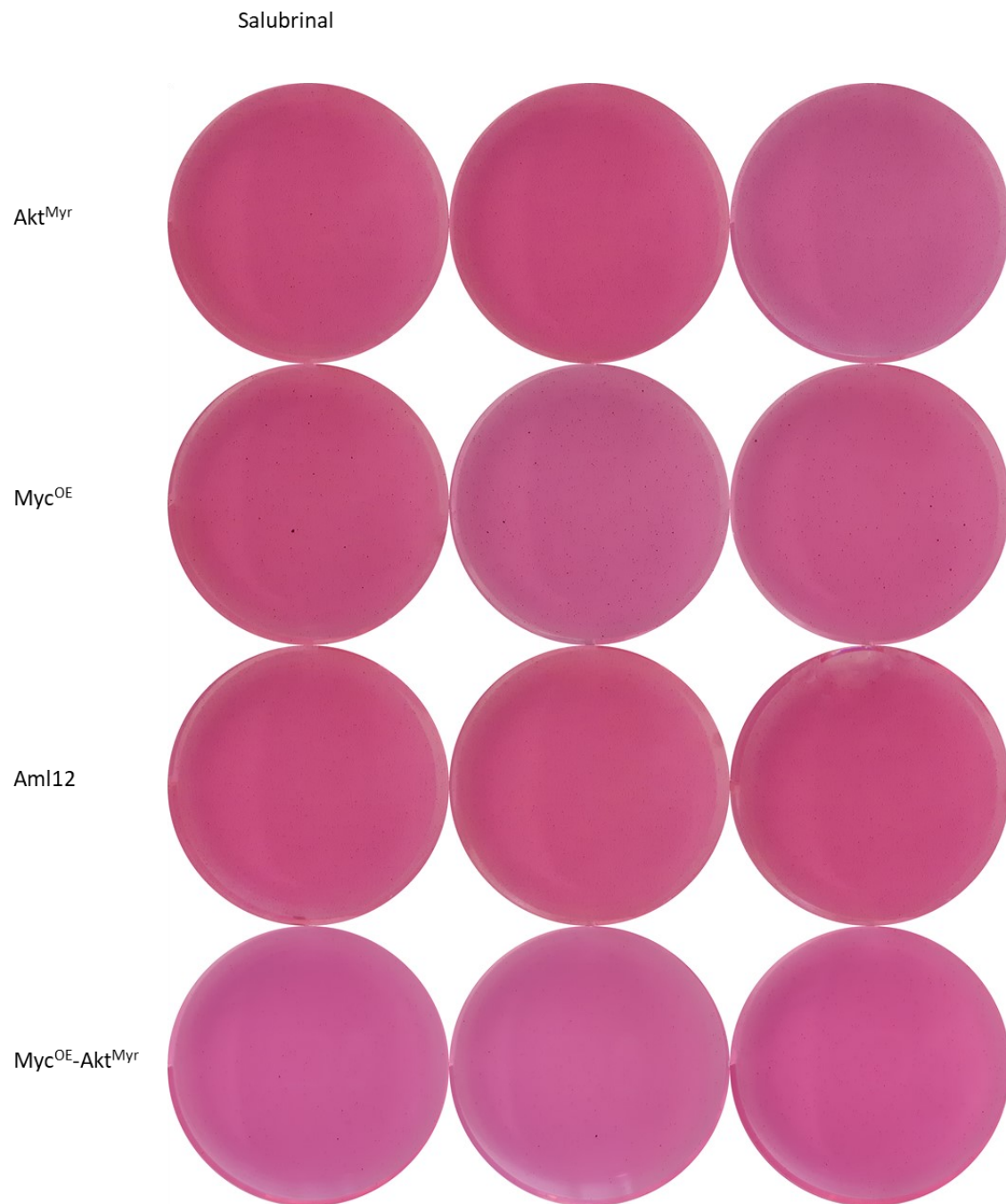


Abbildung 6.1.2: Wachstumsverhalten der Zelllinien im Soft Agar unter Behandlung mit 10mM Salubrinal

6.2. Salubrinal Langzeitbehandlung

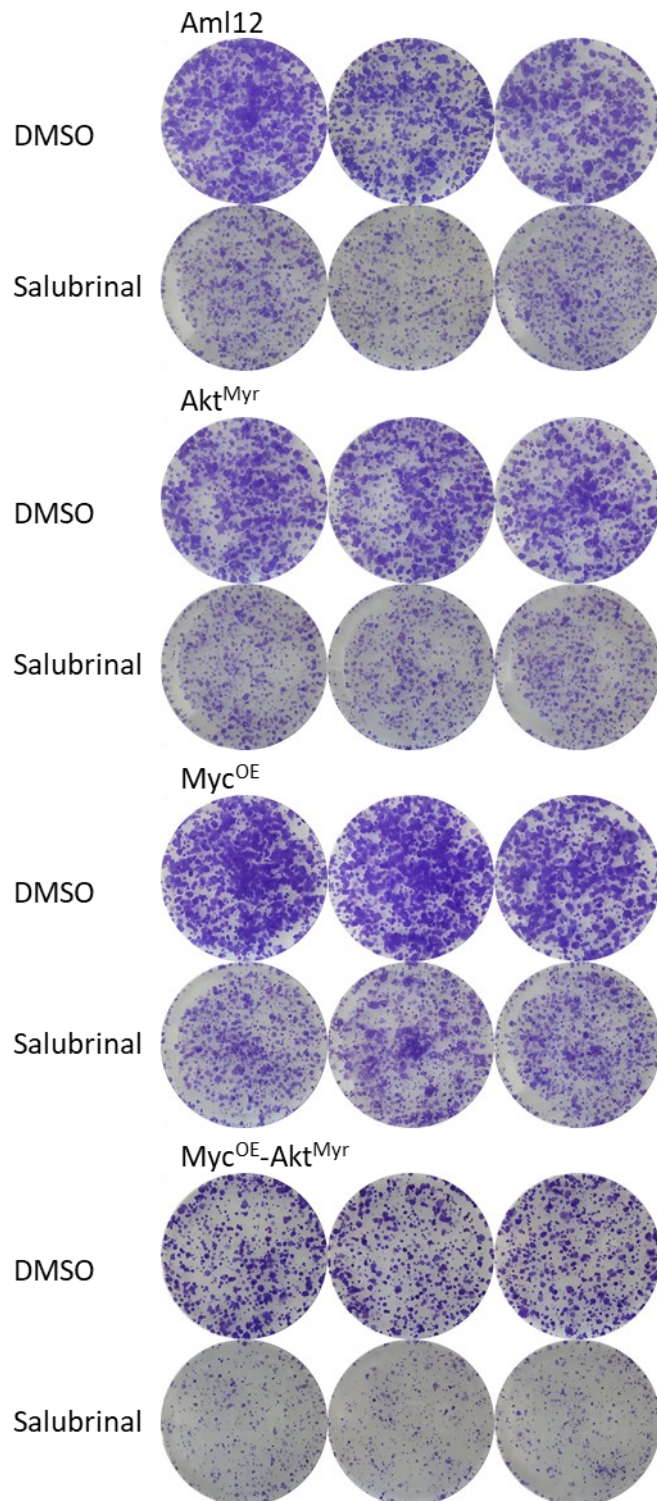


Abbildung 6.2.1: Wachstumsverhalten der Zelllinien in einer sechs-*well*-Platte unter Behandlung mit 10mM Salubrinal oder 0,1% DMSO angefärbt mit Kristallviolett.

6.3. Tunicamycin Behandlung mit unterschiedlichen Dosierungen

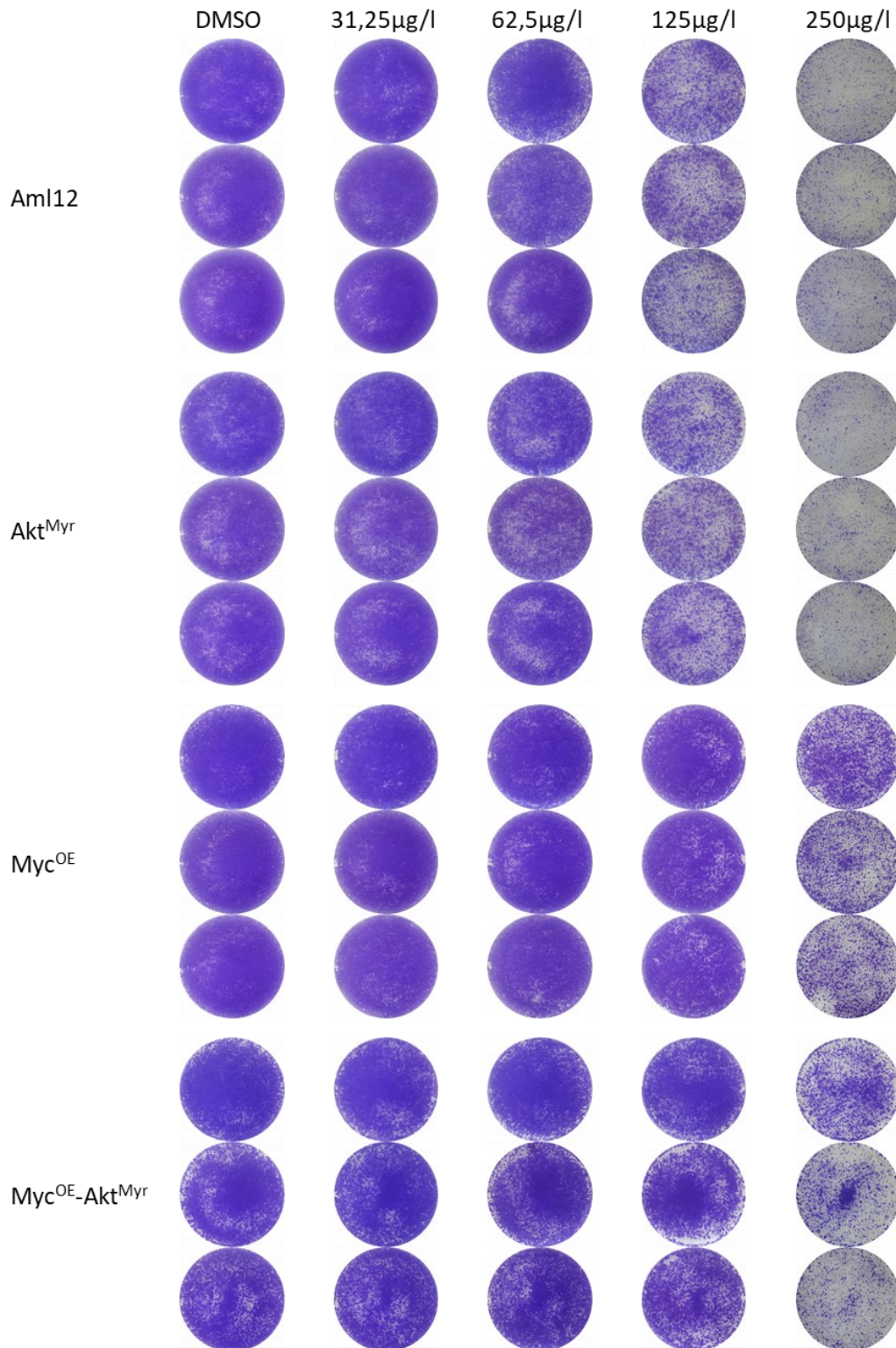


Abbildung 6.3.1: Wachstumsverhalten der Zelllinien in einer sechs-well-Platte unter Behandlung einer steigenden Konzentration von Tunicamycin oder 0,1% DMSO angefärbt mit Kristallviolett.

7. Abbildungsverzeichnis

1.1.: Akt/PI3K-Signalweg	S.9
1.2.: c-Myc beeinflussende Signalwege und zelluläre Auswirkungen von c-Myc	S.11
1.3.: IRE1-, PERK- und ATF6-Signalweg des ER-Stresses	S.17
1.4.: Graphische Darstellung der Wirkweise von Salubrinal	S.18
1.5.: Graphische Darstellung der Wirkweise von Tunicamycin	S.20
2.1.10.1.1.: Darstellung des pBABE-hygro-hTERT Plasmids	S.30
2.1.10.1.2.: Darstellung des UTF_8_de_pLNCX2 Plasmids	S.31
3.1.1.: Repräsentativer Immunoblot der Expression der Onkogene in den Zelllinien	S.45
3.2.1.: Durchschnittliche Verdopplungszeit der Zelllinien unter zweidimensionalen Bedingungen	S.47
3.2.2.: Repräsentative Abbildung der angefärbten Kolonien im Soft Agar Assay	S.49
3.2.3.: Anzahl der Kolonien von 50-100 Pixeln im Soft Agar Assay	S.50
3.2.4.: Anzahl der Kolonien von 100-200 Pixeln im Soft Agar Assay	S.51
3.2.5.: Anzahl der Kolonien von >200 Pixeln im Soft Agar Assay	S.53
3.3.1.: Repräsentative Abbildung der Kristallviolett-Experimente zur Visualisierung der Auswirkung des ER-Stressors Tunicamycin 125µg/l und 250µg/l	S.55
3.3.2.: Bewachsene Fläche eines Wells unter der Behandlung mit 125µg/l Tunicamycin	S.57
3.3.3.: Bewachsene Fläche eines Wells unter der Behandlung mit 250µg/l Tunicamycin	S.58
3.3.4.: Repräsentativer Immunoblot der Expression der ER-Stress Proteine in den Zelllinien	S.60
3.4.1.: Bewachsene Fläche eines Wells unter der Behandlung mit Salubrinal	S.63

3.5.1.: Anzahl der Kolonien >50 Pixel unter der Behandlung mit Salubrinal und DMSO	S.65
6.1.1.: Wachstum der Zelllinien im Soft Agar unter Behandlung mit DMSO	S.76
6.1.2.: Wachstum der Zelllinien im Soft Agar unter Behandlung mit Salubrinal	S.77
6.2.1.: Kristallviolett Experiment der Behandlung mit Salubrinal und DMSO	S.78
6.3.1.: Kristallviolett Experiment der Behandlung mit DMSO und Tunicamycin steigender Konzentrationen und DMSO	S.79

8. Tabellenverzeichnis

2.1.1.1.: Zusammensetzung des Kulturmediums	S.22
2.1.1.2.: Bakterielle Medien	S.22
2.1.2.: ER-Stressoren und ER-Stress-Modulatoren	S.22
2.1.3.1.: Zellkultur	S.23
2.1.3.2.: Soft Agar	S.24
2.1.3.3.: Polymerasekettenreaktion	S.24
2.1.3.4.: Chemikalien und Materialien der Gele des Western Blots	S.24
2.1.3.5.: Western Blot	S.25
2.1.3.6.: Agarose Gel	S.26
2.1.3.7.: Klonierungsprozess	S.26
2.1.3.8.: Kristallviolett Assay	S.26
2.1.4.: Bakterien	S.27
2.1.5.: Enzyme	S.27
2.1.6.: Weitere Maschinen	S.27
2.1.7.: Weitere Chemikalien	S.28
2.1.8.1.: Primäre Antikörper	S.28
2.1.8.2.: Sekundäre Antikörper	S.29
2.1.9.: Primer	S.29
2.1.11.: Zelllinien und Produktion der Zelllinien	S.33
2.1.12.: Kits	S.33
2.1.13.: Puffer	S.34
3.1.: Auflistung der verschiedenen Zelllinien und deren Kürzel	S.44

9. Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
Bak	Bcl2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl2-associated X protein
Bim	Bcl2-interacting mediator of cell death
Bcl2	B-cell-lymphoma-protein 2
BiP	Binding immunoglobulin protein
bZIP	Basic leucine zipper domain
CCA	Cholangiozelluläres Karzinom
CHOP	C/EBP-homologous protein
CK1 α	Casein kinase 1 α
CR ϵ P (PPP1R15B)	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B
DNA	Deoxyribonucleic acid
DR5	Death receptor 5
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatic reticulum-associated protein degradation
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

ERO1 α	Endoplasmatic reticulum oxioeductin 1 α
ERSE	ER stress response elements
FOXO	Forkhead box protein O
Gadd34 (PPP1R15A)	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A
GCN2	Kinase general control nondepressible 2
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine exchange factor
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase bzw. Alanin-Aminotransferase (ALAT, ALT)
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HRI	Heme-regulated eIF2 α kinase
Hsp	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes simplex Virus
IRES	Internal ribosomal entry site
IRE1	Inositol required 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LRP5/6	Low density lipoprotein receptor-related proteins 5 or 6
MAM	Mitochondria-associated endoplasmatic reticulum membranes
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-activated/extracellulär signal-aktiviert kinase kinase
MraY	Phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide transferase

mRNA	messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Phospholipid dependent Kinase
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
PKR	Protein kinase R
RIP	Regulated intermembranes proteolysis
Sal	Salubrinal
SAPK	stress-activated protein kinase
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
SRP	Small recognition particle
S1P	Site 1 protease
S2P	Site 2 protease
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TGF α	transforming growth factor α
TCF4	Transkriptionsfaktor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
uORF	Upstream open reading frame
UPR	Unfolded protein response
WecA transferase	Undecanyl-phosphate α -N-acetylglucosaminyl 1-phosphate

XBP1

x-box protein 1

10. Literaturverzeichnis

- [1] Guichard, Cécile, Giuliana Amaddeo, Sandrine Imbeaud, Yannick Ladeiro, Laura Pelletier, Ichrafé Ben Maad, Julien Calderaro, u. a. „Integrated Analysis of Somatic Mutations and Focal Copy-Number Changes Identifies Key Genes and Pathways in Hepatocellular Carcinoma“. *Nature Genetics* 44, Nr. 6 (Juni 2012): 694–98. <https://doi.org/10.1038/ng.2256>.
- [2] Vogelstein, Bert, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou, Luis A. Diaz, und Kenneth W. Kinzler. „Cancer Genome Landscapes“. *Science* 339, Nr. 6127 (29. März 2013): 1546–58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
- [3] Bissell, Mina J, und William C Hines. „Why Don't We Get More Cancer? A Proposed Role of the Microenvironment in Restraining Cancer Progression“. *Nature Medicine* 17, Nr. 3 (März 2011): 320–29. <https://doi.org/10.1038/nm.2328>.
- [4] Decker, William K., Rodrigo F. Da Silva, Mayra H. Sanabria, Laura S. Angelo, Fernando Guimarães, Bryan M. Burt, Farrah Kheradmand, und Silke Paust. „Cancer Immunotherapy: Historical Perspective of a Clinical Revolution and Emerging Preclinical Animal Models“. *Frontiers in Immunology* 8 (2. August 2017): 829. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00829>.
- [5] Hanahan, Douglas, und Robert A. Weinberg. „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“. *Cell* 144, Nr. 5 (März 2011): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [6] Wu, J C, G Merlino, und N Fausto. „Establishment and Characterization of Differentiated, Nontransformed Hepatocyte Cell Lines Derived from Mice Transgenic for Transforming Growth Factor Alpha.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, Nr. 2 (18. Januar 1994): 674–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.674>.
- [7] Quinton, Lee J., Matthew R. Jones, Bryanne E. Robson, und Joseph P. Mizgerd. „Mechanisms of the Hepatic Acute-Phase Response during Bacterial Pneumonia“. *Infection and Immunity* 77, Nr. 6 (Juni 2009): 2417–26. <https://doi.org/10.1128/IAI.01300-08>.
- [8] Zhang, Y, H Mashima, M Kanzaki, H Shibata, und I Kojima. „Assessment of the Role of Activin A and Transforming Growth Factor β in the Regulation of AML12 Cell Growth“. *Hepatology* 25, Nr. 6 (Juni 1997): 1370–75. <https://doi.org/10.1002/hep.510250612>.
- [9] Gala, Kinisha, und Sarat Chandarlapaty. „Molecular Pathways: HER3 Targeted Therapy“. *Clinical Cancer Research* 20, Nr. 6 (15. März 2014): 1410–16. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1549>.
- [10] Maennling, Amaia Eleonora, Mehmet Kemal Tur, Marcus Niebert, Torsten Klockenbring, Felix Zeppernick, Stefan Gattenlöhner, Ivo Meinhold-Heerlein, und Ahmad Fawzi Hussain. „Molecular Targeting Therapy against EGFR Family in Breast Cancer: Progress and Future Potentials“. *Cancers* 11, Nr. 12 (20. November 2019): 1826. <https://doi.org/10.3390/cancers11121826>.
- [11] Fruman, David A., Honyin Chiu, Benjamin D. Hopkins, Shubha Bagrodia, Lewis C. Cantley, und Robert T. Abraham. „The PI3K Pathway in Human Disease“. *Cell* 170, Nr. 4 (August 2017): 605–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029>.

- [12] Anderson, Karen E., John Coadwell, Len R. Stephens, and Phillip T. Hawkins. „Translocation of PDK-1 to the Plasma Membrane Is Important in Allowing PDK-1 to Activate Protein Kinase B“. *Current Biology* 8, Nr. 12 (Juni 1998): 684–91. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70274-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70274-X).
- [13] Manning, Brendan D., und Alex Toker. „AKT/PKB Signaling: Navigating the Network“. *Cell* 169, Nr. 3 (April 2017): 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>.
- [14] Xu, Chong, Nam-Gyun Kim, und Barry M. Gumbiner. „Regulation of Protein Stability by GSK3 Mediated Phosphorylation“. *Cell Cycle* 8, Nr. 24 (15. Dezember 2009): 4032–39. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10111>.
- [15] Domoto, Takahiro, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, und Toshinari Minamoto. „Glycogen Synthase Kinase 3 β in Cancer Biology and Treatment“. *Cells* 9, Nr. 6 (3. Juni 2020): 1388. <https://doi.org/10.3390/cells9061388>.
- [16] Dakhllallah, Duaa, Yijie Wang, Tierra A. Bobo, Emily Ellis, Xiaokui Mo, Melissa G. Piper, Timothy D. Eubank, und Clay B. Marsh. „Constitutive AKT Activity Predisposes Lung Fibrosis by Regulating Macrophage, Myofibroblast and Fibrocyte Recruitment and Changes in Autophagy“. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 10, Nr. 10 (2019): 346–73. <https://doi.org/10.4236/abb.2019.1010027>.
- [17] Wang, Bin, Tong Dai, Wenhuan Sun, Yujun Wei, Jiang Ren, Long Zhang, Mengdi Zhang, und Fangfang Zhou. „Protein N-Myristoylation: Functions and Mechanisms in Control of Innate Immunity“. *Cellular & Molecular Immunology* 18, Nr. 4 (April 2021): 878–88. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00663-2>.
- [18] Nakanishi, Kazuaki, Michiie Sakamoto, Susumu Yamasaki, Satoru Todo, und Setsuo Hirohashi. „Akt Phosphorylation Is a Risk Factor for Early Disease Recurrence and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma“. *Cancer* 103, Nr. 2 (15. Januar 2005): 307–12. <https://doi.org/10.1002/cncr.20774>.
- [19] Vivanco, Igor, und Charles L. Sawyers. „The Phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT Pathway in Human Cancer“. *Nature Reviews Cancer* 2, Nr. 7 (1. Juli 2002): 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>.
- [20] Stasevich, Ekaterina Mikhailovna, Matvey Mikhailovich Murashko, Lyudmila Sergeevna Zinevich, Denis Eriksonovich Demin, und Anton Markovich Schwartz. „The Role of Non-Coding RNAs in the Regulation of the Proto-Oncogene MYC in Different Types of Cancer“. *Biomedicines* 9, Nr. 8 (30. Juli 2021): 921. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080921>.
- [21] Heinrich, Peter C., Matthias Müller, und Lutz Graeve, Hrsg. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Aufl. 2014. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.
- [22] Bretones, Gabriel, M. Dolores Delgado, und Javier León. „Myc and Cell Cycle Control“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849, Nr. 5 (Mai 2015): 506–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.013>.
- [23] Dang, Chi V., Kathryn A. O’Donnell, Karen I. Zeller, Tam Nguyen, Rebecca C. Osthus, und Feng Li. „The C-Myc Target Gene Network“. *Seminars in Cancer Biology* 16, Nr. 4 (August 2006): 253–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.014>.
- [24] Liu, Jiaqi, Qing Xiao, Jiani Xiao, Chenxi Niu, Yuanyuan Li, Xiaojun Zhang, Zhengwei Zhou, Guang Shu, und Gang Yin. „Wnt/ β -Catenin Signalling:

- Function, Biological Mechanisms, and Therapeutic Opportunities“. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7, Nr. 1 (3. Januar 2022): 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.
- [25] Niu, Zhao-Shan. „Expression of P53 and C-Myc Genes and Its Clinical Relevance in the Hepatocellular Carcinomatous and Pericarcinomatous Tissues“. *World Journal of Gastroenterology* 8, Nr. 5 (2002): 822. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i5.822>.
- [26] Llombart, Victor, und Marc R Mansour. „Therapeutic Targeting of “Undruggable” MYC“. *eBioMedicine* 75 (Januar 2022): 103756. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103756>.
- [27] Nesbit, Chadd E, Jean M Tersak, und Edward V Prochownik. „MYC Oncogenes and Human Neoplastic Disease“. *Oncogene* 18, Nr. 19 (13. Mai 1999): 3004–16. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202746>.
- [28] Hetz, Claudio. „The Unfolded Protein Response: Controlling Cell Fate Decisions under ER Stress and Beyond“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, Nr. 2 (Februar 2012): 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>.
- [29] Nakagawa, Hayato, Atsushi Umemura, Koji Taniguchi, Joan Font-Burgada, Debanjan Dhar, Hisanobu Ogata, Zhenyu Zhong, u. a. „ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development“. *Cancer Cell* 26, Nr. 3 (September 2014): 331–43. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.001>.
- [30] Obeng, Esther A., Louise M. Carlson, Delia M. Gutman, William J. Harrington, Kelvin P. Lee, und Lawrence H. Boise. „Proteasome Inhibitors Induce a Terminal Unfolded Protein Response in Multiple Myeloma Cells“. *Blood* 107, Nr. 12 (15. Juni 2006): 4907–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3531>.
- [31] Zhou, Bei, Qianqian Lu, Jiatao Liu, Lulu Fan, Yu Wang, Wei, Hua Wang, und Guoping Sun. „Melatonin Increases the Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma to Sorafenib through the PERK-ATF4-Beclin1 Pathway“. *International Journal of Biological Sciences* 15, Nr. 9 (2019): 1905–20. <https://doi.org/10.7150/ijbs.32550>.
- [32] Lengyel, P, und D Söll. „Mechanism of Protein Biosynthesis“. *Bacteriological Reviews* 33, Nr. 2 (Juni 1969): 264–301. <https://doi.org/10.1128/br.33.2.264-301.1969>.
- [33] Perry, R P. „RNA Processing Comes of Age.“ *The Journal of Cell Biology* 91, Nr. 3 (1. Dezember 1981): 28s–38s. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.28s>.
- [34] Pederson, T. „Nuclear RNA-Protein Interactions and Messenger RNA Processing.“ *The Journal of Cell Biology* 97, Nr. 5 (1. November 1983): 1321–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.5.1321>.
- [35] Banerjee, A K. „5'-Terminal Cap Structure in Eucaryotic Messenger Ribonucleic Acids“. *Microbiological Reviews* 44, Nr. 2 (Juni 1980): 175–205. <https://doi.org/10.1128/mr.44.2.175-205.1980>.
- [36] Sachs, A., und E. Wahle. „Poly(A) Tail Metabolism and Function in Eucaryotes“. *The Journal of Biological Chemistry* 268, Nr. 31 (5. November 1993): 22955–58.
- [37] Pain, V M. „Initiation of Protein Synthesis in Mammalian Cells“. *Biochemical Journal* 235, Nr. 3 (1. Mai 1986): 625–37. <https://doi.org/10.1042/bj2350625>.
- [38] Thomas, A.A.M, R. Benne, und H.O. Voorma. „Initiation of Eukaryotic Protein Synthesis“. *FEBS Letters* 128, Nr. 2 (15. Juni 1981): 177–85.

- [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80076-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80076-2).
- [39] Merrick, W C. „Mechanism and Regulation of Eukaryotic Protein Synthesis“. *Microbiological Reviews* 56, Nr. 2 (Juni 1992): 291–315. <https://doi.org/10.1128/mr.56.2.291-315.1992>.
- [40] Valle, Rosaura P.C., und Marie-Dominique Morch. „Stop Making Sense or Regulation at the Level of Termination in Eukaryotic Protein Synthesis“. *FEBS Letters* 235, Nr. 1–2 (August 1988): 1–15. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81225-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81225-0).
- [41] Nagai, K. „NEW EMBO MEMBER’S REVIEW: Structure, Function and Evolution of the Signal Recognition Particle“. *The EMBO Journal* 22, Nr. 14 (15. Juli 2003): 3479–85. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg337>.
- [42] Bukau, Bernd, und Arthur L Horwich. „The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines“. *Cell* 92, Nr. 3 (Februar 1998): 351–66. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80928-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80928-9).
- [43] Li, Jingzhi, Xinguo Qian, und Bingdong Sha. „Heat Shock Protein 40: Structural Studies and Their Functional Implications“. *Protein & Peptide Letters* 16, Nr. 6 (1. Juni 2009): 606–12. <https://doi.org/10.2174/092986609788490159>.
- [44] Mandon, Elisabet C, Steven F Trueman, und Reid Gilmore. „Translocation of Proteins through the Sec61 and SecYEG Channels“. *Current Opinion in Cell Biology* 21, Nr. 4 (August 2009): 501–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.010>.
- [45] Malhi, Harmeet, und Randal J. Kaufman. „Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Disease“. *Journal of Hepatology* 54, Nr. 4 (April 2011): 795–809. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.005>.
- [46] Parodi, A. J. „Role of N-Oligosaccharide Endoplasmic Reticulum Processing Reactions in Glycoprotein Folding and Degradation“. *The Biochemical Journal* 348 Pt 1, Nr. Pt 1 (15. Mai 2000): 1–13.
- [47] Hong, Wanjin, und Bor Luen Tang. „Protein Trafficking along the Exocytotic Pathway“. *BioEssays* 15, Nr. 4 (April 1993): 231–38. <https://doi.org/10.1002/bies.950150403>.
- [48] Halban, P A, und J C Irminger. „Sorting and Processing of Secretory Proteins“. *Biochemical Journal* 299, Nr. 1 (1. April 1994): 1–18. <https://doi.org/10.1042/bj2990001>.
- [49] Tartakoff, Alan M. „The Confined Function Model of the Golgi Complex: Center for Ordered Processing of Biosynthetic Products of the Rough Endoplasmic Reticulum“. In *International Review of Cytology*, 85:221–52. Elsevier, 1983. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62374-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62374-8).
- [50] Harding, Heather P., Yuhong Zhang, und David Ron. „Protein Translation and Folding Are Coupled by an Endoplasmic-Reticulum-Resident Kinase“. *Nature* 397, Nr. 6716 (21. Januar 1999): 271–74. <https://doi.org/10.1038/16729>.
- [51] Ron, David. „Translational Control in the Endoplasmic Reticulum Stress Response“. *Journal of Clinical Investigation* 110, Nr. 10 (15. November 2002): 1383–88. <https://doi.org/10.1172/JCI0216784>.
- [52] Cui, Wenjun, Jingzhi Li, David Ron, und Bingdong Sha. „The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation“. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 67, Nr. 5 (1. Mai 2011): 423–28. <https://doi.org/10.1107/S0907444911006445>.
- [53] Harding, Heather P, Yuhong Zhang, Anne Bertolotti, Huiqing Zeng, und David

- Ron. „Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response“. *Molecular Cell* 5, Nr. 5 (Mai 2000): 897–904. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80330-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80330-5).
- [54] Chesnokova, Ekaterina, Natalia Bal, und Peter Kolosov. „Kinases of eIF2a Switch Translation of mRNA Subset during Neuronal Plasticity“. *International Journal of Molecular Sciences* 18, Nr. 10 (22. Oktober 2017): 2213. <https://doi.org/10.3390/ijms18102213>.
- [55] Kaufman, Randal J., Donalyn Scheuner, Martin Schröder, Xiaohua Shen, Kyungho Lee, Chuan Yin Liu, und Stacey M. Arnold. „The Unfolded Protein Response in Nutrient Sensing and Differentiation“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, Nr. 6 (Juni 2002): 411–21. <https://doi.org/10.1038/nrm829>.
- [56] Vattem, Krishna M., und Ronald C. Wek. „Reinitiation Involving Upstream ORFs Regulates ATF4 mRNA Translation in Mammalian Cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, Nr. 31 (3. August 2004): 11269–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400541101>.
- [57] Harding, Heather P, Isabel Novoa, Yuhong Zhang, Huiqing Zeng, Ron Wek, Matthieu Schapira, und David Ron. „Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells“. *Molecular Cell* 6, Nr. 5 (November 2000): 1099–1108. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00108-8).
- [58] Fawcett, T. W., J. L. Martindale, K. Z. Guyton, T. Hai, und N. J. Holbrook. „Complexes Containing Activating Transcription Factor (ATF)/cAMP-Responsive-Element-Binding Protein (CREB) Interact with the CCAAT/Enhancer-Binding Protein (C/EBP)-ATF Composite Site to Regulate Gadd153 Expression during the Stress Response“. *The Biochemical Journal* 339 (Pt 1), Nr. Pt 1 (1. April 1999): 135–41.
- [59] Puthalakath, Hamsa, Lorraine A. O’Reilly, Priscilla Gunn, Lily Lee, Priscilla N. Kelly, Nicholas D. Huntington, Peter D. Hughes, u. a. „ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim“. *Cell* 129, Nr. 7 (Juni 2007): 1337–49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>.
- [60] Kim, Hyungjin, Ho-Chou Tu, Decheng Ren, Osamu Takeuchi, John R. Jeffers, Gerard P. Zambetti, James J.-D. Hsieh, und Emily H.-Y. Cheng. „Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis“. *Molecular Cell* 36, Nr. 3 (November 2009): 487–99. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.030>.
- [61] Yamaguchi, Hirohito, und Hong-Gang Wang. „CHOP Is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells“. *Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 44 (Oktober 2004): 45495–502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406933200>.
- [62] Edagawa, Makoto, Junya Kawauchi, Manabu Hirata, Hiroto Goshima, Makoto Inoue, Tatsuro Okamoto, Akira Murakami, Yoshihiko Maehara, und Shigetaka Kitajima. „Role of Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Sensitization of P53-Deficient Human Colon Cancer Cells to Tumor Necrosis Factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Mediated Apoptosis through Up-Regulation of Death Receptor 5 (DR5) by Zerumbone and Celecoxib“. *Journal of Biological Chemistry* 289, Nr. 31 (August 2014): 21544–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.558890>.
- [63] Seervi, M, P K Sobhan, J Joseph, K Ann Mathew, und T R Santhoshkumar. „ERO1 α -Dependent Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Calcium Flux

- Contributes to ER Stress and Mitochondrial Permeabilization by Procaspase-Activating Compound-1 (PAC-1“*. Cell Death & Disease* 4, Nr. 12 (19. Dezember 2013): e968–e968. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.502>.
- [64] Shergalis, Andrea G., Shuai Hu, Armand Bankhead, und Nouri Neamati. „Role of the ERO1-PDI Interaction in Oxidative Protein Folding and Disease“*. Pharmacology & Therapeutics* 210 (Juni 2020): 107525. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107525>.
- [65] Han, Jaeseok, Sung Hoon Back, Junguk Hur, Yu-Hsuan Lin, Robert Gildersleeve, Jixiu Shan, Celvie L. Yuan, u. a. „ER-Stress-Induced Transcriptional Regulation Increases Protein Synthesis Leading to Cell Death“*. Nature Cell Biology* 15, Nr. 5 (Mai 2013): 481–90. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>.
- [66] Burlacu, Alexandrina. „Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins“*. Journal of Cellular and Molecular Medicine* 7, Nr. 3 (Juli 2003): 249–57. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00225.x>.
- [67] McCullough, Karen D., Jennifer L. Martindale, Lars-Oliver Klotz, Tak-Yee Aw, und Nikki J. Holbrook. „Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State“*. Molecular and Cellular Biology* 21, Nr. 4 (1. Februar 2001): 1249–59. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>.
- [68] Morris, Jill A., Andrew J. Dorner, Chris A. Edwards, Linda M. Hendershot, und Randal J. Kaufman. „Immunoglobulin Binding Protein (BiP) Function Is Required to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress but Is Not Required for the Secretion of Selective Proteins“*. Journal of Biological Chemistry* 272, Nr. 7 (Februar 1997): 4327–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4327>.
- [69] He, B. „Viruses, Endoplasmic Reticulum Stress, and Interferon Responses“*. Cell Death and Differentiation* 13, Nr. 3 (März 2006): 393–403. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401833>.
- [70] Hu, Hai, Mingxing Tian, Chan Ding, und Shengqing Yu. „The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection“*. Frontiers in Immunology* 9 (4. Januar 2019): 3083. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03083>.
- [71] Novoa, Isabel, Huiqing Zeng, Heather P. Harding, und David Ron. „Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34 -Mediated Dephosphorylation of eIF2 α “*. The Journal of Cell Biology* 153, Nr. 5 (28. Mai 2001): 1011–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1011>.
- [72] Sano, Renata, und John C. Reed. „ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms“*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, Nr. 12 (Dezember 2013): 3460–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>.
- [73] Read, Adam, und Martin Schröder. „The Unfolded Protein Response: An Overview“*. Biology* 10, Nr. 5 (29. April 2021): 384. <https://doi.org/10.3390/biology10050384>.
- [74] Shen, Jingshi, Xi Chen, Linda Hendershot, und Ron Prywes. „ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals“*. Developmental Cell* 3, Nr. 1 (Juli 2002): 99–111. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00203-4).

- [75] Kondo, Shinichi, Atsushi Saito, Rie Asada, Soshi Kanemoto, und Kazunori Imaizumi. „Physiological Unfolded Protein Response Regulated by OASIS Family Members, Transmembrane bZIP Transcription Factors“. *IUBMB Life* 63, Nr. 4 (April 2011): 233–39. <https://doi.org/10.1002/iub.433>.
- [76] Ye, Jin, Robert B Rawson, Ryutaro Komuro, Xi Chen, Utpal P Davé, Ron Prywes, Michael S Brown, und Joseph L Goldstein. „ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases That Process SREBPs“. *Molecular Cell* 6, Nr. 6 (Dezember 2000): 1355–64. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00133-7).
- [77] Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R. J. Kaufman, und R. Prywes. „Activation of ATF6 and an ATF6 DNA Binding Site by the Endoplasmic Reticulum Stress Response“. *The Journal of Biological Chemistry* 275, Nr. 35 (1. September 2000): 27013–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003322200>.
- [78] Bertolotti, Anne, Yuhong Zhang, Linda M. Hendershot, Heather P. Harding, und David Ron. „Dynamic Interaction of BiP and ER Stress Transducers in the Unfolded-Protein Response“. *Nature Cell Biology* 2, Nr. 6 (Juni 2000): 326–32. <https://doi.org/10.1038/35014014>.
- [79] Yoshida, Hiderou. „ER Stress and Diseases“. *The FEBS Journal* 274, Nr. 3 (Februar 2007): 630–58. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x>.
- [80] Shen, Xiaohua, Ronald E. Ellis, Kyungho Lee, Chuan-Yin Liu, Kun Yang, Aaron Solomon, Hiderou Yoshida, u. a. „Complementary Signaling Pathways Regulate the Unfolded Protein Response and Are Required for C. Elegans Development“. *Cell* 107, Nr. 7 (Dezember 2001): 893–903. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00612-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00612-2).
- [81] Park, Sung-Min, Tae-Il Kang, und Jae-Seon So. „Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes“. *Biomedicines* 9, Nr. 7 (8. Juli 2021): 791. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070791>.
- [82] Nishitoh, Hideki, Atsushi Matsuzawa, Kei Tobiume, Kaoru Saegusa, Kohsuke Takeda, Kiyoshi Inoue, Seiji Hori, Akira Kakizuka, und Hidenori Ichijo. „ASK1 Is Essential for Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Cell Death Triggered by Expanded Polyglutamine Repeats“. *Genes & Development* 16, Nr. 11 (1. Juni 2002): 1345–55. <https://doi.org/10.1101/gad.992302>.
- [83] Zhang, Jinxi, Yue Zhang, Xue Qi, Yuan Cui, Xiaoming Chen, und Hongjin Lin. „TRAF2/ASK1/JNK Signaling Pathway Is Involved in the Lung Apoptosis of Swine Induced by Cadmium Exposure“. *Biological Trace Element Research* 200, Nr. 6 (Juni 2022): 2758–66. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02860-6>.
- [84] Morris, G., A. J. Walker, M. Berk, M. Maes, und B. K. Puri. „Cell Death Pathways: A Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists“. *Molecular Neurobiology* 55, Nr. 7 (Juli 2018): 5767–86. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0793-y>.
- [85] Yoneda, Takunari, Kazunori Imaizumi, Kayoko Oono, Daishi Yui, Fumi Gomi, Taiichi Katayama, und Masaya Tohyama. „Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2-Dependent Mechanism in Response to the ER Stress“. *Journal of Biological Chemistry* 276, Nr. 17 (April 2001): 13935–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010677200>.
- [86] Morishima, Nobuhiro, Keiko Nakanishi, Hiromi Takenouchi, Takehiko Shibata, und Yukuto Yasuhiko. „An Endoplasmic Reticulum Stress-Specific Caspase

- Cascade in Apoptosis“. *Journal of Biological Chemistry* 277, Nr. 37 (September 2002): 34287–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204973200>.
- [87] Cnop, Miriam, Laurence Ladriere, Paul Hekerman, Fernanda Ortis, Alessandra K. Cardozo, Zeynep Dogusan, Daisy Flamez, Michael Boyce, Junying Yuan, und Decio L. Eizirik. „Selective Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α Dephosphorylation Potentiates Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Causes Pancreatic β -Cell Dysfunction and Apoptosis“. *Journal of Biological Chemistry* 282, Nr. 6 (Februar 2007): 3989–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607627200>.
- [88] Harding, Heather P., Yuhong Zhang, Donalyn Scheuner, Jane-Jane Chen, Randal J. Kaufman, und David Ron. „Ppp1r15 Gene Knockout Reveals an Essential Role for Translation Initiation Factor 2 Alpha (eIF2 α) Dephosphorylation in Mammalian Development“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, Nr. 6 (10. Februar 2009): 1832–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809632106>.
- [89] Sengupta, Surojeet, Catherine M. Seigny, Poulomi Bhattacharya, V. Craig Jordan, und Robert Clarke. „Estrogen-Induced Apoptosis in Breast Cancers Is Phenocopied by Blocking Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha (eIF2 α) Protein“. *Molecular Cancer Research* 17, Nr. 4 (1. April 2019): 918–28. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0481>.
- [90] Matsuoka, Masato, und Yuta Komoike. „Experimental Evidence Shows Salubrinal, an eIF2 α Dephosphorylation Inhibitor, Reduces Xenotoxicant-Induced Cellular Damage“. *International Journal of Molecular Sciences* 16, Nr. 7 (17. Juli 2015): 16275–87. <https://doi.org/10.3390/ijms160716275>.
- [91] Chun-Lei, Liu, Li Xin, Hu Guo-Liang, Li Rui-Jun, He Yun-Yun, Zhong Wu, Li Song, He Kun-Lun, und Wang Li-Li. „Salubrinal Protects against Tunicamycin and Hypoxia Induced Cardiomyocyte Apoptosis via the PERK-eIF2 α Signaling pathwaySalubrinal Protects against Tunicamycin and Hypoxia Induced Cardiomyocyte Apoptosis via the PERK-eIF2 α Signaling Pathway: Salubrinal Protects against Tunicamycin and Hypoxia Induced Cardiomyocyte Apoptosis via the PERK-eIF2 α Signaling pathwaySalubrinal Protects against Tunicamycin and Hypoxia Induced Cardiomyocyte Apoptosis via the PERK-eIF2 α Signaling Pathway“. *Journal of Geriatric Cardiology* 9, Nr. 3 (27. November 2012): 258–68. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1263.2012.02292>.
- [92] Bryant, Kevin F., Elizabeth R. Macari, Natasha Malik, Michael Boyce, Junying Yuan, und Donald M. Coen. „ICP34.5-Dependent and -Independent Activities of Salubrinal in Herpes Simplex Virus-1 Infected Cells“. *Virology* 379, Nr. 2 (September 2008): 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.028>.
- [93] Boyce, Michael, Kevin F. Bryant, Céline Jousse, Kai Long, Heather P. Harding, Donalyn Scheuner, Randal J. Kaufman, u. a. „A Selective Inhibitor of eIF2 α Dephosphorylation Protects Cells from ER Stress“. *Science* 307, Nr. 5711 (11. Februar 2005): 935–39. <https://doi.org/10.1126/science.1101902>.
- [94] Doroghazi, James R., Kou-San Ju, Daren W. Brown, David P. Labeda, Zixin Deng, William W. Metcalf, Wenqing Chen, und Neil P. J. Price. „Genome Sequences of Three Tunicamycin-Producing Streptomyces Strains, S. Chartreusis NRRL 12338, S. Chartreusis NRRL 3882, and S. Lysosuperificus ATCC 31396“. *Journal of Bacteriology* 193, Nr. 24 (15. Dezember 2011): 7021–22. <https://doi.org/10.1128/JB.06262-11>.

- [95] Al-Dabbagh, Bayan, Dominique Mengin-Lecreulx, und Ahmed Bouhss. „Purification and Characterization of the Bacterial UDP-GlcNAc:Undecaprenyl-Phosphate GlcNAc-1-Phosphate Transferase WecA“. *Journal of Bacteriology* 190, Nr. 21 (November 2008): 7141–46. <https://doi.org/10.1128/JB.00676-08>.
- [96] Lukose, Vinita, Lingqi Luo, Dima Kozakov, Sandor Vajda, Karen N. Allen, und Barbara Imperiali. „Conservation and Covariance in Small Bacterial Phosphoglycosyltransferases Identify the Functional Catalytic Core“. *Biochemistry* 54, Nr. 50 (22. Dezember 2015): 7326–34. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01086>.
- [97] Yamamoto, Kazuki, und Satoshi Ichikawa. „Tunicamycin: Chemical Synthesis and Biosynthesis“. *The Journal of Antibiotics* 72, Nr. 12 (Dezember 2019): 924–33. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0200-1>.
- [98] Yoo, Jiho, Ellene H. Mashalidis, Alvin C. Y. Kuk, Kazuki Yamamoto, Benjamin Kaeser, Satoshi Ichikawa, und Seok-Yong Lee. „GlcNAc-1-P-Transferase–Tunicamycin Complex Structure Reveals Basis for Inhibition of N-Glycosylation“. *Nature Structural & Molecular Biology* 25, Nr. 3 (März 2018): 217–24. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0031-y>.
- [99] Abdullahi, Abdikarim, Mile Stanojic, Alexandra Parousis, David Patsouris, und Marc G. Jeschke. „Modeling Acute ER Stress in Vivo and in Vitro“. *Shock* 47, Nr. 4 (April 2017): 506–13. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000759>.
- [100] Onkopedia. „Hepatozelluläres Karzinom (HCC)“. Connector. Zugegriffen 22. Dezember 2024. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/hepatozellulaeres-karzinom-hcc>.
- [101] Ally, Adrian, Miruna Balasundaram, Rebecca Carlsen, Eric Chuah, Amanda Clarke, Noreen Dhalla, Robert A. Holt, u. a. „Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma“. *Cell* 169, Nr. 7 (Juni 2017): 1327-1341.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.046>.
- [102] Moon, Hyuk, Hyunjung Park, und Simon Weonsang Ro. „C-Myc-Driven Hepatocarcinogenesis“. *Anticancer Research* 41, Nr. 10 (Oktober 2021): 4937–46. <https://doi.org/10.21873/anticancer.15307>.
- [103] Sun, Eun Jin, Miriam Wankell, Pranavan Palamuthusingam, Craig McFarlane, und Lionel Hebbard. „Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma“. *Biomedicine* 9, Nr. 11 (8. November 2021): 1639. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9111639>.
- [104] García-Gutiérrez, Lucía, María Dolores Delgado, und Javier León. „MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes“. *Genes* 10, Nr. 3 (22. März 2019): 244. <https://doi.org/10.3390/genes10030244>.
- [105] Tu, William B., Sara Helander, Robert Pilstål, K. Ashley Hickman, Corey Lourenco, Igor Jurisica, Brian Raught, Björn Wallner, Maria Sunnerhagen, und Linda Z. Penn. „Myc and Its Interactors Take Shape“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849, Nr. 5 (Mai 2015): 469–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.06.002>.
- [106] Yang, Wei-Lei, Ching-Yuan Wu, Juan Wu, und Hui-Kuan Lin. „Regulation of Akt Signaling Activation by Ubiquitination“. *Cell Cycle* 9, Nr. 3 (Februar 2010): 486–97. <https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10508>.
- [107] Schild, Carolin, Matthias Wirth, Maximilian Reichert, Roland M. Schmid, Dieter Saur, und Günter Schneider. „PI3K Signaling Maintains C-myc

- Expression to Regulate Transcription of E2F1 in Pancreatic Cancer Cells“. *Molecular Carcinogenesis* 48, Nr. 12 (Dezember 2009): 1149–58. <https://doi.org/10.1002/mc.20569>.
- [108] Barr, L. F., S. E. Campbell, B. S. Bochner, und C. V. Dang. „Association of the Decreased Expression of Alpha3beta1 Integrin with the Altered Cell: Environmental Interactions and Enhanced Soft Agar Cloning Ability of c-Myc-Overexpressing Small Cell Lung Cancer Cells“. *Cancer Research* 58, Nr. 23 (1. Dezember 1998): 5537–45.
- [109] Hoffman, B, und D A Liebermann. „Apoptotic Signaling by C-MYC“. *Oncogene* 27, Nr. 50 (27. Oktober 2008): 6462–72. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312>.
- [110] Evan, Gerard I., Andrew H. Wyllie, Christopher S. Gilbert, Trevor D. Littlewood, Hartmut Land, Mary Brooks, Catherine M. Waters, Linda Z. Penn, und David C. Hancock. „Induction of Apoptosis in Fibroblasts by C-Myc Protein“. *Cell* 69, Nr. 1 (April 1992): 119–28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90123-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90123-T).
- [111] Yeh, Elizabeth S., George K. Belka, Ann E. Vernon, Chien-Chung Chen, Jason J. Jung, und Lewis A. Chodosh. „Hunk Negatively Regulates C-Myc to Promote Akt-Mediated Cell Survival and Mammary Tumorigenesis Induced by Loss of *Pten*“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, Nr. 15 (9. April 2013): 6103–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217415110>.
- [112] Xin, B, M Yamamoto, K Fujii, T Ooshio, X Chen, Y Okada, K Watanabe, N Miyokawa, H Furukawa, und Y Nishikawa. „Critical Role of Myc Activation in Mouse Hepatocarcinogenesis Induced by the Activation of AKT and RAS Pathways“. *Oncogene* 36, Nr. 36 (September 2017): 5087–97. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.114>.
- [113] De Salvo, Maria, Giovanna Maresca, Igea D’agnano, Rodolfo Marchese, Antonio Stigliano, Raffaella Gagliassi, Ercole Brunetti, Giorgio H. Raza, Ugo De Paula, und Barbara Bucci. „Temozolomide Induced C-Myc-Mediated Apoptosis via Akt Signalling in MGMT Expressing Glioblastoma Cells“. *International Journal of Radiation Biology* 87, Nr. 5 (Mai 2011): 518–33. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.556173>.
- [114] Burwick, Nicholas, und Bertal H. Aktas. „The eIF2-Alpha Kinase HRI: A Potential Target beyond the Red Blood Cell“. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21, Nr. 12 (Dezember 2017): 1171–77. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1397133>.
- [115] Misra, Jagannath, Kenneth R. Carlson, Dan F. Spandau, und Ronald C. Wek. „Multiple Mechanisms Activate GCN2 eIF2 Kinase in Response to Diverse Stress Conditions“. *Nucleic Acids Research* 52, Nr. 4 (28. Februar 2024): 1830–46. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae006>.
- [116] Friend, Kyle, Hunter A. Brooks, Nicholas E. Propson, James A. Thomson, und Judith Kimble. „Embryonic Stem Cell Growth Factors Regulate eIF2 α Phosphorylation“. Herausgegeben von Johnson Rajasingh. *PLOS ONE* 10, Nr. 9 (25. September 2015): e0139076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139076>.
- [117] Zhao, Xiaofang, Chunyan Zhang, Hong Zhou, Bin Xiao, Ying Cheng, Jinju Wang, Fuli Yao, u. a. „Synergistic Antitumor Activity of the Combination of Salubrinal and Rapamycin against Human Cholangiocarcinoma Cells“. *Oncotarget* 7, Nr. 51 (20. Dezember 2016): 85492–501.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.13408>.

- [118] Chen, Mei-Chun, Li-Lin Hsu, Sheng-Fan Wang, Yi-Ling Pan, Jeng-Fan Lo, Tien-Shun Yeh, Ling-Ming Tseng, und Hsin-Chen Lee. „Salubrial Enhances Cancer Cell Death during Glucose Deprivation through the Upregulation of xCT and Mitochondrial Oxidative Stress“. *Biomedicines* 9, Nr. 9 (28. August 2021): 1101. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091101>.
- [119] Espadas, Isabel, María Ángeles Cáliz-Molina, Raúl López-Fernández-Sobrino, Concepción Panadero-Morón, Alejandro Sola-García, Mario Soriano-Navarro, Enrique Martínez-Force, u. a. „Hydroxycitrate Delays Early Mortality in Mice and Promotes Muscle Regeneration While Inducing a Rich Hepatic Energetic Status“. *Aging Cell* 23, Nr. 9 (September 2024): e14205. <https://doi.org/10.1111/acel.14205>.

11. Eigenständigkeitserklärung

Diese Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Nisar P. Malek von 2018 bis 2025 angefertigt.

Die Planung und der Aufbau der Versuche wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Mathias Riebold, einem Postdoc der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Malek, durchgeführt.

Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die Transduktion der Aml12 Zellen zur Herstellung der verschiedenen Zelllinien erfolgte durch Dr. Mathias Riebold. Zusätzlich wurden die Western Blots von Dr. Przemyslaw Bozko durchgeführt.

Ich versichere, dass dieses Manuskript von mir selbstständig verfasst wurde und nur die von mir angegebenen Quellen verwendet wurden.

Tübingen, den 03.04.2025

12. Danksagung

Hiermit möchte ich meine tiefempfundene Dankbarkeit allen Personen ausdrücken, welche mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Malek bedanken, welcher mich als seinen Doktoranden annahm und mir somit ermöglichte, meinen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern. Ebenfalls brachte er mich durch konstruktive Kritik und hilfreiche Vorschläge zur Durchführung dieser Arbeit immer weiter voran.

Großer Dank gebührt ebenfalls Dr. Mathias Riebold. Einerseits für sein großes Engagement und seine große Geduld während meiner Einarbeitungszeit und andererseits für seine dauerhafte Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Experimente.

Zusätzlich möchte ich noch dem wissenschaftlichen Mitarbeiter Sebastian Reuter für die dauerhafte Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Arbeit und die aufmunternden Gespräche nach einem langen Arbeitstag danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie – insbesondere meinen Eltern Andreas und Ulrike Kohlenbach – und meinen Freunden, welche mich in dieser lehrreichen, aber auch sehr anstrengenden Zeit immer unterstützt haben und mir in schweren Phasen beistanden.