

**Die Rolle zellulärer Stressantworten
bei der Chemoresistenz gegenüber
5-Fluorurazil**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht beim Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Kähler

aus Lutherstadt Wittenberg



2013

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.04.2009 bis 31.05.2013 angefertigt
in der Arbeitsgruppe „Neurodegenerative Disorders“ unter Leitung von
Dr. Sylvia Krobitsch
am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: 05.06.2014

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ich versichere außerdem, dass diese Arbeit weder in dieser noch in anderer Form bei einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, den 31.05.2013

Christian Kähler

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Hans Lehrach für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Doktorarbeit anfertigen zu können. Besonders danke ich Prof. Dr. Rupert Mutzel dafür, dass er spontan das Zweitgutachten übernommen hat.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Sylvia Krobitch für die Betreuung meiner Projekte und die große Unterstützung während der gesamten Zeit.

Auch bei der gesamten Arbeitsgruppe „Neurodegenerative Disorders“ einschließlich aktueller wie auch zahlreicher ehemaliger Mitglieder möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Im Speziellen danke ich Dr. Ute Nonhoff, von deren Erfahrungsschatz ich sehr profitieren konnte. Auch Dr. Christian Linke und Dr. Guifré Ruiz haben mir die Zeit am Institut durch ihre Ratschläge und sehr erleichtert.

Überaus dankbar bin ich zudem für die Hilfe und den Rückhalt, für die Silke Wehrmeyer in jeder Situation verfügbar war.

Ich danke außerdem den zahlreichen Studenten, speziell Markus Terrey, Elisabeth Pfrommer und Büzra Selin Kenet, die im Rahmen ihrer Abschlussarbeit oder einer Mitarbeit ihren Teil zum Gelingen der Projekte beigetragen haben.

Dr. Jörg Isensee, Beatrix Fauler und Dr. Andrea Wunderlich bin ich für ihre wertvollen Beiträge zu Kollaborationen innerhalb des Instituts sehr dankbar.

Schließlich möchte ich mich bei Anika Günther sowie bei meiner Familie bedanken, deren starker Rückhalt mir diese Arbeit sehr erleichtert hat.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/ Summary	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Krebserkrankungen.....	5
1.2 Chemotherapie	7
1.3 Rolle der zellulären Stressantwort bei Krebs	9
1.3.1 Zelluläre Veränderungen unter Stressbedingungen	9
1.3.2 Transkriptionelle Regulation der Stressantwort	10
1.3.3 Translationaler Arrest und Stress- <i>granule</i> -Bildung	13
1.4 Zusammenspiel von Stress-<i>granules</i> und P-<i>bodies</i>	17
1.5 Bedeutung von Stress-<i>granules</i> bei Erkrankungen.....	20
1.5.1 Stress- <i>granules</i> bei neurologischen Erkrankungen	20
1.5.2 Stress- <i>granules</i> bei Virusinfektionen	21
1.5.3 Stress- <i>granules</i> bei der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika	23
1.6 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Verwendete Materialien.....	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Lösungen und Medien.....	30
2.1.3 Geräte und sonstige Materialien	32
2.1.4 Bakterien und Hefestämme.....	34
2.1.5 Humane Zelllinien	35
2.1.6 Plasmide und siRNAs	36
2.1.7 Primer	36
2.1.8 Antikörper und RNA-Sonden.....	37

2.1.9 Enzyme.....	38
2.2 Methoden	38
2.2.1 DNA-Präparation.....	38
2.2.2 Analyse von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2.1 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2.2 Wachstumsanalysen von <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.2.3 Plasmidtransformation in <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.3 Zellkultur	41
2.2.3.1 Lagerung von humanen Zelllinien.....	41
2.2.3.2 Kultivierung von humanen Zellen.....	41
2.2.3.3 Inkubation mit Chemotherapeutika	41
2.2.3.4 Transfektion mit <i>small interfering RNAs</i>	42
2.2.3.5 Stressinduktion.....	42
2.2.3.6 Proliferationsmessung.....	42
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie	43
2.2.4.1 Immunfluoreszenz-Markierung	43
2.2.4.2 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	43
2.2.5 Automatisierte Mikroskopie	44
2.2.5.1 Immunfluoreszenz-Markierung	44
2.2.5.2 Automatische Bildaufnahmen	44
2.2.6 Elektronenmikroskopie.....	45
2.2.6.1 Epon-Einbettung.....	45
2.2.6.2 LR-Gold-Einbettung und Immunmarkierung	46
2.2.7 Durchflusszytometrie	46
2.2.8 Proteinanalysen	47
2.2.8.1 Zellyse und Proteinbestimmung.....	47
2.2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
2.2.8.3 Coomassie-Gelfärbung.....	48
2.2.8.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran.....	48

2.2.8.5 Immunologischer Nachweis von transferierten Proteinen	49
2.2.9 qRT-PCR	49
2.2.9.1 RNA-Isolierung	49
2.2.9.2 Reverse Transkription	50
2.2.9.3 Analyse des mRNA-Levels	50
3 Ergebnisse	53
3.1 Identifizierung potentieller 5-FU-Resistenzwege in <i>S. cerevisiae</i>	53
3.1.1 Globale Analyse potentieller Resistenzwege in <i>S. cerevisiae</i>	53
3.1.2 Zusammenhang von 5-FU-Resistenzwegen und der Bildung von Stress- <i>granules</i> und <i>P-bodies</i>	58
3.2 Untersuchung der Auswirkungen von 5-FU auf humane Zellen	61
3.2.1 Auswirkungen von 5-FU auf die Stress- <i>granule</i> -Bildung in HeLa-Zellen	61
3.2.2 Quantifizierung der Stress- <i>granule</i> -Induktion durch 5-FU	63
3.2.3 Auswirkungen von 5-FU auf die Stress- <i>granule</i> -Bildung in verschiedenen Zelllinien	65
3.2.4 Zusammensetzung von Stress- <i>granules</i> bei 5-FU-Behandlung	67
3.2.5 Auswirkungen von 5-FU auf die Stress- <i>granule</i> -Bildung unter Stressbedingungen	69
3.2.6 Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von <i>P-bodies</i> sowie auf das Zytoskelett	71
3.3 Charakterisierung der 5-FU-induzierten Stress-<i>granule</i>-Bildung	74
3.3.1 Auswirkungen von 5-FU auf die Expression von Stress- <i>granule</i> - und <i>P-body</i> -Komponenten	74
3.3.2 Rolle der translationellen Regulation bei der 5-FU-induzierten Stress- <i>granule</i> -Bildung	76
3.3.3 Zeitverlauf der Auflösung von 5-FU-induzierten Stress- <i>granules</i>	79
3.3.4 Einfluss von 5-FU-induzierten Stress- <i>granules</i> auf die Sensitivität gegenüber 5-FU	81
3.3.5 Untersuchung der Ultrastruktur von Stress- <i>granules</i>	82

3.3.6 Untersuchung von 5-FU-induzierten <i>Stress-granules</i> auf Merkmale von Proteinaggregaten	85
3.4 Untersuchung der Mechanismen der 5-FU-induzierten <i>Stress-granule</i>-Bildung.....	87
3.4.1 Auswirkungen der 5-FU-Inkorporation in RNA und DNA auf die <i>Stress-granule</i> -Bildung	88
3.4.2 Untersuchung RNA-abhängiger Auswirkungen von 5-FU.....	90
3.4.2.1 RNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von <i>Stress-granules</i>	90
3.4.2.2 RNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU auf die Zytotoxizität	92
3.4.2.3 RNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von <i>P-bodies</i>	93
3.4.3 RNA-abhängige Effekte weiterer Chemotherapeutika auf die <i>Stress-granule</i> -Bildung	94
3.5 Untersuchung der Auswirkungen von 5-FU in Kombination mit anderen Chemotherapeutika	97
3.5.1 Gemeinsamkeiten im Metabolismus von Gemcitabin und 5-FU	97
3.5.2 Auswirkungen einer Kombination von Gemcitabin und 5-FU auf die <i>Stress-granule</i> -Bildung	98
3.5.3 Einfluss der Ribonukleotidreduktase auf die 5-FU-induzierte <i>Stress-granule</i> -Bildung	102
3.5.4 Auswirkungen einer Kombination von Selenit und 5-FU auf die <i>Stress-granule</i> -Bildung	104
3.6 Untersuchungen zur Rolle von HSF1 bei den Wirkmechanismen von 5-FU.....	106
3.6.1 Einfluss von Transkriptionsregulatoren auf die Bildung von <i>Stress-granules</i> und <i>P-bodies</i>	106
3.6.2 Einfluss von HSF1 auf die 5-FU-induzierte Bildung von <i>Stress-granules</i>	109
3.6.3 Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von nukleären <i>Stress-bodies</i>	111

4 Diskussion	115
4.1 5-FU führt zur <i>de novo</i>-Bildung von Stress-<i>granules</i> in Hefezellen und humanen Zellen	115
4.2 Die 5-FU-induzierte Stress-<i>granule</i>-Bildung kann der Apoptose entgegenwirken.....	120
4.3 5-FU führt zu vermehrter P-<i>body</i>-Bildung	122
4.4 5-FU führt zu verzögerter Auflösung von Stress-<i>granules</i>.....	124
4.5 RNA-Inkorporation von 5-FU ist für die Induktion von Stress-<i>granules</i> verantwortlich.....	126
4.6 HSF1 ist ein negativer Regulator der Stress-<i>granule</i>- und P-<i>body</i>- Bildung bei 5-FU-Behandlung	128
4.7 Zusammenspiel verschiedener 5-FU-induzierter zellulärer Stressantworten	131
Literaturverweise.....	133
Abkürzungsverzeichnis	167
Lebenslauf	169
Verzeichnis der Publikationen	171

Zusammenfassung

Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika schränken die Effektivität der Chemotherapie bei Krebserkrankungen häufig stark ein. Daher ist die Aufklärung der Mechanismen, die zur Ausbildung solcher Resistenzen führen, von großer Bedeutung. Hierzu wird vor allem die Bäckerhefe *S. cerevisiae* eingesetzt, da sie sich aufgrund ihrer Homologie zum Menschen und ihrer simplen Genetik hervorragend zur Untersuchung von Resistenzwegen eignet.

Deshalb war es das Ziel, zunächst in einer globalen Analyse Gene zu identifizieren, die eine Resistenz gegenüber 5-Fluorurazil (5-FU) vermitteln, das als Standardtherapie bei verschiedenen soliden Tumoren eingesetzt wird. In dieser Analyse wurden 65 5-FU-sensitive Deletionsstämme identifiziert, von denen 27 bereits publiziert worden sind. Die identifizierten Gene sind vor allem in die RNA-Prozessierung und Translation involviert. Darüber hinaus wurden auch Deletionsstämme identifiziert, die für Komponenten von *Stress-granules* (SGs) oder *P-bodies* (PBs) defizient sind. Außerdem ließ sich zeigen, dass 5-FU in Hefezellen die *de novo*-Bildung von SGs induziert. Des Weiteren wurde die PB-Bildung durch 5-FU verstärkt.

Diese Beobachtungen in Hefezellen ließen sich auch in humanen Zellen bestätigen. So zeigten auch 5-FU-behandelte HeLa-Zellen eine *de novo*-Bildung von SGs, die zentrale Markerproteine von *bona fide* SGs enthielten. Darüber hinaus wurde die SG-Bildung unter Stressbedingungen sowie die Bildung von PBs durch 5-FU verstärkt. Die SG-Induktion ging mit der Phosphorylierung von eIF2 α einher und ließ sich auch in weiteren Zelllinien aufzeigen. Da die 5-FU-induzierten SGs außerdem den Apoptose-Regulator RACK1 rekrutierten, könnten sie sich zytoprotektiv auswirken und den toxischen Effekten von 5-FU entgegenwirken.

Eine weitergehende Charakterisierung der 5-FU-induzierten SGs zeigte, dass diese sehr beständig waren und sich daher über einen langen Zeitraum hinweg nicht auflösten. Damit einhergehend wiesen sie eine sehr dichte Ultrastruktur auf. Zudem war die Sensitivität von Zellen gegenüber 5-FU durch die Bildung von SGs verringert, was auf eine Rolle der SGs bei der Resistenz gegenüber 5-FU hindeutet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inkorporation von 5-FU in RNA verantwortlich ist für die Induktion von SGs. Dementsprechend lösten auch andere RNA-inkorporierende chemotherapeutische Substanzen wie Azacytidin oder Thioguanin die SG-Bildung aus. Hingegen führten Chemotherapeutika wie Trifluor-thymidin oder Gemzitabin, die hauptsächlich in DNA eingebaut werden, zu einer

vermehrten PB-Bildung. Gemcitabin wird oft in Kombinationstherapie mit 5-FU eingesetzt. Obwohl Gemcitabin allein keinen Einfluss auf SGs hatte, wurde hingegen in Kombination mit 5-FU die SG-Bildung verstärkt.

Außerdem verstärkte 5-FU unter Stressbedingungen auch die Bildung von nukleären Stress-*bodies* (nSBs), die den Hitzeschockfaktor HSF1 enthalten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass HSF1 ein negativer Regulator der SG- und PB-Bildung ist und somit auch die Auswirkungen von 5-FU auf SGs und PBs beeinflusst, was wiederum eine Bedeutung von HSF1 für die Chemoresistenz nahelegt.

Sowohl die Induktion von SGs als auch die vermehrte Bildung von PBs und nSBs durch 5-FU könnten protektive Mechanismen darstellen, die das Überleben von Krebszellen bei der Chemotherapie ermöglichen und so deren Wirksamkeit einschränken. Weitere Untersuchungen der zellulären Prozesse könnten somit potentielle Ziele für eine effektivere Therapie aufdecken.

Summary

Resistance to chemotherapeutic agents often severely limits the efficiency of chemotherapy for cancer. Therefore, the elucidation of mechanisms leading to the development of such chemoresistance is of great importance. For this, the baker's yeast *S. cerevisiae* is primarily used because it is excellently suited to study resistance pathways due to its homology to human and its simple genetics. Therefore, the goal was to first identify in a global analysis genes which confer resistance to 5-fluorouracil (5-FU), which is used as standard therapy in various solid tumors. In this analysis, 65 5-FU-sensitive deletion strains were identified, of which 27 have already been published. The genes identified are involved mainly in RNA processing and translation. In addition, deletion strains deficient for components of stress granules (SGs) or P bodies (PBs) were identified. Besides that, it was demonstrated that 5-FU induces the *de novo* formation of SGs in yeast cells. Moreover, the PB formation was enhanced by 5-FU.

These observations in yeast cells could also be confirmed in human cells. 5-FU-treated HeLa cells exhibited the *de novo* formation of SGs containing central marker proteins of *bona fide* SGs. In addition, the SG formation under stress conditions as well as the formation of PBs was enhanced by 5-FU. The SG induction was accompanied by the phosphorylation of eIF2 α and was also demonstrated in other cell lines. Since the 5-FU-induced SGs also recruited the apoptotic regulator RACK1, they could be cytoprotective and thus counteract the toxic effects of 5-FU.

A further characterization of the 5-FU-induced SGs showed that they were very durable and thus did not dissolve over a long time period. Concomitantly, they exhibited a very dense ultrastructure. In addition, the sensitivity of cells to 5-FU was reduced by the formation of SGs, suggesting a role of SGs in the resistance to 5-FU.

Furthermore, it was shown that the incorporation of 5-FU into RNA is responsible for the induction of SGs. Accordingly, other RNA-incorporated chemotherapeutic agents such as azacytidine or thioguanine induced SG formation. However, chemotherapeutics such as trifluorothymidine or gemcitabine, mainly incorporated into DNA, led to increased PB formation. Gemcitabine is often used in combination therapy with 5-FU. Although gemcitabine alone had no effect SGs, the formation of SGs was enhanced in combination with 5-FU.

In addition, under stress conditions 5-FU also increased the formation of nuclear stress bodies (nSBs) containing the heat shock factor HSF1. It could also be demonstrated that HSF1 is a negative regulator of SG and PB formation and thus also modulates the effects of 5-FU on SGs and PBs, suggesting a role of HSF1 in chemoresistance.

Both the induction of SGs by 5-FU and the increased formation of PBs as well as nSBs could represent protective mechanisms allowing the survival of cancer cells during chemotherapy and thereby restricting its efficiency. Further investigation into these cellular processes could thus reveal potential targets for more effective therapy.

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stellen heutzutage eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. 2008 wurden weltweit 12,7 Mio. Krebsfälle diagnostiziert, während 7,6 Mio. Menschen in Folge von Krebserkrankungen starben [1]. Diese sind damit für etwa 13 % aller Todesfälle weltweit verantwortlich.

Krebserkrankungen sind eine Zusammenfassung von malignen Neoplasien- also bösartigen Gewebsneubildungen- in verschiedenen Organen, die sich recht stark voneinander unterscheiden können. Entsprechend der betroffenen Organe und Gewebe existieren mehr als 200 verschiedene Krebsarten. Sie werden nach dem Zelltyp eingeteilt in Karzinome (abgeleitet von Epithelzellen), Sarkome (abgeleitet von Mesenchymzellen des Bindegewebes), Lymphome und Leukämien (abgeleitet von blutbildenden Zellen) sowie Blastome (abgeleitet von Vorläuferzellen) und Tumore der Keimzellen. Bei der Häufigkeit der Krebsarten treten geschlechtsspezifische Unterschiede auf. So sind die am häufigsten auftretenden Krebsfälle weltweit bei Frauen Brustkrebs gefolgt von Kolorektal-, Uterus- und Lungenkrebs, während bei Männern Lungenkrebs knapp vor Prostata-, Kolorektal- und Magenkrebs die Statistiken anführt [1].

Die Krebsentwicklung umfasst die Transformation von Zellen, die Tumorprogression und die Metastasierung. Im Folgenden sind die Schritte der Tumorigenese und deren Schlüsselmerkmale dargestellt [2]:

Die Regulation des Wachstums von Zellen durch verschiedene Signalwege ist in Krebszellen in der Regel beeinträchtigt. Auf diese Weise erlangen Krebszellen die Fähigkeit zur anhaltenden Proliferation. Durch beispielsweise eine erhöhte Expression von Rezeptoren oder eine autokrine Stimulation mit Liganden kann die proliferative Wirkung von Wachstumsfaktoren verstärkt werden [3]. Darüber hinaus können auch beteiligte Signalwege dereguliert sein. So sind bei Krebs durch Mutationen in B-Raf oder PI3K (Phosphatylinositol-3-kinase) die entsprechenden MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)- bzw. Akt-Signalwege oft verstärkt. Auch ein Verlust der negativen Rückkopplung dieser Signalwege durch Mutationen von Ras bzw. PTEN (Phosphatase- und Tensin-Homolog) verstärkt die Proliferation und Tumorigenese.

Oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kann zudem die MAPK/AP-1-, NF- κ B- und Akt-Signalwege aktivieren und so die Zellproliferation verstärken [4, 5]. Zusätzlich entgehen Krebszellen einer Wachstumskontrolle durch weitere Signalwege. Tumorsuppressoren wie Rb (Retinoblastoma-Protein) oder p53 regulieren den Zellzyklusarrest als Antwort auf externe und interne Signale [6]. Außerdem verhindert die „Kontaktinhibition“ durch Signale an Zell-Zell-Verbindungen eine übermäßige Zellproliferation [7]. Eine Beeinträchtigung dieser Signalwege führt daher zu einem ungehinderten Wachstum.

Zudem sind Krebszellen weitgehend resistent gegenüber apoptotischen Prozessen, die durch fehlregulierte Signalwege oder akkumulierte DNA-Schäden ausgelöst werden. Extrazelluläre Fas-Rezeptor-vermittelte Signale führen wie auch intrazelluläre Signale zur Aktivierung von Initiatorcaspasen, die daraufhin Effektorcaspasen spalten und aktivieren und so die Apoptose auslösen. Intrazelluläre Auslöser führen zur Freisetzung von Bax und Bak durch Bcl-2, die daraufhin die Auflösung der äußeren Mitochondrienmembran und die Freisetzung von Cytochrom c bewirken [8]. Krebszellen weisen entsprechend meist eine erhöhte Expression antiapoptotischer Regulatoren wie Bcl-2 bzw. eine verringerte Expression proapoptotischer Proteine wie Bax auf. Bcl-2 reguliert durch Interaktion mit Beclin-1 auch Autophagie-Signalwege, die bei Krebs beeinträchtigt sein können [9].

Normalerweise gehen Zellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen in den nicht-proliferativen Zustand der Seneszenz und später in die Apoptose über. Die Telomere werden bei jeder Zellteilung verkürzt und ihre Länge bestimmt so die Fähigkeit zu weiteren Teilungen. Krebszellen sind hingegen immortalisiert, also zu unbegrenzter Zellteilung befähigt [10]. Durch die verzögerte Expression von Telomerase können sie die telomerische DNA aufrechterhalten. Zunächst führt die fehlende Telomerase-Expression auch in Krebszellen zur Chromosomeninstabilität [11]. Außerdem werden durch Fehlfunktion von Prozessen zur Aufrechterhaltung und Reparatur von DNA weitreichende Mutationen angesammelt [12]. Oxidativer Stress trägt zur Tumorgenese durch vermehrte Mutationen bei, indem Hydroxylradikale die Entstehung von 8-Hydroxyguanosin-DNA verstärken [13].

Während der Tumorprogression wird außerdem die Angiogenese induziert. Die Neubildung von Blutgefäßen wird durch verstärkte Expression des vaskulären epithelialen Wachstumsfaktors (VEGF) durch den Hypoxie-induzierenden Faktor HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen stimuliert und so die Versorgung des Tumors sichergestellt [14]. ROS stabilisieren HIF-1 α und verstärken so die Angiogenese [15]. Zugleich reprogrammieren Krebszellen ihren Stoffwechsel, so dass sie vermehrt

Glukose aufnehmen und Energie vorrangig durch Glykolyse gewinnen (Warburg-Effekt). Somit stehen mehr Metabolite für die anabolen Wege unter verstärktem Wachstum zur Verfügung [16-18].

Die Invasion und Metastasierung ist eine Kaskade von Schritten, die durch unkontrollierte Proliferation zur Entstehung eines primären Tumors führt, der daraufhin in umliegendes Gewebe eindringen und letztlich durch Verbreitung im Blutssystem sekundäre Tumoren (Metastasen) ausbilden kann [19]. Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug und Twist regulieren die so genannte „epithelial-mesenchymale Transition“ (EMT), bei der durch verringerte Expression von Zelladhäsionsproteine wie E-Cadherin die Anhaftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix geschwächt und diese außerdem durch verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) abgebaut wird [20, 21]. Die Expression von MMPs wird auch durch ROS wie beispielsweise Wasserstoffperoxid stimuliert [22]. Durch Signale von umliegenden Zellen können sich Metastasen schließlich an ihre „Tumor-Mikroumgebung“ anpassen und weiter wachsen [23]. Zudem werden Tumore im Zuge inflammatorischer Prozesse von verschiedenen Immunzellen infiltriert, die durch Freisetzung von ROS weitere Mutationen auslösen, durch weitere Signalstoffe aber auch die Proliferation, Invasion und Angiogenese beeinflussen können [24]. Gleichzeitig entgehen Tumorzellen jedoch der Erkennung durch das Immunsystem, so dass Entzündungsreaktionen letztlich die Tumorprogression verstärken [25].

1.2 Chemotherapie

Seit den 1940-er Jahren werden chemotherapeutische Substanzen in der Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt [26]. Zusätzlich zu lokaler Bestrahlung und chirurgischen Eingriffen bietet die Chemotherapie die Möglichkeit, mit basalen zellulären Prozessen spezifisch zu interferieren. 1942 wurden Senfgas-Derivate als erste Chemotherapeutika bei einem Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom eingesetzt [27]. Die entarteten Zellen gingen zwar zeitweise zurück, wurden jedoch schnell resistent gegenüber der Chemotherapie. In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden ähnliche DNA-alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid oder Chlorambucil entwickelt, die Kreuzvernetzungen der DNA herstellen und so vor allem in schnell proliferierenden Krebszellen Apoptose auslösen. Zu diesen DNA-alkylierenden Substanzen gehören auch Platinverbindungen wie Cisplatin, Oxaliplatin oder Carboplatin [28].

Eine weitere Klasse von Chemotherapeutika sind Antimetabolite, die spezifisch wichtige Stoffwechsellzyme inhibieren. Das Antifolat Methotrexat war das erste Therapeutikum dieser Art, das die Dihydrofolatreduktase inhibiert und bei vielen Krebsarten angewendet wurde [29]. Andere Antimetabolite umfassen Purinanaloga wie 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin sowie Pyrimidinanaloga wie 5-Fluorurazil (5-FU), Gemcitabin und Cytarabin [30, 31]. Sie können durch Inkorporation Schäden in DNA oder RNA hervorrufen und zugleich auch auf Enzyme des Nukleinsäure-Stoffwechsels einwirken. Diese Antimetabolite werden vor allem in Kombination mit anderen Stoffklassen wie Platinverbindungen eingesetzt [32].

Pflanzenalkaloide bilden eine weitere Klasse von Chemotherapeutika. Taxane wie Taxol beeinträchtigen ebenso wie *Vinca*-Alkaloide das Mikrotubuli-Zytoskelett und hemmen so die Mitose [33]. Camptothecin und sein Derivat Irinotecan hemmen Topoisomerase I und finden vor allem bei Kolonkarzinom Anwendung [34]. Etoposid hingegen ist ein Inhibitor der Topoisomerase II. Später wurden beispielsweise auch Mitoxantron und Anthracycline wie Doxorubicin als Topoisomerase II-Inhibitoren eingesetzt [35]. Diese beeinträchtigen sowohl die Replikation als auch die Transkription und DNA-Reparatur.

Neuere chemotherapeutische Substanzen umfassen Geldanamycin als Inhibitor des Hitzeschockproteins HSP90 sowie Zellzyklusinhibitoren wie Flavopiridol und Proteasominhibitoren wie Bortezomib [36-38]. Seit den 1980-er Jahren werden in einer „zielgerichteten Therapie“ spezifische Signalwege anvisiert, die bei bestimmten Krebsarten verändert sind. Dazu gehören spezifische Inhibitoren der Glykolyse, der Telomerase oder der DNA-Reparatur durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) sowie proapoptotische oder antiinflammatorische Substanzen und spezifische Immunaktivatoren [2]. Darüber hinaus wird Imatinib (Glivec) als spezifischer Inhibitor des Bcr-Abl-Fusionsproteins eingesetzt, das bei chronischer myeloischer Leukämie auftritt [39]. Cetuximab und Trastuzumab wiederum sind monoklonale Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) und werden vor allem bei Kolonkarzinom eingesetzt, aber auch Gefinitib hemmt spezifisch EGFR und somit die Proliferation von Krebszellen [40-42]. Die verstärkte Angiogenese hingegen ist Ziel des anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab [43].

Das Hauptproblem bei der Chemotherapie ist die genetische Diversität innerhalb von Tumoren, die zur Resistenz von einigen Zellen führen kann, die sich daraufhin weiter vermehren [2]. Verschiedene Mechanismen tragen zur Entstehung von Chemoresistenzen bei und schränken so die Effektivität der Therapie stark ein. Die vermehrte

Expression von MDR (*multidrug-resistance*)-Transporterproteinen beeinträchtigt die Effektivität verschiedenster therapeutischer Substanzen [44].

Die Tumorigenese geht wie bereits beschreiben mit oxidativem Stress infolge erhöhter ROS-Produktion einher. Ebenso verursachen viele Chemotherapeutika oxidativen Stress [45]. Tumorzellen passen sich an diese Stressbedingungen an [46]. Dadurch werden antiapoptotische Signalwege aktiviert, die auch zur Chemoresistenz beitragen können. So ist der Nrf2-Signalweg in vielen chemoresistenten Tumoren besonders aktiv und induziert die Expression von Glutathion sowie antioxidativen Enzymen wie Hämoxigenase-1, Glutathionreduktase, Thioreduktase und Peroxiredoxin [47].

Auch die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs durch Chemotherapeutika oder die inflammatorische Tumorumgebung trägt zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie auch gegenüber Bestrahlung bei [48]. Schließlich führt auch die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen (HSPs) zur Chemoresistenz [49]. Bei der Krebsentstehung spielen somit verschiedene Signalwege eine Rolle, die auch unter Stressbedingungen aktiviert werden. Die zelluläre Stressantwort schützt Zellen vor den Auswirkungen von Stress, die Deregulierung der Stressantwort trägt jedoch auch zum Überleben von Krebszellen sowie zur Entstehungen von Chemoresistenzen bei.

1.3 Rolle der zellulären Stressantwort bei Krebs

1.3.1 Zelluläre Veränderungen unter Stressbedingungen

Da Organismen sich an ihre jeweiligen optimalen Wachstumsbedingungen angepasst haben, bedeuten schon leichte Abweichungen davon, wie beispielsweise eine Temperaturerhöhung von wenigen Grad Celsius, für den Organismus Stress. Deshalb haben Zellen eine komplexe Stressantwort entwickelt, um auf verschiedene Arten von Stress reagieren zu können, wie sie im Folgenden modellhaft beschrieben wird [50].

Zunächst führen verschiedene Stressbedingungen wie Hitzestress zu einem Verlust der Funktion von Proteinen durch deren Entfaltung und damit einhergehender unspezifischer Aggregation. Dies betrifft unter anderem das Zytoskelett, das durch Umorganisation von Aktinfilamenten in Stressfasern [51] und Aggregation anderer Filamente wie Mikrotubuli schließlich vollständig zerstört wird (Abbildung 1). Darüber hinaus führt Stress zur Fragmentierung von Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum (ER) sowie zum Verlust von Lysosomen und Mitochondrien, was letztlich in einem starken Abfall des ATP-Levels resultiert. Ebenso sinkt der pH der Zelle infolge von Veränderungen der Membranzusammensetzung. Außerdem wird das Spleißen

und die Prozessierung ribosomaler RNAs (rRNAs) sowie die Ribosomen-Biogenese im Nukleolus stark beeinträchtigt [52], so dass es zu einem Arrest der Translation kommt. Damit einhergehend treten auch zytoplasmatische *Stress-granules* (SGs) auf, in denen die nicht-translatierten mRNAs gespeichert werden (Abschnitt 1.3.3). Je nach Dauer und Schwere der Stresseinwirkung wird schließlich auch der Zellzyklus arretiert und Apoptose ausgelöst.

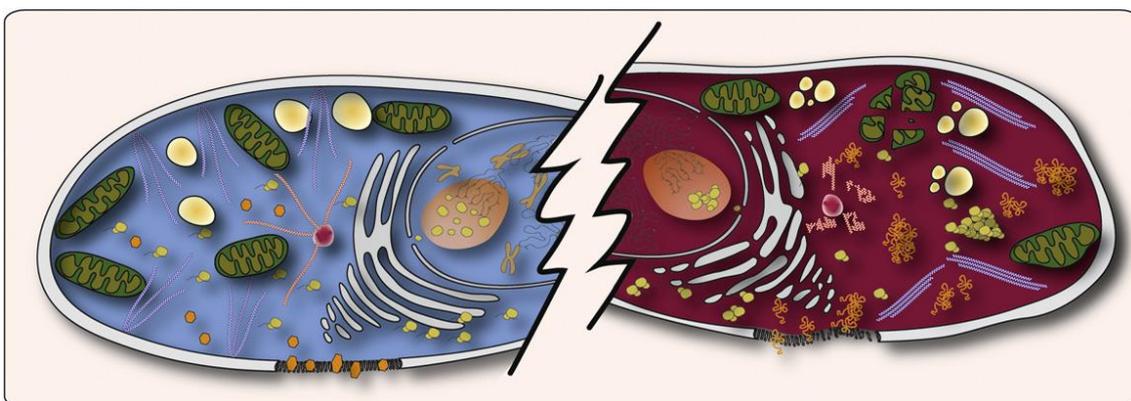


Abbildung 1: Auswirkungen von Hitzestress auf die Zellorganisation [50]. Dargestellt sind Veränderungen des Aktin (blau)- und Mikrotubuli-Zytoskeletts (rot), von Mitochondrien (grün), Lysosomen (hellgelb), ER und Golgi-Apparat (weiß) sowie die Entstehung von Proteinaggregaten (orange) und *Stress-granules* (gelb) unter Hitzestress (rechts).

Um diesen Stressauswirkungen entgegenzuwirken, werden etwa 50-200 Gene induziert [50]. Diese kodieren in erster Linie für so genannte Hitzeschock-Proteine (HSPs), verschiedene molekulare Chaperone, die entfaltete Proteine binden und falten können. Darüber werden aber auch proteolytische Komponenten exprimiert, um fehlgefaltete und aggregierte Proteine abzubauen. Weitere stressinduzierte Proteine umfassen Transkriptionsfaktoren und Kinasen zur Umsetzung der Stressantwort sowie RNA- und DNA-Reparaturenzyme, metabolische Enzyme zur Stabilisierung der zellulären Energieversorgung und Regulatoren des Membrantransports.

1.3.2 Transkriptionelle Regulation der Stressantwort

Die Hitzeschockantwort gewährleistet die Expression stressinduzierter Gene innerhalb von Minuten, um die Anpassung an Stressbedingungen zu ermöglichen. Darüber hinaus wird die Hitzeschockantwort jedoch auch von Krebszellen ausgenutzt und kann so zur Krebsentstehung beitragen.

Für die Expression dieser Hitzeschockgene ist der Hitzeschock-Faktor 1 (HSF1) verantwortlich. HSF1 wird durch Interaktion mit den Chaperonkomplexen HSP90 oder HSP70/HSP40 im Zytoplasma in der inaktiven monomeren Form gehalten. Unter Stressbedingungen werden die HSPs durch entfaltete Proteine gebunden und HSF1 so freigesetzt und aktiviert [53]. Außerdem dient die nicht-kodierende Hitzeschock-RNA 1 (HSR1) als Thermosensor und trägt nach Konformationsänderung im Komplex mit eIF1A zur Aktivierung von HSF1 bei [54].

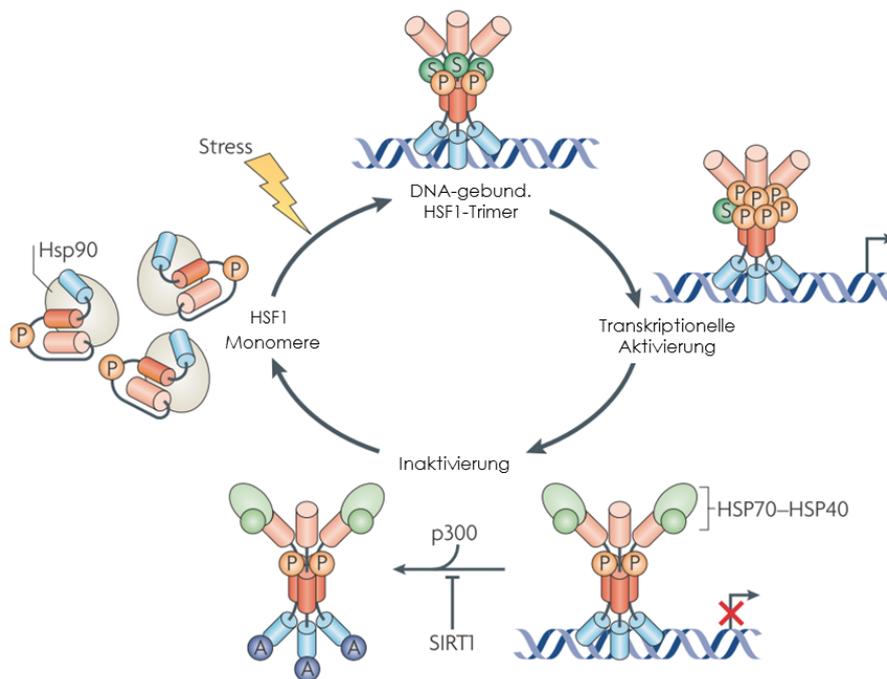


Abbildung 2: HSF1-Aktivierungszyklus (nach [56]). Dargestellt sind die Stimuli und posttranslationalen Modifikationen, die zur Freisetzung von HSF1 im Zytoplasma sowie zur Trimerisierung und transkriptionellen Aktivierung im Zellkern führen.

HSF1 kann je nach Art des Stressstimulus sowohl Homotrimerie als auch Heterotrimerie mit der Isoform HSF2 bilden [55]. Die Trimerie gelangen in den Zellkern, wo die DNA-Bindedomänen an Hitzeschock-Elemente (HSE) in stressinduzierten Genen wie *Hsp70* binden (Abbildung 2). Vielfache Phosphorylierung und Sumoylierung der regulatorischen Domäne modulieren die Aktivität von HSF1. Über die Transaktivierungsdomäne rekrutiert HSF1 den positiven Transkriptionselongationsfaktor b (P-TEFb), der wiederum die RNA-Polymerase II durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne aktiviert. Über seine Interaktion mit BRG1 beeinflusst HSF1 zudem die Chromatin-Remodellierung durch den SWI/SNF-Komplex [53]. Die Expression der Zielgene wird mit leichter Verzögerung durch stressabhängige

Azetylierung der DNA-Bindedomäne durch p300/CBP beendet, während sie durch SIRT1 (Sirtuin-1)-vermittelte Deazetylierung länger aufrechterhalten wird [56]. Während die Expression von Hitzeschockgenen aktiviert wird, blockieren lange nicht-kodierende Alu-RNAs die Transkription durch die RNA-Polymerase II und sorgen so für eine globale transkriptionelle Repression unter Stress [57].

Es konnte gezeigt werden, dass auch in perizentrischen heterochromatischen Regionen des humanen Chromosoms 9q12 bindet, die aus tandemartigen Satelliten III-Wiederholungen besteht, und dort die Expression langer nicht-kodierender Sat III-Transkripte bewirkt. [58-60]. Unter Hitze und einigen anderen Stressbedingungen akkumulieren HSF1 und HSF2 an Sat III-Sequenzen und formen dort so genannte nukleäre Stress-*bodies* (nSBs) [61]. Die Funktion dieser Strukturen wie auch der Sat III-RNA ist unklar, da nSBs aber auch viele Spleißfaktoren rekrutieren [62, 63], wird ihnen eine Funktion bei der Regulation des alternativen Spleißens als Antwort auf Stress zugeschrieben [64]. Darüber hinaus könnten die Sat III-Transkripte eine Rolle bei der Ausbildung von Heterochromatin und der Stabilisierung bestimmter Chromosomenabschnitte spielen [65].

Die von HSF1 vermittelte Hitzestressantwort spielt eine bedeutende Rolle bei Krebs, da sie Signalwege reguliert, die auch zum Überleben von Krebszellen beitragen können. HSF1 verstärkt die Transformation und Tumorgenese [66, 67]. So schützt eine unterbundene HSF1-Expression Mäuse vor der chemischen Induktion von Tumoren. Zudem ist eine höhere Expression sowie Aktivität von HSF1 mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebs assoziiert [68]. Darüber hinaus vermittelt HSF1 die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika wie Platinverbindungen, Doxorubicin und Proteasominhibitoren [69-71].

Die krebsspezifische Genexpression, die durch HSF1 reguliert wird, unterscheidet sich von der klassischen Hitzestressantwort [72]. So werden in Krebszellen neben Hitzeschockgenen weitere HSF1-Zielgene reguliert, die unter anderem bei Zellzyklus, DNA-Reparatur, Adhäsion sowie Apoptose eine Rolle spielen und nicht unter Hitzestressbedingungen reguliert werden. Die Auswirkungen von HSF1 auf die Tumorgenese beruhen jedoch größtenteils auf der Expression von HSPs, auch wenn HSF1 unabhängig von HSPs zur Aneuploidie von Tumorzellen sowie zur Metastasierung beitragen kann [73, 74]. Dementsprechend ist eine erhöhte Expression verschiedener Klassen von HSPs in vielen Krebsarten beobachtet worden, die entweder auf der erhöhten HSF1-Aktivität oder auf der Stabilisierung und selektiven

Translation von HSP mRNAs bzw. Stabilisierung der HSPs selbst beruhen kann [49, 75].

Die erhöhte HSP-Expression spielt bei vielen Schritten der Tumorgenese eine Rolle. HSP90 verstärkt krebsspezifische Signalwege, indem es verstärkt exprimierte oder mutierte Proteine in ihrer aktiven Konformation stabilisiert und so die Evolution neuer Proteinvarianten erleichtert [76]. Unterstützt durch verschiedene Ko-Chaperone stabilisiert HSP90 beispielsweise Kinasen wie Src, B-Raf, Akt und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), die das Wachstum der Zellen regulieren, aber auch mutierte Proteine wie Bcr-Abl [77, 78]. Auf diese Weise kann HSP90 zur anhaltenden Proliferation von Krebszellen beitragen. Andererseits können HSP90 und HSP70 auch Mutationen in Tumorsuppressoren wie p53 und Rb stabilisieren und so die Wachstumskontrolle von Krebszellen unterbinden [79, 80].

Darüber hinaus inhibieren HSPs sowohl die Apoptose als auch die Seneszenz. So hemmt HSP70 beispielsweise die Freisetzung von Cytochrom c und somit die Aktivierung der Caspase 8, während HSP27 die Aktivierung von Caspase 9 durch extrazelluläre Fas-vermittelte Signale unterbindet [81]. Verschiedene Proteine der HSP70-Familie hemmen die Aktivierung der Seneszenz unter anderem durch ihren Einfluss auf p53 [82]. HSP90 hingegen stabilisiert auch die Telomerase [83]. Auf diese Weise ermöglicht die erhöhte HSP-Expression das Überleben von Krebszellen.

Darüber hinaus tragen HSP70 und HSP90 durch Stabilisierung von HIF-1 α sowie VEGF auch zur vermehrten Angiogenese bei [84, 85]. Zudem stabilisiert HSP90 auch die Matrix-Metalloprotease MMP2, die bei der Metastasierung involviert ist [86]. HSP70 wird zudem von nekrotischen Zellen freigesetzt und wirkt sich pro-inflammatorisch aus [87]. Durch die Expression entsprechender Rezeptoren auf Krebszellen kann extrazelluläres HSP70 schließlich aufgenommen werden und so die beschriebenen Signalwege in den Zellen beeinflussen, um die Tumorgenese zu verstärken [88].

1.3.3 Translatationaler Arrest und Stress-granule-Bildung

Neben der Expression von Hitzeschockgenen im Zuge der Hitzeschockantwort kommt es unter Stressbedingungen zu einem Arrest der Translation, der mit der Bildung von SGs einhergeht. SGs wurden zunächst in Tomatenzellen unter Hitzestressbedingungen entdeckt [89], später aber unter anderem auch in Hefen, Trypanosomen sowie Insekten- und Säugerzellen beschrieben [90]. Sie wurden lange Zeit als passive Aufbewahrungsorte von nicht-translatierten mRNAs (*messenger-RNAs*) unter Stressbedingungen angesehen. Jedoch wird ihre weitreichende Bedeutung

zunehmend klar, da sie darüber hinaus auch verschiedene Signalwege regulieren und zudem auch die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika vermitteln (Abschnitt 1.5.3).

Die Initiation der Translation unter Normalbedingungen beginnt mit der Bildung eines Präinitiationskomplexes an der mRNA [91, 92] (Abbildung 3, links). Dieser besteht aus der kleinen (40S)-Ribosomenuntereinheit, der Methionyl-Initiator-tRNA (Transfer-RNA) und verschiedenen eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs). Die 40S-Untereinheit liegt mit eIF3 und eIF1A assoziiert im Zytoplasma vor. Der so genannte ternäre Komplex besteht aus der Initiator-tRNA, eIF5 und eIF2-GDP. eIF2B katalysiert den Austausch von GDP zu GTP und somit die Aktivierung des ternären Komplexes, der nun mit Hilfe von eIF1 die 40S-Untereinheit binden und so den 43S-Präinitiationskomplex bilden kann.

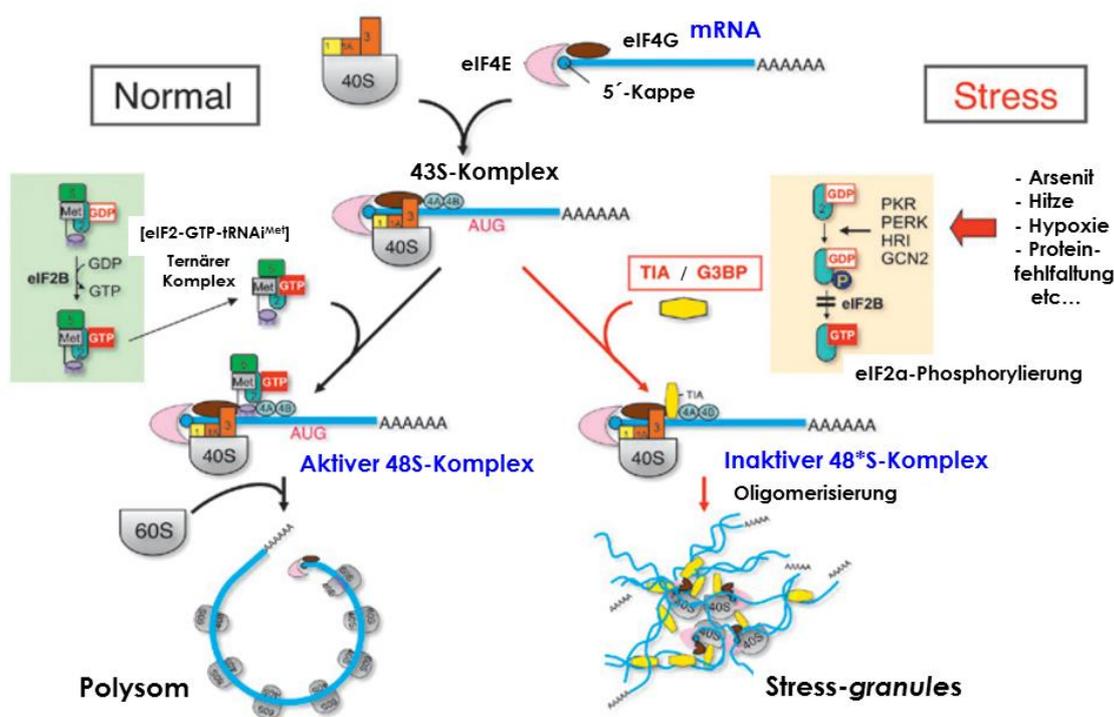


Abbildung 3: Translation unter normalen und Stressbedingungen (nach [93]). Dargestellt sind die Signalwege, die unter Stressbedingungen (rechts) zum Arrest der Translation und zur Bildung von SGs führen.

Die m⁷G (7-Methylguanotin)-Kappenstruktur am 5'-Ende der mRNA wird durch eIF4E erkannt, das Teil des eIF4F-Komplexes ist. Weitere eIF4F-Komponenten sind die RNA-Helikase eIF4A sowie das Gerüstprotein eIF4G, das durch Interaktion mit eIF3 den 43S-Präinitiationskomplex rekrutiert, so dass der aktive 48S-Komplex entsteht [91].

Nun kann sich die 40S-Untereinheit entlang der mRNA bis zum Initiatorcodon bewegen, wo eIF5 durch Hydrolyse von eIF2-GTP die Dissoziation der Initiationsfaktoren und die Rekrutierung der großen (60S)-Ribosomenuntereinheit bewirkt und so die Elongation startet. Das Poly(A)-Bindepotein PABP bindet das polyadenylierte 3'-Ende und zirkularisiert die mRNA durch Interaktion mit eIF4G am 5'-Ende. Durch wiederholte Rekrutierung weiterer 80S-Ribosomen können schließlich Poly(ribo)somen entstehen [92].

Verschiedene Stressstimuli bewirken einen Arrest der Translation durch Phosphorylierung der α -Untereinheit des heterotrimeren eIF2 (eIF2 α) an Serin 51. In Vertebraten existieren vier eIF2 α -Kinasen, die durch verschiedene Stimuli aktiviert werden [94, 95]: HRI (*heme-regulated inhibitor kinase*)/ EIF2AK1 wird durch Hitze, oxidativen und osmotischen Stress, aber auch durch veränderte Häm-Level während der Reifung von Erythrozyten aktiviert [96, 97]. PKR (*double-stranded RNA-dependent protein kinase*)/ EIF2AK2 wird durch doppelsträngige RNA infolge viraler Infektionen aktiviert [98]. PERK (*PKR-like ER kinase*)/ PEK/ EIF2AK3 ist ein ER-Transmembranprotein, das im ER-Lumen mit dem Chaperon BiP/GRP78 assoziiert ist. Fehlgefaltete Proteine im ER rekrutieren die Chaperone und aktivieren so PERK im Zuge der *unfolded protein response* (UPR) [99]. GCN2 (*general control non-derepressible 2*)/ EIF2AK4 schließlich erkennt unbeladene tRNAs und wird so infolge von Aminosäuredeprivation aktiviert [100].

Die Phosphorylierung von eIF2 α führt zur Inhibition von eIF2B, so dass der ternäre Komplex nicht mehr aktiviert werden kann (Abbildung 3, rechts). An Stelle des ternären Komplexes werden Proteine wie TIA-1 (*T-cell-restricted intracellular antigen-1*) und TIAR (*TIA-1-related protein*) in einen inaktiven 48*S-Komplex eingebaut. Weitere Initiationsrunden werden so verhindert und die Ribosomen lösen sich von der mRNA. Mittels ihrer Prion-ähnlichen Domänen können TIA-1 und TIAR aggregieren und so zur Akkumulation der inaktiven Komplexe in SGs beitragen [92].

Diese primäre Aggregation kann unabhängig voneinander durch eine Reihe weiterer RNA-Bindeproteine wie G3BP (*Ras GTPase-activating protein-binding protein*), TTP (Tristetraprolin) und FMRP (*Fragile X mental retardation protein*) ausgelöst werden, die ebenfalls Aggregationsdomänen aufweisen und zudem bevorzugt spezifische Transkripte binden. Durch Interaktion verschiedener SG-Proteine untereinander (sekundäre Aggregation) sowie Rekrutierung weiterer Proteine durch Protein-Protein-Interaktionen entstehen schließlich mikroskopisch sichtbare Strukturen [101]. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Regulatoren der Transkription, des Spleißens

sowie des Transports über die Kernmembran oder entlang des Zytoskeletts sowie eine Vielzahl von Kinasen und anderen Proteinen, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen (Tabelle 1). Auch Posttranslationale Modifikationen von SG-Komponenten wie Phosphorylierung, Methylierung und Glykosylierung regulieren schließlich die SG-Bildung sowie ihre Funktion [102, 103].

Wenn die Stresseinwirkung beendet ist, lösen sich SGs innerhalb von Minuten auf. Die Translation der gespeicherten mRNAs kann dann reinitiiert werden, sobald wieder aktive ternäre Komplexe zur Verfügung stehen, und Polysomen können erneut entstehen [104]. Aber auch bei anhaltendem Stress können einige Transkripte aus SGs freigesetzt werden, um die Translation wieder aufzunehmen [101]. SGs sind weder für die translationale Repression noch für die Stabilität von mRNAs notwendig, sondern erhöhen vielmehr die lokale Konzentration von Translationsregulatoren und RNA-Bindeproteinen [105].

Während unter Stress die Expression von Haushaltsgenen durch Arrest der Translation ihrer mRNAs verhindert wird, werden etwa 10-15 % der mRNAs bevorzugt unter Stress und unabhängig von einer eIF2 α -Phosphorylierung translatiert [Buchan, Parker 2009]. Stress-induzierte mRNAs wie diejenige von HSP70 enthalten lange strukturierte 5'-UTRs, aber keine Introne [106]. Zudem enthalten diese mRNAs regulatorische IRES (*internal ribosome entry site*)-Elemente in ihren 5'-UTRs [107]. Im Gegensatz zur oben beschriebenen „Kappen-abhängigen“ Translation benötigen diese Transkripte weder eine m⁷G-Kappenstruktur noch eIF4E für deren Bindung. Stress führt durch Inhibition des mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Signalwegs zu einem Umschalten von der „Kappen-abhängigen“ zur „-unabhängigen“ (IRES)-Translation, indem eIF4E durch vermehrtes aktiviertes eIF4E-Bindeprotein (eIF4E-BP) gebunden und inhibiert wird [108]. Kürzlich wurde noch eine weitere Form der „Kappen-unabhängigen“ Translation beschrieben, die über CITE (*cap-independent translation enhancer*)-Elemente in der 5'-UTR vermittelt wird [109].

Dementsprechend können SGs auch unabhängig von der Phosphorylierung von eIF2 α entstehen. So lösen die Inhibitoren der RNA-Helikase eIF4A Pateamin und Hippuristanol SGs aus, ohne eine eIF2 α -Phosphorylierung zu bewirken [110, 111]. Die Inhibition der Translation durch reduzierte eIF4E-Level oder eine beeinträchtigte Rekrutierung der 60S-Ribosomenuntereinheit führt hingegen nicht zur Entstehung von SGs, so dass Translationsarrest und SG-Bildung unabhängig voneinander ablaufen können [112].

1.4 Zusammenspiel von Stress-granules und P-bodies

SGs dienen nicht nur der passiven Aufbewahrung von nicht-translatierten mRNAs unter Stress, sondern vielmehr der aktiven und reversiblen Sortierung von mRNAs, die entweder translatiert, gespeichert oder abgebaut werden können [101].

Dazu stehen SGs mit anderen zytoplasmatischen RNA-granules, so genannten P-bodies (*processing bodies*, PB) oder GW-bodies, in einem dynamischen Gleichgewicht (Abbildung 4). Diese Strukturen enthalten neben Komponenten für den 5'-3'-Abbau der mRNA auch Regulatoren von *nonsense-mediated decay* (NMD) und miRNA (*micro RNA*)-Wegen [113]. PBs sind im Gegensatz zu SGs auch unter Normalbedingungen in der Zelle vorhanden. Ähnlich wie SGs entstehen sie durch die Selbstaggregation spezieller Proteindomänen, z.B. in EDC3 (*enhancer of decapping 3*) und LSM4 (*Sm-like protein 4*) [114].

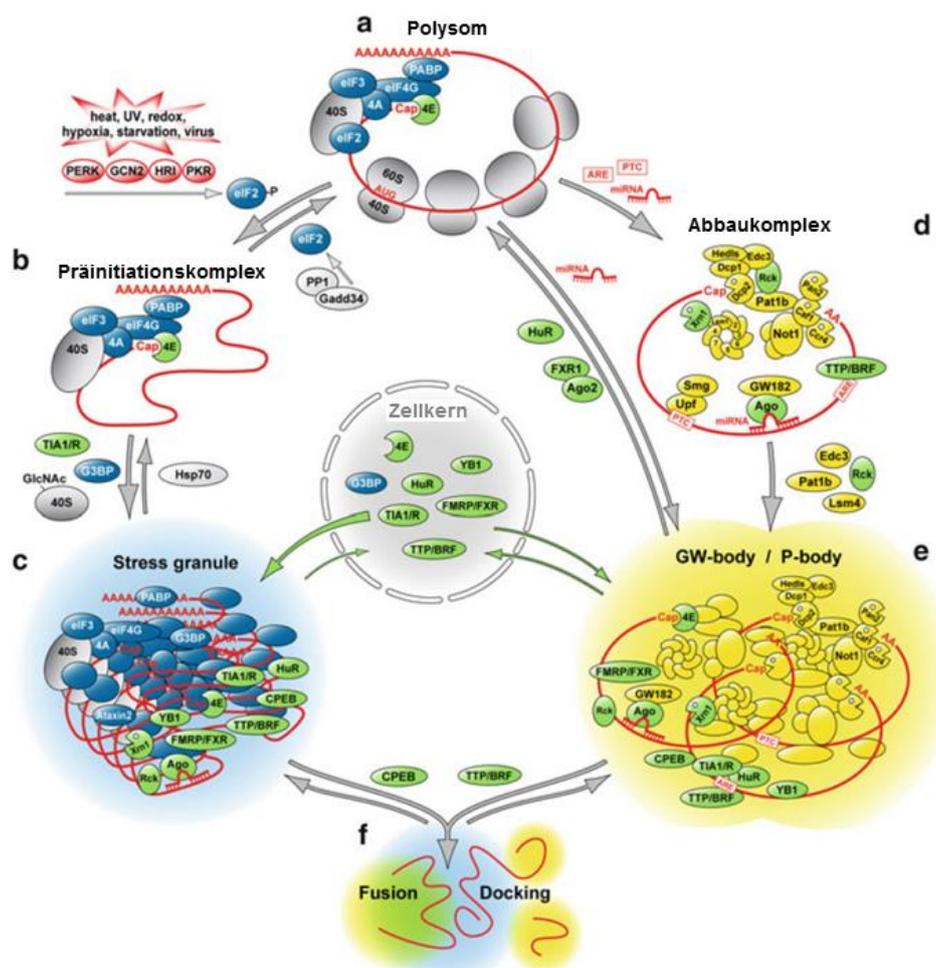


Abbildung 4: mRNA-Zyklus aus Polysomen, SGs und PBs (nach [115]). Dargestellt sind die verschiedenen Stationen von mRNAs im Zytoplasma und die beteiligten Proteine- mit Polysomen (a), SG-Bildung unter Stress (b, c), mRNA-Abbau im Zytoplasma (d) und PBs (e) sowie Interaktion von SGs mit PBs (f).

Der mRNA-Abbau beginnt mit der Entfernung des 3'-poly(A)-Schwanzes (Deadenylierung) durch den CNOT-Komplex aus CNOT6/CCR4, CNOT7/CAF1 und anderen NOT-Proteinen [116]. Die Translation deadenylierter mRNAs wird durch Bindung von PAT1 (*topoisomerase II-associated protein 1*) und dem heptameren LSM1-7-Komplex unterbunden [117]. In einigen Fällen können stabile deadenylierte mRNAs vorkommen, meist jedoch werden diese mRNAs einem von verschiedenen Abbauwegen zugeführt [118].

Der 3'-5'-Abbau der mRNAs kann durch das Exosom erfolgen, einem Multiprotein-Komplex im Zellkern und Zytoplasma. Das Exosom ist einerseits zuständig für die Prozessierung nukleärer RNAs wie rRNAs, snRNAs (*small nuclear*) und snoRNA (*small nucleolar RNA*) sowie die Qualitätskontrolle von mRNAs im Zellkern. Andererseits werden auch zytoplasmatische mRNAs durch das Exosom abgebaut [119, 120].

Der 5'-3'-mRNA-Abbau in PBs geht mit der Entfernung der m⁷G-Kappenstruktur vom 5'-Ende der mRNA (*decapping*) einher, die durch den Komplex aus DCP1 (*mRNA decapping enzyme 1*) und DCP2 vermittelt wird [121]. DCP2 ist die katalytische Komponente des Komplexes, die durch den Koaktivator DCP1 unterstützt wird [122, 123]. EDC4/Hedls stimuliert deren Assoziation und somit die Aktivität von DCP2 [124]. Der *decapping*-Komplex konkurriert mit dem eIF4F-Komplex um die mRNA-Kappenstruktur und sorgt somit für die translationale Repression der mRNA [118]. Darüber hinaus verstärken auch andere Proteine wie DDX6/RCK (*DEAD box protein 6*), EDC3, PAT1 und der LSM1-7-Komplex das *decapping* und unterdrücken zugleich die Translation [125]. Die 5'-3'-Exoribonuklease XRN1 katalysiert schließlich den Abbau der mRNA [126]. Dieser kann auch ohne das Vorhandensein von PBs erfolgen, in PBs liegen die nötigen Faktoren jedoch aufkonzentriert vor [127] (Abbildung 4d).

Verschiedene RNA-Bindeproteine bestimmen darüber, ob nicht-translatierte Transkripte in SGs gespeichert und so vor dem Abbau geschützt werden oder ob sie stattdessen in PBs transferiert werden (Abbildung 4f). So destabilisieren RNA-Bindeproteine wie TTP und BRF1 (*B-related factor 1*) manche Transkripte durch Bindung an deren AU-reiche Elementen (AREs) in den 3'-UTRs. Andere Transkripte werden durch stabilisierende Faktoren wie ZBP1/IGF2BP1 (*zip-code-binding protein 1*) und HuR (*Hu-antigen R*) in SGs zurückgehalten und so vor dem Abbau geschützt [101]. Somit stehen SGs und PBs in engem Kontakt und können mRNAs untereinander austauschen [128]. Nicht-translatierte mRNAs können auch aus PBs wieder freigesetzt werden, um ihre Translation fortzusetzen [129].

Tabelle 1: Komponenten von SGs und PBs: Die Proteinkomponenten von SGs und PBs (in Säugern) sind nach ihrer zellulären Funktion geordnet.

PB-Komponenten	SG-Komponenten
Translation (Kernkomponenten) eIF4E [128], eIF4E-T [130]	40S-Ribosomen [131]; eIF1 [132] ; eIF2, eIF2B [133]; eIF3 [131]; eIF4A, B [134]; eIF4E [131]; eIF4-T [135]; eIF4G [131] ; eIF4H [132]; eIF5A [136]
RNA-Bindeproteine CPEB1 [137]; hnRNP A3 [138]; MEX3A, B [139]; NANOS2 [140]; PCBP1,2/hnRNP E1,E2 [141, 142]; RAP55 [143]	ATXN2 [144]; ATXN2L [145]; BRF1 [128]; CELF1/CUG-BP [146]; CIRBP [147]; CPEB1 [137]; CRHSP-24 [148]; CRYZ [149]; DAZAP2/ PRTB [150] ; DAZL [151]; FUBP2/KSRP [152]; FMR1; FXR1,2 [153]; G3BP1,2 [154]; hnRNP A1 [155]; hnRNP A2 [156]; hnRNP D/AUF1 [152] ; hnRNP K [157]; hnRNP Q [158]; HuD/ELAVL4 [159] HuR/ELAVL1 [160]; IGF2BP3 [161]; LARP4B [162]; Lin28A,B [163] ; MEX3B [139]; MSI1 [164]; NANOS3 [165]; PABP1 [166]; PABP4 [167]; PCBP1,2/hnRNP E1,E2 [141, 142]; PUM1 [168]; PUM2 [169]; QKI [170]; RAP55 [143]; RBM42 [157]; SERBP1/PAI-RBP1 [171, 172] ; Smaug1 [173] ; Staufen1,2 [174]; TTP/TIS11 [175, 176]; ZBP1/IGF2BP1 [177]
Signaltransduktion 14-3-3γ [178]; AJUBA [179]; FASTK [128]; JNK1/MAPK8 [180]; LIMD1, WTIP [179]	AKAP350 [181]; Calretikulin/ERp60 [182]; CD24 [183]; CXCR-4 [184]; Cyr61 [185]; DISC1 [186]; DYRK3 [187]; eIF4E-BP [188]; FAK1 [189]; FASTK [128]; GIGYF2/PERQ2 [190]; Grb7 [189]; HRI/EIF2AK1 [191]; IP5K [192]; JNKBP1 [193]; MDA5 [194]; OGFOD1 [191]; PACT [195]; PARG, PARP5A,12,13,14,15 [196]; PKCα [161]; RACK1 [197]; RhoA, ROCK1 [198]; RSK2 [199]; SMG-1 [200]; MK-STYX [201]; WDR62 [180]
Transkription APOBEC3F,G [202]	APOBEC3F,G [202]; Caprin1 [203]; CCAR1 [181]; CNBP [204]; EWS [205]; HDAC6 [206]; Ki-1/57 [207]; PQBP1 [208]; PHB2 [209]; SRC-3/NcoA-3 [210]; TAF15 [205]; TDRD3 [172, 211], Tudor-SN [212, 213]
RNA-Abbau/ Modifikation AGO1-4 [214, 215]; CNOT6, CNOT7 [116]; DCP1, DCP2 [216]; DDX6/RCK [137]; EDC3, EDC4/ Hedls [124] ; GW182/TNRC6A,B,C [217]; LSM1-7 [216]; MOV10 [218]; PAN2,3 [116]; PATL1 [219]; PNRC2 [220]; SMG5-7 [221, 222]; UPF1-3 [220]; XRN1 [128]	ADAR1 [212]; AGO2 [184]; DCP1 [137]; DDX1 [223]; DDX3 [224]; DDX6/RCK [137]; DHX36/RHAU [225]; Dnmt2 [226]; MOV10 [227]; PMR1 [228]; RRP20 [229]; SGNP [230]; XRN1 [128]
Spleißen TIA-1, TIAR [166]; YB-1 [231]	CASC3/MLN51 [232]; MBNL1 [223]; RBM4 [233]; RBM9/FOX2 [234]; SAM68 [235]; SMN1 [236]; SRSF1/AUF1 [237]; SRSF3/SRp20 [238]; SRSF7/9G8 [171]; TDP43 [156, 239-241]; TIA-1, TIAR [166]; YB-1 [231]
Transport Importin β2 [242], Importin-8 [243]	Dynein DLC-A, DIC1, DHC1 [244]; Importin α1 [245]; Importin β1, β2/Transportin [242]; Importin-8 [243]; Kinesin KLC1, KHC [244]; NXF1/TAP [224]; NXF7 [138]; Ran [245]
sonstige/ unbekannt DEF6 [246] ; HAX1 [247]; HTT [248]; TOB2 [249]; TRIM21/Ro52 [250]; TRIM71/ Lin-41 [251]; ZAR1, ZAR1L [252]	DEF6 [246]; GAPDH [209]; HSP27 [166]; HSP90 [195]; HTT [253] OGG1 [254]; PKP1, PKP3 [255]; RIG1 [256]; Roquin [257]; VHL [258]; ZBP1 [259]

Während SGs vor allem Translationskomplexe und einige RNA-Bindeproteine enthalten, beinhalten PBs also vor allem Proteine zum mRNA-Abbau. Neben diesen haben SGs und PBs auch einige andere Komponenten gemeinsam (Tabelle 1). Darüber hinaus spielen PBs eine Rolle beim *nonsense-mediated decay* (NMD)-Abbauweg von Transkripten mit einem vorzeitigen Stopp-Codon (*premature termination codon*, PTC) [260]. Die RNA-Helikase UPF1 (*up-frameshift suppressor 1*) wird durch die Serin-Threonin-Kinase SMG1, UPF2 und UPF3 aktiviert und vermittelt mit Hilfe von SMG5-7 den Abbau solcher mRNAs [261].

Des Weiteren enthalten PBs Faktoren der miRNA-vermittelten Genregulation (Abbildung 4d) [113]. Die Argonaut (Ago)-Proteine bilden den *RNA-induced silencing complex* (RISC)-Komplex, der mit miRNAs assoziiert ist. Diese miRNAs binden teilweise komplementär an die Ziel-mRNA-Sequenz und bewirken so einen Arrest der Translation und beschleunigen den Abbau der mRNAs [262]. Proteine der GW182-Familie interagieren mit Ago-Proteinen und rekrutieren zugleich weitere Faktoren für den mRNA-Abbau [263].

1.5 Bedeutung von Stress-*granules* bei Erkrankungen

1.5.1 Stress-*granules* bei neurologischen Erkrankungen

SGs spielen bei der Entstehung vieler Krankheiten eine bedeutende Rolle. So sind SGs und deren Komponenten unter anderem in neurodegenerativen und anderen neurologischen Erkrankungen involviert.

Mutationen der SG-Komponenten TDP43 (*TAR DNA-binding protein 43*) und FUS (*fused in sarcoma*) verstärken den Kernexport und somit die Ablagerung in zytoplasmatischen Inklusionen [264]. Diese Ablagerungen sind Merkmale von Amyotropher Lateralsklerose (ALS) sowie Frontotemporaler Lobardegeneration (FTLD). Auch Mutationen in den SG-Proteinen hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) A1 und A2 tragen zur Pathogenese von ALS bei [265]. Das SG-Protein Ataxin-2 (ATXN2) ist krankheitsverursachend für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2. Diese geht mit einem erhöhten Level des Polyglutamin-expandierten ATXN2 einher, das die Bildung von PBs unterbindet [144]. ATXN2-Mutationen sind auch mit ALS assoziiert und ATXN2 modifiziert die TDP-43-Toxizität [266]. Das die Huntington-Erkrankung verursachende expandierte Polyglutaminprotein Huntingtin kann ebenfalls stabile Aggregate bilden und lokalisiert zudem in SGs und PBs [248, 253].

Durch lokale Aufkonzentrierung von Proteinen mit speziellen Aggregationsdomänen, die eine starke Tendenz zur Bildung von Oligomeren haben, können SGs zur Entstehung von krankheitsassoziierten Aggregaten beitragen [267]. Im Gegensatz zum regulierten und reversiblen Prozess der SG-Bildung ist diese mit einer überaktiven SG-Bildung vergleichbare Aggregation hingegen nicht-reversibel.

Außerdem ist das für die Spinale Muskelatrophie (SMA) verantwortliche SMN-Protein (*survival motor neuron protein*) eine Komponente von SGs und neuronalen RNA-*granules* und für den axonalen mRNA-Transport verantwortlich [268]. Mutiertes SMN gelangt hingegen nicht in SGs, und die SG-Bildung ist somit bei SMA gestört [236]. Darüber hinaus ist bei SMA auch der Zusammenbau von snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) und somit das Spleißen beeinträchtigt [269]. FMRP reguliert die aktivitätsabhängige Translation an Dendriten [270]. Dementsprechend führt die Mutation des SG-Proteins FMRP beim Fragiles-X-Mentale-Retardierung-Syndrom zur Deregulierung vieler mRNAs [271]. Zudem ist die SG-Bildung beeinträchtigt [272]. Auch die paralogen SG-Proteine FXR1 (*Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1*) und FXR2 beeinflussen die Funktion von FMRP [273]. Auch das an der Pathogenese der Myotonen Dystrophie Typ 1 beteiligte CUG-BP1 (*CUG triplet repeat RNA-binding protein*) sowie das mit Schizophrenie assoziierte DISC1 (*Disrupted in schizophrenia 1*) sind Komponenten von SGs [146, 186].

Auch Tauopathien wie die Alzheimer-Erkrankung beeinflussen die SG-Bildung: Aggregiertes tau-Protein stimuliert die SG-Bildung, wodurch wiederum die Entstehung phosphorylierter tau-Inklusionen verstärkt wird [274]. Die bei der Alzheimer-Erkrankung auftretende granulovakuoläre Degeneration weist Ähnlichkeiten zu SGs auf und könnte die Neuronen vor Schäden durch RNA-Oxidierung schützen [275]. Prionprotein-infizierte Zellen schließlich bilden PrP^{Sc}-Aggregate, die zur PKR-abhängigen eIF2 α -Phosphorylierung und einem Translationsarrest führen, aber gleichzeitig die Bildung von SGs verhindern [276]. Stimulierung der Translation durch reduzierte eIF2 α -Phosphorylierung hingegen unterdrückt die Neurodegeneration durch PrP^{Sc} [277].

1.5.2 Stress-*granules* bei Virusinfektionen

Auch bei Infektionserkrankungen sind SGs von großer Bedeutung, da verschiedene Viren die SG-Bildung beeinflussen [278]. Flaviviren wie das Westnil-Virus und das Dengue-Virus können die Bildung von SGs verhindern, indem sie eine RNA exprimieren, die SG-Komponenten wie TIA-1, TIAR und G3BP zu den Replikationsfoci

rekrutiert [279]. Darüber hinaus werden auch PB-Komponenten wie DDX6, XRN1 und GW182 rekrutiert und somit auch die PB-Bildung unterbunden. Das Gag-Protein des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV-1) bindet und sequestriert das SG-Protein Staufen ebenso wie das Tax-Protein des humanen T-Zell-Leukämievirus (HTLV-1) HDAC6 (Histon-Deazetylase 6) bindet [206]. In ähnlicher Weise rekrutieren auch Virenproteine des Junin-Virus oder von Alphaviren G3BP zu den Replikationsfoci, um so die SG-Bildung zu unterbinden [280, 281]. Das NS1-Protein (*non-structural protein 1*) des Influenza-A-Virus verhindert die Lokalisation von RAP55 (*RNA-associated protein of 55kDa*) in SGs und PBs [282]. Darüber hinaus verhindert NS1 die PKR-Aktivierung [256]. Auch das Junin-Virus inhibiert die eIF2 α -Phosphorylierung [283].

Andere Viren lösen die Bildung von SGs aus, verhindern im weiteren Verlauf der Infektion jedoch deren Bildung. Das Poliovirus unterdrückt die Translation von WirtsmRNAs durch Induktion von SGs, die Spaltung von G3BP durch die 3C-Virusprotease jedoch führt zur Auflösung der SGs, um die virale Translation zu gewährleisten [284]. Die PB-Komponenten DCP1, XRN1 und PAN3 werden bei Polioinfektionen ebenfalls abgebaut, um so die PB-Bildung zu verhindern [285]. Auch bei Hepatitis-C-Virus-Infektionen entstehen zunächst SGs, durch die Sequestrierung von G3BP, ATXN2 sowie PB-Komponenten wie DDX6, XRN1 und Ago2 wird die Bildung von SGs und PBs jedoch unterdrückt [286].

Coronaviren und das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) lösen die eIF2 α -Phosphorylierung durch PKR und die Bildung von SGs aus, die für die Virusreplikation nötig sind [287-289]. Das Vacciniavirus verhindert die eIF2 α -Phosphorylierung und löst zugleich die Bildung von SG-ähnlichen Strukturen aus, die jedoch keine mRNAs enthalten [290, 291]. Wahrscheinlich unterdrücken diese Viren so spezifisch nur die Wirtstranslation sowie anti-virale Funktionen von SG [278].

Die anti-virale Bedeutung von SGs wird durch die Tatsache unterstützt, dass die meisten Virusinfektionen mit gestörter oder veränderter SG-Bildung einhergehen. Dementsprechend spielen einige SG-Komponenten eine prominente Rolle bei der Abwehr von Viren. Die Adenosin-Deaminase ADAR1 katalysiert die Editierung von doppelsträngiger RNA, bei der Adenosin zu Inosin umgewandelt wird [219]. Diese kann viralen Ursprungs sein oder von repetitiven Alu-Elementen oder miRNA-Vorläufern stammen. Diese editierte RNA wird schließlich durch ADAR1 in SGs gespeichert oder auch durch TSN (*Tudor-staphylococcal nuclease*) degradiert [219, 292]. Die DNA-Cytidin-Deaminasen APOBEC3F und APOBEC3G können in ähnlicher Weise Cytidin in Uracil in der DNA von Viren und Retrotransposons umwandeln und so ihre

Expression verhindern [293]. Darüber hinaus kann APOBEC3G auch HIV-1-RNA binden und in SGs befördern [294]. Schließlich werden auch die IRES-Transaktivatoren PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*) und PCBP2 (*Poly(rC)-binding protein 2*), die für die Virustranslation nötig sind, in SGs sequestriert [295].

1.5.3 Stress-granules bei der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika

Für verschiedene Chemotherapeutika konnte ein Einfluss auf die SG-Bildung gezeigt werden. Da SGs neben ihrer Rolle im mRNA-Metabolismus auch die Apoptose regulieren können, sind sie auch für die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika von Bedeutung.

Die zelluläre Stressantwort bietet die Möglichkeit, die Auswirkungen verschiedener Stressstimuli zu bewältigen. Wenn die verursachten Schäden allerdings zu schwerwiegend sind, gehen Zellen Apoptose ein. In die Entscheidung darüber, ob apoptotische oder Reparaturprozesse aktiviert werden, sind die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) involviert [93]. Verschiedene Stressstimuli aktivieren spezifische Kaskaden von Kinasen. So können die mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 durch verschiedene MAPK-Kinasen (MAPKK) und MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden und schließlich einen Zellzyklusarrest oder Apoptose auslösen.

Durch die Bildung von SGs kann die Aktivierung der Apoptose über diesen Signalweg jedoch unterbunden werden (Abbildung 5). Dabei spielt das Adaptorprotein GNB2L1/RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) eine zentrale Rolle. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass RACK1 für die Dimerisierung der MAPKKK MTK1 (*MAP three kinase 1*) und für deren anschließende Aktivierung durch GADD45 infolge von DNA-Schäden nötig ist [197]. MTK1 bewirkt dann die Aktivierung von MKK3/6 und schließlich p38 und somit die Einleitung der Apoptose. Andere Stressbedingungen wie oxidativer Stress oder Hypoxie jedoch führen zur Bildung von SGs, so dass RACK1 von MTK1 dissoziiert und in SGs rekrutiert wird. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass die SG-Bildung infolge Hypoxie die Aktivierung von SAPK-Wegen sowie Apoptose durch DNA-schädigende Substanzen wie das Chemotherapeutikum Etoposid verhindern kann [197]. Dies legt eine protektive Funktion von SGs nahe, die zur Chemoresistenz beitragen könnte.

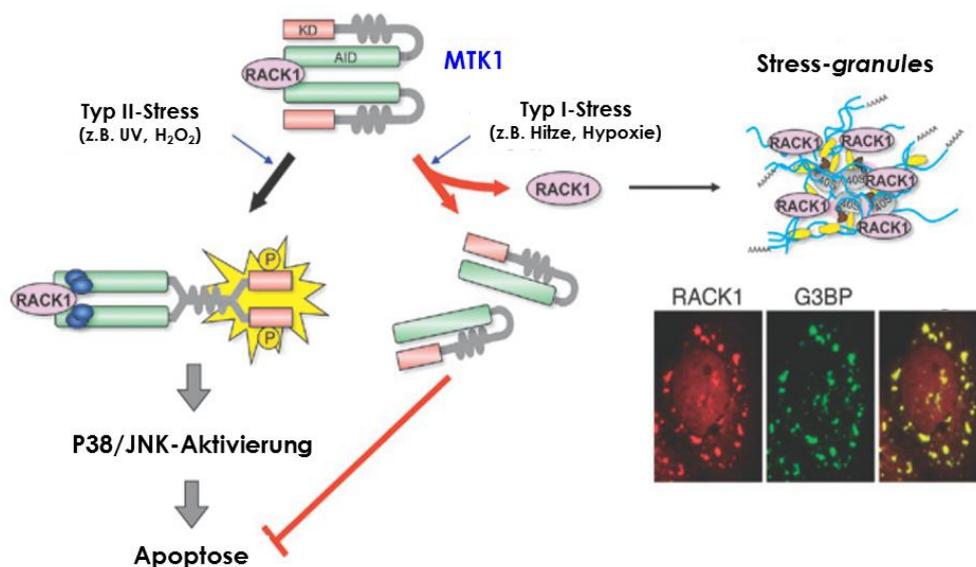


Abbildung 5: Zusammenhang von SG-Bildung und Apoptose (nach [93]). Dargestellt ist die Aktivierung von MTK1 durch RACK1, die durch RACK1-Sequestrierung in SGs unterbunden wird.

Das erste Chemotherapeutikum, für das ein Einfluss auf die SG-Bildung gezeigt werden konnte, ist der Proteasomeninhibitor Bortezomib [296]. Bortezomib führt zur Phosphorylierung von eIF2 α durch HRI und damit einhergehend zur *de novo*-Bildung von SGs. Diese Bortezomib-induzierten SGs wirken sich antiapoptotisch aus, da eine reduzierte HRI-Expression die Bortezomib-vermittelte Apoptose verstärkt. Weitere Studien zeigten, dass die Bortezomib-Behandlung zu erhöhter Expression des antiapoptotischen Faktors p21^{WAF1/CIP1} führt [297]. Die p21-mRNA wird durch Bindung von CUGBP1 stabilisiert und akkumuliert in SGs. Nach Auflösung der SGs wird die p21-mRNA so in großer Zahl freigesetzt, und das p21-Protein inhibiert daraufhin apoptotische Signalwege vermutlich durch seinen Einfluss auf ASK1 (*apoptosis signal-regulated kinase 1*).

Darüber hinaus ist ein Einfluss auf die SG-Bildung für die Platinverbindung Oxaliplatin aufgezeigt worden: Oxaliplatin löst im Gegensatz zu Cisplatin ER-Stress aus, führt somit zur eIF2 α -Phosphorylierung durch PERK und zur Induktion von SGs [298]. Kürzlich ist gezeigt worden, dass die SG-Bildung durch Caprin-1-Überexpression vor Cisplatin-induzierter Apoptose schützt [185].

Außerdem ist die Induktion von SGs für die Translationsinhibitoren Silvestrol und Verrucarin A sowie den ILK (*integrin-linked protein kinase*)-Kinaseinhibitor QLT0267 nachgewiesen, aber nicht näher charakterisiert worden [258, 299, 300].

Andere chemotherapeutische Substanzen lösen die Bildung veränderter SGs aus. So induziert Darinaparsin (S-Dimethylarsinoglutathion), eine abgeleitete organische Form

von Arsenitoxid (As_2O_3), die Bildung kleinerer SGs, verhindert durch Depolymerisierung von Mikrotubuli aber zugleich die vollständige Ausbildung größerer SGs [301]. Auch Selenit löst die Bildung kleinerer SGs aus, die sich deutlich von klassischen SGs unterscheiden: Einige Initiationsfaktoren wie eIF3 und eIF5A fehlen ebenso wie RACK1, sodass sie frühe Stadien von SGs ohne zytoprotektive Funktion darstellen könnten [302].

1.6 Zielsetzung

Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika stellen ein großes Problem bei der Therapie von Krebserkrankungen dar, da sie deren Effektivität stark einschränken. Die Mechanismen, die zur Ausbildung solcher Resistenzen führen, sind noch weitgehend unverstanden.

Das Basenanalogue 5-Fluorurazil (5-FU) ist die Standardtherapie bei verschiedenen soliden Tumoren, jedoch treten auch bei diesem Chemotherapeutikum Resistenzen auf. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* eignet sich hervorragend zur Analyse von Genen, die an Resistenzen gegenüber verschiedenen toxischen Substanzen beteiligt sind. Daher sollten zunächst in einer globalen Hefeanalyse Gene identifiziert werden, die die Resistenz gegenüber 5-FU vermitteln, um so potentielle Resistenzmechanismen ableiten zu können.

Da für einige Chemotherapeutika eine Induktion der SG-Bildung bereits gezeigt worden ist, sollte ein Hauptaugenmerk der weiteren Untersuchungen darauf liegen, einen potentiellen Einfluss von 5-FU auf die SG-Bildung zu untersuchen und näher zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss von 5-FU auf die stressspezifische transkriptionelle Regulation durch den Hitzeschockfaktor HSF-1 näher untersucht werden. Diese Untersuchungen könnten weitere zelluläre Mechanismen als potentielle Ziele für eine effektivere Therapie aufdecken.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

- Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiphorese	Roth
- Adenin	Sigma
- Alamar Blue [®] -Reagenz	Invitrogen
- Agarose UltraPure [®]	Invitrogen
- Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
- Ammoniumsulfat [(NH ₄) ₂ SO ₄]	Merck
- Ampizillin	Sigma
- AURION BSA-c	Aurion
- 5-Azacytidin	Sigma
- Bakto-Agar	Becton, Dickson & Co.
- Bakto-Pepton	Difko
- Bakto-Trypton	Becton, Dickson & Co
- Benzil	Sigma
- Benzonase	Merck
- Betain	Fluka
- Bleizitrat	Serva
- Bradford Protein Assay	Bio-Rad
- Bromphenolblau	Sigma
- Cell Mask [®] Deep Plasmamembran-Farbstoff	Invitrogen Molecular Probes [®]
- Coomassie-Brilliant-Blau	Sigma
- CSM-Ade-His-Leu-Trp-Ura	MP Biomedicals
- DAPI (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma
- DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser	Ambion
- Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
- Dihydrorhodamin 123 (DHR)	Invitrogen Molecular Probes [®]

Material und Methoden

- DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
- DTT (Dithiothreitol)	Sigma
- DMEM-Zellkulturmedium 31885 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen Gibco®
- dNTPs (CTP, GTP, ATP, TTP)	Pharmacia
- DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Invitrogen Gibco®
- Emetin	Sigma
- Entwickler- und Fixiererlösung für Fotofilme	Agfa
- Essigsäure	Merck
- Ethanol absolut	Merck
- Ethidiumbromid	Sigma
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
- FACS Flow	BD Biosciences
- Fluoromount Mountingmedium	Southern Biotech
- 5-Fluorurazil (5-FU)	Sigma
- Fluordesoxyuridin (FdUrd)	Sigma
- Fluoruridin (FUrd)	Sigma
- Formaldehyd 16 %	Polysciences, Inc.
- Formamid	Sigma
- Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
- Gemcitabin	Selleck
- D-Glukose-Monohydrat	Merck
- Glycerin	Merck
- Glyzin	Merck
- N-Glyzylglyzin	Sigma
- Hefeextrakt	Difko
- HEPES	Sigma
- Heringsperma-DNA-Natriumsalz	Sigma
- Histidin	Sigma
- Hoechst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma
- Isopropanol	Merck
- Kaliumchlorid (KCl)	Merck
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
- Leucin	Sigma
- Lithiumazetat (LiAc)	Sigma
- Magermilchpulver	Bio-Rad

- Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
- Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
- Methanol absolut	Merck
- Natriumazid	Merck
- Natriumcacodylat	Sigma
- Natriumchlorid (NaCl)	Merck
- Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
- Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
- Natrium- <i>meta</i> -Arsenit	Merck
- Natrium-Selenit	Sigma
- Natriumzitat	Sigma
- Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Roth
- Penizillin/ Streptomycin	Biochrom
- Phloxin B	Sigma
- Polyethylenglykol 3350 g/mol	Sigma
- Proteinmarker Page Ruler Prestained Plus	Fermentas
- Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
- RPMI 1640-Zellkulturmedium 21875	Invitrogen Gibco®
- D-Sorbitol	Sigma
- Tanninsäure	Sigma
- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Invitrogen
- 6-Thioguanin	Sigma
- Trifluorthymidin	Tokyo Chem. Ind.
- Tris-HCl	Merck
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma
- Triton X-100	Merck
- Trypsin	Biochrom
- Tryptophan	Sigma
- Tween 20	Roth
- Uranylazetat	Sigma
- Urazil	Sigma
- Uridin	Sigma
- Western Blot-Nachweisreagenz Western Lightning	Perkin-Elmer
- Yeast Nitrogen Base (YNB)	Difko

2.1.2 Lösungen und Medien

- 10x PBS (<i>phosphate-buffered saline</i>), pH 7,4:	1,37 M NaCl 27 mM KCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
- TE-Puffer, pH 7,5:	10 mM Tris 1 mM EDTA
- LB (<i>lysogeny broth</i>)-Medium, pH 7,0:	0,5 % NaCl 1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt (100 µg/ml Ampizillin vor Gebrauch)
- Heringsperma-DNA	0,2 % DNA-Natriumsalz 0,5 mM EDTA
- YPD-Medium:	1 % Hefeextrakt 2 % Bakto-Trypton 2 % Glukose
- CSM-Medium:	0,68 % Yeast Nitrogen Base (YNB) 2 % Glukose 0,57 g/l CSM-Ade-His-Leu-Trp-Ura (je 0,02 % Adenin, Histidin, Leucin, Urazil, Tryptophan)
- Hogness-Einfriermedium	36 mM K ₂ HPO ₄ 13,2 mM KH ₂ PO ₄ 0,4 mM MgSO ₄ 1,7 mM Natriumzitat 6,8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 4,4 % (v/v) Glyzerin 1x YPD 2 % Glukose

- Hefetransformationsmix 1:	100 mM LiAc 1,0 M Sorbitol 0,5x TE
- Hefetransformationsmix 2:	100 mM LiAc 40 % PEG 3350 1x TE
- Cacodylat-Puffer, pH 7,4	50 mM Natriumcacodylat 50 mM NaCl
- Immunmarkierungs-Puffer für TEM, pH 7,5	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
- Blockpuffer für TEM	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,4 % (v/v) AURION BSA-c
- 2x SSC-Puffer für FISH	300 mM NaCl 30 mM Natriumzitat
- Prähybridisierungspuffer für FISH	2x SSC 20 % (v/v) Formamid 0,2 % BSA
- Lysepuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM Tris-EDTA, pH 8,0 1 % (v/v) Triton X-100 1 µl/ 10ml Benzonase

- 5x Laemmlipuffer:	250 mM Tris, pH 6,8 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 50 % (v/v) Glycerin 100 mM DTT
- Sammelgelpuffer, pH 6,8:	125 mM Tris 0,1 % SDS
- 4x Trenngelpuffer, pH 8,8:	375 mM Tris 0,1 % SDS
- SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris 250 mM Glyzin 0,1 % SDS
- Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glyzin 20 % (v/v) Methanol
- Coomassie-Färbelösung:	2,4 % Brilliant-Blau 60 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure
- Coomassie-Entfärbelösung:	50 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure

2.1.3 Geräte und sonstige Materialien

- 6, 12, 24- <i>well</i> -Zellkulturplatten	Biochrom
- 96- <i>well</i> -Mikrotiterplatten	Biochrom
- 96- <i>well</i> -Fluoreszenzplatten μ Clear [®]	Greiner
- 384- <i>well</i> -Platte für RT-PCR	Applied Biosystems
- 384- <i>well</i> -Platten für Hefekultur	Genetix
- Analysenwaage AT 250	Mettler
- Cellomics ArrayScan VTI	Cellomics

- Deckgläschen (Ø 12 mm)	Roth
- Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences
- elektronische Mehrschritt-Pipetten	Eppendorf
- Elektronenmikroskop Spirit 120 kV	Tecnai
- Elektronenmikroskop CM100 100 kV	Philips
- Fluoreszenzmikroskop AxioImager Z1	Zeiss
- Fluoreszenz-Spektrometer LS55	Perkin-Elmer
- Fotofilme Hyperfilm ECL	Fujifilm
- Fotofilm-Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
- Fotokassette	Fujifilm
- Geldokumentationssystem Alphamager	Alpha Innotech
- Gelkammer und Einsätze Protean II	Bio-Rad
- Gelkämme	Bio-Rad
- Glasplatten	MPI-Werkstatt
- Heizblock	Eppendorf
- Immersionsöl	Zeiss
- Klebefolien Microamp (für qRT-PCR)	Applied Biosystems
- Kunststoffküvetten	Roth
- Kupfergitter für TEM	SPI Supplies
- Kryoröhrchen	Nalgene
- Laserscanning-Mikroskop LSM 700	Zeiss
- Magnetrührer	IKA-Combimag-REO
- Membran-Vakuumpumpe MZ 2C	Vacuubrand
- Multikanalpipette	Eppendorf
- Nano Drop [®] ND-1000 UV-Spektrometer	Nano Drop Technologies
- Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad
- Objektträger	Roth
- Pasteurpipetten	Brand
- PCR-Maschinen PTC-100, PTC-225	MJ Research
- Petrischalen	Greiner
- Photometer 6700	Jenway
- Pipetten	Eppendorf
- Präzisionswaage PM 3000	Mettler
- PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran Protran [®]	Perkin Elmer
- Reaktionsgefäße („Eppis“) 1,5/ 2 ml	Sarstedt, Eppendorf
- Reaktionsgefäße 15/ 50 ml	Saarstedt, Greiner

- Replikator 96-Spitzen	Nalgen Nunc
- Replikator 384-Spitzen	Nalgen Nunc
- Rollmischer RM5	CAT
- RT-PCR-System ABI-Prism 7900 HT	Applied Biosystems
- Schüttelinkubatoren Innova 44, 4330	New Brunswick Scientific
- sterile Glaskugeln	MPI-Werkstatt
- sterile Pipetten (10 ml, 25 ml)	Saarstedt
- sterile Impfösen	Nunc
- Thermanox-Plastikplättchen für TEM (Ø 13 mm)	Nunc
- Tiefkühler -20 °C	Bosch
- Tiefkühler -80 °C	Forma Scientific
- Tischzentrifugen 5415D, 5810R	Eppendorf
- Ultramikrotom Reichert Ultracut E	Leica
- UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
- Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries
- Wasserbad	Memmert
- Western Blot-Transferapparatur (<i>semi-dry</i>)	Peqlab
- Wipptisch Rocky® RT-1S	Fröbel Labortechnik
- Whatman®-Filterpapier 3mm	Whatman
- Hefemedium-Schalen OmniTray	Nunc
- Zählkammer	Neubauer
- Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Biochrom
- Zellkulturinkubatoren	Heraeus, New Brunswick
- Zentrifuge Avanti J-25 Beckman	Coulter

2.1.4 Bakterien und Hefestämme

Für die Transformation von Plasmiden wurden chemokompetente Bakterien *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene) verwendet. Diese haben folgenden Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q Z_M15 Tn10 (Tet^r)]*.

Die *E. coli*-Kulturen wurden in sterilem LB-Medium angezogen. Zur Selektion von Plasmid-transformierten Bakterien wurden dem Medium 100 µg/ml Ampizillin zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurden 2 % (w/v) Bakto-Agar hinzugefügt.

Für Hefeexperimente wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm BY4741 mit folgendem Genotyp verwendet: *Mat a his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 uraΔ0::kanMX4*.

Die globalen Analysen wurden mit einer Deletionsbank von EUROSCARF durchgeführt, die alle vitalen haploiden Deletionsstämme vom Paarungstyp a (Mat a) umfasst. Die Analyse von SG- und PB-defizienten Stämmen erfolgte mit den folgenden sequenzvalidierten Deletionsstämmen: *ΔCCR4*, *ΔDHH1*, *ΔEAP1*, *ΔEBS1*, *ΔEDC1*, *ΔEDC2*, *ΔEDC3*, *ΔeIF3j/HCR1*, *ΔeIF4G1/TIF4631*, *ΔGBP2*, *ΔLSM1*, *ΔLSM6*, *ΔLSM7*, *ΔLSM12*, *ΔMDY12*, *ΔNGR1*, *ΔNOT4*, *ΔNOT5*, *ΔNRP1*, *ΔPAT1*, *ΔPBP1*, *ΔPBP4*, *ΔPOP2*, *ΔPUB1*, *ΔSCD6*, *ΔSCP160*, *ΔSUS1*, *ΔUPF1*, *ΔUPF2*, *ΔUPF3*, *ΔVTS1*, *ΔXRN1* und *ΔYGR250c*.

Die Hefestämme wurden in YPD (*yeast peptone dextrose*)-Vollmedium oder definiertem CSM (*complete supplement mixture*)-Medium kultiviert. Zur Herstellung von Festmedien wurden 2 % (w/v) Bakto-Agar hinzugefügt. Die Selektion von Hefezellen, die mit dem Plasmid pRP-PBP1-GFP/EDC3-mCh transformiert wurden, erfolgte hingegen in CSM-Trp-Medium.

2.1.5 Humane Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet (Tabelle 2):

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Zelllinien mit deren Ursprungsgewebe und des verwendeten Zellkulturmediums.

Zelllinie	Ursprungsgewebe	ATCC®- Nummer	Medium
A549	Lungenalveolen-Adenokarzinom [303]	CCL-185	DMEM
Du145	Prostata-Adenokarzinom, Hirnmetastasen [304]	HTB-81	DMEM
HEK293T	embryonale Nierenepithelzellen [305]	CRL-1573	DMEM
HeLa	Zervix-Adenokarzinom [306]	CCL-2	DMEM
HepG2	(hepatozelluläres) Leber-Adenokarzinom [307]	HB-8065	DMEM
PC3	Prostata-Adenokarzinom, Knochenmetastasen [308]	CRL-1435	RPMI
RWPE1	Prostata-Epithelzellen [309]	CRL-11609	RPMI
WI-38	embryonale Lungenfibroblasten [310]	CCL-75	DMEM

Die humanen Zelllinien wurden entweder in DMEM- oder in RPMI 1640-Zellkulturmedium mit L-Glutamin und 1 g/l Glukose kultiviert, dem vor Gebrauch 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) Penizillin/ Streptomycin (Endkonzentration 50 U/ml bzw. 50 µg/ml) zugesetzt wurden.

2.1.6 Plasmide und siRNAs

Das pRP-1659-Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe von Roy Parker am Howard-Hughes-Institut (Tuscon/ USA) zur Verfügung gestellt. Es trägt ein Ampizillin-Resistenzgen und erlaubt die konstitutive Expression des GFP-gekoppelten SG-Markerproteins PBP1 sowie des mCh-fusionierten PB-Markers EDC3, die mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können [311].

Die verwendeten SMART-pool ON-TARGETplus *small interfering* RNAs (siRNAs) gegen RRM2 (L-010379), HSF1 (L-012109), HSF2 (L-011874) und BRD4 (L-004937) sowie die entsprechende „*non-targeting*“ Kontroll-siRNA (siNT) (D-001810) wurden gefriergetrocknet als Aliquots von 5 nmol vom Hersteller Dharmacon/ Thermo Scientific bezogen. Sie wurden zunächst in RNase-freiem Wasser aufgenommen, auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt und bei -80°C gelagert.

2.1.7 Primer

Die folgenden Primerpaare wurden für qRT-PCR-Analysen verwendet (Tabelle 3):

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten qRT-PCR-Primer.

Primer	Sequenz
BRD4 fwd	5'-GAA ATG AAG CCT GTG GAT GTC G-3'
BRD4 rev	5'-TCG GCT CCT GTT TCT GTT TGT C-3'
HSF1 fwd	5'-CCA TGA AGC ATG AGA ATG AG-3'
HSF1 rev	5'-GCC ACT GTC GTT CAG CAT CA-3'
HSF2 fwd	5'-CAA GGG AGA GGA TTT CAG AT-3'
HSF2 rev	5'-CAG GGT ACT GGC TAC AGT TG-3'
RRM2 fwd	5'-CAC GGA GCC GAA AAC TAA AGC-3'
RRM2 rev	5'-CTG CCT TCT TAT ACA TCT GCC AG-3'
β-Aktin fwd	5'-CGGATGTCCACGTCACACTT-3'
β-Aktin rev	5'-GTTGCTATCCAGGCTGTGCT-3'

2.1.8 Antikörper und RNA-Sonden

Die Primärantikörper (Tabelle 4) für die Western Blot-Analysen wurden in den angegebenen Konzentrationen in 0,5 % BSA in PBS angesetzt und mit 1 % Natriumazid versetzt. Sie wurden bei 4°C gelagert und wiederverwendet. Die Sekundärantikörper (Tabelle 4) wurden in 2 % Milchpulver in PBS jeweils frisch angesetzt.

Die Primär- und Sekundärantikörper für die Mikroskopie wurden jeweils in 3 % BSA in PBS angesetzt. Die Primärantikörper wurden bei -20°C gelagert und wiederverwendet.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. Die für Mikroskopie (M), Elektronenmikroskopie (EM) und Western Blot (WB) eingesetzten Verdünnungen sind angegeben. (Kan.: Kaninchen, POD: Peroxidase, IG: Immunogold)

Antigen	Wirts-organismus	Verdünnung			Hersteller
		M	EM	WB	
Primärantikörper					
ATXN2	Maus	1:200	-	-	BD Biosciences
ATXN2L	Kaninchen	1:300	-	1:1000	Bethyl
P-ATM (Ser1981)	Kaninchen	1:100	-	-	Epitomics
DCP1	Maus	1:400	-	1:2000	Abnova
DDX6	Kaninchen	1:300	1:60	-	Novus
eIF2 α	Kaninchen	-	-	1:500	Cell Signaling
P-eIF2 α (Ser51)	Kaninchen	1:100	-	1:500	Cell Signaling
eIF4G	Kaninchen	1:300	-	-	Abcam
G3BP	Maus	1:200	1:60	1:2000	Abnova
HSF1	Ziege	1:100	-	-	Affinity Bioreagents
RACK1	Maus	1:200	-	-	BD Biosciences
TIAR	Maus	1:200	-	-	BD Biosciences
Tubulin	Maus	1:200	-	-	Sigma
Ubiquitin	Maus	1:200	-	-	Santa Cruz
Sekundärantikörper					
Alexa488- α -Maus	Ziege	1:2000	-	-	Molecular Probes
Alexa594- α -Kan.	Ziege	1:2000	-	-	Molecular Probes
FITC- α -Ratte	Ziege	1:1000	-	-	Dianova
POD- α -Maus	Ziege	-	-	1:10000	Sigma
POD- α -Kan.	Ziege	-	-	1:10000	Sigma
IG α -Maus-5 nm	Ziege	-	1:100	-	Tebu-Bio
IG α -Kan.-10 nm	Ziege	-	1:100	-	Tebu-Bio

Darüber hinaus wurden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung Cy3-gekoppelte Oligo-dT₃₀-Sonden (Gentaur Oligo Synthesis) verwendet, die sich mittels

Fluoreszenzmikroskopie detekieren lassen. Diese wurden in DEPC-Wasser aufgenommen und auf 50 μ M verdünnt.

2.1.9 Enzyme

Für die Herstellung von cDNA wurde eine M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega) mit entsprechendem Puffer sowie Oligo-dT₁₅-Primern (Promega) verwendet.

Die qRT-PCR erfolgte mit dem Absolute SYBR[®]-Green ROX-Fertigmix (Thermo Scientific), der neben einer Thermo-Start-DNA-Polymerase einschließlich passendem Puffer einen an doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR[®] Green I) und einen Referenzfarbstoff zur Normalisierung (ROX) beinhaltet.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

Die verwendeten Plasmide wurden aus transformierten *E. coli* XL1 blue-Stammkulturen gewonnen, die in LB-Medium mit Ampizillin und 25 % Glycerin bei -80°C gelagert wurden.

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des GeneJET[®]-Kits (Fermentas) für Mini-Präparationen oder des Nucleobond[®] Xtra-Kits (Macherey-Nagel) für Midi-Präparationen. Für die DNA-Präparationen wurden 5 ml bzw. 50 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampizillin) mit den entsprechenden *E. coli*-Stammkulturen angeimpft und ü.N. bei 37°C und 180 rpm schwenkend inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 4000 g, RT) pelletiert. Gemäß Herstellerangaben wurden die Bakterienzellen anschließend durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA gefällt, an eine Silicamembran (bei Mini-Präparationen) oder Anionenaustauscher-Chromatografiemembran (bei Midi-Präparationen) gebunden, gewaschen und schließlich eluiert.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde anschließend mit Hilfe des Nano Drop[®] UV-Spektrometers gemessen. Dazu wurde etwa 1 μ l der Plasmidlösung auf den Messkopf aufgetragen und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen.

2.2.2 Analyse von *S. cerevisiae*

2.2.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme wurden in YPD-Medium mit 25 % Glycerin bei -80°C dauerhaft gelagert. Sie wurden vor Verwendung auf Petrischalen mit YPD-Festmedium ausgestrichen und bei 4°C gelagert.

Zur Kultivierung der Hefestämme wurden etwa 5 ml YPD-Flüssigkultur mit den entsprechenden Stämmen angeimpft und ü.N. bei 30°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

2.2.2.2 Wachstumsanalysen von *S. cerevisiae*

Für die globalen Hefeanalysen wurden die einzelnen Kolonien der EUROSCARF-Deletionsbank zunächst mit einem 96-Spitzen-Replikator von 96-*well*-Festmediumplatten auf 15 384-*well*-Platten mit Hogness-Einfriermedium übertragen. Diese wurden dauerhaft bei -80°C gelagert.

Für die Wachstumsanalysen wurden die 384-*well*-Platten mit einem 384-Spitzen-Replikator auf rechteckige CSM-Festmediumplatten gestempelt, die jeweils mit 1 µg/ml 5-FU bzw. als Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen von DMSO oder aqua bidest. versetzt wurden. Nach 1-2 Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum der Hefekolonien analysiert. 5-FU-sensitive Stämme wurden durch ein verringertes Wachstum auf den 5-FU-Platten im Vergleich zum Wachstum auf den Kontrollplatten identifiziert.

Das Wachstum der als 5-FU-sensitiv identifizierten Deletionsstämme wurde anschließend zur Validierung in Verdünnungsstufen analysiert. Dazu wurden Vorkulturen mit 5 ml YPD-Flüssigmedium mit den entsprechenden Deletionsstämmen sowie dem BY4741-Wildtyp als Kontrolle angeimpft und ü.N. bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Am folgenden Tag wurde diese auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt und in 96-*well*-Platten jeweils schrittweise 1:4 verdünnt. Jeweils 5 µl der verdünnten Kulturen wurden mit einer Multikanalpipette auf CSM-Festmediumplatten getropft, die jeweils mit 1 µg/ml 5-FU bzw. als Kontrolle mit aqua bidest. sowie mit Phloxin B (2 µg/ml) versetzt wurden. Das Wachstum der Deletionsstämme wurde nach 2 Tagen analysiert.

2.2.2.3 Plasmidtransformation in *S. cerevisiae*

Für die Plasmidtransformation von *S. cerevisiae* wurde zunächst eine 5 ml YPD-Vorkultur mit dem BY4741 Wildtyp-Stamm angeimpft. Am folgenden Tag wurde mit etwa 1,5 ml der Vorkultur eine 30 ml YPD-Hauptkultur angeimpft und für etwa 4 h bei

30°C und 180 rpm kultiviert, bis eine optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bis 0,8 erreicht war, die auf ein logarithmisches Wachstum der Hefezellen hinweist. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 g, RT), das Zellpellet in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Hefetransformationsmix 1 resuspendiert und für 10 min inkubiert. Danach wurden 1 µg Plasmid (pRP-PBP1-GFP/EDC3-mCh) und 5 µl Heringsperma-DNA mit 230 µl Hefetransformationsmix 2 gemischt. Nach Zugabe von 40 µl der vorbereiteten Zellsuspension wurde der Ansatz für 30 min bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 30 µl DMSO zugegeben und der Transformationsansatz für 7 min im Wasserbad einem Hitzestress bei 42°C ausgesetzt. Nach Zentrifugation (4 min, 1200 g, RT) wurde das Pellet in 50 µl aqua bidest. aufgenommen und mit Hilfe steriler Glaskugeln auf einer Petrischale mit CSM-Trp-Festmedium ausplattiert, die für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert wurde.

Anschließend wurden mit pRP-PBP1-GFP/EDC3-mCh transformierte Hefezellen für mikroskopische Analysen verwendet. Dazu wurde eine Vorkultur von 5 ml CSM-Trp-Medium mit isolierten Hefetransformanten angeimpft und ü.N. bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden weitere Kulturen mit 20 ml CSM-Trp-Medium mit einer OD_{600} von etwa 0,3 angeimpft, mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU oder Kontrollansätze mit dem entsprechenden Volumen von aqua bidest. versetzt und für 16 h bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Als weitere Kontrollen wurden unbehandelte Kulturen am folgenden Tag für 30 min mit 1 mM Natrium-Arsenit einem oxidativem Stress ausgesetzt. Anschließend wurden die verschiedenen Ansätze entweder sofort einer mikroskopischen Analyse unterzogen oder zunächst durch Zusatz von Ethanol (70 % Endkonzentration) bei 4°C fixiert und gelagert. Dafür wurden die Hefekulturen pelletiert, in etwa 30 µl aqua bidest. aufgenommen und 4 µl Hefesuspension auf Objektträgern eingebettet.

Die mikroskopische Analyse der Hefekulturen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioImager Z1 mit 40x 1,3 DIC-Ölimmersionsobjektiv und der Software AxioVision (Zeiss). Die Aufnahmen wurden mit AxioVison Rel4.8 (Zeiss) sowie Adobe Photoshop und Illustrator weiter bearbeitet.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Lagerung von humanen Zelllinien

Die humanen Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen im entsprechenden Medium bei 37°C und 5 % CO₂ bis etwa 80 % Konfluenz kultiviert. Zum Ablösen wurden die Zellen kurz mit etwa 5 ml sterilem DPBS gewaschen, etwa 10 min mit 1 ml Trypsin (0,25 % in 1 mM EDTA) inkubiert und schließlich in 10 ml DMEM (mit 10 % FCS und 1 % Penizillin/ Streptomycin) aufgenommen. Nach Zentrifugation (5 min, 1000 g, RT) wurde das Pellet in 900 µl DMEM aufgenommen, mit 150 µl FCS und 105 µl DMSO versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden sofort in einem Kryobehälter mit Isopropanol abgekühlt und im Gefrierschrank bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung schließlich in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum langsamen Auftauen der gelagerten Zelllinien wurde auf 37°C vorgewärmtes DMEM zu den Kryoröhrchen hinzugefügt und die aufgetaute Zellsuspension in etwa 10 ml DMEM aufgenommen. Nach Zentrifugation (5 min, 1000 g, RT) wurde das Pellet mit etwa 5 ml DPBS gewaschen, in etwa 1 ml DMEM aufgenommen und schließlich in eine Zellkulturflasche mit 20 ml DMEM überführt.

2.2.3.2 Kultivierung von humanen Zellen

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM- oder RPMI-Zellkulturmedium (jeweils mit 10 % FCS und 1 % Penizillin/ Streptomycin). Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen kurz mit 5 ml DPBS gewaschen, durch Inkubation mit 1 ml Trypsin abgelöst und schließlich in entsprechenden Verdünnungen in neue Zellkulturflaschen mit 20 ml DMEM oder RPMI-Medium überführt. Für die Experimente wurde die Zellzahl mit einer Zählkammer ermittelt und die entsprechende Zahl von Zellen (gegebenenfalls auf sterilen Deckgläschen) in Zellkulturplatten ausgesät.

2.2.3.3 Inkubation mit Chemotherapeutika

Zunächst wurden 2500 HeLa-Zellen in 96-*well*-Zellkulturplatten (für Quantifizierung mittels automatisierter Mikroskopie), 8000 HeLa-Zellen in 24-*well*-Platten (für Mikroskopie-Analysen, EM-Experimente und Proliferationsmessungen) oder 25000 HeLa-Zellen in 6-*well*-Platten (für Western Blot-Analysen und Durchflusszytometrie) ausgesät.

Die Zellen wurden am folgenden Tag mit verschiedenen Konzentrationen von Chemotherapeutika (5-FU, Fluoruridin, Fluordesoxyuridin, Gemzitabin, Azacytidin, Trifluorthymidin oder Natrium-Selenit), mit Emetin oder Uridin bzw. mit entsprechenden Kombinationen behandelt und für weitere 72 h inkubiert.

Für *recovery*-Experimente wurden die Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit 5-FU kurz mit DPBS gewaschen und weitere 24 oder 72 h in DMEM-Medium kultiviert.

2.2.3.4 Transfektion mit *small interfering RNAs*

Für RNA-Interferenz-Experimente wurden zunächst 15000 HeLa-Zellen auf Deckgläschen in 24-*well*-Zellkulturplatten (für Mikroskopie-Analysen) oder 30000 HeLa-Zellen in 12-*well*-Platten (für qRT-PCR) ausgesät und in je 0,5 ml bzw. 1 ml DMEM-Medium ohne FCS kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium erneut gewechselt. Der Transfektionsmix für 1 ml DMEM, bestehend aus 100 µl DMEM ohne FCS und Antibiotika sowie 1,2 µl 20 µM siRNA-Ansatz (Endkonzentration 22 nM) und 3 µl Lipofectamine RNA-Max, wurde etwa 15 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen DMEM mit FCS und Antibiotika gewechselt und die Zellen nach der Transfektion für weitere 48 h kultiviert.

Für die Kombinationsbehandlung mit Chemotherapeutika und siRNAs wurden 15 000 HeLa-Zellen auf Deckgläschen in 24-*well*-Platten mit 0,5 ml DMEM-Medium ohne FCS ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit einem Transfektionsansatz aus 50 µl DMEM ohne FCS und Antibiotika sowie 0,6 µl 20 µM siRNA und 1,5 µl Lipofectamine RNA-Max versetzt und weitere 24 h inkubiert, ehe die Zellen für 24 h mit 5-FU behandelt wurden.

2.2.3.5 Stressinduktion

Für Stressexperimente wurden HeLa-Zellen entweder oxidativem oder Hitzestress ausgesetzt. Zur Auslösung von oxidativem Stress wurden die Zellen nach Inkubation mit 5-FU oder siRNAs für 1 h in frischem DMEM-Medium mit Natrium-*meta*-Arsenit (Endkonzentration 0,5 mM) inkubiert.

Für Hitzestressexperimente wurden die Zellen nach Inkubation mit 5-FU für 30 Minuten in vorgewärmtem DMEM-Medium bei 44°C im Wasserbad inkubiert.

2.2.3.6 Proliferationsmessung

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden HeLa-Zellen in Triplikaten in 24-*well*-Platten ausgesät. Nach Inkubation mit 5-FU wurde das Medium gegen 0,5 ml DMEM mit

10 % (v/v) Alamar Blue[®]-Reagenz (Invitrogen) ausgetauscht und die Zellen für weitere 4 h kultiviert. Das Alamar Blue-Reagenz wird laut Herstellerangaben von proliferierenden Zellen umgesetzt und von einer nicht-fluoreszierenden blauen Form zu einer fluoreszierenden roten Form reduziert.

Anschließend wurden von jedem *well* je viermal 100 µl des Zellkulturmediums in 96-*well*-Fluoreszenzplatten überführt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrometer bei 560 nm angeregt und die Emission bei 585 nm gemessen. Die Werte der vier technischen Replikate wurden jeweils gemittelt und der Mittelwert der drei biologischen Replikate jeweils mit Standardfehler dargestellt.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.4.1 Immunfluoreszenz-Markierung

Für mikroskopische Analysen wurden humane Zelllinien in 24-*well*-Platten auf runden Deckgläschen ausgesät. Nach Inkubation mit Chemotherapeutika (Abschnitt 2.2.3.3) oder siRNAs (Abschnitt 2.2.3.4) sowie Stressinduktion (Abschnitt 2.2.3.5) wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Für Immunfluoreszenz-Analysen erfolgte zunächst die Fixierung der Zellen mit 2 % Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT, gefolgt von einer Permeabilisierung mit eiskaltem Methanol für mindestens 30 min. Unspezifische Antikörper-Bindestellen wurden durch Inkubation für 30 min mit 3 % BSA in PBS abgesättigt. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl/*well* Primärantikörper in 3 % BSA für etwa 1 h bei RT schwenkend inkubiert, nach mehrmaligem Waschen mit einem weiteren Primärantikörper und nach erneutem Waschen schließlich mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in 3 % BSA für etwa 1 h bei RT inkubiert (für jeweilige Verdünnungen siehe Tabelle 4). Schließlich wurden die DNA der Zellkerne durch Inkubation mit Hoechst (5 µg/ml in PBS) für etwa 1 min gefärbt und die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden entnommen und mit jeweils 8 µl Fluoromount-Einbettmedium auf Objektträgern eingebettet.

2.2.4.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Zum Nachweis von Poly(A)-RNA mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden HeLa-Zellen nach der Fixierung mit 2 % Formaldehyd in PBS für 10 min zunächst mit 0,5 % Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Prähybridisierungspuffer für 30 min bei 37°C und anschließend mit Cy3-Oligo-dT₃₀-Sonden in Prähybridisierungspuffer (0,5 nM) für

3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für je 5 min mit 2x SSC-Puffer mit 20 % Formamid, 2x SSC-Puffer, 1x SSC-Puffer und schließlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben in 3 % BSA geblockt und mit dem immunologischen Nachweis der entsprechenden Proteine fortgeföhren.

Die eingebetteten humanen Zellen wurden mit einem inversen konfokalen Fluoreszenzmikroskop LSM700 mit Plan-NEOFLUAR 40x 1,3 DIC-Öl-immersionsobjektiv und der Software ZEN 5.5 (Zeiss) als Bildstapel aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit AxioVison Rel4.8 (Zeiss) sowie Adobe Photoshop und Illustrator weiter bearbeitet.

2.2.5 Automatisierte Mikroskopie

2.2.5.1 Immunfluoreszenz-Markierung

Für die Quantifizierung der SG-Bildung durch automatisierte Mikroskopie wurden je 2500 HeLa-Zellen in fünf Replikaten in 96-well-Fluoreszenzplatten ausgesät. Nach Inkubation mit 5-FU für 72 h wurden die Zellen im Zellkulturmedium durch Zugabe von Formaldehyd (2 % Endkonzentration) für 10 min fixiert und das Medium vorsichtig entfernt. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 30 min permeabilisiert. Unspezifische Antikörper-Bindestellen wurden durch Inkubation für 30 min mit 3 % BSA in PBS abgesättigt. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl/well Primärantikörpern (α -G3BP und α -eIF4G) in 3 % BSA für 1 h bei RT und nach mehrmaligem Waschen schließlich mit den entsprechenden Sekundärantikörpern in PBS für 1 h bei RT schwenkend inkubiert (für jeweilige Verdünnungen siehe Tabelle 4). Die Zellkerne und Zellumrisse wurden durch Zugabe von DAPI (1 µg/ml) und Cell Mask[®] Deep Red-Farbstoff (1:125000) zur Sekundärantikörperlösung angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Fluoreszenzplatte schließlich mit einer intransparenten Folie verschlossen.

2.2.5.2 Automatische Bildaufnahmen

Mit dem Cellomics ArrayScan VTI mit 20x Luftobjektiv und der entsprechenden Cellomics-Software (Thermo Fisher) wurden automatisch jeweils 60 Aufnahmen pro well und Fluoreszenzkanal erstellt. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit freundlicher Hilfe von Jörg Isensee. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe der „Colocalization“-Applikation automatisch segmentiert. Zellkerne wurden dabei anhand der DAPI-Färbung und Zellgrenzen anhand der Cell Mask[®]-Färbung sowie verschiedener Parameter (Fläche, Längen-/Breitenverhältnis, Intensität) identifiziert. SGs wurden

anhand der G3BP-Färbung und entsprechender Parameter identifiziert. Strukturen außerhalb der gewählten Parameter wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Werte für Anzahl und Fläche der identifizierten Zellen ebenso wie für Anzahl und Fläche G3BP-markierter SGs wurden ermittelt und der Mittelwert der fünf Replikate jeweils mit Standardabweichung dargestellt.

2.2.6 Elektronenmikroskopie

2.2.6.1 Epon-Einbettung

Für Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Analysen wurden 8000 HeLa-Zellen in 24-*well*-Platten auf Thermanox-Plastikplättchen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 0,01 mM 5-FU behandelt oder unbehandelt belassen und weitere 72 h kultiviert. Danach wurden die Zellen entweder für 1 h mit Natrium-*meta*-Arsenit behandelt oder unbehandelt belassen. Schließlich wurden die Zellen entweder für 1 h bei RT mit 2,5 % Glutaraldehyd in 50 mM Cacodylat-Puffer (für Epon-Einbettung) oder für 30 min mit 2 % PFA/ 0,2% Glutaraldehyd in 50 mM Cacodylat-Puffer (für LR-Gold-Einbettung und Immunmarkierungen) fixiert.

Die Vorbereitung der Proben sowie die TEM-Aufnahmen erfolgten mit freundlicher Hilfe von Beatrix Fauler (MPI-MG, Berlin). Die Einbettung in einem Epoxidharz (Epon) nach Spurr [312] ermöglicht die bessere Sichtbarkeit der zellulären Strukturen. Hierfür wurden die Zellen im Anschluss an die Fixierung zunächst für 10 min in Cacodylat-Puffer, für 10 min in 50 mM Glycylglycin mit 100 mM NaCl und weitere zwei Mal 10 min in Cacodylat-Puffer gewaschen und anschließend in 0,5% Osmiumtetroxid in Cacodylat-Puffer nachfixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit aqua bidest. wurden die Zellen für 30 min in 0,1% Tanninsäure in 100 mM HEPES inkubiert, erneut mit aqua bidest. gewaschen und durch Inkubation für 90 min mit 2 % Uranylazetat kontrastiert. Schließlich wurden die Zellen auf den Plastikplättchen durch Behandlung mit ansteigenden Ethanol-Konzentrationen für jeweils etwa 10 min schrittweise entwässert, mit Hilfe des Low Viscosity Spurr-Kits (Ted Pella, Inc.) ü.N. bei 4°C in Epon-Harz eingebettet und das Harz für 3 Tage bei 60°C ausgehärtet. Anschließend wurden mit einem Ultramikrotom 70 nm-Dünnschnitte angefertigt und auf Pioloform[®]-beschichtete Kupfergitter eingebettet. Diese wurde schließlich durch Inkubation für 20 s mit 2 % Uranylazetat, mehrmaliges Waschen mit aqua bidest. und Inkubation für 20 s mit Bleizitrat gefolgt von erneutem Waschen nachkontrastiert.

2.2.6.2 LR-Gold-Einbettung und Immunmarkierung

Die Einbettung in LR-Gold-Harz eignet sich für Immunmarkierungen. Hierfür wurden die Zellen im Anschluss an die Fixierung zunächst für 2 x 20 min in Cacodylat-Puffer gewaschen und anschließend durch Behandlung mit ansteigenden Ethanol-Konzentrationen für jeweils etwa 10 min schrittweise entwässert. Anschließend wurden die Zellen zur Einbettung ü.N. bei 4°C in einem 1:1-Gemisch aus Ethanol und LR-Gold-Harz (London Resin Company), dann ü.N. bei 4°C in LR-Gold und schließlich ü.N. bei RT und im Dunkeln in LR-Gold mit 0,1 % Benzil inkubiert und das Harz schließlich für mindestens 3 Tage bei RT ausgehärtet. Anschließend wurden 80 nm-Dünnschnitte angefertigt und auf Kupfergittern eingebettet. Für die Immunmarkierungen wurden die Proben zunächst für 10 min bei RT in Immunmarkierungs-Puffer und weitere 30 min in Blockpuffer geblockt und daraufhin ü.N. bei 4°C mit den Primärantikörpern (gleichzeitig 1:60 α -DDX6 und α -G3BP) in Blockpuffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Immunmarkierungs-Puffer wurden die Proben für 90 min bei 37°C mit den Sekundärantikörpern (gleichzeitig 1:100 Immunogold α -Maus-5 nm und α -Kaninchen-10 nm) in Blockpuffer inkubiert. Schließlich wurden die Proben nach erneutem Waschen durch Inkubation für 1 min mit 2 % Uranylazetat, mehrmaliges Waschen mit aqua bidest. und Inkubation für 30 s mit Bleizitrat gefolgt von erneutem Waschen nachkontrastiert.

Die Aufnahmen wurden an einem Tecnai Spirit-Elektronenmikroskop mit einer 2 K CCD-Kamera bzw. an einem Philips CM100 mit einer 1 K CCD-Kamera angefertigt und mit Adobe Photoshop und Illustrator bearbeitet.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Für den ROS-Nachweis mittels Durchflusszytometrie wurden 25000 HeLa-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und für 72 h mit 5-FU (0,01; 0,5 mM), FURd oder FdURd (0,5; 10 μ M) und gleichzeitig mit 1 μ M Dihydrorhodamin 123 (DHR) inkubiert. Kontrollzellen wurden unbehandelt belassen oder nur mit DHR inkubiert. Als Positivkontrolle wurden außerdem Zellen verwendet, die für 72 h mit DHR und danach für 2 h mit Wasserstoffperoxid (1, 10 mM) behandelt wurden, um die ROS-Produktion zu stimulieren. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, in PBS resuspendiert und bei 4°C im Dunkeln belassen. Der nicht-fluoreszierende DHR-Farbstoff diffundiert über Membranen hinweg in Mitochondrien, wo er durch ROS zu einer grün-fluoreszierenden Form oxidiert wird. Die DHR-Fluoreszenz von jeweils 10000 Zellen wurde mit Hilfe des FACSCalibur-Zytometers und der Software

CELLQuest (BD Biosciences) gemessen. Die Werte wurden im Vergleich zu DHR-behandelten Kontrollzellen als Histogramme dargestellt.

Für die Analyse der Zellgröße wurden 25000 HeLa-Zellen in 6-well-Platten in Triplikaten ausgesät und für 72 h mit 5-FU (0,001 bis 0,1 mM) inkubiert oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden durch Trypsinierung abgelöst und mit Hilfe des FACSCalibur-Zytometers die Beugung des Laserstrahls (*forward scatter*, FSC) durch die Zellen ermittelt, die abhängig von der Größe der Zellen ist. Die FSC der drei Replikate wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

2.2.8 Proteinanalysen

2.2.8.1 Zellyse und Proteinbestimmung

Für die Proteinanalyse wurden HeLa-Zellen in 6-well-Zellkulturplatten kultiviert. Nach Inkubation mit 5-FU wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit DPBS gewaschen und anschließend lysiert. Je 250 µl Lysepuffer wurden zu den Zellen gegeben und anschließend für mindestens 30 min schwenkend bei 4°C inkubiert. Verbliebene Zellreste wurden abzentrifugiert (30 min, 16000 g, 4°C) und die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bradford-Methode, bei der das Absorptionsmaximum eines Coomassie-Farbstoffs vor allem durch Bindung an basische Aminosäuren von 470 zu 595 nm verschoben wird [313]. Dazu wurden 5 µl des Zellysats mit 800 µl PBS und 200 µl Bradford-Reagenz in einer Küvette gut gemischt, die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen und die Konzentration anhand einer BSA-Standardreihe berechnet. Je 30 µg Protein pro Ansatz wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert.

2.2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine der Zellysate wurden anschließend mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt [314]. Durch Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine dabei stark negativ geladen und zusätzlich durch DTT denaturiert, sodass sie, nachdem sie in einem Sammelgel zu einer gleichmäßigen Front konzentriert worden sind, in einem Trenngel entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

Zunächst wurde das Trenngel mit der entsprechenden Konzentration (Tabelle 5) zubereitet und zwischen zwei Glasplatten gegossen, die mit dafür vorgesehenen Klammern befestigten wurden. Anschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol

überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel hergestellt (Tabelle 5) und über das Trenngel gegossen. Schließlich wurde ein Gelkamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt.

Tabelle 5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE. (in ml)

	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
Trenngelpuffer	2,5	-
Sammelgelpuffer	-	3,125
aqua bidest.	4,2	-
Acrylamid (30%)	3,3	0,625
APS	0,1	0,05
TEMED	0,01	0,005

Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel mit den Glasplatten in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Protean II-Elektrophoresekammer eingesetzt und der Gelkamm aus dem Gel gezogen. Die Geltaschen wurden mit den vorbereiteten Proben (mit gleicher Proteinhöhe) und einem Proteinmarker beladen. Die Gelkammer wurde an das Netzgerät angeschlossen und zunächst eine geringe Spannung von etwa 60 V angelegt, um die Proben langsam in das Sammelgel einlaufen zu lassen. Danach wurde die Spannung auf etwa 120 V erhöht, bis die Lauffront des im Laemmli-Probenpuffer enthaltenen Farbstoffs die untere Gelkante erreichte. Schließlich wurde das Gel von den Gelplatten abgelöst und die Proteine entweder mit Coomassie angefärbt oder auf eine PVDF-Membran übertragen.

2.2.8.3 Coomassie-Gelfärbung

Die Proteine in SDS-Gelen wurden mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau nachgewiesen, um eine gleichmäßige Proteinkonzentration in verschiedenen Proben nachzuweisen [315]. Um das Eindringen des Farbstoffs zu erleichtern, wurde ein Gel in Coomassie-Färbelösung kurz in der Mikrowelle erhitzt und für mindestens 10 min schwenkend bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung schwenkend so lange entfärbt, bis ein Bandenmuster zu erkennen war.

2.2.8.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran

Durch „Western Blotting“ lassen sich die während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Membranen aus PVDF (Polyvinylidendifluorid) oder Nitrozellulose

übertragen, um den immunologischen Nachweis der an der Membran anhaftenden Proteine mittels Antikörpern zu ermöglichen [316, 317].

Der Transfer erfolgte nach der *semi-dry*-Methode. Dazu wurde eine PVDF-Membran zunächst für 10 min in Transferpuffer inkubiert und anschließend auf drei Lagen mit Transferpuffer befeuchtetem Whatman®-Papier auf die Anodenplatte der Transferapparatur gelegt. Daraufhin wurde die Membran luftblasenfrei mit dem SDS-Gel und drei weiteren Lagen befeuchtetem Whatman®-Papier bedeckt und die Apparatur mit der Katodenplatte verschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte schließlich für 40-75 min bei 150 mA.

2.2.8.5 Immunologischer Nachweis von transferierten Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine wurden die Membranen ü.N. bei 4°C mit 5% Milchpulver in PBS inkubiert, um unspezifische Bindestellen für die Antikörper abzusättigen. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit PBS gewaschen und in etwa 5 ml Primärantikörperlösung (in 0,5 % BSA in PBS) auf einem Rollmischer ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Membranen mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (in 5-10 ml 2 % Milchpulver) für 1 h bei RT inkubiert. Die Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 4 angegeben (Abschnitt 2.1.8). Die Membranen wurden erneut mit PBS gewaschen, je etwa 1 ml der beiden Komponenten des Western Lighting-Nachweisreagenz gemischt und die Membranen damit benetzt. In der Dunkelkammer wurde in einer Fotokassette schließlich ein Fotofilm auf die Membranen aufgelegt, der durch die einsetzende Chemolumineszenz-Reaktion geschwärzt und mit der Entwicklermaschine entwickelt wurde.

2.2.9 qRT-PCR

2.2.9.1 RNA-Isolierung

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) lässt sich die Expression bestimmter mRNAs im Vergleich zu mRNAs von Haushaltsgenen quantitativ bestimmen. Für diese Experimente wurden 30000 HeLa-Zellen jeweils in Duplikaten in 12-*well*-Platten ausgesät und mit siRNAs transfiziert (Abschnitt 2.2.3.4). Nach 48 h wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend die Gesamt-RNA der Zellen mit dem RNeasy®-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

Dazu wurden die Zellen zunächst durch Zugabe von 350 µl RLT-Lysepuffer mit 0,01 mM DTT lysiert, anschließend mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt und auf die Säulen überführt. Die Bindung der RNA an die Silicamembran erfolgte durch Zentrifugation (1 min, 16000 g, RT). Nach Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und erneuter Zentrifugation wurden die Säulen für 15 min mit 80 µl DNase I (Qiagen, 0,34 U/µl in RDD-Puffer) inkubiert. Anschließend wurden die Säulen mit 350 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und die RNA schließlich durch Zentrifugation in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wurde mit Hilfe des Nano Drop[®] UV-Spektrometers bestimmt.

2.2.9.2 Reverse Transkription

Jeweils 1 µg RNA der jeweiligen Proben wurde anschließend in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das entsprechende Volumen an RNA-Lösung mit DEPC-Wasser auf 9,5 µl eingestellt, mit 0,5 µl Oligo-dT₁₅-Primern versetzt und für 5 min bei 70°C aufgeschmolzen. Danach wurden den Ansätzen 5 µl M-MLV-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (je 25 nM ATP, CTP, GTP und TTP), 0,1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase sowie 9,4 µl DEPC-Wasser zugegeben. Für die Reverse Transkription wurden die Proben schließlich für 1 h bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen für 10 min auf 70°C beendet. Die Konzentration und Reinheit der cDNA-Proben wurde mit Hilfe des Nano Drop[®] UV-Spektrometers bestimmt und auf 100 ng/µl eingestellt.

2.2.9.3 Analyse des mRNA-Levels

Für die qRT-PCR-Analysen wurden mit einer elektronischen Mehrschritt-Pipette pro Ansatz je 2 µl cDNA (200 ng) mit 0,5 µl des jeweiligen Primermix (10 µM in DEPC-Wasser), 2,5 µl SYBR[®] Green ROX sowie 5 µl DEPC-Wasser in einer 384-well-Platte gemischt. Jeweils drei technische Replikate wurden für jede Probe gemessen. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und die Fluoreszenzemission während der Amplifikation mit der qRT-PCR-Maschine gemessen. Das dafür verwendete PCR-Programm umfasste einen initiellen Aufschmelzschritt bei 95°C für 10 min gefolgt von 40 Zyklen mit 95°C für 15 s und 60°C für 1 min.

Die Auswertung erfolgte mit der Software SDS 2.1 (Applied Biosystems) nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dabei wird der Zeitpunkt C_t bestimmt, an dem ein festgelegter Schwellenwert der Fluoreszenzemission durch Bindung des SYBR[®] Green-Farbstoffs an die amplifizierte doppelsträngige DNA überschritten wird. Der ΔC_t -Wert für verschiedene Versuchsbedingungen ergab sich jeweils durch den Vergleich mit der Amplifikation des Haushaltsgens *β -Aktin*. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert der jeweiligen

Versuchsbedingung wurde durch Vergleich mit der Kontrollbedingung (siNT) ermittelt und auf diese Kontrolle normalisiert. Die $\Delta\Delta C_t$ -Werte der drei technischen Replikate wurden jeweils gemittelt und der Mittelwert der zwei biologischen Replikate jeweils mit Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung potentieller 5-FU-Resistenzwege in *S. cerevisiae*

Bei der Chemotherapiebehandlung entwickeln sich oft Resistenzen, die deren Effektivität enorm einschränken. Daher ist die Identifizierung der Mechanismen, die zur Entstehung von Resistenzen beitragen, von großer Bedeutung [2]. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird als Modellsystem eingesetzt, da sie gut konservierte zelluläre Prozesse aufweist, die eine Homologie zu entsprechenden Wegen in humanen Zellen besitzen. Aufgrund ihrer relativ simplen Genetik, des schnellen Wachstums und der einfachen Kultivierung eignet sich Hefe hervorragend zur Untersuchung von Wirkmechanismen verschiedenster toxischer Substanzen [318]. Resistenzmechanismen und die beteiligten Gene sind durch globale Analysen von Hefe-Deletionsstämmen charakterisiert worden [319, 320]. Vor allem die Identifizierung von Mechanismen einer Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen wie 5-FU oder Cisplatin konnte durch Hefe-Analysen bereits erreicht werden [321, 322]. Da das Antimetabolit 5-FU, das durch die Inkorporation in RNA und DNA Schäden hervorruft, häufig für die Therapie verschiedener Krebstypen eingesetzt wird [31], allerdings oft 5-FU-Resistenzen auftreten, sollten daher im folgenden Abschnitt die Wirkmechanismen und potentiellen Resistenzwege von 5-FU zunächst in *S. cerevisiae* näher untersucht werden.

3.1.1 Globale Analyse potentieller Resistenzwege in *S. cerevisiae*

Eine globale Analyse von *S. cerevisiae*-Deletionsstämmen deckte bereits einige Gene auf, die eine Rolle bei der Resistenz gegenüber 5-FU spielen [321]. Da in dieser Studie YPD-Vollmedium eingesetzt wurde und verschiedene Hefemedien die Sensitivität von Hefestämmen gegenüber toxischen Substanzen beeinflussen können, sollte zunächst in eine weitere globale Analyse unter Einsatz von CSM-Hefemedium durchgeführt werden.

Hierfür wurde eine haploide MATa-Deletionsbank mit etwa 5000 verschiedenen Deletionsstämmen verwendet. Die Hefestämme wurden in 384-well-Platten kultiviert und von diesen auf CSM-Agarplatten gestempelt, die entweder 1 µg/ml 5-FU oder als Kontrolle lediglich DMSO enthielten (Abschnitt 2.2.2.2). Das Wachstum der einzelnen

Hefestämme wurde nach 1-2 Tagen analysiert. Diese Analysen wurden in drei unabhängigen Durchführungen wiederholt.

In Abbildung 6A ist eine repräsentative 384-well-Platte dargestellt. Stämme mit der Deletion eines potentiell Resistenz-vermittelnden Gens zeichneten sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber 5-FU und somit verringertem Wachstum im Vergleich zu anderen Stämmen aus (gelbe Kreise). Durch die Analyse der gesamten Deletionsbank wurden schließlich 65 Deletionsstämme identifiziert, die mindestens in zwei von drei unabhängigen Versuchen eine Sensitivität gegenüber 5-FU aufzeigten. Diese lassen sich in verschiedene funktionellen Klassen wie Transkription, DNA-Reparatur, Translation, RNA-Prozessierung, Lipidsynthese sowie Vesikeltransport zwischen Vakuole und Endosomen einteilen (Abbildung 6B).

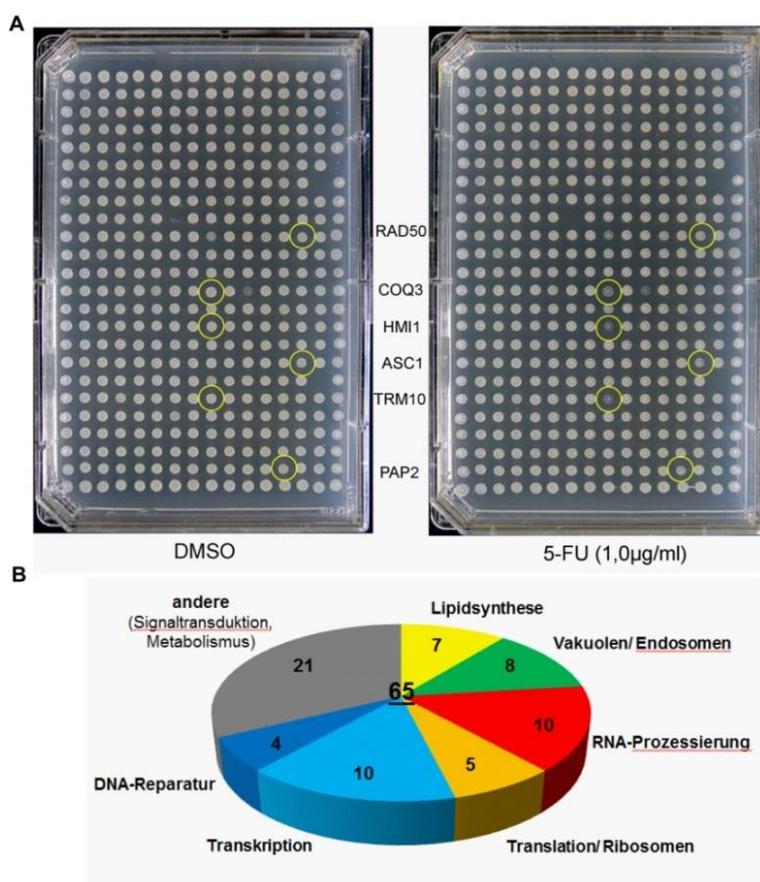


Abbildung 6: Globale Hefeanalyse zur Identifizierung 5-FU-sensitiver Deletionsstämme. (A) Repräsentative 384-well-Platte mit einigen 5-FU-sensitiven Stämmen (gelbe Kreise). Die Hefe-Deletionsbank wurde auf CSM-Platten mit 5-FU (1 µg/ml) bzw. Kontrollplatten mit DMSO gestempelt und für 1-2 Tage inkubiert. (B) Übersicht über die verschiedenen funktionellen Klassen von 5-FU-sensitiven Hefestämmen.

Die Tabelle 1 zeigt eine genauere Aufschlüsselung der 65 5-FU-sensitiven Deletionsstämme, von denen 35 orthologe Gene im Menschen aufweisen [www.inparanoid.sbc.su.se]. Gustavsson und Ronne konnten bereits 132 Deletionsstämme als 5-FU-sensitiv identifizieren [321]. Von diesen ließen sich im Rahmen dieser Arbeit 27 Stämme bestätigen, während darüber hinaus 38 weitere 5-FU-sensitive Stämme identifiziert werden konnten.

In dieser Veröffentlichung ist gezeigt worden, dass vor allem tRNA-modifizierende Enzyme eine wichtige Rolle bei der Sensitivität gegenüber 5-FU zukommt, da 5-FU zur Destabilisierung von tRNAs beiträgt [321]. Entsprechend konnten auch im Rahmen dieser Arbeit zehn sensitive Deletionsstämme identifiziert werden, die die Reifung sowohl von tRNAs als auch von rRNAs, mRNAs und snoRNAs beeinträchtigen. Neben an der rRNA-Prozessierung beteiligten Genen wurden zudem mehrere weitere Gene identifiziert, die an der Biogenese von Ribosomen beteiligt sind oder wie *RPL39* und *ASC1* (*absence of growth suppressor of Cyp1*) für ribosomale Proteine kodieren. Das humane ASC1-Ortholog GNB2L1/RACK ist besonders interessant, da gezeigt werden konnte, dass die Sequestrierung von RACK1 in SG der Apoptose entgegenwirken kann [197]. Zudem ist ASC1 als ein Regulator von P-bodies beschrieben [323].

Tabelle 6: 5-FU-sensitive Hefestämme. Übersicht über die in der globalen Hefeanalyse identifizierten Deletionsstämme, die in mindestens zwei von drei unabhängigen Versuchen eine Sensitivität gegenüber 5-FU aufwiesen, sowie die humanen Orthologe der entsprechenden Gene und deren zelluläre Funktion. (*: publizierte 5-FU-sensitive Stämme [321])

Gen	humane Orthol.	Funktion	Gen	humane Orthol.	Funktion
3x			2x		
APN1	-	DNA-Reparatur	MED1	-	RNA-Polymerase II-Mediator Komplex
ARG82*	-	Signaltransduktion	MED2	-	RNA-Polymerase II-Mediator Komplex
ASC1*	GNB2L1/ RACK1	Ribosomenprotein, Signaltransduktion	MSY1	YARS2	Mitochondriale tRNA-Aminoacylierung
BUB3	BUB3	Zellzyklusregulation	NBP2	SH3GL1	Signaltransduktion
COQ3	COQ3	Mitochondriale Ubiquinonsynthese	PEP7	ZFYVE20	Vesikelsortierung
ERG3*	SC5DL	Ergosterolsynthese	PEP12	STX12	Vesikelsortierung
ERG6*	-	Ergosterolsynthese	RAD51*	RAD51	DNA-Reparatur
FUI1	-	Uridin-Transport	RAI1	DOM3Z	mRNA/rRNA-Prozessierung
HMI1	-	Mitochondriale DNA-Reparatur	ROX3	-	RNA-Polymerase II-Mediator Komplex
PAP2	PAPD7	RNA-Abbau	RPL39	RPL39	Ribosomenprotein
RAD50*	RAD50	DNA-Reparatur	SIT4	PPP6C	Zellzyklusregulation
REG1*	-	Signaltransduktion	SMI1	-	Zellwandsynthese
RRP8*	RRP8	rRNA-Prozessierung	SNF1	PRKAA2	Signaltransduktion
RSA1*	-	Ribosomen-Biogenese	SRS2	-	DNA-Reparatur
SAC1*	-	Vesikelsortierung	SSF1*	PPAN	Ribosomen-Biogenese
TAF14*	-	Chromatin-Remodellierung	SSN8	CCNC	RNA-Polymerase II-Mediator Komplex
TAN1*	THUMPD1	tRNA-Prozessierung	SUR1	A4GNT	Sphingolipidsynthese
TRM10*	TRMT10A	tRNA-Prozessierung	TMA23*	-	Ribosomen-Biogenese
YNG2	ING4	Chromatin-Remodellierung	TRM1*	TRMT1	tRNA-Prozessierung
2x			VPS3	-	Vesikelsortierung
ACB1	ACBP	Acyl-CoA-Bindung	VPS5	SNX1	Vesikelsortierung
AIM4	-	Kernporen-Komplex	VPS8	VPS8	Vesikelsortierung
AKR1*	ZDHHC17	Protein-Palmitoylierung	VPS15	PIK3R4	Vesikelsortierung
CSG2	-	ER-Protein	YET1	BCAP31	ER-Protein
DBP3*	-	rRNA-Prozessierung	YEL045c	-	unbekannt
DEF1*	-	RNA-Polymerase II-Degradationsfaktor	YJL175w	-	unbekannt
DID4	-	Vesikelsortierung	YJR018w	-	unbekannt
DOA4	-	Proteinubiquitinierung	YNL198c	-	unbekannt
EFG1	-	rRNA-Prozessierung	YOR139c	-	unbekannt
ERG2	SIGMAR1	Ergosterolsynthese	YOR309c	-	unbekannt
ERG24*	LBR	Ergosterolsynthese	YOR385w	-	unbekannt
IES6*	INO80C	Chromatin-Remodellierung	YPK9	ATP13A2 / PARK9	Vakuolenprotein
IKI1	-	tRNA-Prozessierung	YVH1	DUSP12	Signaltransduktion

Zur weiteren Validierung wurden die 65 identifizierten 5-FU-sensitiven Deletionsstämme außerdem in Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit oder ohne 5-FU ausgetropft, die zudem Phloxin B enthielten. Der rote Phloxin B-Farbstoff wird nur von lebenden Zellen aktiv ausgeschleust. Auf diese Weise lassen sich lebende und tote Hefekolonien unterscheiden und somit beurteilen, ob die Sensitivität eines Stammes durch verlangsamtes Wachstum oder vermehrtes Absterben verursacht wird [324].

Abbildung 41 zeigt eine Auswahl der Hefestämme, deren 5-FU-Sensitivität sich eindeutig bestätigen ließ. Zum Teil zeigten die Hefestämme in der Validierung allerdings nur eine sehr geringe oder keine erkennbare Sensitivität. Die Deletionsstämme $\Delta APN1$, $\Delta RAD50$ und $\Delta HMI1$, die defizient für DNA-Reparaturprozesse sind, zeigten wie auch die für tRNA-Prozessierung defizienten Hefestämme $\Delta TRM1$ und $\Delta TAN1$ die stärkste Sensitivität gegenüber 5-FU. Bei diesen Stämmen war einhergehend mit verstärktem Absterben der Kolonien auch der deutlichste Phloxin B-Farbumschlag von leichtrosa zu rot zu erkennen.

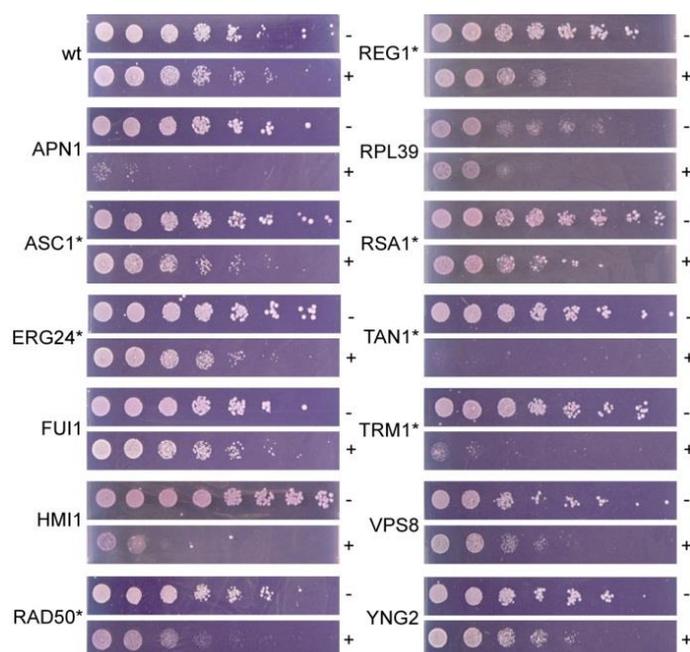


Abbildung 7: Validierung der 5-FU-sensitiven Deletionsstämme. Dargestellt ist eine Auswahl von Stämmen, die die stärkste Sensitivität zeigten. Die entsprechenden Deletionsstämme bzw. der Wildtyp wurden in Verdünnungsstufen auf CSM-Platten mit 5-FU (+) und Phloxin B bzw. entsprechenden Kontrollplatten (-) ausgetropft und für 2 Tage inkubiert. (*: publizierte 5-FU-sensitive Stämme [321])

3.1.2 Zusammenhang von 5-FU-Resistenzwegen und der Bildung von Stress-granules und P-bodies

Verschiedene Stressbedingungen führen zum Arrest der Translation und damit einhergehend zur Ausbildung von SGs. Nicht-translatierte mRNAs werden in diesen Strukturen gespeichert und können auch in PBs transferiert und dort abgebaut werden [101]. Die globale Analyse in *S. cerevisiae* deutete auf eine prominente Rolle der Translation und RNA-Prozessierung bei der Ausbildung von 5-FU-Resistenzen hin. Darüber hinaus wurde mit *ASC1* auch ein Gen identifiziert, das eine Rolle bei der Regulation von SGs und PBs spielt. Daher sollte im Folgenden eine potentielle Rolle von SGs und PBs bei der Resistenz gegenüber 5-FU näher untersucht werden.

Dazu wurden 33 Deletionsstämme näher untersucht, die die Bildung von PBs bzw. SGs regulieren oder für Komponenten dieser Strukturen kodieren (Abschnitt 2.1.4). Diese Stämme wurden ebenfalls in Verdünnungsstufen auf Agarplatten mit oder ohne 5-FU ausgetropft und das Wachstum analysiert (Abschnitt 2.2.2.2).

Durch diese Experimente konnten von den 33 untersuchten Stämmen fünf als 5-FU-sensitiv identifiziert werden, die in der ursprünglichen globalen Analyse nicht erkannt worden sind. Wie in Abbildung 8A zu sehen ist, zeigten die Deletionsstämme $\Delta DHH1$, $\Delta LSM1$, $\Delta PAT1$, $\Delta PBP1$ und $\Delta XRN1$ im Vergleich zum Wildtyp ein vermindertes Wachstum auf Medium mit 5-FU.

DHH1 (*DEAD box helicase homolog*) ist bereits zuvor als 5-FU-Resistenzgen beschrieben worden [321]. Es kodiert wie auch *PAT1*, *LSM1* und *XRN1* und deren humane Orthologe für PB-Komponenten. Das humane Ortholog von *PBP1* (*Pab1p-binding protein*), Ataxin-2 (*ATXN2*), ist hingegen eine Komponente von SGs [325], ebenso wie Ataxin-2-like (*ATXN2L*) als ein potentielles weiteres Ortholog [145].

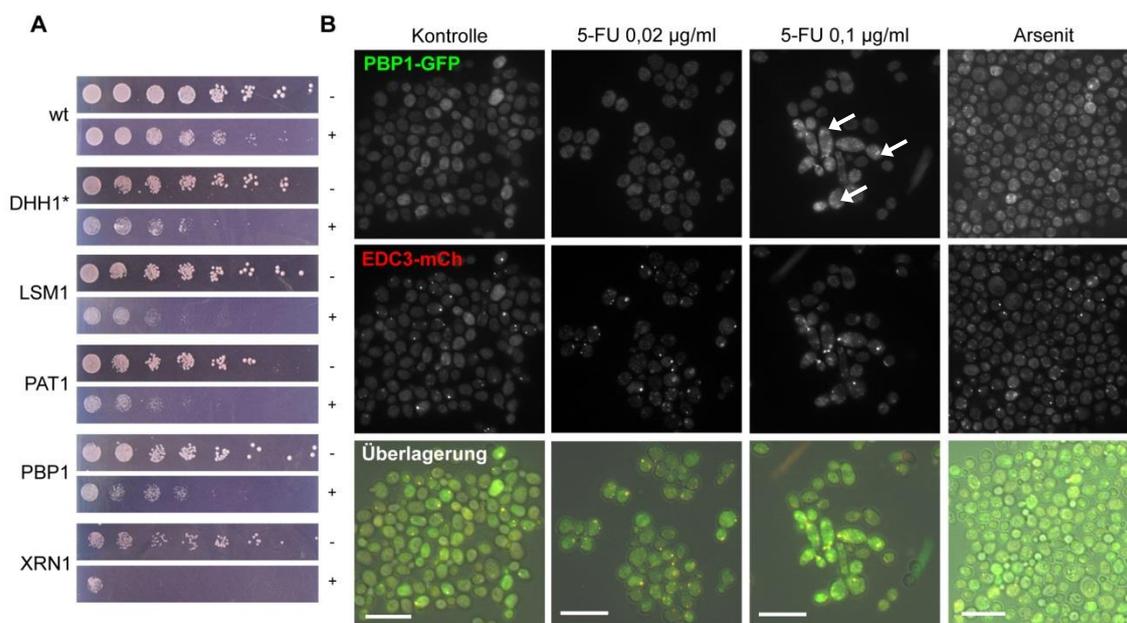


Abbildung 8: 5-FU beeinflusst das Wachstum von SG- bzw. PB-defizienten Hefestämmen sowie die Bildung von SGs und PBs. (A) 5-FU-sensitive Deletionsstämme mit Funktion bei der Bildung von SGs und PBs. Die entsprechenden Hefestämme bzw. der Wildtyp wurden in Verdünnungsstufen auf CSM-Platten mit 5-FU (+) und Phloxin B bzw. entsprechenden Kontrollplatten (-) ausgetropft und für 2 Tage inkubiert. (*: publizierte 5-FU-sensitive Stämme [321]) **(B)** Der Wildtyp-Hefestamm BY4741 wurde mit dem Plasmid pRP-PBP1-GFP/EDC3-mCh transfiziert. Die Hefetransformanten wurden für 16 h in CSM-Trp-Medium mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen inkubiert und fixiert. Kontrollzellen wurden unbehandelt belassen bzw. für 30 min mit 1 mM Natrium-Arsenit behandelt und fixiert. Fluoreszenzsignale von PBP1-GFP als Marker für SGs (Pfeile) bzw. von EDC3-mCh als PB-Marker wurden zusammen mit Durchlichtaufnahmen visualisiert. Maßstabbalken: 10 µm

Da die vorangegangenen Analysen auf eine Rolle von Komponenten von SGs sowie PBs bei der Resistenz gegenüber 5-FU hindeuteten, sollte abschließend geklärt werden, ob 5-FU die Bildung von SGs oder PBs in Hefezellen beeinflusst.

Dafür wurden zunächst Wildtyp-Hefezellen mit dem Markerplasmid pRP-PBP1-GFP/EDC3-mCh transfiziert, um gleichzeitig die GFP-fusionierte SG-Komponente PBP1 sowie die mCh-fusionierte PB-Komponente EDC3 zu exprimieren [311]. Dann wurden die entsprechenden Hefetransformanten für 16 h in Flüssigkultur mit 0,02 oder 0,1 µg/ml 5-FU inkubiert, fixiert und für die mikroskopischen Analysen vorbereitet (Abschnitt 2.2.2.3). Kontrollzellen wurden zudem für 30 min mit 1 mM Natrium-Arsenit oxidativem Stress ausgesetzt oder unbehandelt belassen.

Wie in Abbildung 8B zu erkennen ist, zeigten sowohl unbehandelte als auch mit 0,02 µg/ml 5-FU behandelte Hefezellen eine diffuse Lokalisation von PBP1 im Zytoplasma. Dagegen lokalisierte PBP1 bei 0,1 µg/ml 5-FU in den meisten Zellen in

punktuellen Strukturen (Pfeile). PBP1-positive Strukturen waren wie erwartet auch in Arsenit-behandelten Hefezellen zu sehen. Das Vorhandensein des SG-Markerproteins PBP1 in diesen Foci zeigte, dass es sich um SGs handelte. Darüber hinaus zeigten Hefezellen, die mit 0,02 µg/ml 5-FU behandelt wurden, mehr EDC3-positive Strukturen als unbehandelte Zellen. Auch in Arsenit-behandelten Hefezellen war wie publiziert eine Zunahme dieser Strukturen zu beobachten [311]. Die Lokalisation des PB-Markerproteins EDC3 weist diese Strukturen als PBs aus. Mit 0,1 µg/ml 5-FU behandelte Hefezellen waren außerdem im Vergleich zu unbehandelten Zellen vergrößert.

Diese Untersuchungen zeigten somit, dass 5-FU in Hefezellen die SG-Bildung induzieren und darüber hinaus die PB-Bildung verstärken kann.

Zusammenfassend konnten durch die Analysen in *S. cerevisiae* also Gene identifiziert werden, die eine Resistenz gegenüber 5-FU vermitteln. Darunter waren viele Gene, die Translation und die RNA-Prozessierung betrafen und darüber hinaus auch solche, die die Bildung von SGs und PBs regulieren. Dementsprechend beeinflusste 5-FU auch die Bildung dieser Strukturen in Hefezellen. Somit lässt sich vermuten, dass SGs und PBs eine Rolle bei der Resistenz gegenüber 5-FU spielen könnten.

3.2 Untersuchung der Auswirkungen von 5-FU auf humane Zellen

Die vorangegangenen Arbeiten in der Hefe *S. cerevisiae* zeigten einen Einfluss von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs. Diese RNA-*granules* sind zwischen verschiedenen Organismen relativ gut konserviert. Auch in humanen Zellen entstehen SGs unter ähnlichen Stressbedingungen und stehen in enger Verbindung mit PBs [101]. Es ist zudem bereits gezeigt worden, dass 5-FU aufgrund einer verstärkten Expression von Aquaporinen zu einer Vergrößerung von Zellen führt [326]. Deshalb sollte im Folgenden überprüft werden, wie sich 5-FU in humanen Zellen auf die Bildung von SGs und PBs sowie die Zellmorphologie auswirkt.

3.2.1 Auswirkungen von 5-FU auf die Stress-*granule*-Bildung in HeLa-Zellen

Zunächst sollte untersucht werden, ob 5-FU auch in humanen Zellen zur Ausbildung von SGs führt. Hierzu wurden HeLa-Zellen auf sterile Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, anschließend fixiert und permeabilisiert. Da polyadenylierte RNA (Poly(A)-RNA) unter verschiedenen Stressbedingungen in SGs lokalisiert [166], wurde diese daraufhin mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit Cy3-gekoppelten Oligo-dT₃₀-Sonden detektiert. Anschließend wurde zusätzlich das SG-Markerprotein TIAR [166] mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert, die Zellkerne schließlich mit Hoechst angefärbt und die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abschnitt 2.2.4).

Wie in Abbildung 9A zu sehen ist, lokalisierte TIAR in unbehandelten Zellen vor allem im Zellkern, darüber hinaus aber auch im Zytoplasma. Auch die Poly(A)-RNA ließ sich sowohl im Zytoplasma als im Zellkern nachweisen, wo sie in punktförmigen Strukturen auftrat. Bei 0,001 oder 0,003 mM 5-FU ließ sich keine veränderte Lokalisation von TIAR feststellen. Nach Behandlung mit 0,03 mM oder 0,1 mM 5-FU wiesen die Zellen zytoplasmatische Strukturen auf, die sowohl positiv für TIAR als auch für Poly(A)-RNA waren. Dies lässt vermuten, dass es sich um SGs handelt. SGs ließen sich in vereinzelt Zellen (etwa 5 %) bereits bei 0,01 mM 5-FU nachweisen, während bei 0,1 mM 5-FU bis zu 50 % der Zellen SGs aufwiesen. Nach Behandlung mit 0,001 mM 5-FU waren die Zellen außerdem leicht vergrößert, eine noch deutlichere Vergrößerung der Zellen ließ sich bei höheren 5-FU-Konzentrationen von 0,003 oder 0,01 mM feststellen. Einhergehend mit der Entstehung von SGs waren die Zellen bei

0,03 oder 0,1 mM 5-FU weniger stark vergrößert. Somit führte 5-FU auch in HeLa-Zellen zur *de novo*-Bildung von SGs.

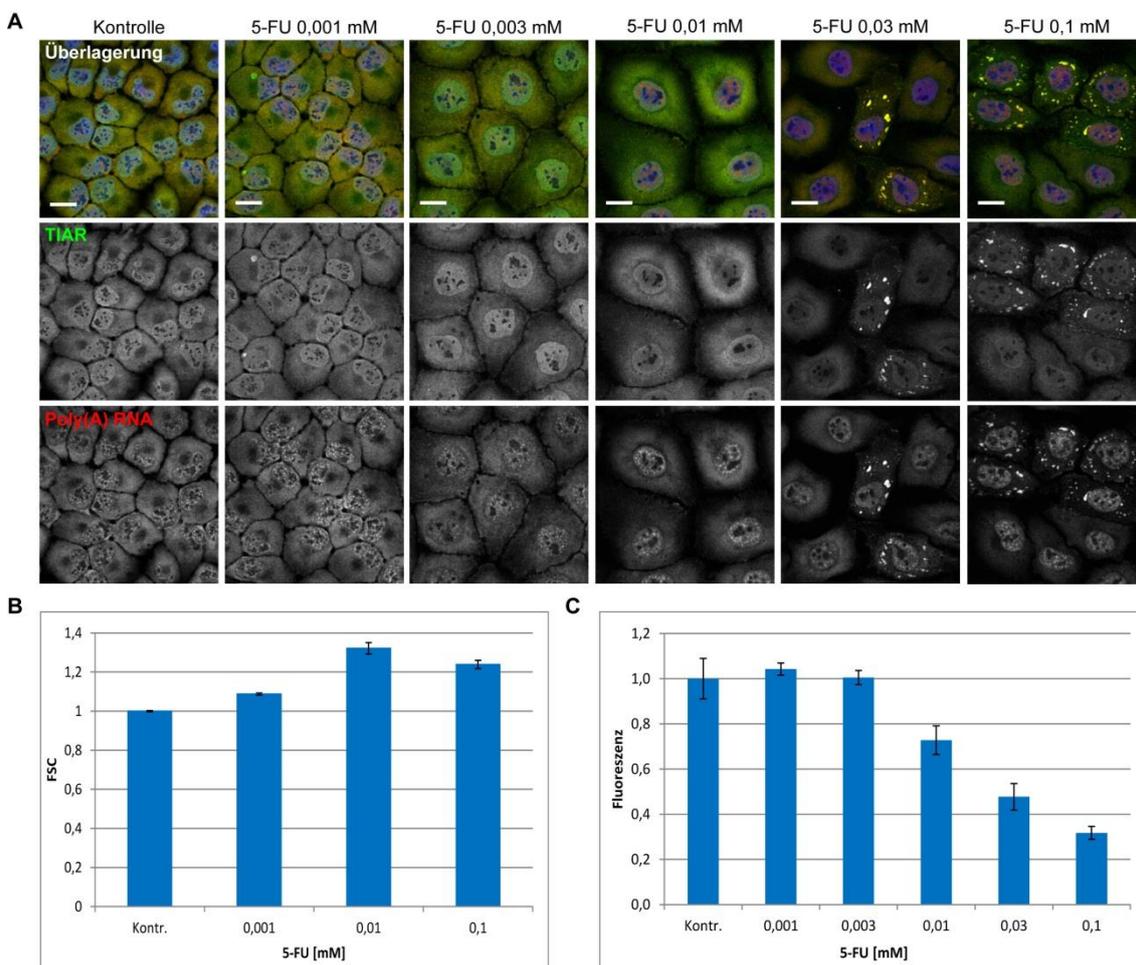


Abbildung 9: 5-FU führt zur Bildung von SGs in HeLa-Zellen. (A) Konfokale Immunfluoreszenz-Analysen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, fixiert und permeabilisiert. Daraufhin wurde Poly(A)-RNA mittels Cy3-Oligo-dT₃₀-Sonden detektiert. TIAR als SG-Marker wurde anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 µm. (B) Messung der Zellgröße mittels Durchflusszytometrie. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, abgelöst und der *frontal scatter* (FSC) in Suspension gemessen. (C) Zellproliferation unter 5-FU-Einfluss. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, für 4 h mit Alamar[®] Blue-Reagenz inkubiert und die Fluoreszenz bei 585 nm gemessen.

Diese Effekte von 5-FU auf die Zellgröße sollten daraufhin zur Validierung mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Dazu wurden HeLa-Zellen für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, durch Trypsinierung abgelöst und

die Beugung des Laserstrahls (*forward scatter*, FSC) durch die Zellen in Suspension als Maß der Zellgröße ermittelt.

Hierbei zeigte sich eine leichte Zellvergrößerung im Vergleich zu unbehandelten Zellen bereits bei 5-FU-Konzentrationen von 0,001 mM (Abbildung 9B). Die Zellen waren bei 0,01 mM noch stärker vergrößert, bei 0,1 mM hingegen weniger stark vergrößert als bei 0,01 mM. Somit ließen sich die in den mikroskopischen Analysen gezeigten Effekte von 5-FU auf die Zellgröße bestätigen.

Abschließend sollte überprüft werden, wie sich die eingesetzten Konzentrationen auf die Proliferation der Zellen auswirken. Dazu wurden HeLa-Zellen für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, anschließend für 4 h mit Alamar Blue[®]-Reagenz inkubiert und dessen Fluoreszenz schließlich mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Das Alamar Blue[®]-Reagenz wird dabei nur von proliferierenden Zellen umgesetzt und von einer nicht-fluoreszierenden Form zu einer bei 585 nm fluoreszierenden Form reduziert.

Wie in Abbildung 9C ersichtlich, ließ sich ein leicht erhöhtes Wachstum der Zellen bei 0,001 mM im Vergleich zu unbehandelten Zellen feststellen. Die Zellproliferation war hingegen bei 0,01 mM 5-FU stark reduziert und wurde weiter verringert bis auf 32 % bei 0,1 mM 5-FU. Somit führte die 5-FU-Behandlung zu einer graduellen Reduzierung der Zellproliferation mit steigenden 5-FU-Konzentrationen. Unter Bedingungen, die zur SG-Bildung führen, war die Proliferation zudem stark verringert.

Zusammenfassend ließ sich also zeigen, dass 5-FU die Proliferation von HeLa-Zellen einschränkt und zu einer starken Vergrößerung der Zellen führt. Bemerkenswerterweise löste 5-FU bei höheren Konzentrationen die *de novo*-Bildung von SGs aus, während die Zellen nur geringfügig vergrößert waren.

3.2.2 Quantifizierung der Stress-*granule*-Induktion durch 5-FU

Um die in den mikroskopischen Analysen beobachteten Auswirkungen von 5-FU weiter zu validieren und quantifizieren, wurde ein automatisiertes Mikroskopie-System genutzt, das Aufnahmen von Zellen im Hochdurchsatz generiert, sowie eine Software, die zelluläre Strukturen wie SGs, PBs, aber auch die Umrisse von Zellen und Zellkernen erkennt. Somit sind genaue Aussagen über Anzahl und Größe verschiedener Strukturen möglich.

HeLa-Zellen wurden dafür in 96-*well*-Platten ausgesät, für 72 h mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen behandelt, fixiert und die Proben wie in Material und Methoden beschrieben vorbereitet (Abschnitt 2.2.5). G3BP als SG-Marker wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

Um den Einfluss von 5-FU auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde zunächst die Zellzahl ermittelt. Wie in Abbildung 10A ersichtlich, konnten mit steigenden 5-FU-Konzentrationen zunehmend weniger Zellen detektiert werden. Bei 0,001 mM 5-FU war die Zellzahl nur leicht verringert, bei 0,01 und 0,1 mM 5-FU hingegen stark reduziert auf etwa 12 %. Die gemessene Zellgröße hingegen stieg bei 5-FU-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen sehr stark an (Abbildung 10B). Bei 0,001 mM 5-FU ließ sich nur ein leichter Anstieg der Zellgröße feststellen, bei 0,01 mM 5-FU war die deutlichste Vergrößerung der Zellen zu sehen. Im Vergleich dazu waren die Zellen bei 0,1 mM 5-FU etwas weniger stark vergrößert.

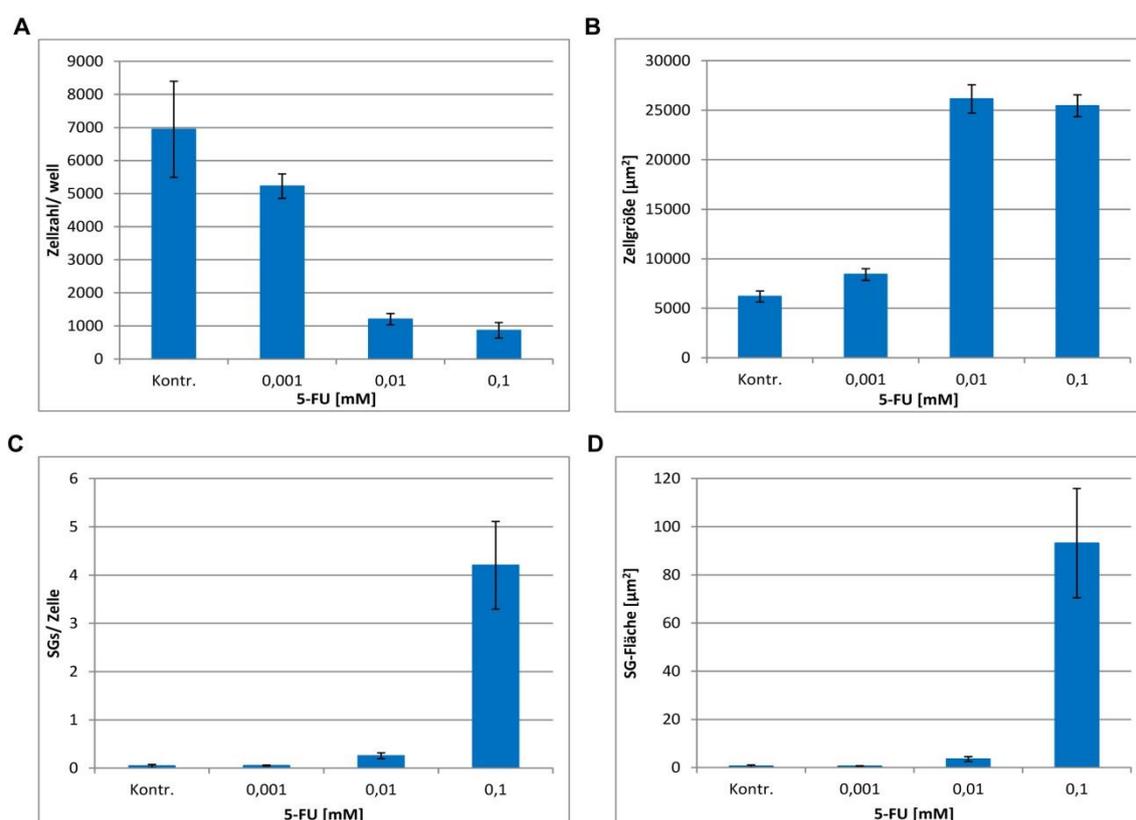


Abbildung 10: Quantifizierung von 5-FU-Effekten auf die SG-Bildung. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt. Daraufhin wurde G3BP als SG-Marker mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Zellzahl (A) pro *well*, die Zellgröße (B) sowie die Anzahl (C) und Gesamtfläche (D) von G3BP-positiven SGs wurden mittels automatisierter Mikroskopie ermittelt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf Replikaten.

Während in unbehandelten Zellen keine erwähnenswerte SG-Bildung detektiert werden konnte, ließ sich ein leichter Anstieg sowohl der Anzahl als auch der Fläche von SGs bei 0,01 mM 5-FU feststellen (Abbildung 10C, D). Jedoch konnte eine deutliche SG-Bildung erst bei 0,1 mM 5-FU beobachtet werden. Somit ließen sich die Befunde aus den vorangegangenen mikroskopischen Analysen bestätigen.

3.2.3 Auswirkungen von 5-FU auf die Stress-*granule*-Bildung in verschiedenen Zelllinien

In den vorangegangenen Untersuchungen ließ sich ein Einfluss einer 5-FU-Behandlung auf die SG-Bildung in HeLa-Zellen aufzeigen, die ihren Ursprung in einem zervikalem Karzinom haben [306]. Um zu überprüfen, ob die beobachteten 5-FU-Effekte allgemeingültig oder zelltypspezifisch sind, sollten im Folgenden die Auswirkungen von 5-FU auch in anderen Zelllinien verschiedenen Ursprungs überprüft werden.

Dafür wurden Du145-Zellen ausgewählt, die aus Hirnmetastasen mit Ursprung in einem Prostata-Adenokarzinom abgeleitet worden sind [304]. Zum Vergleich wurden darüber hinaus weitere Zelllinien herangezogen, die ihren Ursprung in Prostatagewebe haben: zum einen PC3-Zellen, die im Gegensatz zu Du145-Zellen aus Knochenmetastasen abgeleitet worden sind [327] und ein höheres metastatisches Potential aufweisen [308], zum anderen RWPE1-Zellen, eine nicht-tumorigene Zelllinie, die durch Transformation von normalen Prostataepithelzellen mit dem humanen Papillomavirus (HPV) etabliert worden ist [309]. Außerdem wurden weitere Zelllinien untersucht, die ihren Ursprung in Karzinomen haben: zum einen HepG2-Zellen, die von einem hepatozellulären Leberkarzinom abstammen [307], zum anderen A549-Zellen aus einem Adenokarzinom von Lungenalveolen-Epithelzellen [303]. Schließlich wurden zwei Zelllinien embryonalen Ursprungs analysiert: zum einen HEK293T-Zellen, die ihren Ursprung in embryonalen Nierenzellen haben, die mit dem Adenovirus 5 sowie dem SV40-Virus transformiert worden sind [305], und zum anderen WI-38-Zellen, nicht-transformierte embryonale Lungenfibroblasten [310].

Diese Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. TIAR als SG-Marker wurde anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, konnten bei 0,1 mM 5-FU in 20-30 % der Du145-Zellen TIAR-positive SGs detektiert werden (Abbildung 11A). In PC3-Zellen traten bei 0,1 mM

5-FU in 10-20 % der Zellen SGs auf, die jedoch deutlich kleiner waren als in Du145-Zellen (Abbildung 11B). In der dritten untersuchten Prostata-Zelllinie RWPE1 waren SGs bei 0,1 mM 5-FU in 80 % der Zellen zu finden (Abbildung 11C). In 30 % der HepG2-Zellen konnten bei 0,1 mM 5-FU SGs nachgewiesen werden (Abbildung 11D), während in nur 10 % der A549-Zellen nach Behandlung mit 0,3 mM 5-FU SGs zu finden waren (Abbildung 11E). Auch in den untersuchten embryonalen Zelllinien ließen sich SGs nachweisen. Sowohl in HEK293T-Zellen (Abbildung 11F) als auch WI38-Zellen (Abbildung 11G) traten SGs bei 0,1 mM 5-FU in etwa 10 % der Zellen auf. Somit ließen sich in allen untersuchten Zellen nach 5-FU-Behandlung SGs nachweisen.

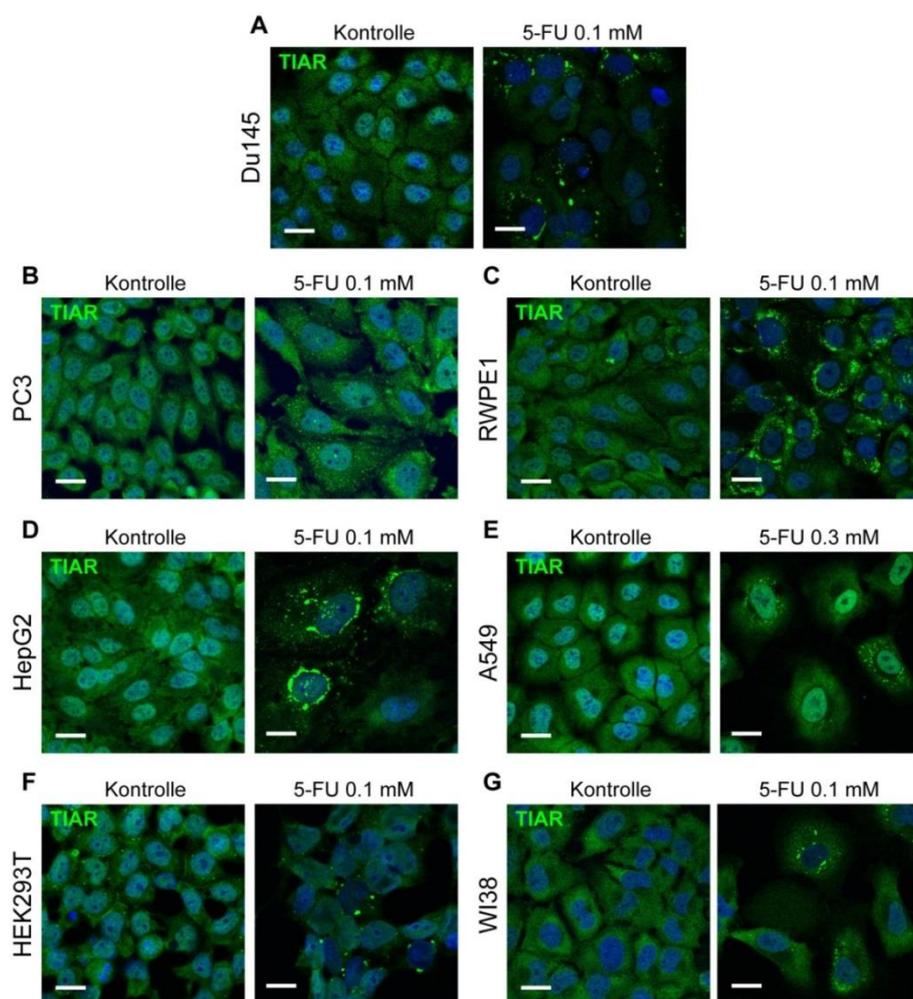


Abbildung 11: 5-FU induziert die SG-Bildung in verschiedenen Zelllinien. (A-G) Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h verschiedenen Konzentrationen von 5-FU ausgesetzt und anschließend fixiert. TIAR als SG-Marker wurde mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μ m.

Zusammenfassend konnte also die zuvor in HeLa-Zellen beobachtete *de novo*-Bildung von SGs durch 5-FU auch in anderen Zelllinien reproduziert werden, auch wenn sich

die Anzahl und Größe der entstehenden SGs zwischen den verschiedenen Zelllinien unterschied.

3.2.4 Zusammensetzung von Stress-*granules* bei 5-FU-Behandlung

Verschiedene Stressbedingungen wie Hitze, Hypoxie, ER-Stress, osmotischer oder oxidativer Stress können die Bildung von SGs auslösen [90]. Unter diesen Bedingungen können SGs auch verschiedene Proteine enthalten. Bestimmte Komponenten wie einige Translationsinitiationsfaktoren und RNA-Bindeproteine haben jedoch alle diese *bona fide* SGs gemeinsam [101]. Poly(A)-RNA ist ebenso ein typischer Bestandteil dieser Strukturen [166]. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, inwiefern sich neben TIAR weitere *bona fide* SG-Komponenten auch in den 5-FU-induzierten Strukturen nachweisen lassen. Neben diesen Komponenten erhalten SGs auch einige Proteine, die eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen. Auf diese Weise können SGs in verschiedene Signalwege eingreifen [90]. Da einige SG-Komponenten auch die Apoptose regulieren, sind Signalwege für die SG-Bildung sowie apoptotische Prozesse eng miteinander verflochten. RACK1 ist ein Mediator der Apoptose durch Aktivierung von stressabhängigen MAPK-Signalwegen. Durch Sequestrierung von RACK1 in SGs unter bestimmten Stressbedingungen kann diese Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege jedoch verhindert werden [197]. Deshalb sollte im Weiteren überprüft werden, ob die 5-FU-induzierten SGs auch RACK1 beinhalten.

Dafür wurden HeLa-Zellen mit 5-FU behandelt, wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und die SG-Komponenten ATXN2 [325], ATXN2L [145], G3BP [154] und eIF4G [131] bzw. RACK1 mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Wie in Abbildung 12A zu sehen, wiesen die Zellen nach Behandlung mit 0,1 mM 5-FU zytoplasmatische Strukturen auf, die positiv für ATXN2 und ATXN2L waren. Darüber hinaus konnten auch G3BP und eIF4G nach 5-FU-Behandlung in diesen Strukturen nachgewiesen werden (Abbildung 12B). Somit scheint es sich bei den 5-FU-induzierten Strukturen tatsächlich um *bona fide* SGs zu handeln.

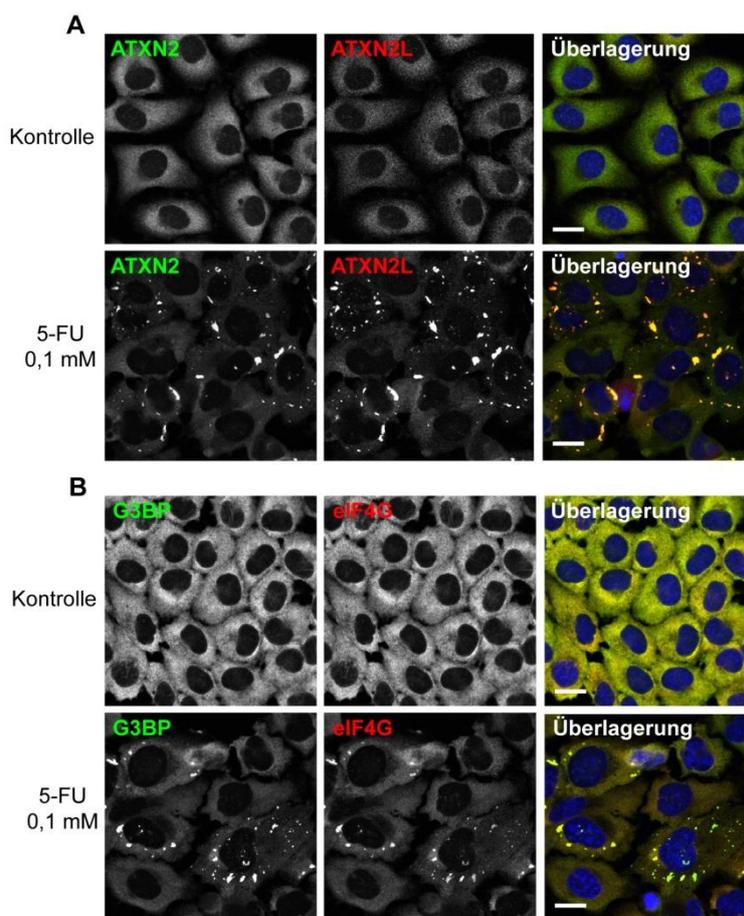


Abbildung 12: 5-FU-induzierte SGs beinhalten verschiedene SG-Markerproteine. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit 0,1 mM 5-FU behandelt oder unbehandelt belassen und danach fixiert. Verschiedene SG-Markerproteine wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen (A) ATXN2, ATXN2L sowie (B) G3BP und eIF4G visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μm .

Wie in Abbildung 13 zu sehen, war RACK1 in unbehandelten Zellen im Zytoplasma lokalisiert. Nach Behandlung mit 0,01 mM 5-FU waren die Zellen wie bereits zuvor beschrieben stark vergrößert. Bei 0,1 mM 5-FU traten zytoplasmatische Strukturen auf, die sowohl positiv für RACK1 als auch für eIF4G waren. RACK1 war darüber hinaus auch bei 0,1 mM 5-FU noch in großem Umfang im Zytoplasma zu finden.

Somit lokalisierte RACK1 zumindest teilweise in 5-FU-induzierten *bona fide* SGs. Diese partielle Sequestrierung von RACK1 in SGs könnte einen protektiven Mechanismus darstellen, der der Apoptose durch 5-FU entgegenwirkt.

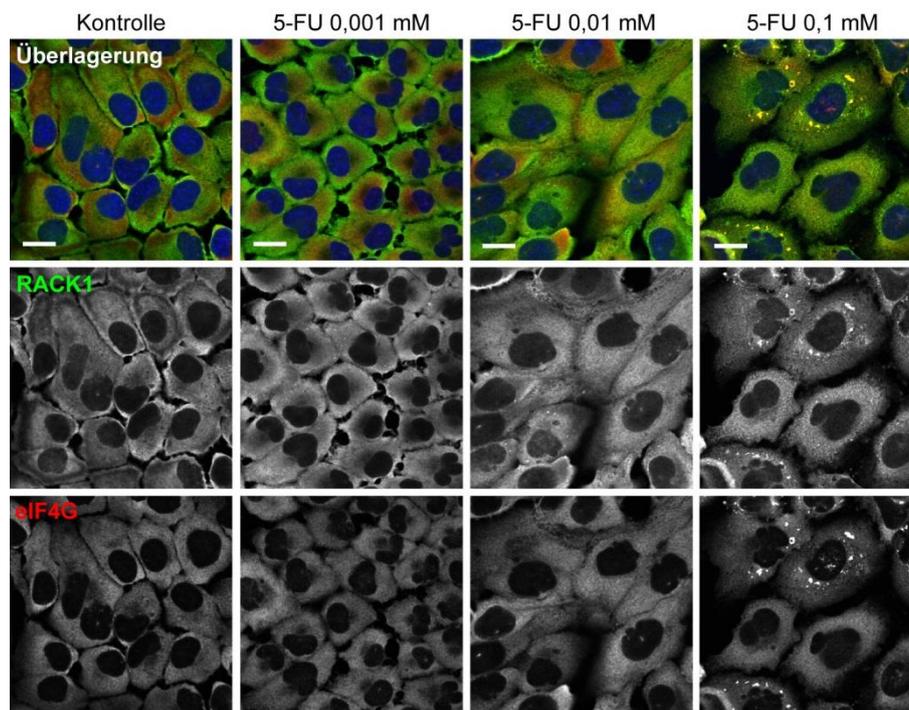


Abbildung 13: 5-FU-induzierte SGs beinhalten RACK1. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt und fixiert. RACK1 sowie eIF4G als SG-Marker wurden mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabstabschen: 20 μm .

3.2.5 Auswirkungen von 5-FU auf die Stress-granule-Bildung unter Stressbedingungen

Nachdem bisher gezeigt werden konnte, dass 5-FU die *de novo*-Bildung von SGs induzieren kann, sollte in einem weiteren Schritt überprüft werden, wie sich 5-FU unter etablierten Stressbedingungen wie oxidativem oder Hitzestress auf die SG-Bildung auswirkt.

Zunächst sollten die Auswirkungen von 5-FU unter gleichzeitigem oxidativen Stress untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen für mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU inkubiert, anschließend für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Zum Nachweis von SGs wurde anschließend Poly(A)-RNA mit Cy3-gekoppelten Oligo-dT₃₀-Sonden sowie TIAR mittels eines spezifischen Antikörpers markiert. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von 5-FU auf die SG-Bildung wie zuvor beschrieben mittels automatisierter Mikroskopie quantifiziert.

Wie in Abbildung 14A erkennbar, wiesen 5-FU- und Arsenit-behandelte Zellen bereits bei 0,001 mM 5-FU mehr SGs im Vergleich zu Arsenit-behandelten Zellen auf. Bei

0,01 mM 5-FU und noch höheren Konzentrationen zeigten die Zellen zudem vergrößerte und zunehmend unregelmäßig geformte SGs. Wie die Quantifizierung ergab, war bei 0,001 mM 5-FU ein deutlicher Anstieg sowohl in der Anzahl als auch der Fläche von SGs zu erkennen (Abbildung 14B, C). In Zellen, die mit 0,01 mM 5-FU behandelt wurden, waren SG-Anzahl und -Fläche mehr als verdreifacht, eine noch höhere 5-FU-Konzentration hatte hingegen keinen stärkeren Effekt auf die SG-Bildung. Somit konnte gezeigt und durch die Quantifizierung weiter untermauert werden, dass die SG-Bildung unter oxidativem Stress durch 5-FU deutlich verstärkt wurde.

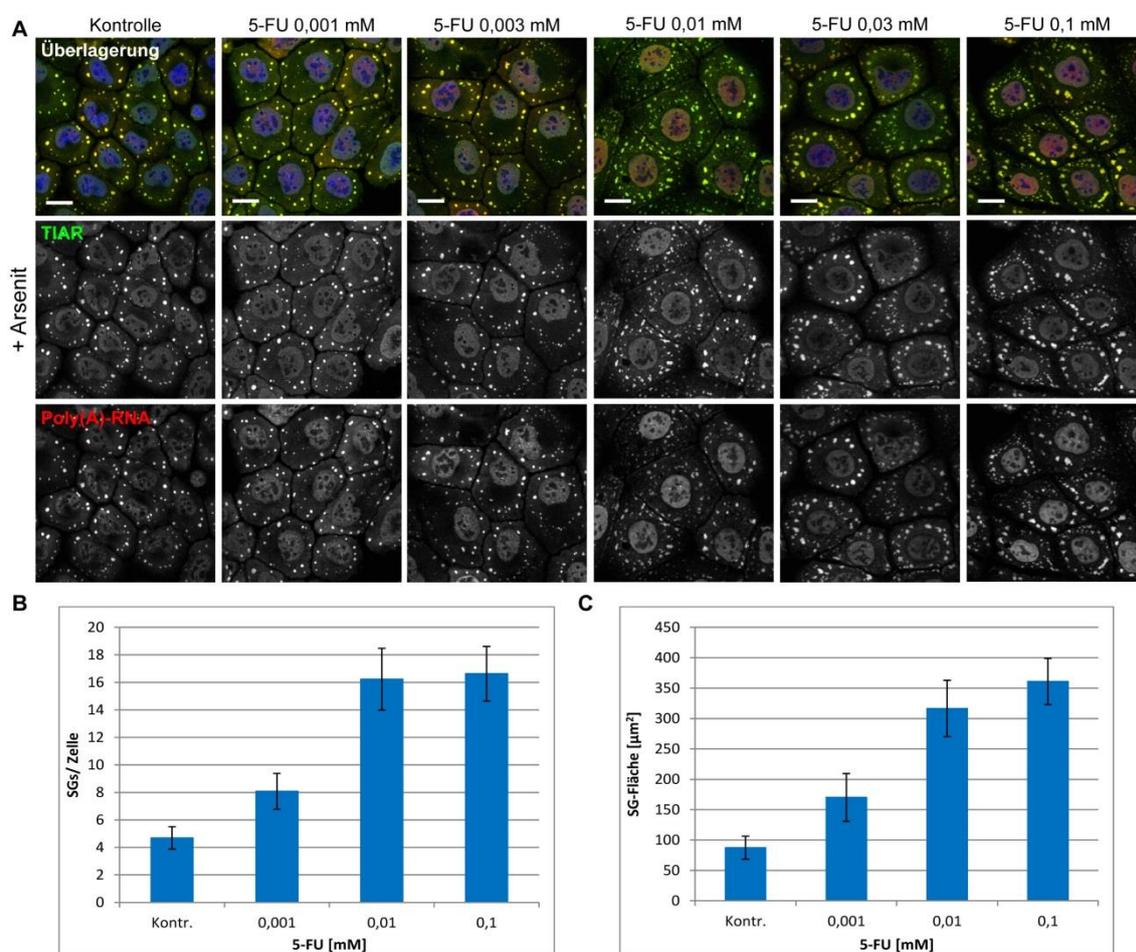


Abbildung 14: 5-FU verstärkt die Bildung von SG unter oxidativen Stressbedingungen. (A) HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, für 72 h verschiedenen Konzentrationen von 5-FU ausgesetzt, anschließend für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt, fixiert und permeabilisiert. Daraufhin wurde Poly(A)-RNA mittels Cy3-Oligo-dT₃₀-Sonden detektiert. TIAR als SG-Marker wurde anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabballen: 20 µm. (B, C) Quantifizierung der Anzahl (B) und Gesamtfläche (C) von G3BP-positiven SGs mittels automatisierter Mikroskopie. HeLa-Zellen wurden hierfür für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt. Daraufhin wurde G3BP als SG-Marker mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus fünf Replikaten.

Des Weiteren sollte der Einfluss von 5-FU auf die SG-Bildung unter Hitzebedingungen untersucht werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt, anschließend für 30 min bei 44°C einem Hitzestress ausgesetzt und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. TIAR als SG-Marker wurde anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert.

Wie in Abbildung 15 erkennbar, ließen sich in 5-FU- und hitzebehandelten Zellen bei 0,003 oder 0,01 mM 5-FU deutlich mehr SGs nachweisen als in hitzebehandelten Kontrollzellen. Darüber hinaus lagen die SGs nach 5-FU-Behandlung stärker im Zytoplasma verteilt vor, während sie in unbehandelten Zellen nach Hitzestress um die Zellkerne angeordnet waren.

Somit ließ sich zeigen, dass 5-FU auch bei Hitzestress die SG-Bildung verstärkte. Die zytoprotektive Funktion der SG-Bildung unter verschiedenen Stressbedingungen könnte auf diese Weise durch 5-FU weiter gesteigert werden.

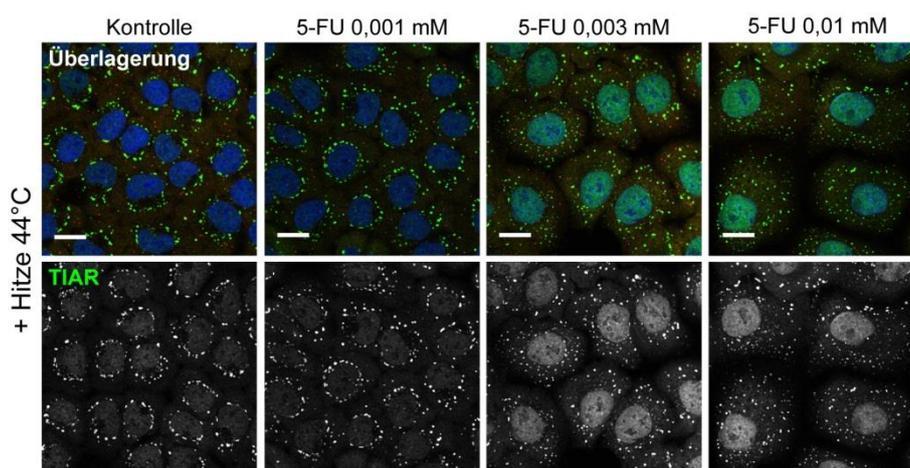


Abbildung 15: 5-FU verstärkt die Bildung von SG unter Hitzebedingungen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h verschiedenen Konzentrationen von 5-FU ausgesetzt, anschließend für 30 min einem Hitzestress bei 44°C ausgesetzt und fixiert. TIAR als SG-Marker wurde anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 µm.

3.2.6 Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von *P-bodies* sowie auf das Zytoskelett

Unter Stressbedingungen kommt es zu einem Arrest der Translation, und stillgelegte mRNAs werden in SGs gespeichert. Die mRNAs können daraufhin wieder freigesetzt und ihre Translation wieder aufgenommen werden, oder sie werden in PBs transferiert und dort abgebaut. SGs und PBs stehen daher in engem Kontakt und haben auch

einige Komponenten gemeinsam [101]. In Hefezellen konnte zuvor bereits ein Einfluss von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs beobachtet werden (Abbildung 8B). Daher sollte nun auch in humanen Zellen ein möglicher Einfluss von 5-FU auf die PB-Bildung überprüft werden.

Dafür wurden HeLa-Zellen mit 5-FU behandelt, wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und essentiellen PB-Komponenten DCP1 sowie DDX6 [137, 217] als PB-Marker mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, konnte wie erwartet schon in etwa zwei Drittel der unbehandelten Zellen PBs nachgewiesen werden. Dagegen wiesen unter 5-FU-Einfluss nahezu alle Zellen PBs auf. Bereits die Behandlung mit 0,003 mM 5-FU führte zu einer stark erhöhten Anzahl von PBs pro Zelle. Auch bei 0,01 und 0,03 mM 5-FU wiesen die Zellen mehr PBs auf als unbehandelte Zellen. Bei 0,1 mM 5-FU waren einhergehend mit der Bildung von SGs weniger PBs nachzuweisen als bei geringeren 5-FU-Konzentrationen. DDX6 konnte dabei auch in Strukturen nachgewiesen werden, die nicht positiv für DCP1 waren (siehe Pfeile bei 0,1 mM). Dies deutet auf eine Lokalisation von DDX6 in SGs hin, wie sie auch für andere Stressbedingungen beschrieben worden ist [137].

Somit führte 5-FU zu einer vermehrten Bildung von PBs, die zudem im Gegensatz zur SG-Bildung mit einer Vergrößerung der Zellen einherging.

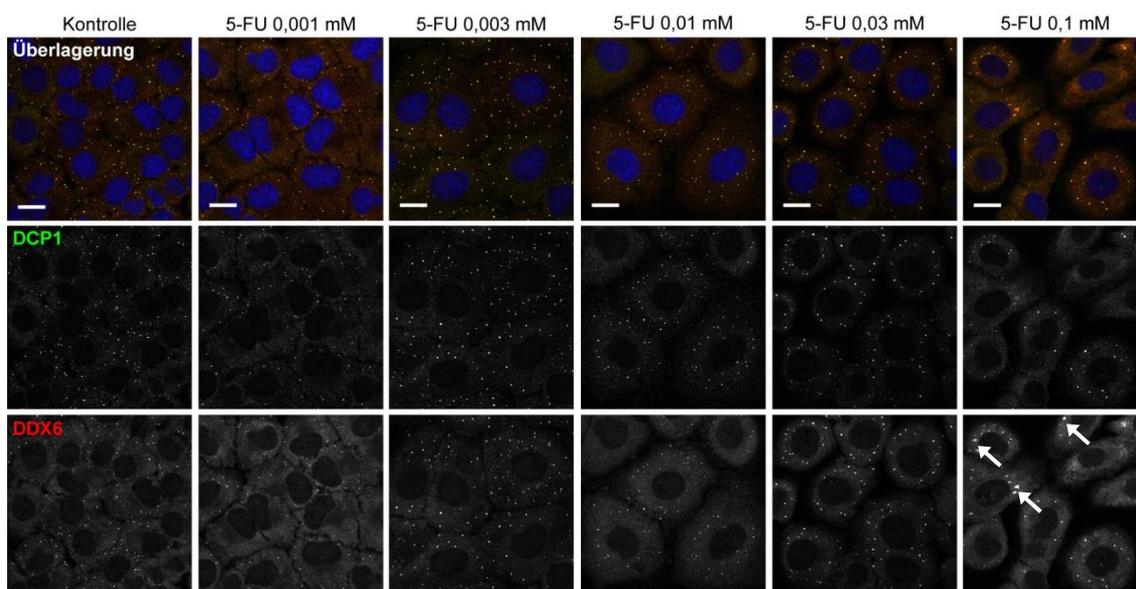


Abbildung 16: 5-FU verstärkt die Bildung von PBs. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt und fixiert. Die PB-Marker DCP1 und DDX6 wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. (Pfeile markieren einige SGs) Maßstabbalken: 20 μ m.

Da 5-FU die Bildung von SGs wie auch von PBs beeinflusste und Mikrotubuli an der Entstehung und Motilität von SGs und PBs beteiligt sind [328-330], sollte im Folgenden untersucht werden, inwiefern 5-FU das Mikrotubuli-Gerüst beeinflusst.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit 5-FU behandelt, wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und α -Tubulin neben ATXN2 als SG-Markerprotein mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Dabei zeigten 5-FU-behandelte Zellen einhergehend mit deren Vergrößerung eine Ausweitung des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Abbildung 17). Es ließ sich jedoch weder eine Verdichtung noch eine Depolymerisierung von Mikrotubuli beobachten. Es konnte zudem kein Unterschied zwischen 5-FU-behandelten Zellen mit oder ohne SGs festgestellt werden (siehe 0,03 mM 5-FU).

Somit scheint 5-FU das Mikrotubuli-Gerüst nicht zu beeinflussen. Veränderungen des Zytoskeletts sind daher wahrscheinlich nicht für die beobachteten Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs verantwortlich.

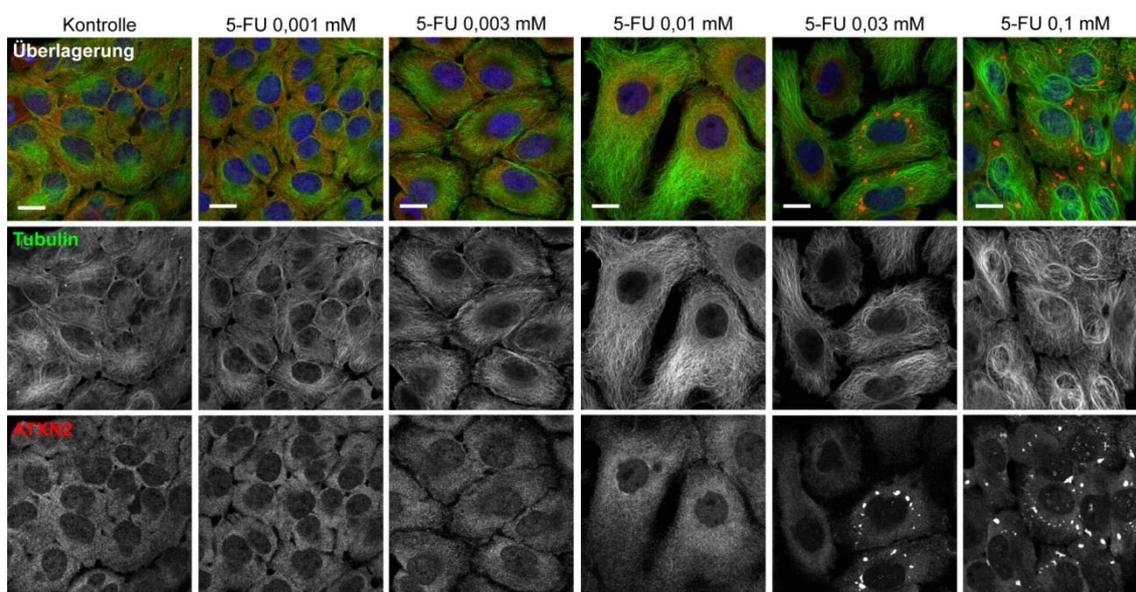


Abbildung 17: Einfluss von 5-FU auf das Zytoskelett. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU behandelt und fixiert. Mikrotubuli wurden mit einem spezifischen α -Tubulin-Antikörper detektiert. ATXN2 als SG-Marker wurde mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μ m.

3.3 Charakterisierung der 5-FU-induzierten Stress-granule-Bildung

Verschiedene Bedingungen wie Hitze, oxidativer oder osmotischer Stress lösen die Bildung SGs aus, wobei sie ähnliche Signalwege aktivieren. So geht die SG-Bildung unter diesen Bedingungen mit einem translationalen Arrest sowie mit der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α einher. Auch der Zeitverlauf von Bildung und Auflösung der SGs ist unter diesen Stressbedingungen ähnlich.

Im folgenden Abschnitt sollten die 5-FU-induzierten SGs weitergehend charakterisiert werden. Dazu sollte überprüft werden, wie sich die SG-Bildung auf die eIF2 α -Phosphorylierung auswirkt. Zudem sollte der Zeitverlauf der Auflösung von 5-FU-induzierten SGs analysiert werden. Dadurch kann geklärt werden, inwiefern sich die SG-Induktion durch 5-FU von der SG-Bildung unter anderen Stressbedingungen unterscheiden könnte.

3.3.1 Auswirkungen von 5-FU auf die Expression von Stress-granule- und P-body-Komponenten

Einige Komponenten von SGs stimulieren aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbstaggregation die Nukleation von SGs. Sie rekrutieren spezifische Transkripte und tragen durch Interaktion untereinander und Rekrutierung weiterer Proteine zur Entstehung mikroskopisch sichtbarer Strukturen bei [101]. Daher beeinflussen die Expressionslevel solcher SG-Komponenten die Bildung und Anzahl dieser Strukturen. Entsprechend sind G3BP und ATXN2L für die SG-Bildung notwendig und hinreichend, da ein reduzierter Level zu einer Abnahme, Überexpression hingegen zu einer Zunahme der Strukturen führt [145, 154]. Deshalb sollte des Weiteren durch Western Blot-Analysen überprüft werden, ob die beobachteten 5-FU-Effekte mit einer veränderten Expression dieser Komponenten einhergehen.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen inkubiert, danach unbehandelt belassen oder für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit oxidativem Stress ausgesetzt und lysiert. Die Lysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die entsprechenden Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abschnitt 2.2.8). Zur Überprüfung gleichmäßiger Proteinmengen wurde ein SDS-Gel mit Coomassie gefärbt (Abbildung 18A).

Wie in Abbildung 18B ersichtlich, zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Probe eine leichte Zunahme von DCP1 bei 5-FU-Konzentrationen ab 0,01 mM. Eine ähnlich erhöhte Proteinkonzentration von DCP1 ließ sich auch in Arsenit- und 5-FU-

behandelten Proben nachweisen. Außerdem war eine deutliche Verschiebung von einer Form niedrigeren zu einer höheren Molekulargewichts bei 5-FU-Konzentrationen ab 0,01 mM festzustellen. Dieses veränderte Verhältnis von verschiedenen DCP1-Formen war ebenfalls in Arsenit-behandelten Proben zu erkennen und war bei höheren 5-FU-Konzentrationen ab 0,01 mM noch stärker ausgeprägt. Es könnte sich hierbei um eine hyperphosphorylierte Form von DCP1 handeln, wie sie bei Stressbedingungen beschrieben worden ist [331, 332].

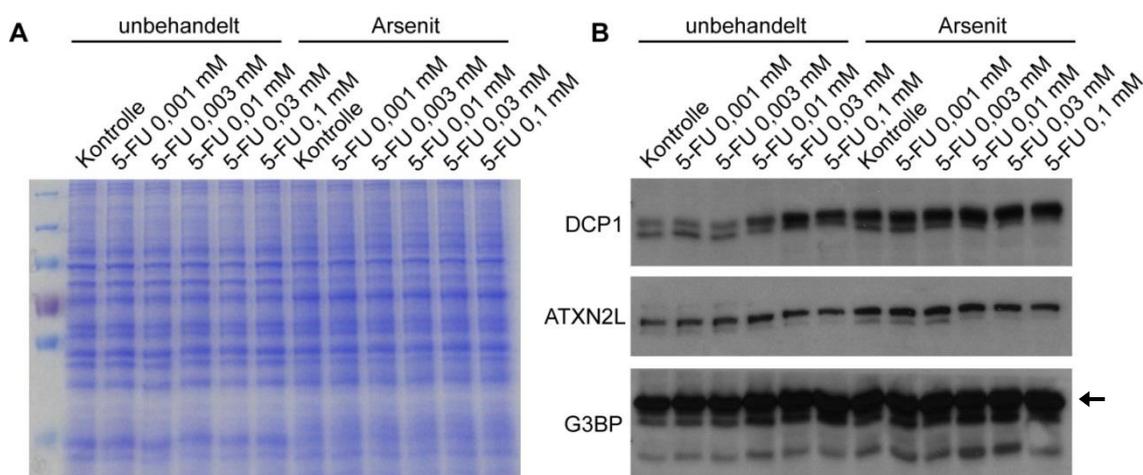


Abbildung 18: Einfluss von 5-FU auf die Expression von SG- oder PB-Komponenten. (A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle sowie (B) Western Blot zum Nachweis verschiedener SG- und PB-Komponenten. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen inkubiert, danach unbehandelt belassen oder 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und lysiert. Je 50 µg Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und diese zur Detektion von DCP1, ATXN2L und G3BP (Pfeil) mit entsprechenden spezifischen Antikörpern inkubiert.

Des Weiteren zeigte sich in den Zelllysaten kein veränderter Level von ATXN2L nach Behandlung mit 5-FU oder Arsenit (Abbildung 18B). Auch die G3BP-Proteinkonzentration wurde nicht verändert. Interessanterweise ließ sich aber auch für ATXN2L eine leichte Verschiebung von einer Form niedrigeren zu einer höheren Molekulargewichts bei 5-FU-Konzentrationen ab 0,03 mM feststellen, die auch in Arsenit-behandelten Proben zu erkennen war. Dies deutet auf eine mögliche Proteinmodifikation von ATXN2L unter Stressbedingungen hin.

Zusammenfassend ließen sich keine deutlichen Veränderungen im Expressionslevel der untersuchten Proteine feststellen, so dass die beschriebenen Effekte von 5-FU auf SGs und PBs wahrscheinlich nicht durch veränderte Expression von Regulatorproteinen hervorgerufen wurden.

3.3.2 Rolle der translationellen Regulation bei der 5-FU-induzierten Stress-granule-Bildung

Die stress-abhängige Phosphorylierung von eIF2 α ist einer der wichtigsten regulatorischen Schritte, der wie in der Einleitung beschrieben zum Translationsarrest und zur Assemblierung der Translationskomplexe in SGs führt [93, 166]. Die verschiedenen eIF2 α -Kinasen HRI, PERK, PKR und GCN2 phosphorylieren eIF2 α als Antwort auf verschiedene Stressstimuli wie Hitze, Hypoxie oder oxidativer Stress [94, 95]. Dadurch kann die Initiator-tRNA nicht mehr aktiviert werden und es bildet sich inaktive Ribosomenkomplexe an den mRNAs, die schließlich durch Selbstaggregation verschiedener Proteine akkumulieren und so SGs bilden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass 5-FU zu einer PKR-abhängigen Phosphorylierung von eIF2 α und damit zum Translationsarrest führt [333]. Im Folgenden sollte nun in Mikroskopie- sowie Western Blot-Analysen überprüft werden, inwiefern die 5-FU-induzierte SG-Bildung mit der Phosphorylierung von eIF2 α einhergeht.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU inkubiert, anschließend unbehandelt belassen oder für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt. Für die mikroskopische Analyse wurden phosphoryliertes eIF2 α (P-eIF2 α) sowie G3BP als SG-Marker anschließend mittels spezifischer Antikörper markiert. Darüber hinaus wurden für die Western Blot-Analysen entsprechende Proteinlysate durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und phosphoryliertes sowie nicht-phosphoryliertes eIF2 α mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Wie in Abbildung 19A zu erkennen ist, ließ sich weder in unbehandelten Zellen noch nach Behandlung mit 0,001 mM 5-FU phosphoryliertes eIF2 α nachweisen. Hingegen konnte bei 0,01 oder 0,1 mM 5-FU eine Phosphorylierung von eIF2 α nur in Zellen detektiert werden, die auch G3BP-positive SGs aufwiesen. In Zellen ohne 5-FU-induzierte SGs konnte hingegen kein Anstieg von P-eIF2 α festgestellt werden. In der Arsenit-behandelten Positivkontrolle war wie bei 5-FU-Behandlung ein deutlich erhöhter P-eIF2 α -Level zu beobachten, P-eIF2 α lag hier sowohl im Zytoplasma als auch zum Teil in SGs vor.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten die Western Blot-Analysen einen deutlichen Anstieg von P-eIF2 α bei 5-FU-Konzentrationen ab 0,03 mM (Abbildung 19B). Entsprechend der 5-FU-induzierten SG-Bildung und eIF2 α -Phosphorylierung in nur einem Teil der Zellen war die P-eIF2 α -Konzentration jedoch geringer als in Arsenit-

behandelten Proben. Im Gegensatz dazu blieb die Proteinkonzentration von nicht-phosphoryliertem eIF2 α nach 5-FU-Behandlung unverändert.

Zusammenfassend ließ sich also sowohl in Mikroskopie- als auch in Western-Blot-Analysen nachweisen, dass die 5-FU-induzierte SG-Bildung mit einer Phosphorylierung von eIF2 α einhergeht.

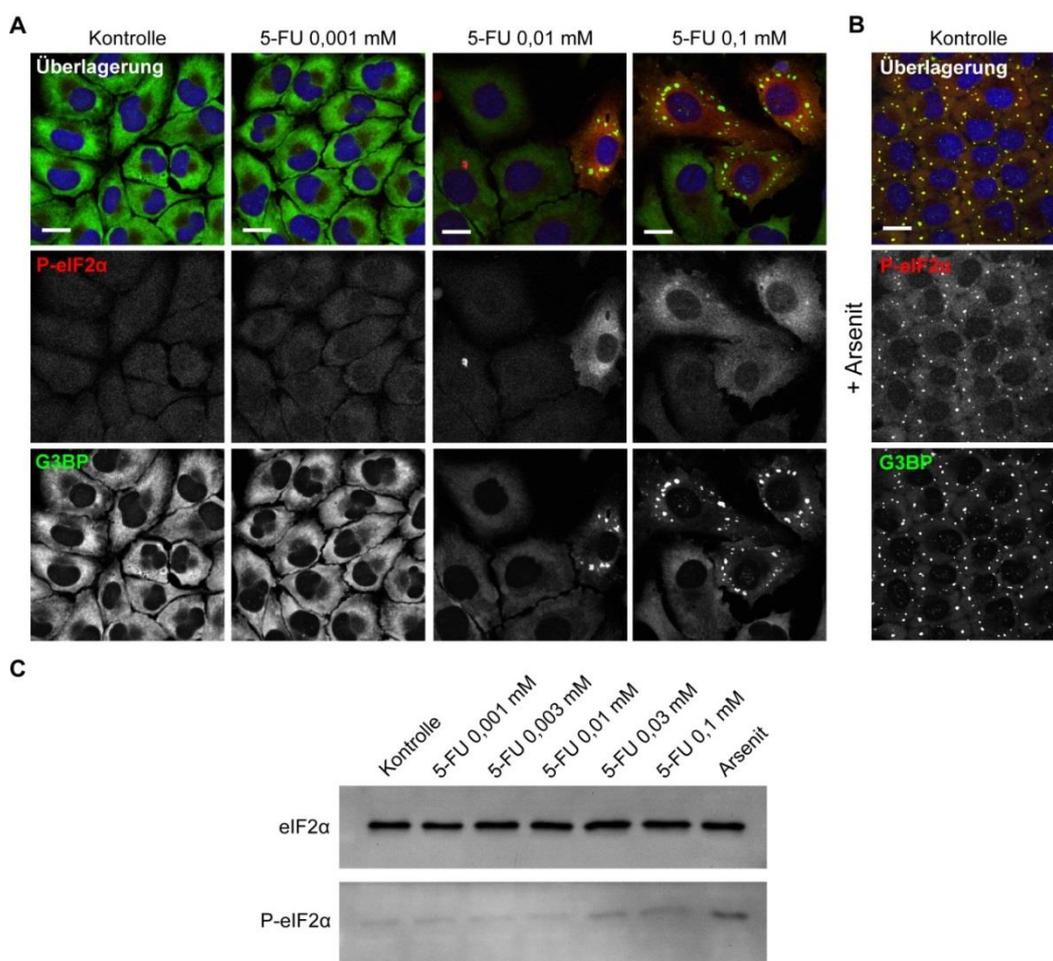


Abbildung 19: 5-FU-induzierte SG-Bildung geht mit eIF2 α -Phosphorylierung einher. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h verschiedenen Konzentrationen von 5-FU ausgesetzt, anschließend **(A)** unbehandelt belassen oder **(B)** für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und fixiert. G3BP als SG-Marker sowie phosphoryliertes eIF2 α (Ser51) wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μ m. **(C)** Western Blot zum Nachweis der eIF2 α -Phosphorylierung. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen inkubiert, danach unbehandelt belassen oder 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und lysiert. Je 50 μ g Proteinlysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und phosphoryliertes eIF2 α (Ser51) mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert.

Da 5-FU mit einem Arrest der Translation einhergeht, sollte im Weiteren analysiert werden, wie sich die Inhibition der Translation auf die 5-FU-induzierte SG-Bildung auswirkt. Die Entstehung von SGs lässt sich durch verschiedene pharmakologische Inhibitoren der Translation beeinflussen. So verstärken Substanzen wie Puromycin, die die Freisetzung von Ribosomen von der mRNA verursachen, die SG-Bildung. Dagegen verhindern Substanzen wie Emetin oder Cycloheximid die Bildung von SGs bzw. führen zur Auflösung bestehender SGs durch die Stabilisierung von Polysomen [92, 334].

Um zu untersuchen, ob sich die 5-FU-induzierte SG-Bildung durch Emetin unterbinden lässt, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU und Emetin in Kombination behandelt, wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und TIAR als SG-Markerprotein sowie DDX6 als Marker für PBs mittels spezifischer Antikörper detektiert.

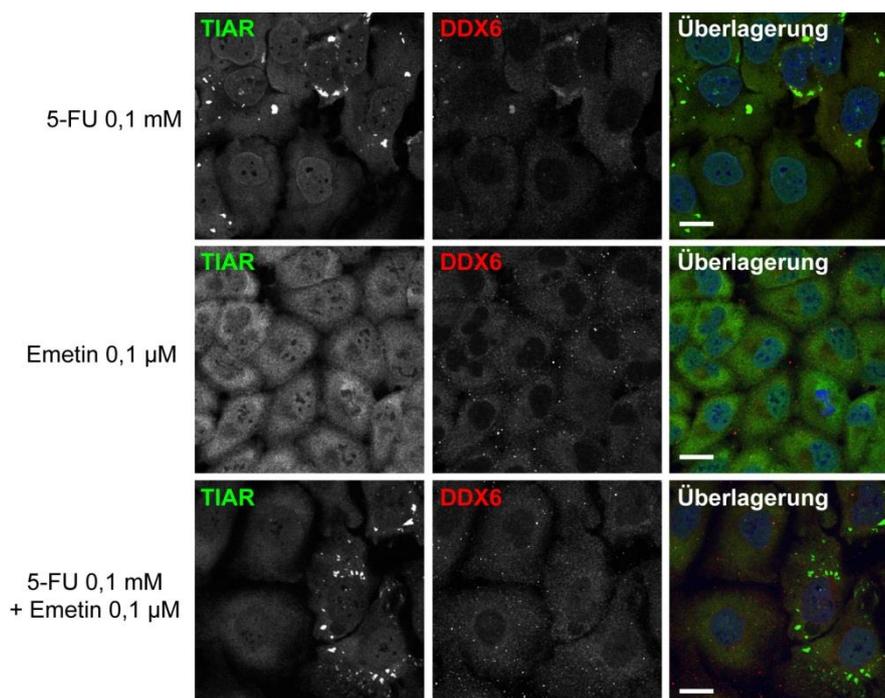


Abbildung 20: 5-FU-induzierte SG-Bildung lässt sich nicht durch Translationsinhibitoren verhindern. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit 0,1 mM 5-FU, mit 0,1 µM Emetin oder mit einer Kombination behandelt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabballen: 20 µm.

Wie Abbildung 20 zeigt, waren TIAR-positive SGs bei Behandlung mit 0,1 mM 5-FU wie bereits zuvor beschrieben in etwa 30 % der Zellen zu finden. Auch nach gleichzeitiger Behandlung mit 5-FU und Emetin waren SGs noch vorhanden. Diese ließen sich in ähnlich vielen Zellen detektieren wie bei 5-FU allein. Die Inkubation mit Emetin allein wirkte sich hingegen wie erwartet nicht auf die Zellen aus.

Somit konnte die 5-FU-induzierte SG-Bildung nicht durch Emetin verhindert werden. Dies deutet darauf hin, dass die unter 5-FU entstehenden SGs resistent gegenüber Translationsinhibitoren sein könnten und sich dadurch von klassischen SGs unterscheiden.

3.3.3 Zeitverlauf der Auflösung von 5-FU-induzierten Stress-granules

SGs bilden sich unter verschiedenen Stressbedingungen innerhalb von Minuten und lösen sich innerhalb 1-2 Stunden wieder auf [334]. Die 5-FU-induzierten SGs entstanden hingegen erst über einen längeren Zeitraum und schienen zudem resistent gegenüber Translationsinhibitoren zu sein. Daher sollte im Folgenden die Auflösung dieser Strukturen näher untersucht werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen für 72 h mit 5-FU behandelt, anschließend in der *Recovery*-Phase für 24 h oder 72 h ohne 5-FU kultiviert und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. TIAR als SG-Markerprotein wurde anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert. Außerdem wurden auch PBs zur Kontrolle anhand von DDX6 als Marker detektiert. Zur Analyse von apoptotischen Wegen wurden darüber hinaus RACK1 sowie ATXN2 als SG-Marker detektiert.

Wie in Abbildung 21A zu erkennen ist, zeigten sich nach Behandlung mit 0,1 mM 5-FU wie zuvor beschrieben eine SG-Bildung in etwa 30-40 % der Zellen. Es ließen sich auch nach einer *Recovery*-Phase von 24 h noch TIAR-positive SGs nachweisen, wobei der Anteil der Zellen mit SGs vergleichbar hoch war wie in 5-FU-behandelten Zellen. Auch nach einer *Recovery*-Phase von 72 h waren noch SGs zu detektieren. Jedoch wies mit etwa 80 % ein weit größerer Anteil der Zellen noch SGs auf. Wie Abbildung 21B zeigt, lokalisierte RACK1 in diesen Zellen sowohl in SGs als auch im Zytoplasma. In unbehandelten Zellen war RACK1 hingegen wie zuvor beobachtet zytoplasmatisch lokalisiert. Darüber hinaus wiesen 5-FU-behandelte Zellen nach einer *Recovery*-Phase von 24 h oder 72 h auch mehr PBs auf (Abbildung 21A).

Somit schienen 5-FU-induzierte SGs interessanterweise besonders beständig zu sein, da sie sich über einen Zeitraum von mindestens 72 h nicht auflösten. Durch die

Rekrutierung von RACK1 könnte diese langanhaltende Aufrechterhaltung von SGs einen effektiven zytoprotektiven Mechanismus darstellen.

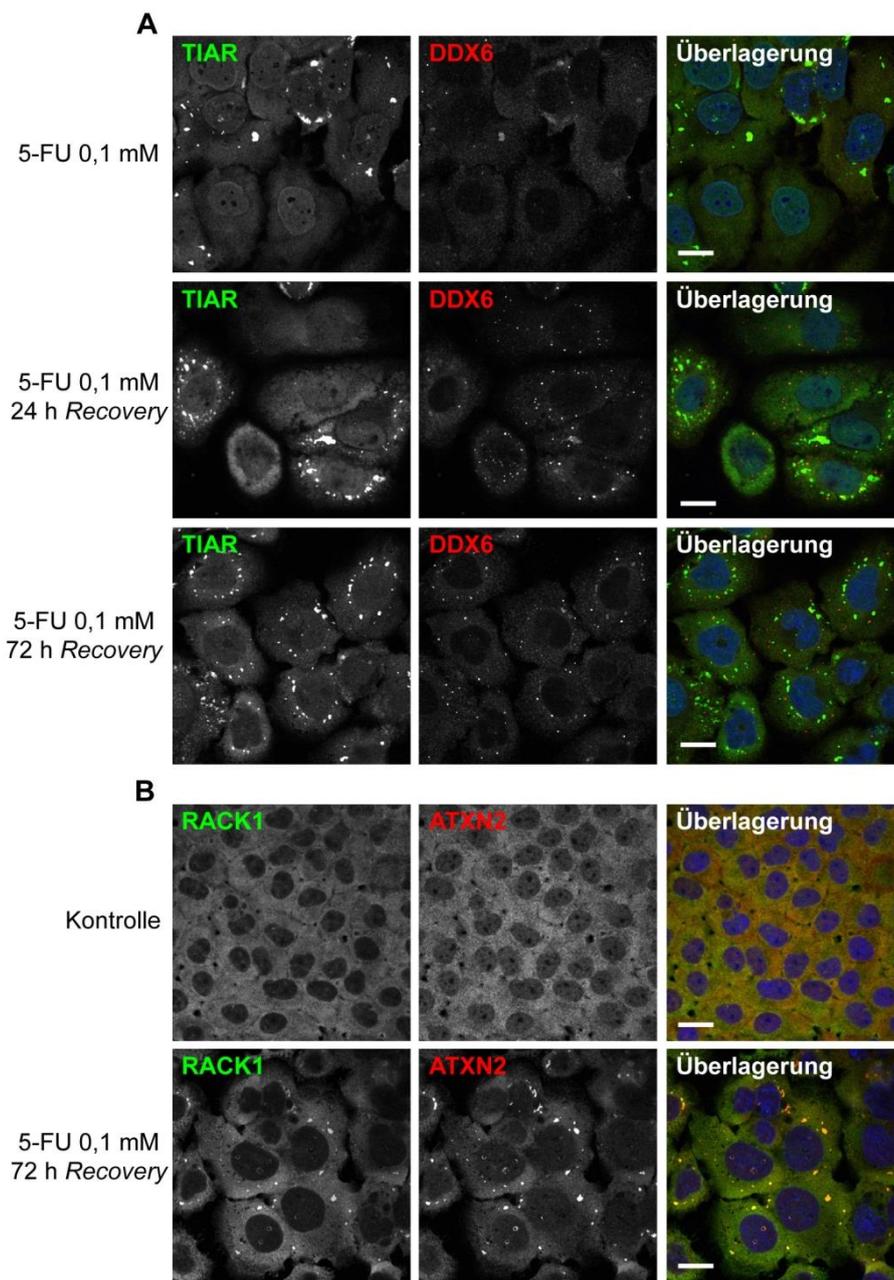


Abbildung 21: 5-FU-induzierte RACK1-positive SGs bestehen auch nach Recovery-Phasen fort. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, ohne 5-FU inkubiert (Kontrolle) oder für 72 h mit 0,1 mM 5-FU behandelt und anschließend für weitere 24 bzw. 72 h ohne 5-FU kultiviert. Nach Fixierung der Zellen erfolgte der Nachweis **(A)** des SG-Markers TIAR sowie des PB-Markers DDX6 bzw. **(B)** von RACK1 und ATXN2 als SG-Marker mittels spezifischer Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt. Maßstabballen: 20 µm.

3.3.4 Einfluss von 5-FU-induzierten Stress-*granules* auf die Sensitivität gegenüber 5-FU

Da die zuvor beobachtete 5-FU-induzierte Bildung von beständigen SGs sich zytoprotektiv auswirkt, könnte sie ebenfalls zur Resistenz gegenüber 5-FU beitragen. Mehrere 5-FU-resistente Zelllinien verschiedenen Ursprungs sind bereits etabliert worden, indem die Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg wiederholt mit steigenden Konzentrationen von 5-FU behandelt worden sind [335-337]. In Folgenden sollte untersucht werden, ob die SG-Induktion durch 5-FU bereits zu einer verminderten 5-FU-Sensitivität führen kann.

Dazu wurden HeLa-Zellen für 72 h mit 5-FU vorbehandelt, um die Bildung von SGs auszulösen, anschließend in einer *Recovery*-Phase für 24 h ohne 5-FU kultiviert und dann erneut für 24 h verschiedenen Konzentrationen von 5-FU ausgesetzt. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen bestimmt, indem die Zellen für 4 h mit Alamar Blue[®]-Reagenz inkubiert und dessen Fluoreszenz schließlich mit Hilfe eines Luminometers gemessen wurde (Abschnitt 2.2.3.6).

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich wird, führte die 72-stündige Vorbehandlung der Zellen mit 5-FU zu einer graduellen Abnahme der Proliferation. Wurden die Zellen mit geringen 5-FU-Konzentrationen bis 0,01 mM vorbehandelt, hatte eine erneute 5-FU-Behandlung keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Jedoch wuchsen Zellen, die mit 0,03 mM oder 0,1 mM 5-FU vorbehandelt wurden, ausreichend für die Induktion von SGs, nach einer erneuten 5-FU-Behandlung deutlich besser als Zellen, die unbehandelt blieben.

Somit war die Sensitivität der Zellen gegenüber 5-FU verringert, wenn sie zuvor mit 5-FU-Konzentrationen behandelt worden sind, die zur Bildung von SGs führen können. Daher könnte die 5-FU-induzierte SG-Bildung zu einer Resistenz gegenüber 5-FU beitragen.

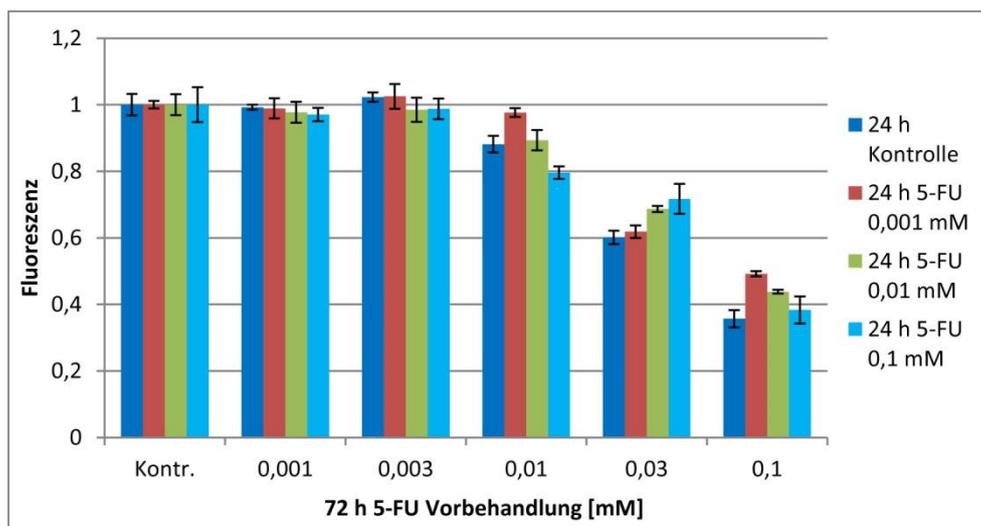


Abbildung 22: Messung der Proliferation nach wiederholter 5-FU-Behandlung. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU vorbehandelt, für 24 h ohne 5-FU kultiviert und anschließend für 24 h erneut mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen behandelt. Die Proliferation der Zellen wurde anschließend anhand der Alamar Blue®-Fluoreszenz ermittelt (und auf unbehandelte Zellen normalisiert).

3.3.5 Untersuchung der Ultrastruktur von Stress-granules

In den vorangegangenen Analysen konnte aufgezeigt werden, dass 5-FU die SG-Bildung verstärkt, die entstehenden SGs vergrößert sind und darüber hinaus ihre Auflösung verändert ist. Daher sollte nun in elektronenmikroskopischen (EM) Analysen geklärt werden, inwiefern die Ultrastruktur von SGs unter dem Einfluss von 5-FU verändert wird.

Dafür wurden HeLa-Zellen mit 0,01 mM 5-FU inkubiert und anschließend für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt oder unbehandelt belassen, mit freundlicher Unterstützung von Beatrix Fauler (MPI-MG, Berlin) in Epon-Harz eingebettet, kontrastiert und für die EM-Analysen vorbereitet. Für Immunmarkierungen wurden die 5-FU-behandelten Proben nach der Einbettung in LR-Gold-Harz mit spezifischen Antikörpern gegen G3BP als SG-Marker sowie gegen DDX6 als Marker für PBs inkubiert und kontrastiert (Abschnitt 2.2.6).

Wie Abbildung 23B zeigt, wiesen Arsenit-behandelte Zellen SGs auf, die sich von PBs durch ihre weniger kompakte Struktur unterscheiden ließen und wie beschrieben teilweise eng mit PBs assoziiert vorlagen [128]. In 5-FU-behandelten Zellen wiesen die SGs eine viel kompaktere Struktur im Vergleich zu Arsenit-induzierten SGs auf, ähnlich der von PBs (Abbildung 23C im Vergleich zu Abbildung 23B). Darüber hinaus waren auch die Mitochondrien stark verändert (Abbildung 23C im Vergleich zu Abbildung

23A). Die 5-FU-Behandlung führte also zu deutlichen Veränderungen auf subzellulärer Ebene.

Nach Inkubation mit 5-FU und anschließender Arsenit-Behandlung trat diese Verdichtung der SG-Struktur noch deutlicher auf, wie in Abbildung 23D und im vergrößerten Ausschnitt zu erkennen ist. In diesen Zellen konnte auch verdichtetes raues Endoplasmatisches Retikulum (ER) beobachtet werden, was eine Akkumulation von Polysomen nahelegt (Abbildung 23E). In unbehandelten Kontrollzellen waren hingegen keine SGs nachzuweisen (Abbildung 23A), das raue ER wies zudem eine typische Struktur auf. Allerdings ließen sich PBs detektieren, die wie publiziert eine sehr kompakte, elektronendichte Struktur aufwiesen und oft mit Mitochondrien assoziiert waren [338, 339]. Somit konnten unter 5-FU-Einfluss SGs nachgewiesen werden, die eine ähnlich verdichtete Struktur aufwiesen wie PBs.

Daher sollten die Strukturen im Folgenden mittels Immunmarkierung auf das Vorhandensein von SG- und PB-Markerproteine untersucht werden. SGs lassen sich auch aufgrund ihrer Größe von PBs unterscheiden, da ihr Durchmesser mehr als 1 μM betragen kann, wohingegen der von PBs selten mehr als 300 nm beträgt, wie elektronenmikroskopische Analysen zeigten [340, 341]. In Abbildung 23F und 10G ist der Vergleich von SGs und PBs bei 5-FU-Behandlung dargestellt. SGs zeichneten sich zwar durch eine ähnliche Struktur aus wie PBs, waren aber wesentlich größer. Die Immunmarkierung zeigte zudem, dass sich in SGs entsprechend der zuvor beschriebenen Befunde (Abbildung 16) sowohl DDX6 als auch G3BP nachweisen ließ (Vergrößerung in Abbildung 23F), während PBs nur positiv für DDX6 waren (Abbildung 23G).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den sehr elektronendichten und kompakten Strukturen, die unter dem Einfluss von 5-FU entstanden, um SGs handelt. Die Verdichtung dieser 5-FU-induzierten SGs könnte die Ursache für deren verzögerte Auflösung sein.

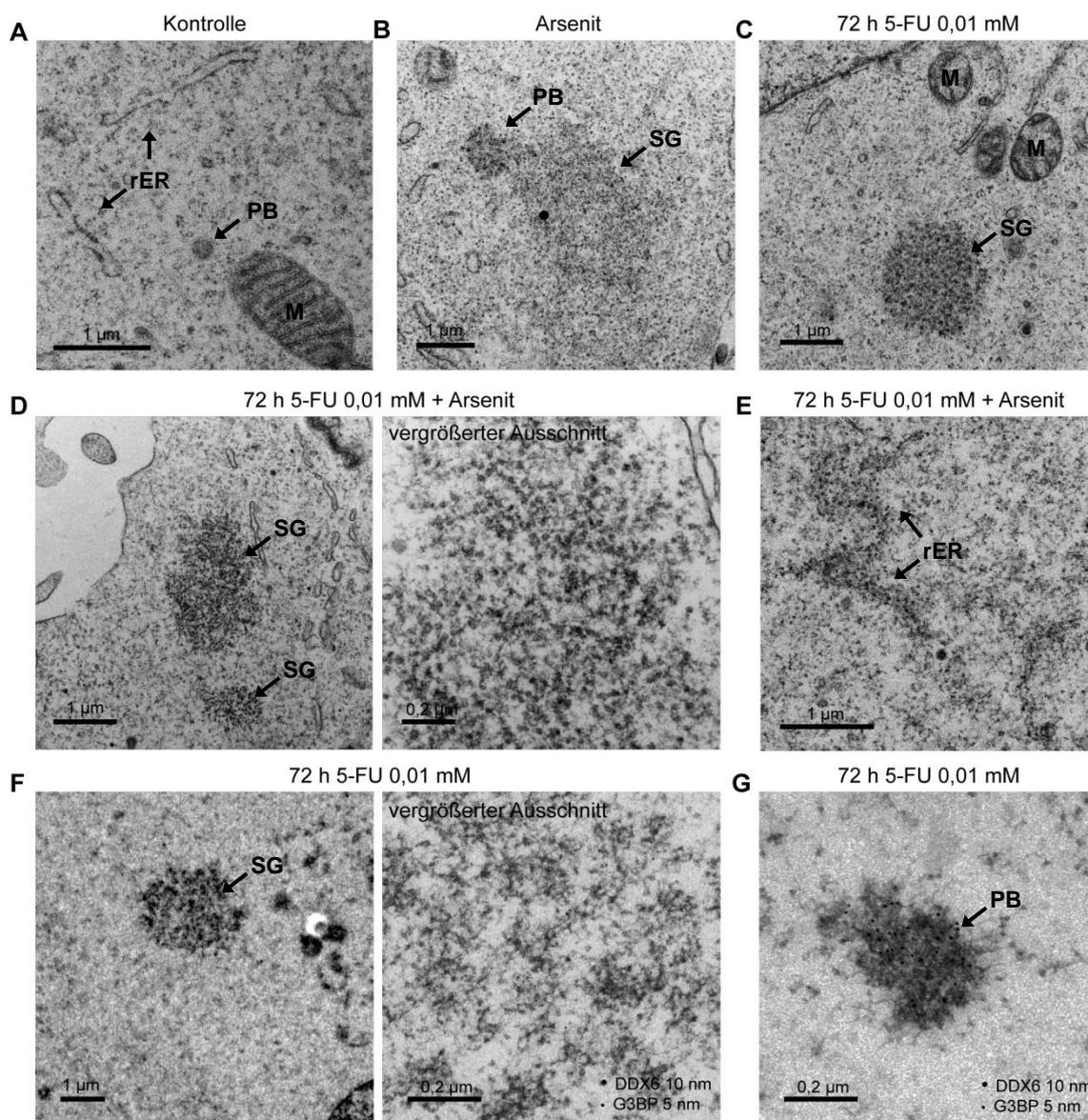


Abbildung 23: 5-FU verändert die Ultrastruktur von SGs. HeLa-Zellen wurden für die Elektronenmikroskopie auf Plastikplättchen ausgesät, ohne 5-FU inkubiert, anschließend **(A)** unbehandelt belassen oder **(B)** 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt, oder für 72 h mit 0,01 mM 5-FU inkubiert und anschließend **(C)** unbehandelt belassen oder **(D, E)** für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt. Die Zellen wurden anschließend fixiert, in Epon-Harz eingebettet und mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert. SGs, PBs, raues ER und Mitochondrien (M) sind markiert. **(F, G)** Immunologischer Nachweis von SG- und PB-Markern. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit 0,01 mM 5-FU inkubiert, anschließend fixiert, in LR-Gold-Harz eingebettet und kontrastiert. G3BP als SG-Marker und DDX6 als PB-Marker wurden anschließend mit spezifischen Primär- sowie Immunogold-Sekundäntikörpern (5 bzw. 10 nm Goldkugeln) markiert.

3.3.6 Untersuchung von 5-FU-induzierten Stress-*granules* auf Merkmale von Proteinaggregaten

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer Fehlfaltung von Proteinen einher [342]. Diese werden polyubiquitiniert und schließlich über den proteosomalen Weg abgebaut. Bei Fehlfunktion oder Überladung des Proteasom-abhängigen Abbaus jedoch akkumulieren ubiquitinierte Proteine in stabilen Aggregaten [343, 344]. SGs ähneln in vielen Punkten Proteinaggregaten [90], sodass eine Rolle von SGs bei der Entstehung dieser Aggregate vermutet wird [345, 346]. Deshalb sollte im Folgenden geklärt werden, ob die durch 5-FU induzierten verdichteten SGs eine Akkumulation polyubiquitiniertes Proteine als ein Hauptmerkmal von Proteinaggregaten aufweisen.

Dafür wurden HeLa-Zellen mit 5-FU behandelt, anschließend unbehandelt belassen oder für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Ubiquitin wie auch ATXN2 als SG-Marker wurden danach mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 24A ersichtlich, zeigten unbehandelte Zellen eine Ubiquitin-Lokalisation im Zytoplasma und vor allem im Zellkern. In 5-FU-behandelten Zellen konnten ATXN2-positive SGs nachgewiesen werden, die jedoch nicht positiv für Ubiquitin waren. Arsenit-behandelte Zellen wiesen SGs auf, die positiv für ATXN2, aber nicht für Ubiquitin waren (Abbildung 24B). Nach 5-FU-Behandlung und oxidativem Stress waren die SGs wie zuvor beobachtet vergrößert, enthielten jedoch ebenfalls kein Ubiquitin. Allerdings war Ubiquitin unter 5-FU-Einfluss in stärkerem Maße diffus im Zellkern und in manchen Zellen zudem in punktuellen Kernstrukturen vorzufinden (Pfeile).

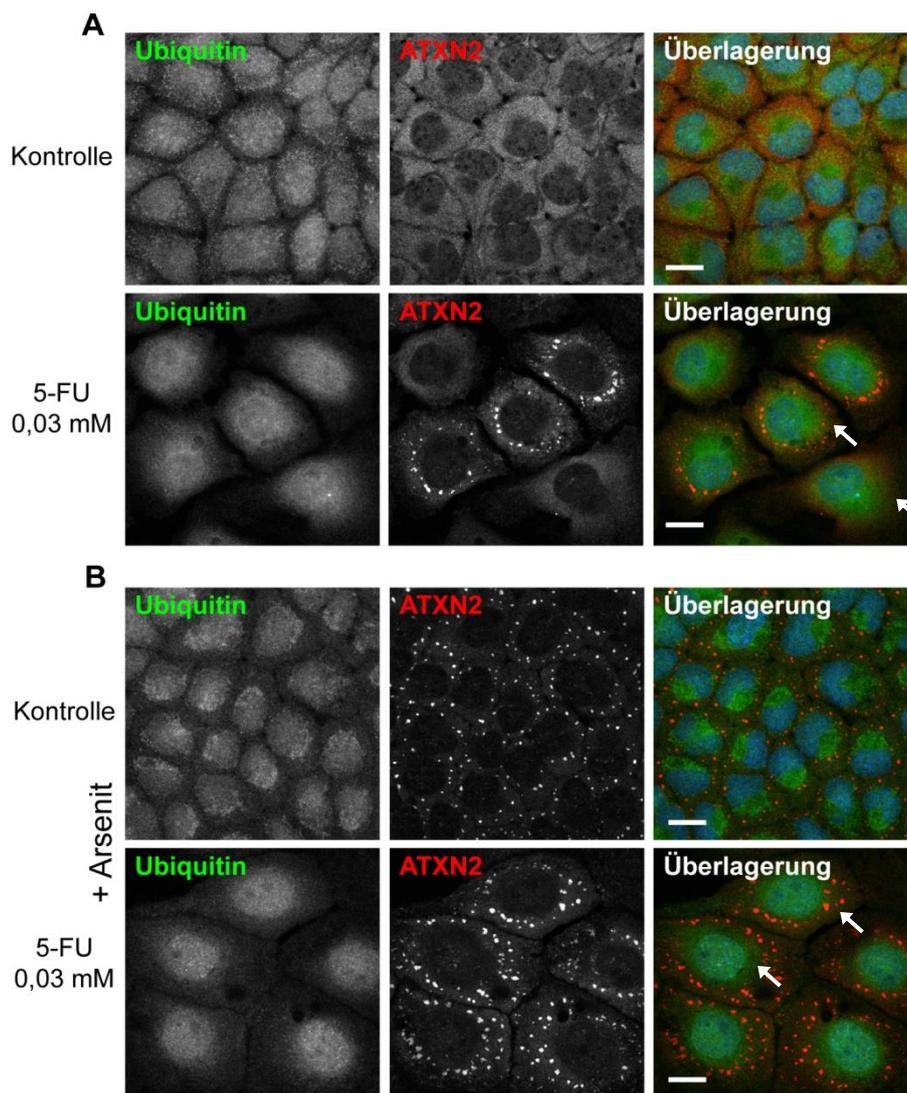


Abbildung 24: 5-FU-induzierte SGs sind nicht positiv für Ubiquitin. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit 0,03 mM 5-FU behandelt oder ohne 5-FU inkubiert (Kontrolle), anschließend **(A)** unbehandelt belassen oder **(B)** 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und fixiert. Ubiquitin sowie der SG-Marker ATXN2 wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. (Pfeile markieren Ubiquitin-positive Kernstrukturen) Maßstabballen: 20 μ m.

Zusammenfassend konnten bei 5-FU-Behandlung besonders dichte und kompakte SGs nachgewiesen werden, die sich zudem als besonders beständig erwiesen und über einen längeren Zeitraum nicht auflösten. Jedoch scheint eine Akkumulation polyubiquitinerter Proteine wie in Polyglutaminaggregaten nicht dafür verantwortlich zu sein. Hingegen könnten andere posttranslationale Modifikationen bei der SG-Induktion durch 5-FU involviert sein.

3.4.1 Auswirkungen der 5-FU-Inkorporation in RNA und DNA auf die Stress-granule-Bildung

Da sowohl die Inkorporation in DNA als auch in RNA den zytotoxischen Effekte von 5-FU zugrunde liegen können, sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob die 5-FU-induzierte SG-Bildung abhängig von dessen Einbau in RNA oder DNA ist.

Dazu wurden HeLa-Zellen für 72 h mit den entsprechenden 5-FU-Metaboliten behandelt, dem Ribonukleosid 5-Fluoruridin (FUrd) bzw. dem Desoxyribonukleosid 5-Fluordesoxyuridin (FdUrd) (Abbildung 25). Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und TIAR als SG-Markerprotein sowie DDX6 als Marker für PBs anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie Abbildung 26A zeigt, ließen sich bei 0,01 oder 0,1 μM FUrd keine TIAR-positiven SGs nachweisen. Dagegen zeigten 10-20 % der Zellen SGs nach einer Behandlung mit 0,5 μM FUrd. Darüber hinaus wiesen die Zellen bei 0,01 und 0,1 μM FUrd im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine erhöhte Anzahl von PBs auf. Außerdem waren diese Zellen leicht vergrößert.

Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die mit FdUrd behandelt wurden, keine SG-Bildung bis zu einer Konzentration von 1 μM (Abbildung 26B). Jedoch führte FdUrd schon bei geringen Konzentrationen ab 0,01 μM zu einer deutlichen Vergrößerung der Zellen und einer starken Zunahme von PBs, die auch bei höheren Konzentrationen noch sichtbar war.

Somit zeigten die 5-FU-Metabolite ähnliche Effekte wie 5-FU selbst, wenn auch wie publiziert schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen [354]. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass sich die Induktion von SGs nur bei FUrd nachweisen ließ und somit abhängig von einer 5-FU-Inkorporation in RNA zu sein könnte. Die zuvor für 5-FU beschriebenen Effekte auf die Zellgröße und die PB-Bildung ließen sich hingegen sowohl bei FUrd als auch FdUrd beobachten und sind daher wahrscheinlich unabhängig vom 5-FU-Einbau in RNA.

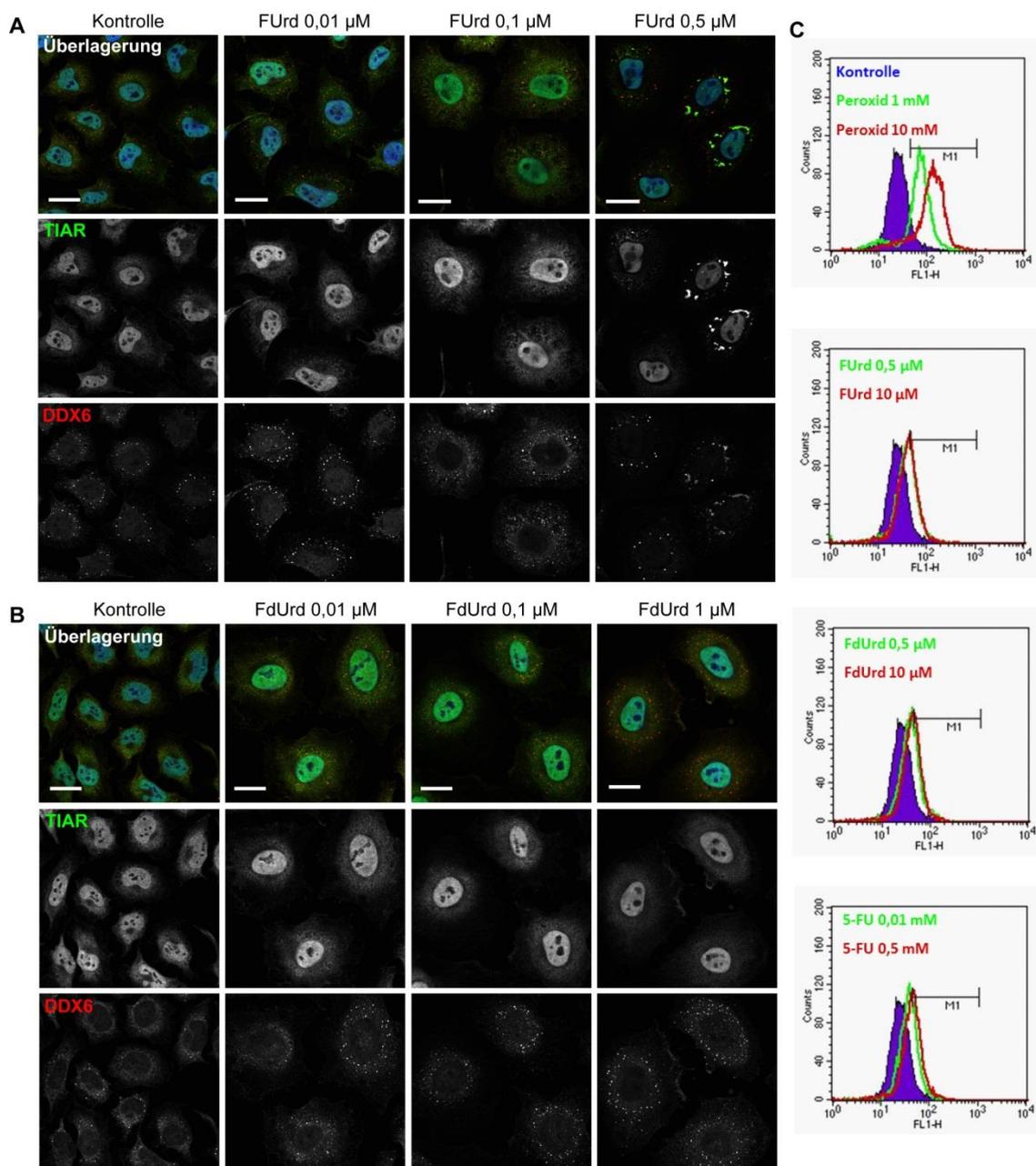


Abbildung 26: FUrd induziert im Gegensatz zu FdUrd die Bildung von SGs. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h verschiedenen Konzentrationen der 5-FU-Metabolite **(A)** FUrd oder **(B)** FdUrd ausgesetzt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μm . **(C)** Nachweis der ROS-Produktion mittels Durchflusszytometrie. HeLa-Zellen wurden für 72 h mit 1 μM DHR sowie verschiedenen Konzentrationen von FUrd, FdUrd oder 5-FU behandelt oder als Positivkontrolle mit H_2O_2 inkubiert. Die Fluoreszenz einzelner DHR-positiver Zellen wurde gegenüber Kontrollzellen (blau) gemessen.

Da bereits gezeigt worden ist, dass 5-FU oxidativen Stress infolge einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) auslösen kann [355, 356] und ROS auch unter Stressbedingungen entstehen, die zur SG-Bildung führen [357], sollte nun überprüft werden, ob die beobachteten unterschiedlichen Auswirkungen von FUrd und FdUrd auf die SG-Bildung auf Unterschieden in der ROS-Produktion beruhen könnten.

Dazu wurden HeLa-Zellen für 72 h mit FUrd bzw. FdUrd und gleichzeitig mit dem ROS-Sensor Dihydrorhodamin (DHR) inkubiert, trypsinisiert und die Fluoreszenz von oxidiertem DHR mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abschnitt 2.2.7). In Kontrollzellen wurde durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die ROS-Produktion stimuliert.

Wie in Abbildung 26C zu sehen ist, zeigten Zellen nach Inkubation mit 1 mM H_2O_2 eine erhöhte ROS-Produktion, die bei 10 mM H_2O_2 noch stärker erhöht war. Außerdem ließ sich auch nach 5-FU-Behandlung ein Anstieg der ROS-Produktion feststellen, wobei sich die Auswirkungen verschiedener 5-FU-Konzentrationen kaum unterschieden. Sowohl nach Behandlung mit FUrd als auch mit FdUrd war eine ähnlich starke Erhöhung des ROS-Levels zu beobachten. Somit lassen sich Unterschiede in der ROS-Produktion als Ursache für die beobachteten Effekte auf die SG-Induktion ausschließen.

3.4.2 Untersuchung RNA-abhängiger Auswirkungen von 5-FU

RNA- und DNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU lassen sich differenzieren, indem die Inkorporation in RNA bzw. in DNA durch Uridin bzw. Thymidin im Überschuss verhindert wird [358, 359]. Im Folgenden sollte auf diese Weise die RNA-Abhängigkeit der Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs sowie auf die Zytotoxizität näher untersucht werden.

3.4.2.1 RNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von Stress-granules

Um die RNA-abhängigen Auswirkungen von 5-FU auf die SG-Bildung zu analysieren, wurden HeLa-Zellen gleichzeitig mit 0,1 mM 5-FU oder 1 μ M FUrd und mit einem 10-fachen molaren Überschuss an Uridin behandelt und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. SGs wurden mittels eines spezifischen Antikörpers gegen TIAR nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden auch PBs anhand von DDX6 als Marker detektiert.

Wie in Abbildung 27A ersichtlich, konnten in etwa 30 % der Zellen nach Behandlung mit 0,1 mM 5-FU TIAR-positive SGs nachgewiesen werden. Dagegen waren in nur

etwa 10 % der gleichzeitig mit 5-FU und Uridin behandelten Zellen noch SGs zu detektieren. Hingegen zeigten Zellen nach Behandlung mit 1 mM Uridin allein wie erwartet keine nennenswerten Veränderungen.

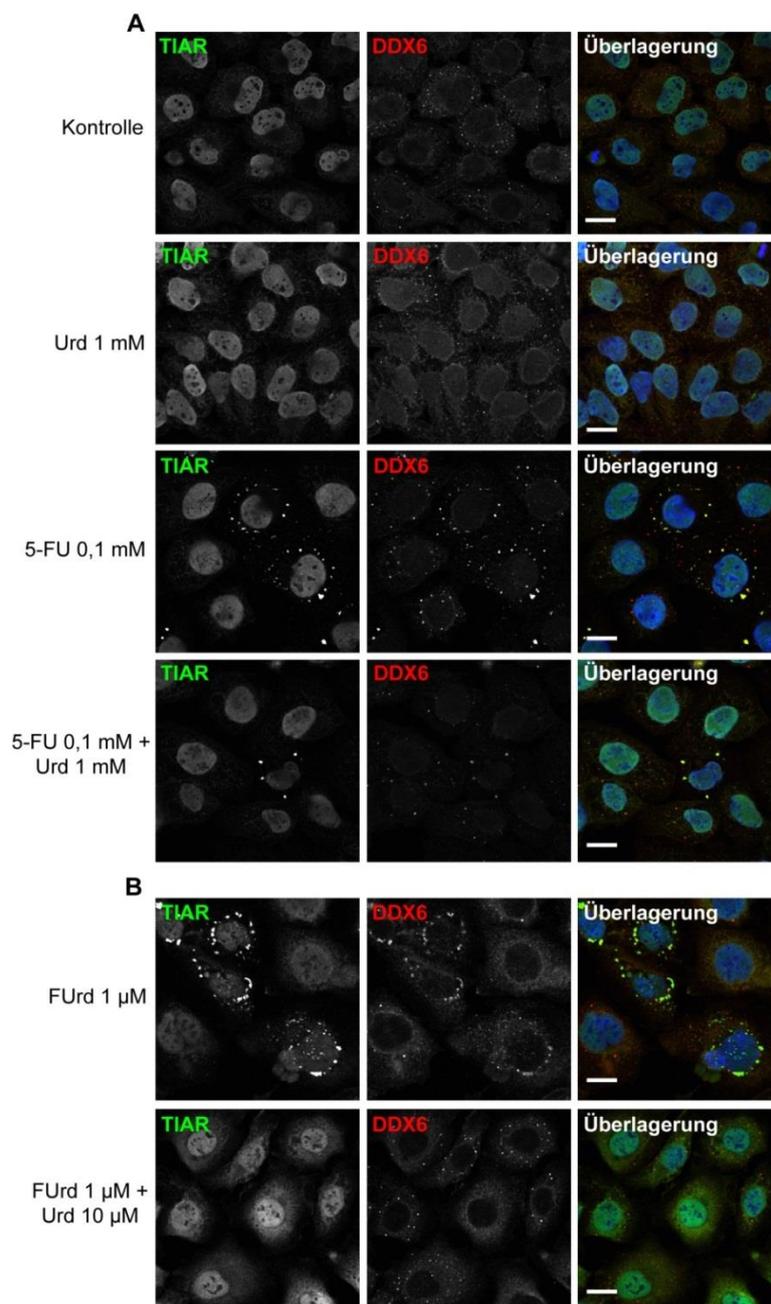


Abbildung 27: 5-FU- sowie FUrd-Effekte auf SGs lassen sich durch Uridin-Behandlung rückgängig machen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, unbehandelt belassen (Kontrolle) oder für 72 h **(A)** mit 0,1 mM 5-FU, mit 1 mM Uridin oder mit einer Kombination behandelt bzw. **(B)** mit 1 μM FUrd oder gleichzeitig mit 10 μM Uridin behandelt. Nach der Fixierung der Zellen wurden TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μm.

Nach Behandlung mit 1 μ M FUrd waren SGs in etwa 30 % der Zellen zu finden (Abbildung 27B). Nach gleichzeitiger Uridin-Zugabe hingegen fehlten SGs nahezu komplett. Somit ließ sich die SG-Bildung unter dem Einfluss von 5-FU und FUrd durch Uridin stark reduzieren bzw. fast komplett unterbinden. Die Bildung von PBs war jedoch nach Uridin-Behandlung nicht deutlich verändert.

Diese Befunde bestätigen die RNA-Abhängigkeit der SG-Induktion durch 5-FU und FUrd.

3.4.2.2 RNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU auf die Zytotoxizität

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass 5-FU stärker in RNA als in DNA eingebaut wird [354] und die Zytotoxizität von 5-FU daher vor allem auf dessen RNA-Inkorporation beruht [352, 360]. Die bisherigen Analysen deuten darauf hin, dass die SG-Induktion durch 5-FU RNA-abhängig sein könnte. Daher sollte anschließend untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der SG-Induktion und zytotoxischen Effekten durch höhere 5-FU-Konzentrationen gibt. Dazu wurden HeLa-Zellen gleichzeitig mit 1 mM 5-FU und mit einem 10-fachen molaren Überschuss an Uridin behandelt.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, zeigten Zellen nach Behandlung mit 1 mM 5-FU deutliche apoptotische Anzeichen wie eine Fragmentierung des Zellkerns (Pfeile). In denselben Zellen waren auch TIAR-positive Strukturen zu finden, die im Vergleich zu den zuvor beschriebenen 5-FU-induzierten SGs jedoch deutlich kleiner waren. Dagegen wiesen Zellen nach gleichzeitiger Uridin-Behandlung kaum apoptotische Merkmale auf. So ließen sich in 20-30 % der gleichzeitig mit 5-FU und Uridin behandelten Zellen größere TIAR-positive Strukturen detektieren, die stärker den 5-FU-induzierten SGs ähnelten. Diese Zellen wiesen zudem weitestgehend intakte Zellkerne auf. Es ließen sich jedoch keine Unterschiede bei der PB-Bildung feststellen.

Somit lässt sich vermuten, dass SGs nur bis zu bestimmten 5-FU-Konzentrationen entstehen, während darüber hinaus RNA-abhängige zytotoxische Effekte stärker zum Tragen kommen. Interessanterweise ließ sich die Zytotoxizität durch gleichzeitige Uridin-Zugabe verhindern und zugleich die SG-Bildung verstärken. Dies untermauert eine mögliche zytoprotektive Rolle der 5-FU-induzierten SG-Bildung.

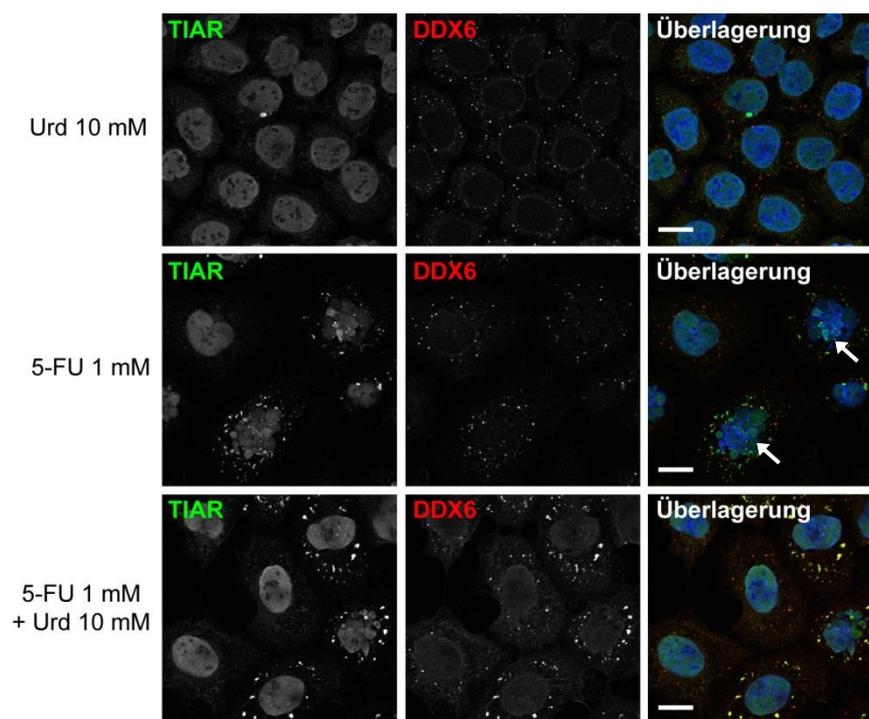


Abbildung 28: Zytotoxische Effekte von 5-FU lassen sich durch Uridin-Behandlung rückgängig machen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit 1 mM 5-FU, 10 mM Uridin oder mit einer Kombination behandelt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. (Pfeile markieren fragmentierte Zellkerne.) Maßstabbalken: 20 μ m.

3.4.2.3 RNA-abhängige Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von P-bodies

Um schließlich auch die RNA-abhängigen Auswirkungen geringerer 5-FU-Konzentrationen auf die PB-Bildung zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen gleichzeitig mit 0,01 mM 5-FU und mit einem 10-fachen molaren Überschuss an Uridin behandelt. PBs wurden mittels eines spezifischen Antikörpers gegen DDX6 nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden auch SGs anhand von TIAR als Marker detektiert.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich wird, zeigten mit 0,01 mM 5-FU behandelte Zellen eine erhöhte Anzahl DDX6-positiver PBs und waren zudem stark vergrößert. Nach gleichzeitiger Behandlung mit 5-FU und Uridin ließen sich ebenfalls eine vermehrte PB-Anzahl sowie eine starke Vergrößerung der Zellen feststellen. Es ließen sich unter diesen Bedingungen jedoch keine TIAR-positiven SGs detektieren.

Somit ließen sich die Auswirkungen von 5-FU auf die PB-Bildung sowie auf die Zellgröße nicht durch Uridin rückgängig machen. Daher könnten sie in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen RNA-unabhängig sein.

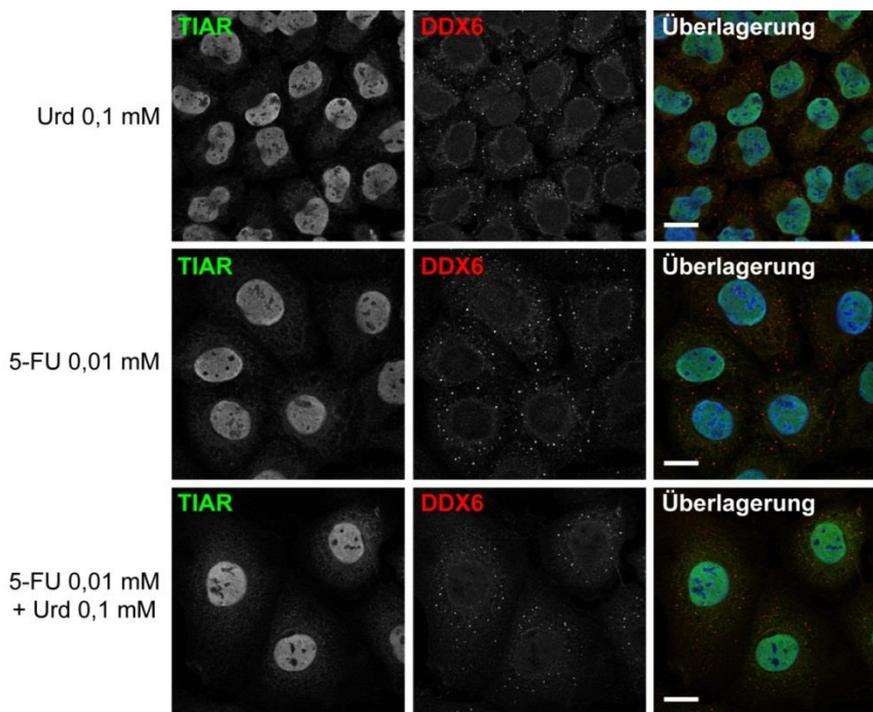


Abbildung 29: 5-FU-Effekte auf PBs können nicht durch Uridin-Behandlung rückgängig gemacht werden. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 72 h mit 0,01 mM 5-FU, mit 0,1 mM Uridin oder mit einer Kombination behandelt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstab Balken: 20 μ m.

Zusammenfassend deuten die Befunde in Übereinstimmung mit den Auswirkungen von RNA- und DNA-Metaboliten darauf hin, dass die SG-Induktion abhängig von einer Inkorporation von 5-FU in RNA sein könnte. Auch die Zytotoxizität von 5-FU scheint zumindest teilweise RNA-abhängig zu sein und mit der SG-Bildung in Zusammenhang zu stehen, während die Auswirkungen von 5-FU auf die PB-Bildung und Zellgröße unabhängig vom 5-FU-Einbau in RNA sein könnten.

3.4.3 RNA-abhängige Effekte weiterer Chemotherapeutika auf die Stress-granule-Bildung

Um die RNA-Abhängigkeit der SG-Bildung durch 5-FU zu untermauern, sollten auch die Auswirkungen anderer chemotherapeutischer Substanzen untersucht werden. Verschiedene Basen- und Nukleosidanaloga finden Anwendung als Chemotherapeutika und werden ähnlich wie 5-FU umgesetzt [361]. Entsprechend ihrer chemischen Struktur können sie in RNA oder DNA eingebaut werden und somit zu deren Schädigung beitragen. Das Nukleosidanalogue 5-Azacytidin sowie das Basenanalogue 6-Thioguanin gehören zu den chemotherapeutischen Substanzen, für die

ein Einbau in RNA bereits gezeigt worden ist [362, 363]. Im Gegensatz dazu wird 5-Trifluorthymidin (TFT) aufgrund seiner Struktur als Desoxyribonukleosid ausschließlich in DNA eingebaut und führt so zur Fragmentierung der DNA [364].

Um zu überprüfen, wie sich diese RNA- und DNA-inkorporierenden Substanzen auf die Bildung von SGs und PBs auswirken, wurden daher HeLa-Zellen für 72 h mit 5-Azacytidin, 6-Thioguanin oder 5-Trifluorthymidin behandelt. Die Zellen wurden anschließend wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und TIAR als SG-Markerprotein sowie DDX6 als Marker für PBs anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 30 ersichtlich, konnten in etwa 10 % der Zellen nach Behandlung mit 50 μM Azacytidin TIAR-positive SGs nachgewiesen werden. In Zellen, die mit Thioguanin behandelt wurden, ließen sich SGs bei einer toxischen Konzentration von 10 μM in weniger als 10 % der Zellen detektieren. Des Weiteren ließ sich weder in Azacytidin- noch in Thioguanin-behandelten Zellen eine veränderte PB-Bildung feststellen.

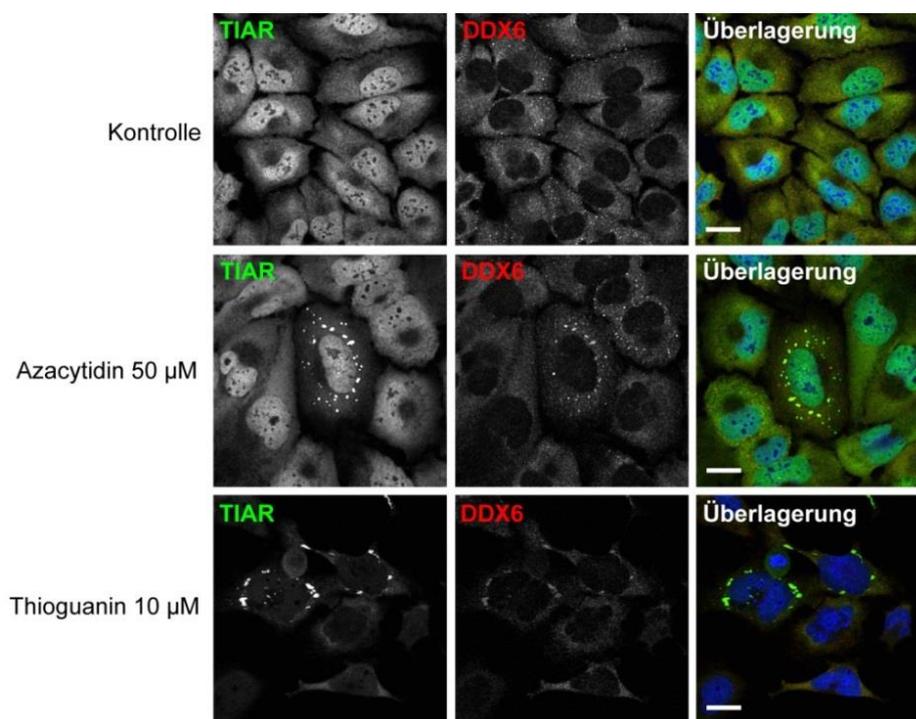


Abbildung 30: Chemotherapeutische Basen- und Nukleosidanalogue führen zur Bildung von SG. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, unbehandelt belassen (mock) oder 72 h den angegebenen Konzentrationen von 5-Azacytidin oder 6-Thioguanin ausgesetzt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabballen: 20 μm .

Somit ließ sich zeigen, dass SGs ähnlich wie durch 5-FU auch durch andere Chemotherapeutika hervorgerufen werden können, die in RNA eingebaut werden können.

Die Analyse der Auswirkungen von TFT zeigte jedoch, dass sich nach Behandlung mit TFT bis zu den höchsten Konzentrationen keine SGs nachgewiesen ließen (Abbildung 31). Bei diesen Konzentrationen traten wiederum deutliche apoptotische Anzeichen wie fragmentierte Zellkerne auf (Pfeil). Dagegen zeigten TFT-behandelte Zellen bereits bei Konzentrationen ab 1 μM eine deutliche Vergrößerung sowie eine sehr starke Zunahme der PB-Anzahl. Dies lässt vermuten, dass DNA-Schäden zu der beobachteten vermehrten PB-Bildung sowie zur Vergrößerung der Zellen beizutragen könnten.

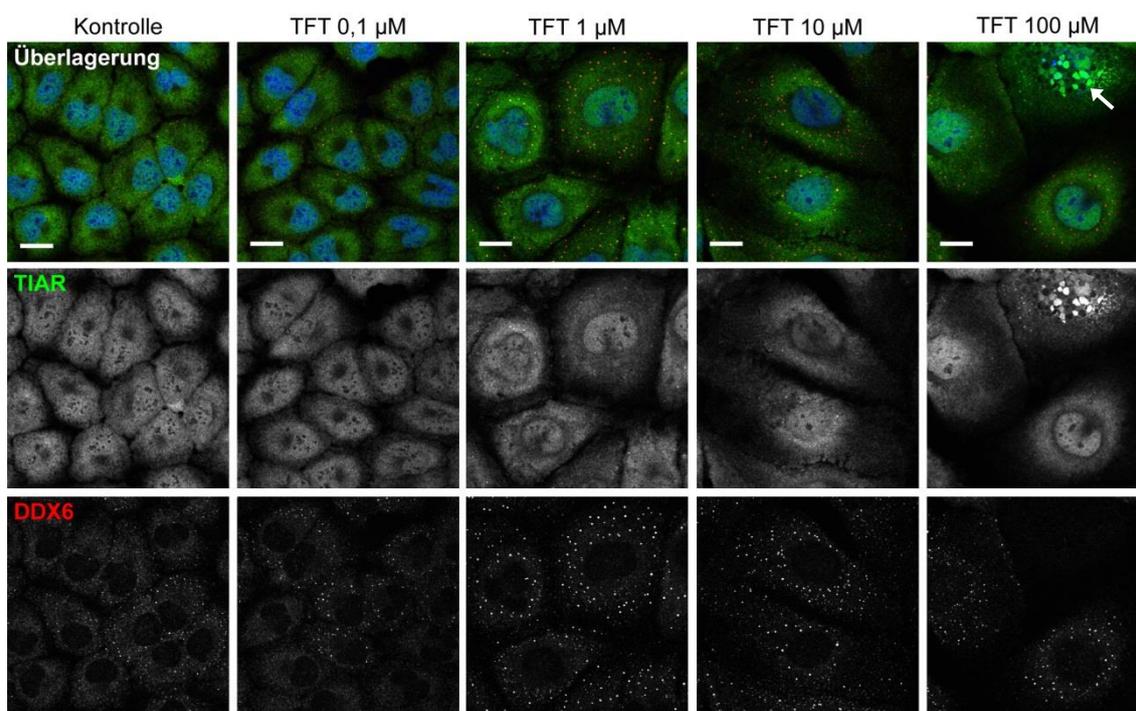


Abbildung 31: Trifluorthymidin verstärkt die Bildung von PBs. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, 72 h verschiedenen Konzentrationen von Trifluorthymidin (TFT) ausgesetzt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. (Der Pfeil markiert einen fragmentierten Zellkern.) Maßstab Balken: 20 μm .

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass neben 5-FU auch andere Chemotherapeutika die Bildung von SGs induzieren und darüber hinaus auch die PB-Bildung beeinflussen können. Während die Auswirkungen auf SGs abhängig von

einem Einbau der Substanzen in RNA sein könnten, scheinen die Auswirkungen auf PB durch den Einbau in DNA verursacht zu werden.

3.5 Untersuchung der Auswirkungen von 5-FU in Kombination mit anderen Chemotherapeutika

3.5.1 Gemeinsamkeiten im Metabolismus von Gemzitabin und 5-FU

5-FU wird selten einzeln eingesetzt, sondern mit anderen chemotherapeutischen Substanzen wie Oxaliplatin, Irinotecan und Gemzitabin kombiniert, um die Effektivität der Therapie gegenüber den einzelnen Substanzen zu erhöhen [31, 32]. Gemzitabin (2',2'-Difluor-2'-desoxycytidin) ist ein Nukleosid-Analog wie FdUrd und wird entsprechend ähnlich verstoffwechselt [30]. Wie 5-FU muss Gemzitabin als Vorstufe in die Zelle aufgenommen und in aktive Metabolite umgewandelt werden, um seine Wirkung auf verschiedene zelluläre Wege zu entfalten (Abbildung 32).

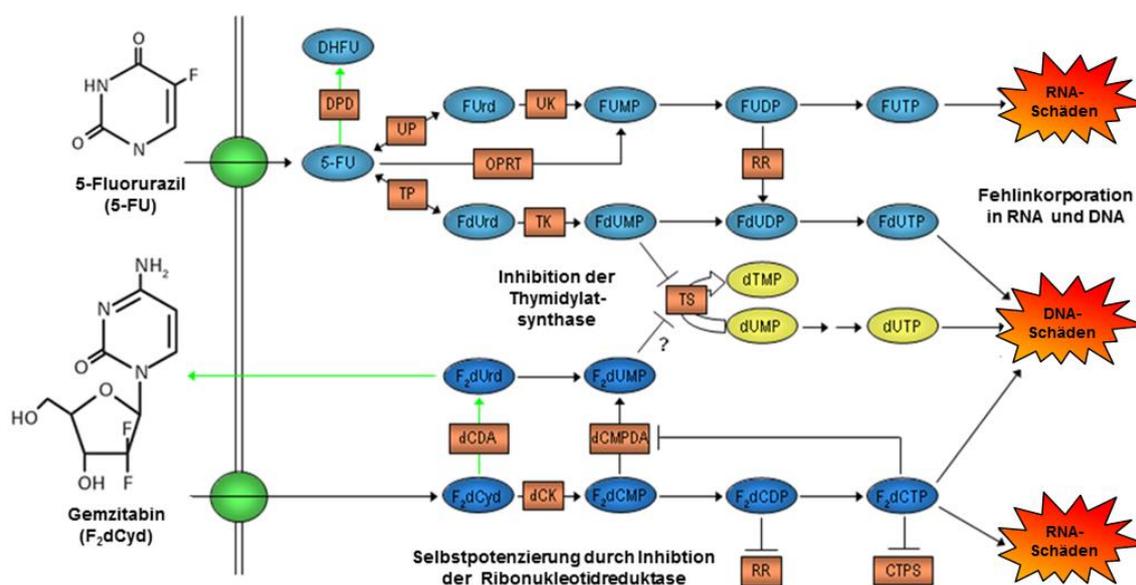


Abbildung 32: Zellulärer Metabolismus und Wirkmechanismen von 5-FU [31] und Gemzitabin [30]. Schematische Darstellung der Effekte fluoridierter Metabolite (blaue Ovale) auf RNA und DNA sowie der beteiligten Enzyme (rote Kästen) und Entgiftungswege (grüne Pfeile). (DHFU: Dihydrofluorurazil; F(d)Urd, UMP, UDP, UTP: 5-Fluor(2'-desoxy)-uridin, mono-, di-, triphosphat; dUMP, dUTP: Desoxyuridinmono-, triphosphat; dTMP: Desoxythymidinmonophosphat; F₂dCyd, CMP, CDP, CTP: 2',2'-Difluor-2'-desoxycytidin, mono-, di-, triphosphat; F₂dUrd, UMP: 2',2'-Difluor-2'-desoxyuridin, monophosphat; DPD: Dihydropyrimidin-dehydrogenase; TK, UK, TP, UP: Thymidin-, Uridinkinase/ -Phosphorylase; OPRT: Orotatphosphoribosyltransferase; RR: Ribonucleotidreduktase; TS: Thymidylat-synthase; dCDA, dCK: Desoxycytidindeaminase, -kinase; dCMPDA: Desoxycytidinmonophosphatdeaminase; CTPS: Cytidintriphosphatsynthetase)

Das Metabolit F_2dCTP konkurriert mit $dCTP$ und wirkt so als Inhibitor der DNA-Polymerase [365]. Zusätzlich kann F_2dCTP in DNA inkorporiert werden und führt dadurch zu DNA-Schäden, die zudem durch normale Reparaturwege nicht behoben werden können [366, 367]. Darüber hinaus wird F_2dCTP auch in RNA eingebaut [368]. Das aus Gemzitabin hervorgehende F_2dUMP kann vergleichbar zum 5-FU-Metabolit $FdUMP$ zur Hemmung der Thymidylatsynthase beitragen, wenngleich dies nur ein Nebeneffekt ist. Auch die Topoisomerase I wird durch Gemzitabin gehemmt [369].

Die Gemzitabin-Produkte können auf verschiedene Weise die Synthese konkurrierender Metabolite unterbinden und so ihre Wirkung selbst potenzieren. Durch Inhibition der $dCMP$ -Deaminase ($dCMPDA$) sowie der CTP -Synthetase ($CTPS$) wird vermehrt F_2dCTP anstatt CTP synthetisiert und in RNA eingebaut [370, 371]. Die Hemmung der Ribonukleotidreduktase (RR) durch Gemzitabin schließlich verringert das Level von $dCTP$, einem Inhibitor der Desoxycytidinkinase (dCK), und führt so zu einem verstärkten Umsatz von Gemzitabin [372]. Interessanterweise stellt die Ribonukleotidreduktase auch eine Verbindung zum Metabolismus von 5-FU her, da sie die entsprechenden Ribonukleotide ($FUDP$) zu Desoxyribonukleotiden ($FdUDP$) umsetzt.

3.5.2 Auswirkungen einer Kombination von Gemzitabin und 5-FU auf die Stress-*granule*-Bildung

Aufgrund seines ähnlichen zellulären Metabolismus im Vergleich zu 5-FU sollte im Folgenden zunächst untersucht werden, inwiefern auch Gemzitabin die Bildung von SGs und PBs beeinflusst. Da Gemzitabin zudem auch in Kombination mit 5-FU in der Chemotherapie eingesetzt wird [32], sollte im Weiteren überprüft werden, wie sich die Kombination beider Substanzen auf die SG-Bildung auswirkt.

Zunächst wurden HeLa-Zellen für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Gemzitabin behandelt, wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und SGs mittels eines TIAR-Antikörpers detektiert. Zur Kontrolle wurde auch PBs durch das Markerprotein DDX6 nachgewiesen.

Wie in Abbildung 33 ersichtlich, zeigten Gemzitabin-behandelte Zellen bis hin zu zunehmend toxischen höheren Konzentrationen keine TIAR-positiven SGs. Bereits bei einer Gemzitabin-Konzentration von 0,1 nM ließ sich eine deutliche Vergrößerung der Zellen feststellen, die bei höheren Konzentrationen noch weiter verstärkt war.

Darüber hinaus zeigten Gemzitabin-behandelte Zellen bereits bei einer Konzentration von 1 nM eine stark erhöhte Anzahl von PBs, die sich auch bei höheren Konzentrationen beobachten ließ.

Somit konnte trotz des ähnlichen Metabolismus von Gemzitabin keine SG-Bildung wie bei 5-FU nachgewiesen werden. Dies könnte mit einer vergleichsweise stärkeren Inkorporation von Gemzitabin in DNA anstatt in RNA zusammenhängen. Dementsprechend wurden vor allem die PB-Bildung und Zellgröße beeinflusst, ähnlich den zuvor beobachteten Auswirkungen von DNA-inkorporierenden Substanzen wie FdUrd oder TFT.

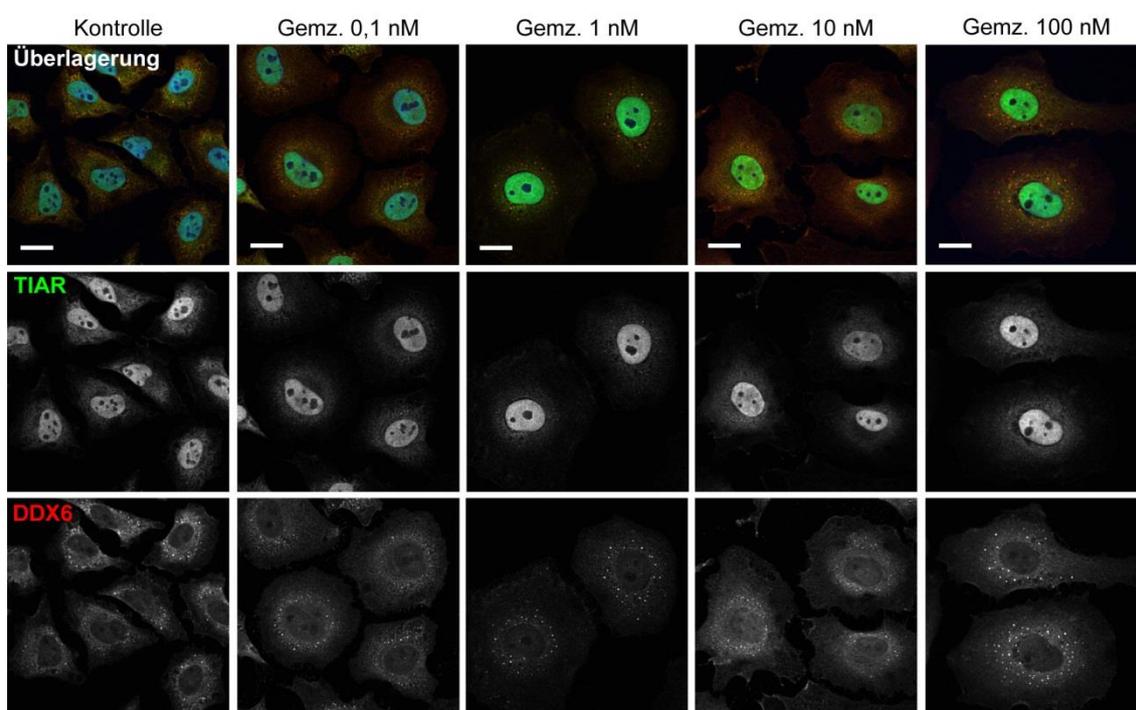


Abbildung 33: Gemzitabin induziert keine SGs, verstärkt aber die Bildung von PBs. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, 72 h verschiedenen Konzentrationen von Gemzitabin ausgesetzt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μ m.

Um im Weiteren die Auswirkungen einer Kombination von Gemzitabin mit 5-FU auf die SG-Bildung zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU und Gemzitabin in Kombination behandelt und wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet. Anschließend wurde TIAR als SG-Markerprotein mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert. Um zu überprüfen, in welchem Umfang DNA-Schäden durch Inkorporation von Gemzitabin und 5-FU auftreten, wurde

außerdem die phosphorylierte ATM-Kinase (*ataxia telangiectasia mutated*) (P-ATM) als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen [373].

Wie in Abbildung 34A zu sehen, zeigten Zellen weder nach Behandlung mit 0,01 mM 5-FU noch mit 1 nM Gemzitabin eine nennenswerte SG-Bildung. Jedoch wiesen bei Kombination von 5-FU und Gemzitabin einige Zellen zahlreiche kleine SGs auf (Pfeile). Somit schien Gemzitabin die SG-Bildung durch 5-FU zu verstärken. Wie schon zuvor beschrieben, waren Zellen sowohl nach Behandlung mit 0,01 mM 5-FU als auch mit 1 nM Gemzitabin stark vergrößert. Der Nachweis von P-ATM zeigte zudem, dass DNA-Schäden in einem gewissen Umfang schon in unbehandelten Zellen vorhanden waren, jedoch durch 5-FU und noch viel stärker durch Gemzitabin weiter zunahmen.

Die starken DNA-Schäden weisen auf eine starke Inkorporation von Gemzitabin in DNA hin und könnten eine Erklärung liefern, warum Gemzitabin allein nicht durch den Einbau in RNA zur Induktion von SGs führte. Allerdings könnte Gemzitabin durch seinen inhibitorischen Einfluss auf die RR zur Verstärkung der 5-FU-induzierten SG-Bildung führen.

Um den Einfluss der RR bei der 5-FU-induzierten SG-Bildung näher zu untersuchen, wurde die Auswirkungen von 5-FU auch in Kombination mit Hydroxyurea (HU) analysiert, das wie Gemzitabin die RR hemmt [374].

Wie in Abbildung 34B zu sehen, ließen sich bei Behandlung mit HU allein keine TIAR-positiven SGs detektieren. Hingegen konnten in Kombination mit 0,01 mM 5-FU in einigen Zellen SGs beobachtet werden. Des Weiteren zeigten auch mit 2 mM HU behandelte Zellen eine starke Vergrößerung sowie vermehrte P-ATM-positive Kernstrukturen, die auf starke DNA-Schäden hinweisen. Somit könnte auch HU die SG-Induktion durch 5-FU verstärken.

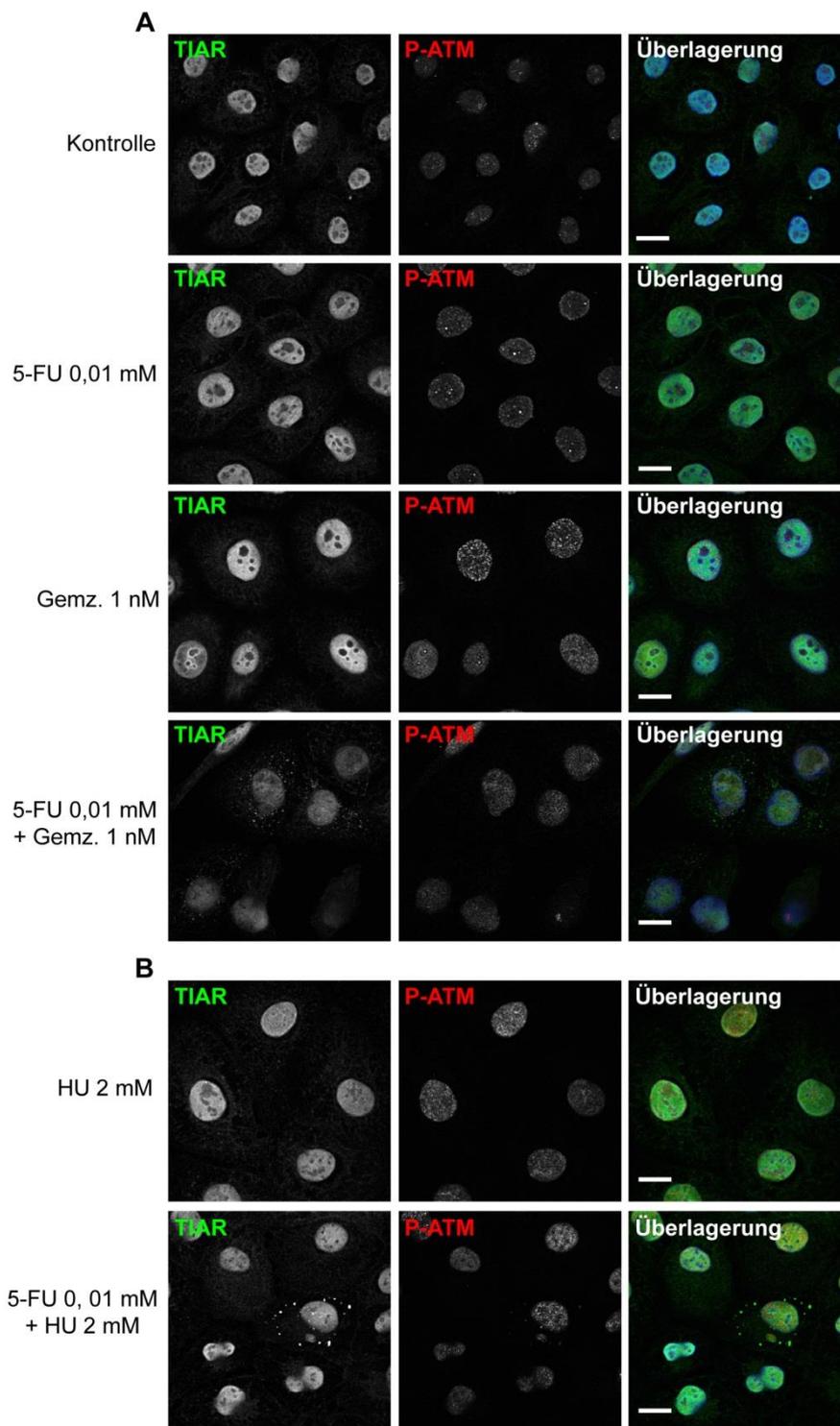


Abbildung 34: Gemcitabin und Hydroxyurea verstärken SG-Induktion durch 5-FU. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, unbehandelt belassen (Kontrolle) oder für 72 h **(A)** mit 0,01 mM 5-FU, mit 1 nM Gemcitabin oder mit einer Kombination behandelt bzw. **(B)** mit 2 mM Hydroxyurea (HU) oder gleichzeitig mit 0,01 mM 5-FU behandelt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie phosphoryliertes ATM als Marker DNA-Schäden wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. (Pfeile markieren kleine SGs.) Maßstabballen: 20 μ m.

Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass die Inhibition der RR durch Gemcitabin oder HU eine verstärkte SG-Bildung durch 5-FU bewirken könnte, möglicherweise durch Verschiebung des 5-FU-Metabolismus hin zu erhöhter FURd-Synthese und somit vermehrten RNA-Schäden.

3.5.3 Einfluss der Ribonukleotidreduktase auf die 5-FU-induzierte Stress-granule-Bildung

Da die vorangegangenen Ergebnisse einen Einfluss der RR auf die 5-FU-induzierte Bildung von SGs vermuten lassen, sollte die Rolle der RR im Folgenden mittels RNA-Interferenz näher untersucht werden. Dafür wurden HeLa-Zellen für 48 h mit siRNA gegen die RR-M2-Untereinheit (siRRM2) oder mit Kontroll-siRNA (siNT) transfiziert und gleichzeitig für 24 h mit 5-FU behandelt. Die Zellen wurden anschließend wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und TIAR als SG-Markerprotein sowie DDX6 als Marker für PBs mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 35A zu erkennen ist, ließen sich in etwa 10 % der siNT-transfizierten Zellen nach Behandlung mit 0,1 mM 5-FU TIAR-positive SGs nachweisen. In siNT-transfizierten Kontrollzellen konnte hingegen keine SG-Bildung beobachtet werden. Allerdings waren SGs in weniger als 10 % der siRRM2-transfizierten und 5-FU-behandelten Zellen zu finden. Somit wurde die SG-Bildung durch reduzierte RRM2-Expression nicht verstärkt. Die durch qRT-PCR ermittelte *knockdown*-Effizienz betrug etwa 85 % (Abbildung 35B).

Interessanterweise führte die Behandlung der Zellen mit siRRM2 im Vergleich zu siNT zu einer starken Zellvergrößerung und einer Zunahme der PB-Anzahl, ähnlich wie sie zuvor für die Behandlung mit Gemcitabin beobachtet werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die Auswirkungen von Gemcitabin auf die PB-Bildung abhängig von der RR-Aktivität sind.

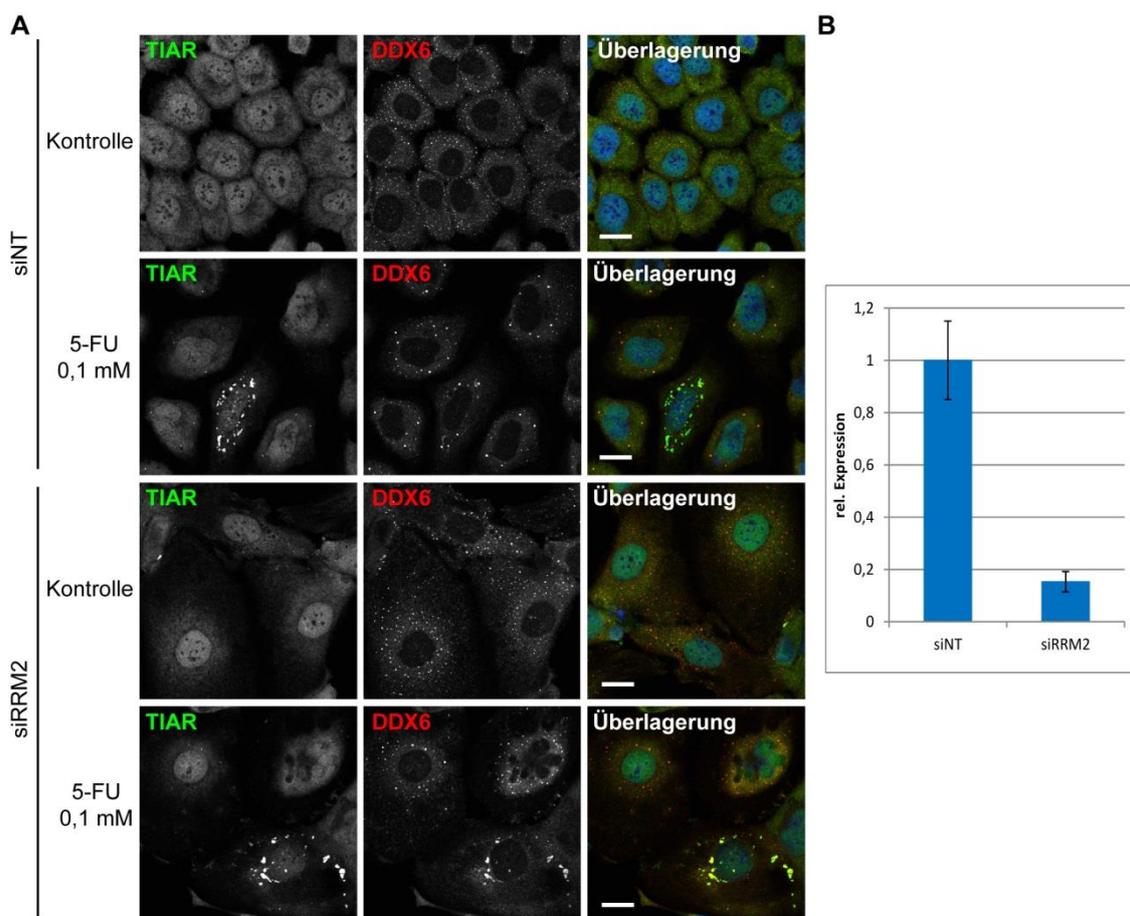


Abbildung 35: 5-FU-Effekte auf SGs werden nicht durch reduzierte Ribonukleotidreduktase-Expression verstärkt. (A) HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 48 h mit Kontroll-siRNA (NT) bzw. siRNA gegen Ribonukleotidreduktase (RRM2) inkubiert und gleichzeitig für 24 h mit 0,1 mM 5-FU behandelt oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden fixiert, TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabalken: 20 μ m. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 48 h mit siNT bzw. siRRM2 inkubiert. Das RRM2-Expressionslevel wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus zwei biologischen Replikaten.

Zusammenfassend ließ sich also kein Einfluss eines reduzierten RR-Level auf die 5-FU-induzierte SG-Bildung aufzeigen. Die zuvor beobachtete verstärkte SG-Bildung bei Kombination von 5-FU mit Gemcitabin oder HU könnte daher auch durch andere Mechanismen ausgelöst worden sein als nur durch die Inhibition der RR.

3.5.4 Auswirkungen einer Kombination von Selenit und 5-FU auf die Stress-granule-Bildung

Selenverbindungen werden häufig als Chemotherapeutika eingesetzt [375]. So potenziert Selenit die Wirkung von 5-FU in kolorektalen Krebszelllinien [376]. Es ist außerdem gezeigt worden, dass Selenit Apoptose durch übermäßige ROS-Produktion verursacht [377]. Damit einhergehend konnte kürzlich auch die Bildung von nicht-kanonischen SGs durch Selenit nachgewiesen werden, die nicht zytoprotektiv wirken [302]. Deshalb sollte im Folgenden näher untersucht werden, wie sich eine Kombinationsbehandlung von 5-FU und Selenit auf die SG-Bildung auswirkt.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU in Kombination mit Natrium-Selenit behandelt, wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und TIAR als SG-Markerprotein sowie DDX6 als Marker für PBs mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 36 ersichtlich, ließen sich bei einer Behandlung der Zellen mit 0,001 mM Selenit für 72 h zahlreiche kleine SGs in nahezu allen Zellen detektieren, wie sie bei kürzerer Inkubation mit höherer Selenit-Konzentration beschrieben worden sind [302]. Nach gleichzeitiger Inkubation mit 0,1 mM 5-FU waren hingegen in etwa 30 % der Zellen größere SGs zu finden, die den zuvor beschriebenen 5-FU-induzierten SGs ähnelten. Somit scheint die 5-FU-induzierte SG-Bildung nicht durch Selenit beeinflusst zu werden.

Interessanterweise wiesen Zellen nach gleichzeitiger Behandlung mit 0,001 mM 5-FU jedoch weniger der kleinen SGs als Selenit-behandelte Zellen auf. Bei 0,01 mM ließen sich die kleinen Selenit-induzierten SGs gar nicht mehr nachweisen. Somit könnte andererseits 5-FU die Bildung kleiner SGs durch Selenit beeinflussen. Darüber hinaus zeigten Selenit-behandelte Zellen weniger PBs als unbehandelte Zellen. Die PB-Bildung wurde jedoch nicht durch gleichzeitige 5-FU-Behandlung beeinflusst.

Die Befunde lassen vermuten, dass verschiedene Wege zur Ausbildung von zytoprotektiven SGs durch 5-FU einerseits oder nicht-protektiven SGs durch Selenit andererseits führen und dass sich diese Wege gegenseitig beeinflussen können.

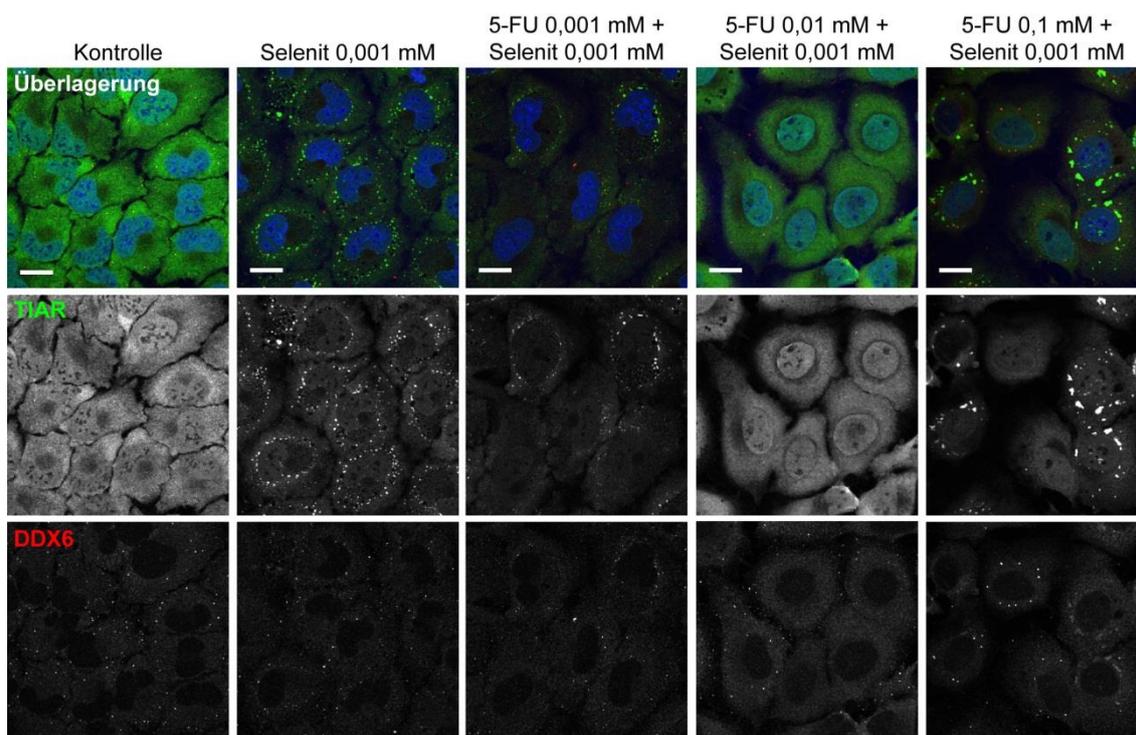


Abbildung 36: 5-FU verhindert die Bildung von SGs durch Selenit. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, unbehandelt belassen (Kontrolle) oder für 72 h verschiedenen Konzentrationen von 5-FU in Kombination mit 0,001 mM Natrium-Selenit ausgesetzt und fixiert. TIAR als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabballen: 20 µm.

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchungen verschiedener Kombinationsbehandlungen gezeigt werden, dass sich die zellulären Mechanismen von 5-FU und die anderer chemotherapeutischer Substanzen wie Gemzitabin und Selenit gegenseitig beeinflussen könnten. Das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen könnte sich auf unterschiedliche Weise auf die Bildung von zytoprotektiven SGs und somit das Überleben von Krebszellen auswirken. Daher lassen die Befunde eine Bedeutung für die Effizienz der Chemotherapie vermuten.

3.6 Untersuchungen zur Rolle von HSF1 bei den Wirkmechanismen von 5-FU

Der Transkriptionsfaktor HSF1 ist ein wichtiger Regulator der krebsspezifischen Genexpression und ist in vielen Krebstypen verstärkt exprimiert [66, 72, 75]. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass HSF1 die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika wie Cisplatin, Carboplatin, Doxorubicin und Proteasominhibitoren vermittelt [69-71]. Darüber hinaus reguliert HSF1 zusammen mit HSF2 die Expression stressinduzierter Gene, die unter anderem für molekulare Chaperone kodieren und den unter verschiedenen Stressbedingungen entstehenden zellulären Schäden entgegenwirken. Im folgenden Abschnitt sollte daher untersucht werden, inwiefern ein Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Regulation durch HSF1 und den Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs besteht.

3.6.1 Einfluss von Transkriptionsregulatoren auf die Bildung von Stress-granules und P-bodies

Eine globale RNA-Interferenz-Analyse von Signalwegen, die in die Bildung von SGs und PBs involviert sind, enthüllte eine bedeutende Rolle von transkriptionellen Wegen [103]. Daher sollte im Folgenden ebenfalls durch RNA-Interferenz-Experimente überprüft werden, inwiefern HSF1 die Entstehung von SGs und PBs beeinflusst. HSF1 kann je nach Art des Stressstimulus sowohl Homotrimerie als auch Heterotrimerie mit der Isoform HSF2 bilden [55]. In Kollaboration mit der AG Schweiger am MPI-MG konnte zudem ein Zusammenhang von HSF1 mit BRD4 (*bromodomain-containing protein 4*), einem weiteren Transkriptionsregulator, gefunden werden. Daher wurden auch HSF2 und BRD4 als Kontrollen in die Untersuchungen einbezogen.

Dazu wurden HeLa-Zellen für 48 h mit siRNA gegen HSF1 (siHSF1), HSF2 (siHSF2) bzw. BRD4 (siBRD4) oder mit einer Kontroll-siRNA (siNT) transfiziert und anschließend für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt. Die Zellen wurden dann wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und G3BP sowie eIF4G als Marker für SGs bzw. DCP1 sowie DDX6 als Marker für PBs mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Die Analyse der SGs ergab, dass sowohl unbehandelte als auch siNT-transfizierte Zellen eine relativ einheitliche Anzahl von SGs aufwiesen (Abbildung 37A). Dagegen ließen sich in den meisten Zellen, die mit siHSF1 behandelt wurden, zahlreiche und teilweise unregelmäßig geformte SGs feststellen. Auch nach Transfektion von siHSF2

und siBRD4 wiesen die meisten Zellen mehr SGs auf. Die mittels qRT-PCR bestimmte *knockdown*-Effizienz betrug für HSF1 etwa 95 %, für HSF2 etwa 72 % und für BRD4 etwa 76 % (Abbildung 37B).

Somit wurde die SG-Bildung durch reduzierte Expression von HSF1 wie auch von HSF2 und BRD4 leicht verstärkt.

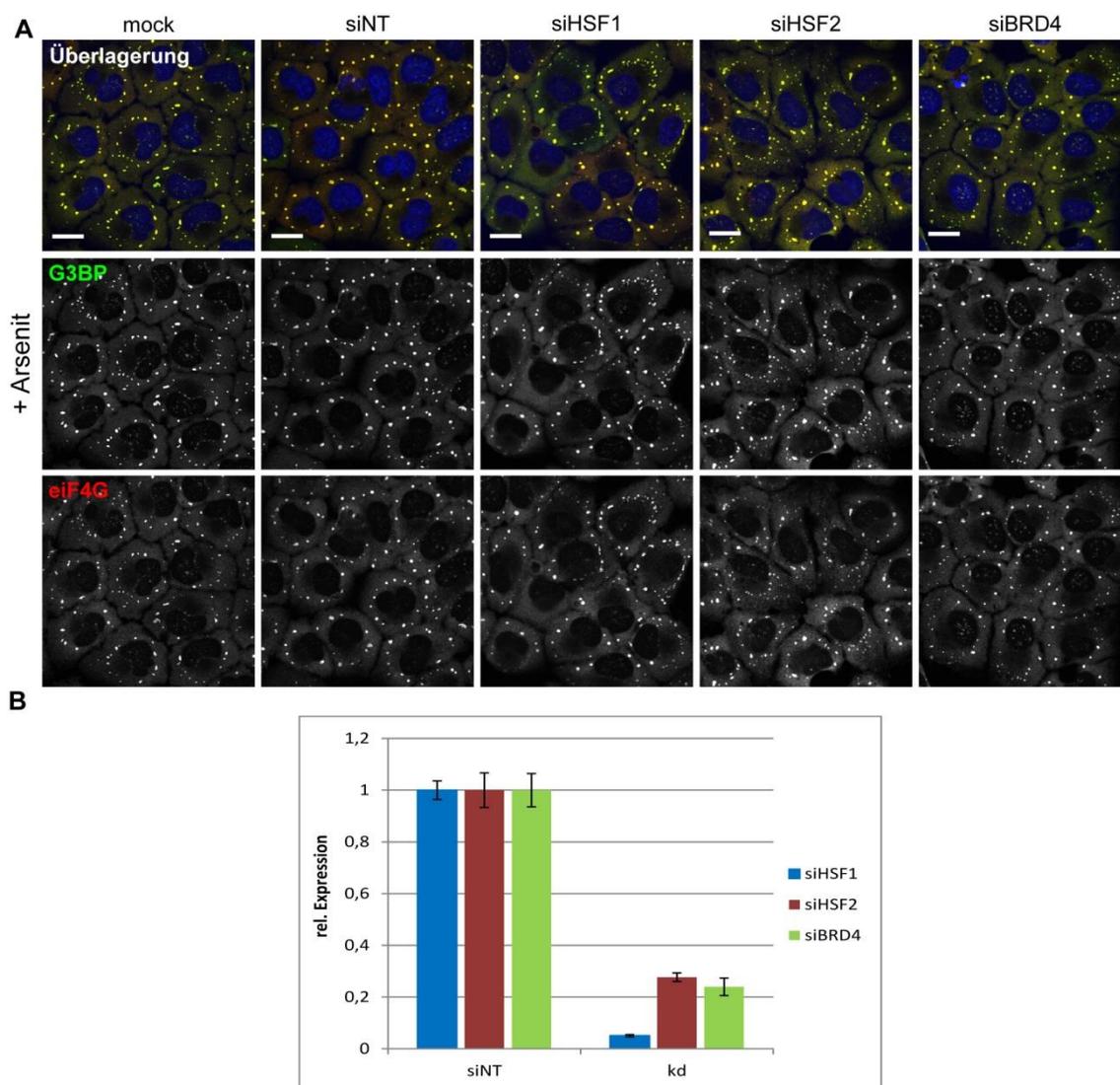


Abbildung 37: Reduzierte Expression von HSF1, HSF2 und BRD4 verstärkt die Bildung von SGs. (A) HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, unbehandelt belassen (mock) oder für 48 h mit Kontroll-siRNA (NT) bzw. siRNAs gegen HSF1, HSF2 oder BRD4 inkubiert, anschließend 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und fixiert. Die SG-Marker G3BP und eIF4G wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μ m. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 48 h mit siRNAs gegen HSF1, HSF2 oder BRD4 inkubiert. Die jeweiligen Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus zwei biologischen Replikaten.

Die Analyse der PBs ergab, dass in nahezu allen siHSF1-transfizierten Zellen eine vermehrte Anzahl von DCP1- und DDX6-positiven PBs zu finden war, während nur in einem Teil der unbehandelten oder siNT-transfizierten Zellen PBs auftraten (Abbildung 38). Außerdem konnte auch nach Transfektion von siHSF2 oder siBRD4 eine stark erhöhte Anzahl von PBs in nahezu allen Zellen beobachtet werden. Somit wurde auch die PB-Bildung durch reduzierte Expression von HSF1, HSF2 oder BRD4 verstärkt.

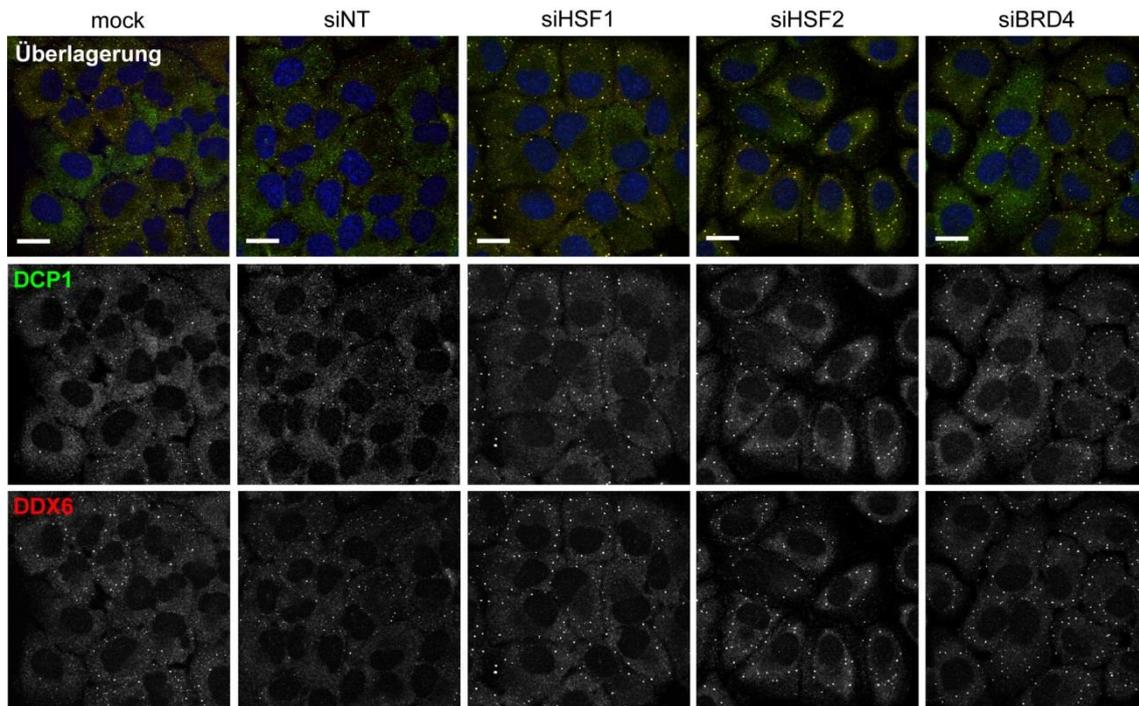


Abbildung 38: Reduzierte Expression von HSF1, HSF2 und BRD4 verstärkt die Bildung von PBs. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, unbehandelt belassen (mock) oder für 48 h mit Kontroll-siRNA (NT) bzw. siRNAs gegen HSF1, HSF2 oder BRD4 inkubiert und fixiert. Die PB-Marker DCP1 und DDX6 wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass HSF1 die Bildung von SGs und PBs beeinflussen könnte. Interessanterweise zeigten auch HSF2 und BRD4 einen ähnlichen Einfluss, so dass sich eine Rolle der transkriptionellen Regulation bei der Bildung von SGs und PBs vermuten lässt.

3.6.2 Einfluss von HSF1 auf die 5-FU-induzierte Bildung von Stress-granules

Die vorangegangenen Versuche lassen vermuten, dass HSF1 die Bildung von SGs und PBs reguliert. Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass 5-FU die Bildung von SGs und PBs verstärkt. Da HSF1 zudem die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika vermittelt, sollte nun geklärt werden, inwiefern eine veränderte HSF1-Expression die Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs beeinflusst.

Hierfür wurden HeLa-Zellen für 48 h mit siRNA gegen HSF1 oder mit einer Kontroll-siRNA (siNT) transfiziert und gleichzeitig für 24 h mit 0,01 mM 5-FU behandelt oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden dann wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und G3BP als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 39 ersichtlich, waren SGs in etwa 10 % der siHSF1-transfizierten Zellen nach Behandlung mit 0,01 mM 5-FU zu beobachten, während in siNT-transfizierten Zellen, die mit 0,01 mM 5-FU behandelt wurden, keine SGs auftraten. Außerdem wiesen weder unbehandelte siNT- noch siHSF1-transfizierte Zellen SGs auf. Die 5-FU-induzierte SG-Bildung wurde somit durch reduzierte HSF1-Expression verstärkt.

Mit siNT und 0,01 mM 5-FU behandelte Zellen wiesen mehr DDX6-positive PBs auf als unbehandelte siNT-transfizierte Zellen. Auch in siHSF1-transfizierten Zellen war die PB-Anzahl gegenüber unbehandelten siNT-transfizierten Zellen stark erhöht. Dagegen konnten in siHSF1-transfizierten Zellen, die mit 5-FU behandelt wurden, jedoch noch mehr PBs nachgewiesen werden. Somit wurde auch die vermehrte PB-Bildung unter 5-FU-Einfluss durch reduzierte HSF1-Expression weiter verstärkt.

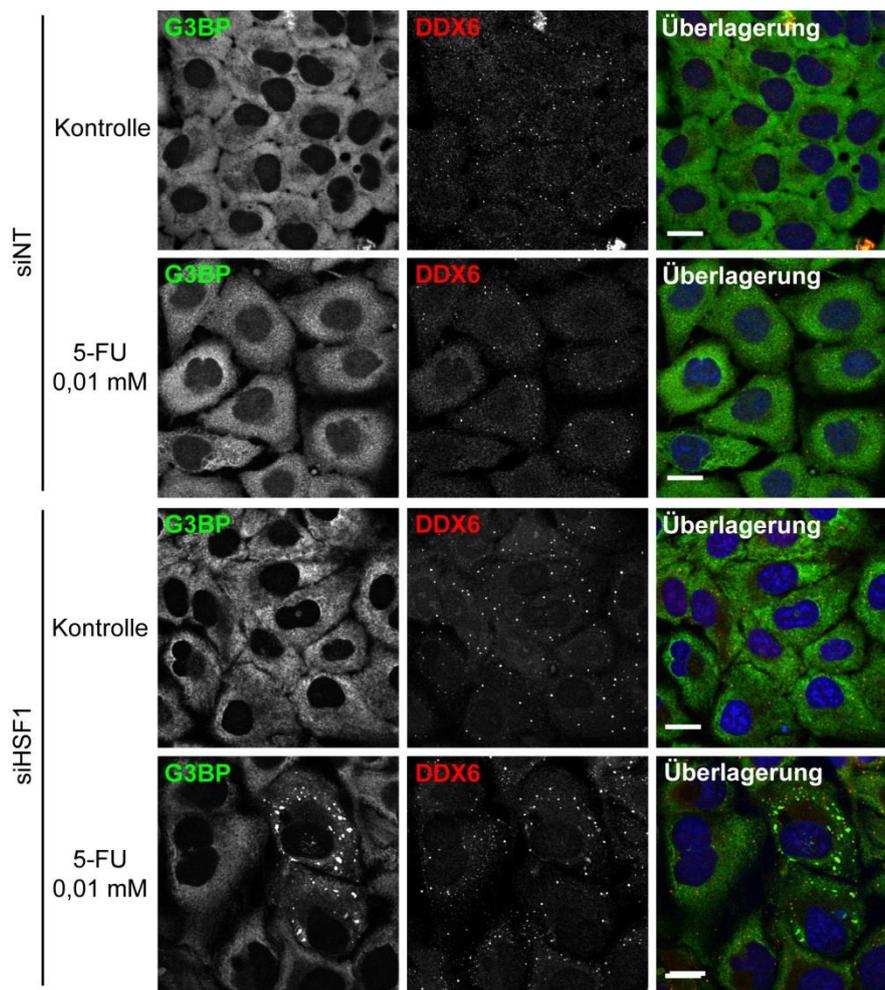


Abbildung 39: 5-FU-Auswirkungen auf SGs und PBs lassen sich durch reduzierte Expression von HSF1 modulieren. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 48 h mit Kontroll-siRNA (NT) bzw. siRNAs gegen HSF1 inkubiert und gleichzeitig für 24 h mit 0,01 mM 5-FU behandelt oder unbehandelt belassen (mock). Die Zellen wurden fixiert, G3BP als SG-Marker sowie DDX6 als Marker für PBs anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstab Balken: 20 µm.

Diese Befunde lassen vermuten, dass reduzierte HSF1-Level die Auswirkungen von 5-FU sowohl auf die SG- als auch auf PB-Bildung verstärken und somit zu einer noch stärkeren Bildung von SGs und PBs führen könnten.

3.6.3 Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von nukleären Stress-bodies

Neben zytoplasmatischen SGs treten bei Hitzestress sowie anderen Stressoren auch so genannte nukleäre Stress-bodies (nSBs) auf [65]. Diese Strukturen sind an der schnellen, transienten Umprogrammierung der Genexpression durch HSF1 und HSF2 unter Stress beteiligt [378]. Darüber hinaus regulieren nSBs aber auch die mRNA-Prozessierung durch Rekrutierung von Spleißfaktoren [64, 378]. Verschiedene Stressoren führen zu einer unterschiedlich starken Induktion von nSBs; so ruft auch oxidativer Stress nSBs hervor, wenn auch weit weniger als Hitzestress [379, 380].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass nSBs auch durch das Chemotherapeutikum Mitoxantron induziert werden [381]. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob auch 5-FU die Entstehung von nSBs unter Stressbedingungen beeinflusst. Um die Auswirkungen von RNA- und DNA-Schäden zu differenzieren, wurde darüber hinaus auch der Einfluss von FUrds als RNA-inkorporierende sowie FdUrds und Gemzitabin als DNA-inkorporierende Substanzen untersucht.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit 5-FU, FUrds, FdUrds oder Gemzitabin behandelt und danach für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit oxidativem Stress ausgesetzt. Die Zellen wurden dann wie zuvor beschrieben für die mikroskopische Analyse vorbereitet und HSF1 als Marker für nSBs sowie ATXN2L als SG-Marker anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Wie in Abbildung 40A zu sehen, ließen sich unter oxidativen Stressbedingungen nach Behandlung mit 0,01 mM 5-FU in nahezu allen Zellen mehrere HSF1-positive Kernstrukturen nachweisen, während nur etwa 50 % der Arsenit-behandelten Zellen vereinzelte HSF1-positive nSBs aufwiesen. Somit scheint die Bildung von nSBs durch 5-FU verstärkt zu werden.

Auch in nahezu allen Zellen, die mit 1 μ M FUrds behandelt wurden, waren mehrere nSBs zu beobachten (Abbildung 40B). Darüber hinaus konnten auch nach Behandlung der Zellen mit 1 μ M FUrds oder 1 nM Gemzitabin HSF1-positive nSBs in nahezu allen Zellen detektiert werden. Somit scheint auch die Bildung von nSBs durch andere chemotherapeutische Substanzen unter Stressbedingungen verstärkt zu sein. Da dies auch DNA-inkorporierende Substanzen mit einschloss, sind die beobachteten Auswirkungen auf die Bildung von nSBs wahrscheinlich unabhängig von einer RNA-Inkorporation.

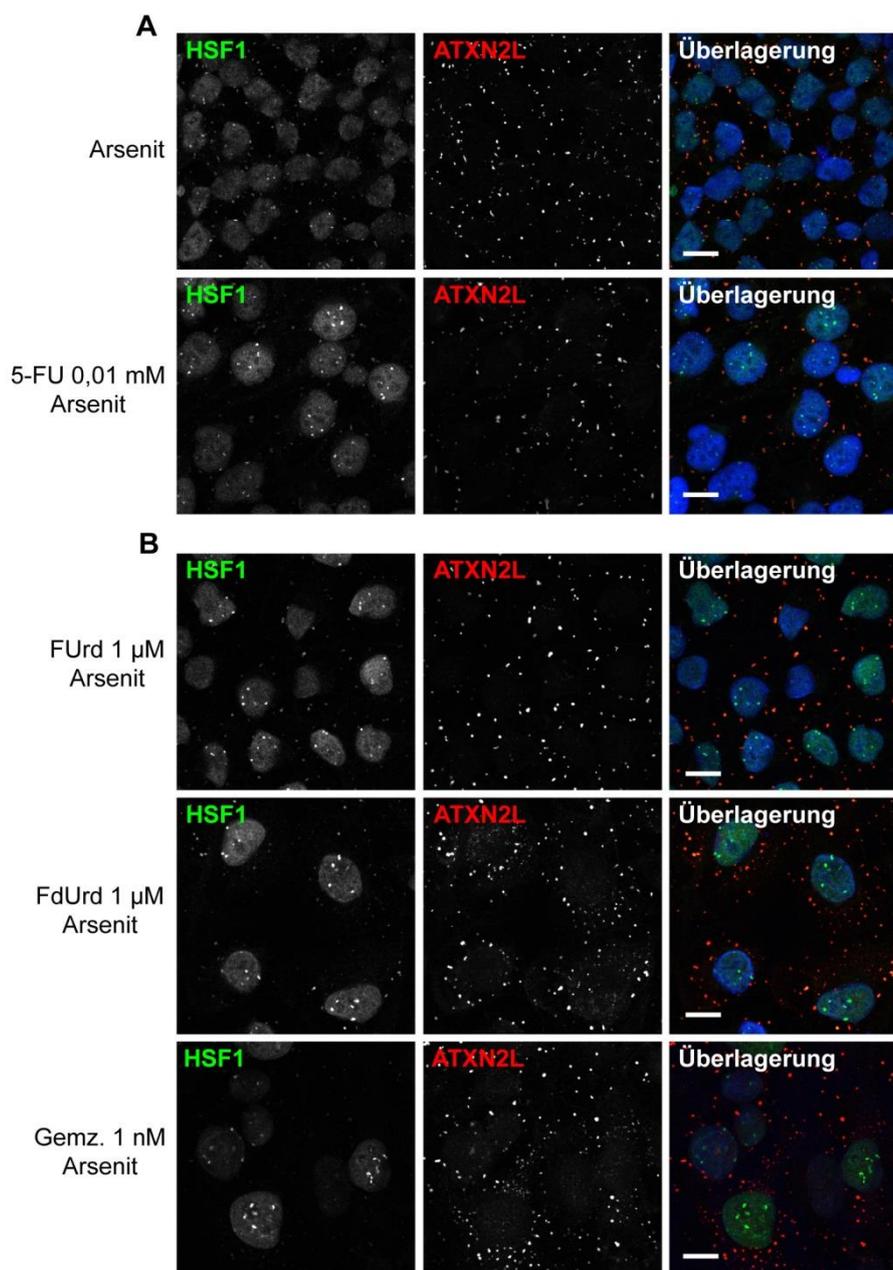


Abbildung 40: Verschiedene Chemotherapeutika verstärken die Bildung von nukleären Stress-Bodies (nSBs) unter oxidativen Stressbedingungen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, **(A)** unbehandelt belassen oder für 72 h mit den angegebenen Konzentrationen von 5-FU bzw. **(B)** von FUr, FdUr oder Gemzitabin inkubiert, anschließend für 1 h mit 0,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und fixiert. HSF1 als Marker für nSBs sowie ATXN2L als SG-Marker wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper visualisiert und die Zellkerne mit Hoechst angefärbt. Maßstabbalken: 20 μ m.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass 5-FU eine zelluläre Stressantwort durch die Induktion von SGs auslösen könnte. Darüber hinaus könnte auch die Bildung von PBs und nSBs verstärkt sein. Die vermehrte nSB-Bildung könnte eine weitere Stressantwort auf transkriptioneller Ebene darstellen, die ebenfalls durch

5-FU ausgelöst wird. Zudem scheint HSF1 ein Regulator der Bildung von SGs und PBs zu sein, was auf ein Zusammenspiel der verschiedenen zellulären Strukturen hindeutet. Neben SGs und PBs könnten somit auch nSBs für die Resistenz gegenüber 5-FU sowie weiteren Chemotherapeutika von Bedeutung sein.

4 Diskussion

4.1 5-FU führt zur *de novo*-Bildung von Stress-granules in Hefezellen und humanen Zellen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Mechanismen der Chemoresistenz gegenüber 5-FU weitergehend zu untersuchen und so potentielle Ansatzpunkte für eine effektivere Therapie zu finden. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten globalen Hefe-Analysen sollten zunächst Gene identifiziert werden, die eine Resistenz gegenüber 5-FU vermitteln. Dabei wurden 65 5-FU-sensitive Deletionsstämme identifiziert, von denen 27 bereits publiziert worden sind (Tabelle 6). Somit konnten in der globalen Analyse 38 weitere Resistenz-vermittelnde Gene identifiziert werden.

Ein mit Hilfe der STRING-Datenbank (www.string-db.org) erstelltes Interaktionsnetzwerk zeigt, dass die in den Hefe-Analysen identifizierten Resistenzgene für Proteine kodieren, die untereinander in vielfältiger Weise in Verbindung stehen (Abbildung 41). Zudem lassen sich drei Unternetzwerke ausmachen: Das erste Netzwerk beinhaltet vor allem Proteine, die an der Prozessierung von tRNAs und rRNAs sowie an der Translation und Ribosomenbiogenese beteiligt sind. Entsprechend zeigten Gustavsson und Ronne bereits die wichtige Rolle von tRNA-modifizierenden Enzymen bei der Sensitivität gegenüber 5-FU, da 5-FU zur Destabilisierung von tRNAs beiträgt [321]. Da 5-FU darüber hinaus auch DNA-Schäden verursacht, war zu erwarten, dass auch die Defizienz von DNA-Reparaturgenen die Sensitivität beeinflusst. Ein weiteres Netzwerk umfasst dementsprechend Proteine, die eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen und den Zellzyklus oder die Transkription als Antwort auf DNA-Schäden regulieren. Das dritte Netzwerk schließlich vereint Proteine, die bei Vesikelsortierung und -transport eine Rolle spielen, sowie an der Lipidsynthese beteiligte Proteine. Diese Gene vermitteln eine Resistenz gegenüber 5-FU wahrscheinlich durch eine veränderte Permeabilität der Zelle für 5-FU bzw. durch dessen Ausschleusung oder Absonderung in die Vakuole.

Das humane ASC1-Ortholog RACK1/GNB2L1 ist zudem eine Komponente von SGs und reguliert zugleich die Apoptose [197]. Interessanterweise trägt RACK1 zur Chemoresistenz von hepatozellulären Karzinomzellen gegenüber Doxorubicin, Cisplatin und auch 5-FU bei [388].

Da die globalen Hefeanalysen eine Beteiligung der RNA-Prozessierung und Translation an der Resistenz gegenüber 5-FU nahelegten, wurden im Weiteren gezielt Deletionsstämme, die für SG- oder PB-Komponenten defizient sind, auf ihre Sensitivität gegenüber 5-FU hin überprüft. Auf diese Weise ließen sich 5 weitere Stämme als 5-FU-sensitiv identifizieren (Abbildung 8A).

Die DExD/H-Box-Helikase DHH1 sowie PAT1 sind *decapping*-Aktivatoren, die nach der Deadenylierung die Entfernung der 5'-Kappenstruktur von mRNAs stimulieren [389, 390]. Der $\Delta DHH1$ -Hefestamm ist bereits als 5-FU-sensitiv identifiziert worden [321]. LSM1 ist Teil des heptameren Ringkomplexes bestehend aus LSM1-7, der ebenfalls am Abbau von mRNAs beteiligt ist [391]. Auch der $\Delta LSM6$ -Hefestamm, der für eine weitere Komponente dieses Komplexes defizient ist, ist bereits als 5-FU-sensitiv identifiziert worden [321]. Die 5'-3'-Exonuclease XRN1 reguliert den mRNA-Abbau in PBs [392], darüber hinaus aber auch die Reifung von rRNAs [393]. Während DHH1, PAT1, LSM1 und XRN1 Komponenten von PBs sind [105], wurde PBP1 als SG-Komponente identifiziert, die zudem die Polyadenylierung reguliert [394, 395].

Aufgrund der erhöhten Sensitivität von SG- und PB-Deletionsstämmen wurde anschließend untersucht, inwiefern 5-FU auch die Bildung von SGs und PBs in *S. cerevisiae* beeinflusst. Bemerkenswerterweise führte 5-FU zur *de novo*-Entstehung von SGs in den Hefezellen (Abbildung 8B). Darüber hinaus wurde auch die PB-Bildung verstärkt. In *S. pombe* ist bereits gezeigt worden, dass das Chemotherapeutikum Doxorubicin die SG-Bildung unter Hitzestress verstärkt [396]. Dies weist auf eine Rolle von SGs bei der Resistenz von Hefen gegenüber Chemotherapeutika hin.

Die bei der Analyse von Hefezellen beobachteten Auswirkungen von 5-FU konnten auch bei der Untersuchung von humanen Zellen weitgehend bestätigt werden. Auch in HeLa-Zellen ließ die *de novo*-Bildung von SGs nachweisen (Abbildung 9A). Diese traten bei Konzentrationen ab 0,01 mM 5-FU in bis zu 10 % der Zellen auf. Bei höheren 5-FU-Konzentrationen wiesen bis zu 50 % der Zellen SGs auf. Die weiteren Analysen zeigten, dass 5-FU nicht nur zur *de novo*-Entstehung von SGs führt, sondern auch die SG-Bildung unter oxidativem oder Hitzestress deutlich verstärkt (Abbildung 15 und Abbildung 14).

Die Zusammensetzung von SGs kann unter verschiedenen Stressbedingungen abweichen, jedoch sind einige Kernkomponenten beschrieben worden [90, 105]. Die Bildung von SGs verläuft, wie in der Einleitung beschrieben, in mehreren Schritten [101]: Zunächst ersetzen Proteine wie TIAR den ternären Komplex und sorgen durch ihre Prion-ähnlichen Domänen für eine erste Akkumulation des Ribosomenkomplex mit den assoziierten Initiationsfaktoren einschließlich eIF4G. Darauf folgt die primäre Aggregation, bei der verschiedene RNA-Bindeproteine wie G3BP oder PABP spezifische Transkripte in die SGs rekrutieren. Auch die RNA-Bindeproteine ATXN2 und ATXN2L sind *bona fide* Komponenten, die unter verschiedenen Bedingungen in SGs lokalisieren. Schließlich interagieren während der sekundären Aggregation verschiedene SG-Proteine untereinander und weitere Proteinkomponenten werden rekrutiert.

Die Analyse FU-induzierter SGs ergab, dass die untersuchten Markerproteine für *bona fide* SGs TIAR, ATXN2, ATXN2L, G3BP und eIF4G vorhanden waren (Abbildung 12). Da darüber hinaus auch polyadenylierte RNA in den SGs nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9A), lässt sich vermuten, dass die 5-FU-induzierten SGs an der translationalen Repression beteiligt sind. Somit scheint es sich tatsächlich um *bona fide* SGs zu handeln.

Durch die Analyse der Auswirkungen von 5-FU in verschiedenen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass 5-FU die SG-Bildung unabhängig von deren Ursprung in allen untersuchten Zelllinien auslösen konnte (Abbildung 11). Die 5-FU-Effekte sind also nicht auf HeLa-Zellen beschränkt, deren Chromosomensegmentierung und Aneuploidie zu den beobachteten 5-FU-Effekten beitragen könnten [397, 398]. Neben dieser Zervixkarzinom-Zelllinie konnten 5-FU-induzierte SGs auch in Zelllinien nachgewiesen werden, die ihren Ursprung in Prostata- (Du145, PC3, RWPE1), Lungen- (A549) oder Leberkarzinoma (HepG2) haben. Darüber hinaus ließ sich die SG-Bildung auch in embryonalen Nierenzellen (HEK293T) aufzeigen, die jedoch ihrem Expressionsprofil nach eher undifferenzierten neuronalen Zellen ähneln [399], sowie in nicht-transformierten embryonalen Lungenfibroblasten (WI-38). Somit scheint auch die Transformation der HEK293T-Zellen mit dem Adeno- und SV40-Virus keine Rolle für die SG-Induktion zu spielen, wenngleich Virusinfektionen SGs auf vielfältige Weise beeinflussen können [278, 400, 401].

Der Vergleich der verschiedenen aus Prostata-Karzinomen abgeleiteten Zelllinien zeigte, dass 5-FU die SG-Bildung unabhängig vom metastatischen Potential induzieren kann- in Zelllinien aus Hirn- (Du145) oder Knochenmetastasen (PC3) genauso wie in

nicht-tumorigenen RWPE-1-Zellen. Allerdings hätte sich hierfür ein Vergleich mit RWPE-2-Zellen angeboten, einer abgeleiteten tumorigenen Zelllinie [309], die jedoch nicht zur Verfügung stand. PC3-Zellen haben ein höheres Potenzial zur Metastasierung als Du145-Zellen [308], bildeten aber ebenso SGs, wenn auch etwas kleinere SGs bei höheren 5-FU-Konzentrationen. Die 5-FU-induzierten SGs waren also ähnlich, unabhängig vom Ursprungsgewebe der Zellen, ob adult oder embryonal, aus Metastasen abgeleitet oder durch Virusinfektion transformiert.

Die *de novo*-Induktion von SGs durch 5-FU ging mit der Phosphorylierung von eIF2 α einher (Abbildung 19). Entsprechend konnte nur in Zellen mit SGs ein erhöhtes Signal von phosphoryliertem eIF2 α detektiert werden. Angel-García *et al.* zeigten bereits in Kolon- und Brustkrebszellen, dass die eIF2 α -Phosphorylierung durch die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) vermittelt wird: 5-FU führt zur Aktivierung von PKR durch Phosphorylierung sowie zu einem erhöhten PKR-Level. PKR ist zudem sowohl für die eIF2 α -Phosphorylierung als auch für die damit einhergehende 5-FU-induzierte Apoptose notwendig [333]. Eine langanhaltende Phosphorylierung von eIF2 α wirkt sich proapoptotisch aus [91], während sie kurzzeitig durch die Aktivierung von PI3K- und NF- κ B-Wegen zytoprotektiv wirken kann [402, 403]. Daher bleiben die Auswirkungen der eIF2 α -Phosphorylierung und PKR-Aktivierung auf die Apoptose unklar.

PKR wird hauptsächlich durch doppelsträngige RNA aktiviert, die bei viralen Infektionen auftritt, aber auch durch andere Stressoren wie oxidativer Stress, ER-Stress, Ethanol oder Ceramid [94, 404-406]. Somit lassen sich die Stressbedingungen, die zur Aktivierung bestimmter eIF2 α -Kinasen führen, nicht exakt trennen. Hitze- und oxidativer Stress als klassische Bedingungen zur Auslösung von SGs aktivieren jedoch hauptsächlich die HRI-Kinase [94, 95].

PKR könnte zudem eine bedeutende Rolle bei Krebserkrankungen spielen. So beruhen die antiproliferativen Wirkungen des Tumorsuppressorgens PTEN zumindest teilweise auf der Aktivierung von PKR und der eIF2 α -Phosphorylierung [407]. Außerdem führt das Chemotherapeutikum Doxorubicin sowohl zur Phosphorylierung von eIF2 α als auch zur Aktivierung JNK-abhängiger Apoptosewege durch PKR [408]. PKR wird im Zuge der Tumorigenese heraufreguliert und könnte daher protektiv wirken; zugleich verstärkt jedoch eine höhere PKR-Expression die eIF2 α -Phosphorylierung und Apoptose durch Doxorubicin [409]. Eine Verstärkung der eIF2 α -Phosphorylierung durch Salubrinal [410] führt zudem zu einer weiteren Verstärkung der apoptotischen Effekte von Doxorubicin. Somit scheint sich eine PKR-Aktivierung hauptsächlich proapoptotisch auszuwirken. Es bleibt weiterhin zu klären, welche Rolle

die 5-FU-induzierte Aktivierung von PKR auf die Apoptose hat und welche Rolle die Induktion von SGs dabei spielen könnte.

4.2 Die 5-FU-induzierte Stress-*granule*-Bildung kann der Apoptose entgegenwirken

Besonders von Bedeutung ist die Tatsache, dass auch das apoptotische Mediatorprotein RACK1 in 5-FU-induzierte SGs rekrutiert wurde (Abbildung 13). Da die Sequestrierung von RACK1 in SGs der Apoptose entgegenwirkt [197], wirken sich die durch 5-FU ausgelösten SGs wahrscheinlich zytoprotektiv aus.

RACK1 (*receptor for activated C kinase 1*) ist ein Gerüstprotein, das durch seine vielfältigen Interaktionen mit Ribosomen, Oberflächenrezeptoren sowie nukleären Proteinen verschiedene Signalwege zusammenführt und somit ein Mediator mehrerer zellulärer Prozesse ist [411]. RACK1 besteht aus sieben WD-Domänen, die in Form von β -Propellerstrukturen radial angeordnet sind und kann darüber beispielsweise mit SH2- und PH-Domänen interagieren. RACK1 kann so zur Dimerisierung und Aktivierung von MTK1 beitragen [197]. In ähnlicher Weise stabilisiert RACK1 auch die Proteinkinase C β II, die Proteinphosphatase 2A oder die Tyrosinkinasen Src und Fyn in ihrer jeweils aktiven oder inaktiven Konformation, bis diese Zielproteine auf bestimmte Signale hin freigesetzt werden [411].

RACK1 ist mit der 40S-Ribosomenuntereinheit assoziiert und rekrutiert PKC β II und eIF6, um die Phosphorylierung von eIF6 und somit den Zusammenbau von kleiner und großer Ribosomenuntereinheit zu gewährleisten [412, 413]. Darüber hinaus rekrutiert RACK1 den miRISC (*miRNA induced silencing complex*) zu den Ribosomen, um die Genexpression zu unterbinden [414].

RACK1 wird in vielen Krebstypen verstärkt exprimiert und dient daher auch als prognostischer Indikator bei Brustkrebs [411]. RACK1 ist auch während der Angiogenese hochreguliert und reguliert die transkriptionelle Aktivität von HIF-1 (*hypoxia-inducing factor 1*) [415]. Darüber hinaus reguliert RACK1 die Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen und integriert somit verschiedene an der Transformation beteiligte Signalwege [411].

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Abschnitt 1.5.3) verknüpft RACK1 die SG-Bildung und apoptotische Prozesse [197]: Unter genotoxischen Stressbedingungen (Typ II-Stress) wie Etoposid, UV-Bestrahlung, MMS oder Wasserstoffperoxid löst RACK1 die Apoptose durch Aktivierung von MTK1 aus, unter bestimmten anderen Bedingungen (Typ I-Stress) wie oxidativem oder Hitzestress wird RACK1 in SGs

sequestriert und steht somit nicht mehr zur Aktivierung apoptotischer Prozesse zur Verfügung. Die Rekrutierung von RACK1 geht zudem mit dessen Glykosylierung mit N-Azetylglucosamin einher [103]. Diese Einteilung in Stressoren vom Typ I oder II, die SGs auslösen oder nicht, ist jedoch widersprüchlich, da auch bei UV-Bestrahlung und Wasserstoffperoxid eine Induktion von SGs beschrieben worden ist [416, 417]. Da die 5-FU-induzierten SGs RACK1 enthalten, kann auch die SG-Bildung durch 5-FU als ein zytoprotektiver Mechanismus angesehen werden, der den toxischen Effekten von 5-FU entgegenwirken kann. Da jedoch nur ein Teil des RACK1-Proteins in SGs rekrutiert wurde und der verbliebene Teil weiterhin zytoplasmatisch vorlag, könnte ausreichend RACK1 für die Aktivierung der Apoptose verbleiben. Wie einige andere Ribosomenkomponenten verknüpft RACK1 verschiedene Signalwege mit der Ribosomenbiogenese und Translation [418] und liegt in stöchiometrischer Anzahl mit translationsfähigen Ribosomen vor [419]. Daher ist das zytoplasmatische RACK1-Protein außerhalb von SGs wahrscheinlich mit Ribosomen assoziiert und löst nur dann Apoptose aus, wenn Ribosomen nicht korrekt zusammengebaut werden.

Auch einige weitere apoptotische Signalwege werden durch SGs beeinflusst. TRAF2 interagiert mit dem TNF-(*tumor necrosis factor*) α -Rezeptor und aktiviert so die proinflammatorische Antwort auf TNF- α über den NF- κ B-Signalweg. Unter Stressbedingungen wird TRAF2 durch Interaktion mit eIF4G in SGs sequestriert und somit die Apoptose im Zuge der proinflammatorischen Antwort unterbunden [420, 421]. Die Serin/Threonin-Kinase ROCK1 (*Rho-associated protein kinase 1*) wird unter Stressbedingungen durch die GTPase RhoA aktiviert, kann so JIP-3 (*JNK-interacting protein 3*) phosphorylieren und JNK-Signalwege sowie letztlich apoptotische Prozesse aktivieren. Ähnlich wie RACK1 werden aktiviertes ROCK1 und RhoA jedoch in SGs sequestriert und somit die JNK-Aktivierung und Apoptose verhindert [198]. Verschiedene Stressoren wie Arsenit oder Hitze können zu einer reduzierten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, wodurch Calretikulin aus dem ER ins Zytoplasma freigesetzt und dort durch Arginylierung modifiziert wird. Arginyliertes Calretikulin wird in SGs sequestriert und ist zudem für die vollständige Assemblierung von SGs notwendig [422, 423]. Apoptose geht allerdings mit einer Lokalisation von arginyliertem Calretikulin in der Plasmamembran einher und könnte daher durch die SG-Bildung unterbunden werden [424, 425]. Außerdem ist gezeigt worden, dass SGs die Apoptose auch hemmen, indem sie der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entgegenwirken [426]: Die USP10 (*ubiquitin-specific processing protease 10*) besitzt antioxidative Aktivität, wird jedoch unter Normalbedingungen durch G3BP

inhibiert. Unter verschiedenen Stressbedingungen wie oxidativem oder Hitzestress werden USP10 und G3BP in SGs rekrutiert, wodurch die inhibitorische Wirkung von G3BP aufgehoben wird und USP10 durch die ATM-Kinase aktiviert werden kann. Andere Stresstypen wie Wasserstoffperoxid und Röntgen-Bestrahlung könnten hingegen zwar zur ATM-Aktivierung, aber nicht zur Bildung von SGs beitragen und somit die ROS-Produktion nicht unterdrücken.

Andererseits kann die SG-Bildung durch Aktivierung der Apoptose unterbunden werden. Der Apoptose-induzierende Faktor (*apoptosis-inducing factor*, AIF) wird im Zuge der Apoptose in den Zellkern transloziert und führt dort zur Degradation der DNA, hemmt aber zugleich durch erhöhte Glutathion-Level die Bildung von SGs [427]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um neben dem RACK1-vermittelten Mechanismus eine mögliche Beteiligung weiterer antiapoptotischer Wege bei der Antwort auf 5-FU aufzuzeigen.

4.3 5-FU führt zu vermehrter P-body-Bildung

Zusätzlich zur SG-Induktion ließ sich in Hefezellen eine Zunahme der PB-Anzahl beobachten (Abbildung 8B). Entsprechend sind PBs in Hefen für die SG-Bildung notwendig [311]. Auch die Auswirkungen von 5-FU auf die PB-Bildung konnten in humanen Zellen rekapituliert werden, so dass diesen wahrscheinlich generelle Mechanismen zugrunde liegen. Die Analysen zeigten, dass die Bildung von PBs in HeLa-Zellen schon bei geringen 5-FU-Konzentrationen verstärkt wurde (Abbildung 16).

Wie in der Einleitung beschrieben enthalten PBs unter anderem verschiedene Komponenten des miRNA-Signalwegs wie Argonaut- und GW182-Proteine, Importin-8 sowie miRNA-reprimierte mRNAs [214, 215, 243, 428, 429]. Somit spielen sie eine bedeutende Rolle bei der translationalen Repression durch RNA-Interferenz, wahrscheinlich in enger Verbindung mit Mitochondrien [339]. So ließ sich auch eine Veränderung von Mitochondrien durch 5-FU in EM-Analysen feststellen, die zur Beeinträchtigung von miRNA-Wegen beitragen könnte (Abbildung 23). Wie die SG-Induktion könnte sich auch die vermehrte PB-Bildung auf die Apoptose auswirken. Viele miRNAs sind bei Krebs dereguliert oder ursächlich für die Krebsentstehung [430]. Außerdem vermitteln miRNAs auch die Chemoresistenz unter anderem gegenüber 5-FU und Gemzitabin [431, 432]. Es ist anzunehmen, dass eine vermehrte PB-Zahl miRNA-Signalwege beeinflusst. Sie könnte zu einer vermehrten Stilllegung der Genexpression führen. Allerdings bleibt zu klären, ob die verstärkte PB-Bildung zu

einer generellen Verstärkung der miRNA-abhängigen Regulation der Translation führt oder ob sie eher mit einer veränderten Zusammensetzung von miRNAs und somit mit einer spezifischen Regulation bestimmter Transkripte einhergeht.

Für PBs ist eine Rolle bei der Antwort auf Hypoxie gezeigt worden [433]: HIF-1 α reguliert die stressspezifische Genexpression bei Hypoxie [434]. Unter Normalbedingungen ist die *HIF-1 α* -mRNA mit DDX6 assoziiert und wird in PBs gespeichert. Unter hypoxischen Bedingungen jedoch wird die Expression von DDX6 durch microRNAs der miR-130-Familie unterdrückt. Geringere DDX6-Proteinlevels führen zu verminderter PB-Anzahl und Freisetzung der *HIF-1 α* -mRNA aus den PBs. Daraufhin kann diese durch IRES-abhängige Mechanismen translatiert werden. Welche Rolle die durch 5-FU hervorgerufenen Veränderungen von PBs in diesem Zusammenhang bei der Chemoresistenz spielen könnten, bleibt zu klären.

Interessanterweise ging die Behandlung der Zellen mit geringen 5-FU-Konzentrationen, die nicht zur SG-Induktion führten, sowohl mit einer vermehrten PB-Bildung als auch einer deutlichen Zellvergrößerung einher. Die Ursache für diese Vergrößerung könnte eine massive Aufnahme von Wasser sein. Dementsprechend ist kürzlich gezeigt worden, dass 5-FU wie auch Gemcitabin die Expression von Aquaporin 3 (AQP3) massiv erhöht [326]. Damit einhergehend waren die Zellen bei 5-FU und noch stärker bei Gemcitabin deutlich vergrößert, was die in dieser Arbeit gewonnenen Befunde bestätigt (Abbildung 33). Interessanterweise ist in diesem Zusammenhang auch gezeigt worden, dass die Zellvergrößerung bei 5-FU mit einem Zellzyklusarrest einhergeht. Eine längere Inkubation hingegen löste Apoptose aus und ging mit relativ normaler AQP3-Expression und Zellgröße einher [326]. Bei höheren 5-FU-Konzentrationen ließ sich parallel zur Bildung von SGs lediglich eine geringere Zellvergrößerung feststellen. Da sich verschiedene 5-FU-Konzentrationen unterschiedlich auf SGs und PBs auswirkten, könnte deren Bildung also unabhängig voneinander durch 5-FU induziert werden und sich sogar teilweise gegenseitig ausschließen.

Die vermehrte PB-Bildung ging zudem mit einer leichten Zunahme des DCP1-Proteinlevels einher, wie die Western Blot-Analysen zeigten (Abbildung 18). Interessanterweise ließ sich vermehrt eine Form höheren Molekulargewichts detektieren, was auf posttranslationale Modifikationen hindeutet. Diese Modifikationen von DCP1 waren jedoch nicht mit dem Auftreten von PBs bei geringeren, sondern eher mit der SG-Induktion bei höheren 5-FU-Konzentrationen korreliert und ließen sich entsprechend auch bei Arsenitbehandlung nachweisen. DCP1 wird infolge

translationaler Repression unter Stressbedingungen durch JNK phosphoryliert, was zur Auflösung von PBs führt [331, 332]. Während verschiedener Zellzyklusphasen kontrolliert die Hyperphosphorylierung von DCP1 die Anzahl von PBs [435]. Dementsprechend könnte auch die 5-FU-induzierte SG-Bildung mit einer Hyperphosphorylierung von DCP1 einhergehen.

Auch für ATXN2L ließ sich eine Form höheren Molekulargewichts bei höheren 5-FU-Konzentrationen sowie bei Arsenit-Behandlung nachweisen, die auf posttranslationale Modifikationen parallel zur Entstehung von SGs hindeutet. Verschiedene Modifikationen sind mit der SG-Bildung in Verbindung gebracht worden [103]. ATXN2L reguliert sowohl die Bildung von SGs als auch von PBs [145]. Interessanterweise wurde ein verringerter Proteinlevel von ATXN2L in einer 5-FU-resistenten hepatozellulären Karzinoma (HCC)-Zelllinie beschrieben [436]. Während G3BP weitestgehend unverändert vorlag, zeigten sich Veränderungen im Level einer niedermolekularen Form bei 5-FU wie auch bei Arsenit-Behandlung. Diese könnten G3BP-Spaltprodukte darstellen, wie sie bei Poliovirus-Infektion beschrieben worden sind [284, 437]. Weitere Analysen sind nötig um zu klären, inwiefern posttranslationale Modifikationen von SG- und PB-Komponenten eine Rolle bei der Bildung von SGs und PBs sowie bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber 5-FU spielen könnten.

4.4 5-FU führt zu verzögerter Auflösung von Stress-granules

Während SGs unter Stressbedingungen wie Hitze oder oxidativem Stress innerhalb weniger Minuten entstehen und auch ihre Auflösung maximal 1-2 Stunden benötigt [334], ließen sich bei 5-FU-Inkubation über einen Zeitraum von wenigen Stunden keine SGs auslösen. Erst eine längere Inkubation über 72 h führte zu einer nennenswerten SG-Induktion. Eine kürzere 5-FU-Behandlung für 24 h erforderte hingegen 10-fach höhere Konzentrationen, um in ähnlichem Ausmaß die SG-Bildung zu induzieren.

5-FU-induzierte SGs waren zudem sehr beständig, da auch ihre Auflösung sehr langsam verlief. Noch mindestens 72 h nach der 5-FU-Behandlung war die Zahl der Zellen mit SGs nicht verringert (Abbildung 21). Daher ist nicht auszuschließen, dass die SGs nicht mehr aufgelöst werden können. Dafür spricht auch das Vorhandensein von kleineren SGs bzw. SG-Überresten in apoptotischen Zellen bei höheren 5-FU-Konzentrationen (Abbildung 28). Die kompakte elektronendichte Struktur der SGs, die sich in den EM-Analysen feststellen ließ (Abbildung 23), könnte eine Erklärung für die Beständigkeit der SGs liefern. Allerdings bleibt zu klären, worauf diese Verdichtung der

SGs beruht. Doch auch die Tatsache, dass sich die 5-FU-induzierten SGs nicht durch Emetin auflösen ließen (Abbildung 20), weist auf eine Veränderung dieser SGs hin.

Beständigere SGs wurden auch unter dem Einfluss von Pateamin A beschrieben, die wahrscheinlich durch Auflösung des eIF4F-Komplexes und unabhängig von einer eIF2 α -Phosphorylierung ausgelöst werden [111]. Darüber hinaus ist auch in Zellen während der Seneszenz die SG-Zahl erhöht und die Auflösung der SGs verzögert [438]. Auch seneszente Zellen könnten einen ähnlichen eIF2 α -unabhängigen Mechanismus zur SG-Bildung nutzen. Es bleibt zu klären, inwiefern Seneszenz bei der Antwort auf eine 5-FU-Behandlung beteiligt sein könnte.

Interessanterweise ließ sich zeigen, dass die SG-Bildung die Sensitivität gegenüber 5-FU beeinflussen könnte (Abbildung 22). Zellen, die mit 5-FU-Konzentrationen vorbehandelt wurden, die SGs induzieren können, wuchsen bei einer weiteren 5-FU-Behandlung besser. Dieser Befund lässt sich so deuten, dass die Induktion oder Verstärkung der SG-Bildung durch die zweite Behandlung den apoptotischen Prozessen entgegenwirken könnte, die durch die erste Behandlung ausgelöst worden sind. Somit würde 5-FU schon nach kurzzeitiger Inkubation durch die SG-Induktion zumindest in geringem Ausmaß zu einer Resistenz führen. Dies bestätigt die potentielle antiapoptotische Rolle der 5-FU-induzierten SGs.

Inwieweit 5-FU-induzierte SGs oder PBs zur Resistenz gegenüber 5-FU beitragen könnten, ließe sich am besten durch einen Vergleich von Zelllinien mit einer erworbenen 5-FU-Resistenz mit den entsprechenden Ursprungszellen klären. Mehrere solcher 5-FU-resistenten Zelllinien sind bereits etabliert worden [335-337, 439], jedoch nicht auf die Bildung von SGs oder PBs hin untersucht worden.

Bisher gibt es keine Untersuchungen zur *in situ* SG-Bildung in primären Tumoren oder Metastasen. Angesicht der potenziellen Rolle von SGs bei der Chemoresistenz wäre es jedoch sehr bedeutsam aufzuklären, inwiefern 5-FU auch *in situ* SGs induzieren kann. Da in Tumoren oft auch hypoxische Bedingungen vorherrschen, könnte 5-FU zudem auch die durch Hypoxie ausgelöste SG-Bildung verstärken. Die SG-Induktion durch 5-FU könnte somit einen protektiven Mechanismus für Tumorzellen darstellen.

4.5 RNA-Inkorporation von 5-FU ist für die Induktion von Stress-*granules* verantwortlich

Die Untersuchungen zum Mechanismus der 5-FU-induzierten SG-Bildung zeigten, dass das RNA-inkorporierende 5-FU-Metabolit FdUrd im Gegensatz zum DNA-inkorporierenden FdUrd die Bildung von SGs induzieren konnte (Abbildung 26). Dies deutet darauf hin, dass wahrscheinlich die Inkorporation von 5-FU in RNA die SG-Bildung verursacht. Entsprechend ließ sich die SG-Bildung durch 5-FU und FdUrd auch durch Behandlung mit Uridin verhindern (Abbildung 27).

Somit lässt sich vermuten, dass der kontinuierliche Einbau von 5-FU in RNA zur allmählichen Akkumulation geschädigter RNA führt. Fluoridierte mRNAs würden so vermehrt die Translation behindern und könnten schließlich zu einem weitläufigen Translationsarrest führen. Darüber hinaus könnten jedoch auch rRNAs und tRNAs durch 5-FU-Inkorporation oder veränderte Modifikationen in ihrer Funktion eingeschränkt sein. Eine Akkumulation von RNA-Schäden bis zu dem Punkt, an dem die Translation schließlich arretiert ist, würde auch die Entstehung der SGs über einen langen Zeitraum hinweg erklären. Somit unterscheidet sich der Mechanismus der 5-FU-induzierten SG-Bildung wesentlich von der SG-Induktion durch andere Chemotherapeutika wie Bortezomib. Diese SGs werden durch proteotoxischen Stress ausgelöst, bilden sich somit innerhalb von 3 Stunden und lösen sich selbst bei anhaltendem Stress innerhalb von 10 Stunden wieder auf [296].

Auch das Nukleosidanalogue 5-Azacytidin und das Basenanalogue 6-Thioguanin können wie 5-FU in RNA inkorporiert werden [362, 363]. Dementsprechend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Induktion von SGs durch beide Substanzen gezeigt werden (Abbildung 30). Darüber hinaus können einige weitere Chemotherapeutika mit ähnlicher Struktur in RNA eingebaut werden, so beispielsweise Cytarabin, Capecitabin, 6-Azaguanin, Sapacitabin und Zebularin. Ob solche Substanzen ebenfalls SGs auslösen können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Das 5-FU-Metabolit FdUrd führte ähnlich wie 5-FU zu vermehrter PB-Bildung sowie zur Vergrößerung der Zellen, jedoch nicht zur Induktion von SGs. Ähnliche Auswirkungen zeigten sich auch bei Behandlung mit TFT (Abbildung 31), das eine sehr ähnliche Struktur aufweist und in DNA eingebaut wird. Somit lässt sich davon ausgehen, dass die Auswirkungen von 5-FU auf PBs im Gegensatz zu SGs abhängig von einer Inkorporation in DNA sind. Sowohl FdUrd [440, 441] als auch TFT [442] werden bereits als Chemotherapeutika eingesetzt. Sie könnten daher bessere Alternativen zu 5-FU

darstellen, um spezifische DNA-Schädigung ohne Auswirkungen auf die SG-Bildung zu erreichen. Allerdings bleibt zu klären, welche Folgen die erhöhte PB-Zahl für die Chemoresistenz haben könnten. In der Dissertation von Anja Nowka in der AG Krobtsch am MPI-MG konnte eine ähnliche Verstärkung der PB-Zahl auch durch den Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin gezeigt werden. Zudem schien die verstärkte PB-Bildung mit verringerter Sensitivität gegenüber Camptothecin einherzugehen, so dass auch PBs zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen könnten.

Auch Gemzitabin weist eine ähnliche Struktur wie FdUrd und TFT auf und wird in DNA inkorporiert [366]. Dementsprechend war ebenfalls eine vermehrte PB-Bildung und eine starke Zellvergrößerung zu beobachten (Abbildung 33). Durch Gemzitabin ließen sich jedoch keine SGs induzieren, obwohl es auch in RNA inkorporiert wird. Dies lässt vermuten, dass der Einbau von Gemzitabin in DNA gegenüber dem Einbau in RNA überwiegt. Dafür spricht auch das im Vergleich zu 5-FU verstärkte Auftreten P-ATM-positiver Kernstrukturen, die DNA-Doppelstrangbrüche markieren (Abbildung 34).

Gemzitabin wird oft in Kombination mit 5-FU therapeutisch eingesetzt [32]. Daher wurde ebenfalls überprüft, wie sich eine Kombination von 5-FU und Gemzitabin auf die SG-Bildung auswirkt. Obwohl Gemzitabin allein keinen Einfluss auf die SG-Bildung hatte, verstärkte Gemzitabin jedoch interessanterweise in Kombination mit 5-FU die SG-Bildung (Abbildung 34). Ähnlich wirkte sich die Kombination von 5-FU mit Hydroxyurea als weiterem Inhibitor der Ribonukleotidreduktase (RR) aus. Hingegen ließen sich bei reduzierter RR-Expression keine Unterschiede in der 5-FU-induzierten SG-Bildung feststellen (Abbildung 35), eventuell aufgrund verbliebener Expression von RR. Nichtsdestoweniger sprechen diese Befunde für eine Rolle der RR bei der 5-FU-induzierten SG-Bildung.

Durch reduzierte RR-Level würden vermehrt Ribonukleotide entstehen und in RNA inkorporiert werden. Die RNA-Schäden könnten so zum Translationsarrest sowie zur SG-Bildung führen. Während die RR-Expression bereits als prognostischer Marker für die Gemzitabin-Resistenz verwendet wird [443], könnte sie somit auch für die Resistenz gegenüber 5-FU von Bedeutung sein. Zudem inhibieren auch andere Substanzen wie 5-Azacytidin und Resveratrol die Aktivität der RR [444, 445]. Dies zeigt auch, dass der Metabolismus verschiedener chemotherapeutischer Substanzen eng miteinander verknüpft ist und sich diese Substanzen so gegenseitig beeinflussen können. Die gemeinsamen Mechanismen verschiedener Chemotherapeutika könnten von großer Bedeutung für die Effizienz von Kombinations-Behandlungen sein.

Interessanterweise ist kürzlich gezeigt worden, dass Gemcitabin zur Phosphorylierung von eIF4E durch MNK2 (*MAPK-interacting serin/threonine-kinase 2*) führt [446]. Zudem ging eine vermehrte eIF4E-Phosphorylierung mit einem früheren Erkranken und verringerten Überleben von Pankreaskarzinom-Patienten einher. Eine erhöhte Phosphorylierung von eIF4E wurde in verschiedenen Krebstypen und bei Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika gefunden [447-449].

Die Regulation von eIF4E ist neben der Phosphorylierung von eIF2 α ein weiterer Weg der Translationsregulation. Weitere Stressoren inhibieren den eIF4F-Komplex aus eIF4A, 4E und 4G und lösen so eIF2 α -unabhängig SGs aus: Die Naturstoffe Pateamin A aus einem Schwamm und Hippuristanol aus einer Koralle inhibieren eIF4A [110, 111]. Polioviren veranlassen die Spaltung von eIF4G [110]. Die stress-induzierte Spaltung von tRNAs führt dagegen zur Ablösung des eIF4A:4G-Komplexes von eIF4E an der 5'-Kappenstruktur der mRNA und löst auf diese Weise die SG-Bildung aus [450, 451]. Der eIF4F-Komplex steht eng mit dem mTOR-Weg in Verbindung, der durch Phosphorylierung von eIF4E-BP1 zur Freisetzung von eIF4E führt [452, 453]. Dementsprechend lösen Selenit und Wasserstoffperoxid SGs durch Hypophosphorylierung von eIF4-BP1 aus, die die Bildung eines inhibitorischen Komplex aus eIF4E und eIF4E-BP1 veranlasst [302, 417]. Es lässt sich somit vermuten, dass sowohl der mTOR-Signalweg als auch die Regulation des eIF4F-Komplexes eine Rolle bei der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und somit eventuell auch gegenüber 5-FU durch Beeinflussung der SG-Bildung spielen könnte.

4.6 HSF1 ist ein negativer Regulator der Stress-granule- und P-body-Bildung bei 5-FU-Behandlung

HSF1 ist der Hauptmediator der zellulären Stressantwort und reguliert die Expression stressinduzierter Gene [66, 454]. Auf diese Weise werden vor allem Chaperone und Proteasomenkomponenten exprimiert, um fehlgefaltete Proteine zu falten oder abzubauen, außerdem aber auch Reparaturenzyme zur Beseitigung der unter verschiedenen Stressbedingungen entstehenden Schäden in RNA oder DNA [50]. Außerdem reguliert HSF1 die krebsspezifische Genexpression [72]. Dementsprechend ist in vielen Krebstypen eine erhöhte Expression von HSF1 festzustellen [454].

Darüber hinaus beeinflusst HSF1 die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika. So verstärkt die reduzierte HSF1-Expression die Autophagie, die durch Cisplatin, Carboplatin und Doxorubicin ausgelöst wird [69]. Ferner sensibilisiert eine reduzierte HSF1-Expression Zellen bei der Hyperthermochemotherapie

gegenüber Cisplatin in Kombination mit Hitzestress [71]. Cisplatin unterdrückt zudem die HSF1-vermittelte Expression stressinduzierter Gene [455]. Schließlich vermittelt HSF1 auch die Resistenz gegenüber Proteasomeninhibitoren [70]. Da diese chemotherapeutischen Substanzen die Bildung von SGs induzieren können, lässt sich in diesem Zusammenhang ein Einfluss der SG-Bildung auf die Chemoresistenz vermuten.

Aufgrund seiner prominenten Rolle bei der Stressantwort wurde untersucht, ob HSF1 auch die Bildung von SGs beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass eine Reduktion von HSF1 durch RNA-Interferenz zu vermehrter SG-Bildung führte (Abbildung 37). Außerdem war auch die Anzahl von PBs bei reduzierter Expression stark erhöht (Abbildung 38). Somit ist HSF1 ein negativer Regulator der Bildung von SGs und PBs. Interessanterweise wurden auch die Auswirkungen von 5-FU auf die Bildung von SGs und PBs durch die HSF1-Expression beeinflusst. So wurde die verstärkte Bildung von SGs und PBs durch 5-FU bei reduzierter HSF1-Expression noch weiter verstärkt (Abbildung 39). HSF1 moduliert also auch die zelluläre Antwort auf 5-FU und könnte somit von Bedeutung für die Chemoresistenz sein.

Da HSF1 bei Krebserkrankungen oft verstärkt exprimiert wird, sollten auch die Auswirkungen einer erhöhten HSF1-Expression auf die Bildung von SGs und PBs untersucht werden. Überexpressionsanalysen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da sowohl die Transfektion als auch die 5-FU-induzierte SG-Bildung nur einen Teil der Zellen betrifft und sich somit der Einfluss des überexprimierten HSF1 schlecht mit der SG-Induktion korrelieren ließe. Für solche Analysen wären stabile Zelllinien zur HSF1-Überexpression die bessere Alternative.

Eine erhöhte HSF1-Expression könnte zu verringerter Bildung von SGs und PBs führen. Durch verminderte SG-Bildung würde deren zytoprotektive Funktion verloren gehen. Dies stimmt jedoch nicht mit der Tatsache überein, dass die verstärkte HSF1-Expression mit einer schlechten Prognose bei Krebs einhergeht [68]. Es ist aber möglich, dass HSF1 Krebszellen zugleich durch die Expression von stressinduzierten Genen vor Apoptose schützt und andererseits durch Repression der SG-Bildung die Apoptose verstärkt. Dennoch könnte die Modulation der Transkription eventuell eine Möglichkeit bieten, die SG-Induktion durch 5-FU zu unterbinden und so die Chemotherapie effektiver zu machen.

HSF1 lokalisiert unter Stressbedingungen zusammen mit HSF2 in nukleären Stressbodies (nSBs), wo sie die Expression langer nicht-kodierender Sat III-Transkripte bewirken [59, 65]. Diese Transkripte rekrutieren wahrscheinlich Spleißfaktoren und

beeinflussen so auch das alternative Spleißen unter Stressbedingungen [62, 64]. Da 5-FU die Bildung von SGs unter Stressbedingungen verstärkte, wurde abschließend überprüft, ob auch die Bildung von nSBs durch 5-FU beeinflusst wird. So zeigte sich, dass 5-FU tatsächlich die Bildung von nSBs unter oxidativen Stressbedingungen verstärken konnte (Abbildung 40A). Es konnte jedoch keine *de novo*-Induktion dieser Strukturen durch 5-FU allein beobachtet werden. Hitzestress führt zu weit stärkerer nSB-Bildung verglichen mit oxidativem Stress [379]. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob auch unter Hitze die Bildung von nSBs durch 5-FU weiter verstärkt werden kann oder ob die Auswirkungen von 5-FU stressspezifisch sind.

Der Topoisomerase-II-Inhibitor Mitoxantron hingegen kann die *de novo*-Entstehung ähnlicher nukleärer Strukturen auslösen; darüber hinaus scheint auch Cisplatin solche Strukturen zu induzieren [381]. Jedoch ist nicht klar, ob es sich bei diesen Strukturen um nSBs handelt, da sie andere Spleißfaktoren wie SC35 enthalten und HSF1 nicht nachgewiesen worden ist.

Neben 5-FU verstärkten auch FUrd, FdUrd und Gemzitabin die Bildung von nSBs (Abbildung 40B). Somit können auch DNA-inkorporierende Substanzen die nSB-Bildung beeinflussen. Im Gegensatz zur SG-Induktion ist somit die verstärkte Bildung von nSBs wahrscheinlich unabhängig von einer Inkorporation von 5-FU in RNA. Es bleibt zu klären, wodurch die vermehrte Bildung von nSBs hervorgerufen wird. Eine Ursache könnte beispielsweise eine vermehrte Fehlfaltung von Proteinen sein, die wie bei anderen Stressbedingungen zur Freisetzung von HSF1 von HSPs führt.

Über die Funktion von nSBs ist wenig bekannt, da erst eine geringe Zahl von Komponenten identifiziert werden konnte. Einige Spleißregulatoren und Transkriptionsfaktoren gehören zu den Proteinen, die in nSBs lokalisieren. Deshalb wird vermutet, dass nSBs durch spezifische Sequestrierung dieser Faktoren alternatives Spleißen und eventuell auch die Transkription unter Stressbedingungen regulieren. Dementsprechend ist der Transkriptionsfaktor TonEBP (*tonicity-response enhancer-binding protein*) nur unter osmotischem Stress in nSBs vorhanden [61].

Die verstärkte Bildung von nSBs durch 5-FU könnte somit einen protektiven Mechanismus darstellen, der durch alternatives Spleißen oder veränderte Transkription zur Chemoresistenz beitragen könnte.

4.7 Zusammenspiel verschiedener 5-FU-induzierter zellulärer Stressantworten

Anhand der Befunde dieser Arbeit wurde ein Modell erstellt, das die Auswirkungen verschiedener Chemotherapeutika verdeutlicht (Abbildung 42): Zusammenfassend löste 5-FU die zelluläre Stressantwort durch *de novo* Induktion von SGs aus und verstärkte zugleich die SG-Bildung unter Stressbedingungen. Diese Auswirkungen sind wahrscheinlich abhängig von der Inkorporation von 5-FU in RNA und wurden daher auch vom 5-FU-Metabolit FUrD sowie von anderen RNA-inkorporierenden Substanzen wie Azacytidin und Thioguanin ausgelöst. Die induzierte SG-Bildung könnte der Apoptose entgegenwirken. Darüber hinaus führte 5-FU zu einer leicht vermehrten PB-Bildung sowie einer leichten Zellvergrößerung.

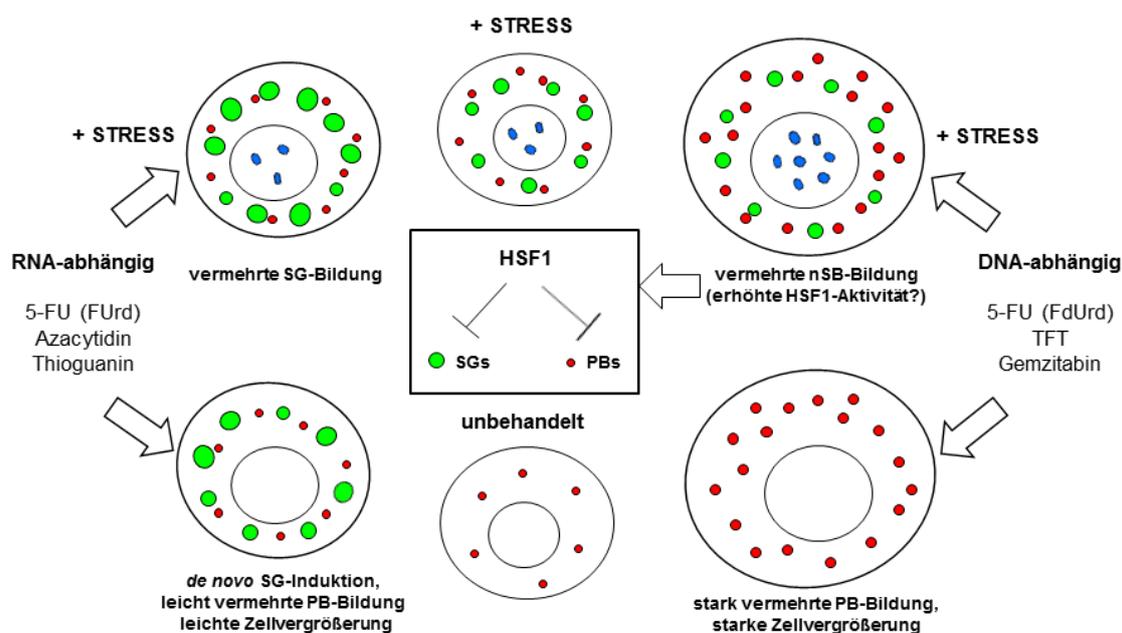


Abbildung 42: Modell der Auswirkungen chemotherapeutischer Substanzen auf verschiedene subzelluläre Strukturen. Dargestellt sind die RNA- und DNA-abhängigen Veränderungen von SGs (grün), PBs (rot) sowie nSBs (blau).

Des Weiteren verstärkte 5-FU die Bildung von nSBs unter Stressbedingungen. Diese Auswirkungen wiederum sind wahrscheinlich abhängig vom Einbau von 5-FU in DNA und wurden somit auch vom 5-FU-Metabolit FdUrD sowie von anderen DNA-inkorporierenden Substanzen wie Gemzitabin verursacht. Darüber hinaus führten diese Substanzen zu einer stark vermehrten PB-Bildung und einer starken Zellvergrößerung.

Die vermehrte nSB-Bildung könnte mit einer erhöhten Aktivität von HSF1 einhergehen, einer weiteren Stressantwort auf transkriptioneller Ebene. HSF1 ist außerdem ein negativer Regulator der SG- und PB-Bildung und beeinflusste auch die Auswirkungen von 5-FU auf SGs und PBs. Sowohl die vermehrte Bildung von nSBs als auch von PBs könnte neben der SG-Induktion einen weiteren protektiven Mechanismus darstellen. Weitergehende Untersuchungen könnten weitere Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Stressantworten durch SG-Bildung und HSF1-Aktivität sowie deren Rolle bei der Chemoresistenz aufklären.

Literaturverweise

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): 69-90.
2. Hanahan, D. und R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): 646-74.
3. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): 1521-33.
4. Gloire, G., S. Legrand-Poels, und J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): 1493-505.
5. Muller, J.M., et al., *Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1*. Eur J Biochem, 1997. **244**(1): 45-52.
6. Sherr, C.J. und F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(2): 103-12.
7. Okada, T., M. Lopez-Lago, und F.G. Giancotti, *Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane*. J Cell Biol, 2005. **171**(2): 361-71.
8. Adams, J.M. und S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): 1324-37.
9. White, E. und R.S. DiPaola, *The double-edged sword of autophagy modulation in cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): 5308-16.
10. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): 611-22.
11. Raynaud, C.M., et al., *DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer*. Am J Clin Oncol, 2010. **33**(4): 341-5.
12. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, und T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): 220-8.
13. Matsui, A., et al., *Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes*. Cancer Lett, 2000. **151**(1): 87-95.

14. Hanahan, D. und J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): 353-64.
15. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): 11715-20.
16. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, und C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): 1029-33.
17. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): 309-14.
18. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): 269-70.
19. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): 453-8.
20. Polyak, K. und R.A. Weinberg, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): 265-73.
21. Yilmaz, M. und G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): 15-33.
22. Nelson, K.K. und J.A. Melendez, *Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): 768-84.
23. Aguirre-Ghiso, J.A., *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): 834-46.
24. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, und M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): 883-99.
25. Kim, R., M. Emi, und K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. Immunology, 2007. **121**(1): 1-14.
26. Chabner, B.A. und T.G. Roberts, Jr., *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(1): 65-72.
27. Gilman, A., *The initial clinical trial of nitrogen mustard*. Am J Surg, 1963. **105**: 574-8.
28. Quiroga, A.G., *Understanding trans platinum complexes as potential antitumor drugs beyond targeting DNA*. J Inorg Biochem, 2012. **114**: 106-12.
29. Farber, S. und L.K. Diamond, *Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid*. N Engl J Med, 1948. **238**(23): 787-93.
30. Mini, E., et al., *Cellular pharmacology of gemcitabine*. Ann Oncol, 2006. **17** Suppl 5: v7-12.

31. Longley, D.B., D.P. Harkin, und P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): 330-8.
32. Shi, S., et al., *Combinational therapy: new hope for pancreatic cancer?* Cancer Lett, 2012. **317**(2): 127-35.
33. Bensch, K.G. und S.E. Malawista, *Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids*. Nature, 1968. **218**(5147): 1176-7.
34. Alagoz, M., et al., *DNA repair and resistance to topoisomerase I inhibitors: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets*. Curr Med Chem, 2012. **19**(23): 3874-85.
35. Pilati, P., D. Nitti, und S. Mocellin, *Cancer resistance to type II topoisomerase inhibitors*. Curr Med Chem, 2012. **19**(23): 3900-6.
36. Worland, P.J., et al., *Alteration of the phosphorylation state of p34cdc2 kinase by the flavone L86-8275 in breast carcinoma cells. Correlation with decreased H1 kinase activity*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(10): 1831-40.
37. Whitesell, L., et al., *Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): 8324-8.
38. Cvek, B., *Proteasome inhibitors*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **109**: 161-226.
39. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): 1031-7.
40. Kris, M.G., et al., *Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial*. JAMA, 2003. **290**(16): 2149-58.
41. Cunningham, D., et al., *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(4): 337-45.
42. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial*. Lancet, 2010. **376**(9742): 687-97.
43. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): 2335-42.
44. Ho, E.A. und M. Piquette-Miller, *Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines*. Curr Cancer Drug Targets, 2006. **6**(4): 295-311.

45. Tiligada, E., *Chemotherapy: induction of stress responses*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13 Suppl 1**: S115-24.
46. Pennington, J.D., et al., *Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy*. *Drug Resist Updat*, 2005. **8(5)**: 322-30.
47. Landriscina, M., et al., *Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11(11)**: 2701-16.
48. Orłowski, R.Z. und A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB as a therapeutic target in cancer*. *Trends Mol Med*, 2002. **8(8)**: 385-9.
49. Ciocca, D.R. und S.K. Calderwood, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. *Cell Stress Chaperones*, 2005. **10(2)**: 86-103.
50. Richter, K., M. Haslbeck, und J. Buchner, *The heat shock response: life on the verge of death*. *Mol Cell*, 2010. **40(2)**: 253-66.
51. Pellegrin, S. und H. Mellor, *Actin stress fibres*. *J Cell Sci*, 2007. **120(Pt 20)**: 3491-9.
52. Boulon, S., et al., *The nucleolus under stress*. *Mol Cell*, 2010. **40(2)**: 216-27.
53. Anckar, J. und L. Sistonen, *Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease*. *Annu Rev Biochem*, 2011. **80**: 1089-115.
54. Shamovsky, I., et al., *RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells*. *Nature*, 2006. **440(7083)**: 556-60.
55. Sandqvist, A., et al., *Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20(5)**: 1340-7.
56. Akerfelt, M., R.I. Morimoto, und L. Sistonen, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11(8)**: 545-55.
57. Mariner, P.D., et al., *Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock*. *Mol Cell*, 2008. **29(4)**: 499-509.
58. Jolly, C., et al., *In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress*. *J Cell Biol*, 2002. **156(5)**: 775-81.
59. Jolly, C., et al., *Stress-induced transcription of satellite III repeats*. *J Cell Biol*, 2004. **164(1)**: 25-33.

60. Rizzi, N., et al., *Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): 543-51.
61. Valgardsdottir, R., et al., *Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): 423-34.
62. Denegri, M., et al., *Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): 3502-14.
63. Jolly, C., et al., *Intron-independent association of splicing factors with active genes*. J Cell Biol, 1999. **145**(6): 1133-43.
64. Biamonti, G., *Nuclear stress bodies: a heterochromatin affair?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): 493-8.
65. Biamonti, G. und C. Vourc'h, *Nuclear stress bodies*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): a000695.
66. Dai, C., et al., *Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis*. Cell, 2007. **130**(6): 1005-18.
67. Meng, L., V.L. Gabai, und M.Y. Sherman, *Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis*. Oncogene, 2010. **29**(37): 5204-13.
68. Santagata, S., et al., *High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): 18378-83.
69. Desai, S., et al., *Heat Shock Factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of Autophagy -related Protein 7 (ATG7)*. J Biol Chem, 2013.
70. Lecomte, S., et al., *Roles of heat shock factor 1 and 2 in response to proteasome inhibition: consequence on p53 stability*. Oncogene, 2010. **29**(29): 4216-24.
71. Rossi, A., et al., *Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(15): 7678-85.
72. Mendillo, M.L., et al., *HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers*. Cell, 2012. **150**(3): 549-62.
73. Hoang, A.T., et al., *A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): 857-64.

74. Wang, Y., et al., *Expression of a dominant negative heat shock factor-1 construct inhibits aneuploidy in prostate carcinoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): 32651-9.
75. Calderwood, S.K., et al., *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(3): 164-72.
76. Pratt, W.B. und D.O. Toft, *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(2): 111-33.
77. Neckers, L. und S.P. Ivy, *Heat shock protein 90*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(6): 419-24.
78. Nimmanapalli, R., E. O'Bryan, und K. Bhalla, *Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts*. Cancer Res, 2001. **61**(5): 1799-804.
79. Lane, D.P., C. Midgley, und T. Hupp, *Tumour suppressor genes and molecular chaperones*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1993. **339**(1289): 369-72; discussion 372-3.
80. Pinhasi-Kimhi, O., et al., *Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins*. Nature, 1986. **320**(6058): 182-4.
81. Beere, H.M., *Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins*. Sci STKE, 2001. **2001**(93): re1.
82. Hsu, A.L., C.T. Murphy, und C. Kenyon, *Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor*. Science, 2003. **300**(5622): 1142-5.
83. Workman, P., *Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone*. Trends Mol Med, 2004. **10**(2): 47-51.
84. Zhou, J., et al., *PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): 13506-13.
85. Sun, J. und J.K. Liao, *Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): 2238-44.
86. Eustace, B.K. und D.G. Jay, *Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90*. Cell Cycle, 2004. **3**(9): 1098-100.
87. Asea, A., et al., *HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine*. Nat Med, 2000. **6**(4): 435-42.

88. Calderwood, S.K., J.R. Theriault, und J. Gong, *Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity*. Eur J Immunol, 2005. **35**(9): 2518-27.
89. Nover, L., K.D. Scharf, und D. Neumann, *Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(9): 1648-55.
90. Thomas, M.G., et al., *RNA granules: the good, the bad and the ugly*. Cell Signal, 2011. **23**(2): 324-34.
91. Holcik, M. und N. Sonenberg, *Translational control in stress and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): 318-27.
92. Anderson, P. und N. Kedersha, *Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation*. Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(2): 213-21.
93. Takekawa, M., et al., *Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions*. Nagoya J Med Sci, 2011. **73**(1-2): 1-14.
94. Donnelly, N., et al., *The eIF2alpha kinases: their structures and functions*. Cell Mol Life Sci, 2013.
95. Wek, R.C., H.Y. Jiang, und T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): 7-11.
96. Lu, L., A.P. Han, und J.J. Chen, *Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): 7971-80.
97. Chen, J.J., *Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias*. Blood, 2007. **109**(7): 2693-9.
98. Barber, G.N., *The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12**(6): 563-70.
99. Kaufman, R.J., *Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(3): 152-8.
100. Dong, J., et al., *Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain*. Mol Cell, 2000. **6**(2): 269-79.
101. Anderson, P. und N. Kedersha, *Stress granules: the Tao of RNA triage*. Trends Biochem Sci, 2008. **33**(3): 141-50.
102. Xie, W. und R.B. Denman, *Protein methylation and stress granules: posttranslational remodeler or innocent bystander?* Mol Biol Int, 2011. **2011**: 137459.

103. Ohn, T. und P. Anderson, *The role of posttranslational modifications in the assembly of stress granules*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010. **1**(3): 486-93.
104. Nover, L., K.D. Scharf, und D. Neumann, *Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(3): 1298-308.
105. Buchan, J.R. und R. Parker, *Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation*. Mol Cell, 2009. **36**(6): 932-41.
106. Rubtsova, M.P., et al., *Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): 22350-6.
107. Robert, F., et al., *Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2.GTP.Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(11): 4632-44.
108. Silvera, D., S.C. Formenti, und R.J. Schneider, *Translational control in cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): 254-66.
109. Terenin, I.M., et al., *A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(3): 1807-16.
110. Mazroui, R., et al., *Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(10): 4212-9.
111. Dang, Y., et al., *Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): 32870-8.
112. Mokas, S., et al., *Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(11): 2673-83.
113. Kulkarni, M., S. Ozgur, und G. Stoecklin, *On track with P-bodies*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): 242-51.
114. Decker, C.J., D. Teixeira, und R. Parker, *Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2007. **179**(3): 437-49.
115. Stoecklin, G. und N. Kedersha, *Relationship of GW/P-bodies with stress granules*. Adv Exp Med Biol, 2013. **768**: 197-211.
116. Zheng, D., et al., *Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells*. J Cell Biol, 2008. **182**(1): 89-101.
117. Tharun, S., et al., *Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay*. Nature, 2000. **404**(6777): 515-8.

118. Franks, T.M. und J. Lykke-Andersen, *The control of mRNA decapping and P-body formation*. Mol Cell, 2008. **32**(5): 605-15.
119. Schaeffer, D., et al., *Functions of the cytoplasmic exosome*. Adv Exp Med Biol, 2010. **702**: 79-90.
120. Lykke-Andersen, S., et al., *The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits*. RNA Biol, 2011. **8**(1): 61-6.
121. Muhlrads, D., C.J. Decker, und R. Parker, *Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-->3' digestion of the transcript*. Genes Dev, 1994. **8**(7): 855-66.
122. van Dijk, E., et al., *Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures*. EMBO J, 2002. **21**(24): 6915-24.
123. Dunckley, T. und R. Parker, *The DCP2 protein is required for mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae and contains a functional MutT motif*. EMBO J, 1999. **18**(19): 5411-22.
124. Fenger-Gron, M., et al., *Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping*. Mol Cell, 2005. **20**(6): 905-15.
125. Coller, J. und R. Parker, *General translational repression by activators of mRNA decapping*. Cell, 2005. **122**(6): 875-86.
126. Bashkirov, V.I., et al., *A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates*. J Cell Biol, 1997. **136**(4): 761-73.
127. Eulalio, A., et al., *P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): 3970-81.
128. Kedersha, N., et al., *Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling*. J Cell Biol, 2005. **169**(6): 871-84.
129. Brengues, M., D. Teixeira, und R. Parker, *Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies*. Science, 2005. **310**(5747): 486-9.
130. Ferraiuolo, M.A., et al., *A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay*. J Cell Biol, 2005. **170**(6): 913-24.
131. Kedersha, N., et al., *Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(1): 195-210.
132. Kedersha, N. und P. Anderson, *Regulation of translation by stress granules and processing bodies*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2009. **90**: 155-85.

133. Kimball, S.R., et al., *Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): C273-84.
134. Low, W.K., et al., *Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A*. Mol Cell, 2005. **20**(5): 709-22.
135. Suzuki, Y., et al., *The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G*. J Biol Chem, 2009. **284**(51): 35597-604.
136. Li, C.H., et al., *eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly*. PLoS One, 2010. **5**(4): e9942.
137. Wilczynska, A., et al., *The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): 981-92.
138. Katahira, J., et al., *Nuclear RNA export factor 7 is localized in processing bodies and neuronal RNA granules through interactions with shuttling hnRNPs*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): 616-28.
139. Buchet-Poyau, K., et al., *Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(4): 1289-300.
140. Saga, Y., *Function of Nanos2 in the male germ cell lineage in mice*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(22): 3815-22.
141. Fujimura, K., F. Kano, und M. Murata, *Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies*. RNA, 2008. **14**(3): 425-31.
142. Fujimura, K., et al., *Selective localization of PCBP2 to cytoplasmic processing bodies*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(5): 878-87.
143. Yang, W.H., et al., *RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules*. RNA, 2006. **12**(4): 547-54.
144. Nonhoff, U., et al., *Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): 1385-96.
145. Kaehler, C., et al., *Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies*. PLoS One, 2012. **7**(11): e50134.
146. Fujimura, K., F. Kano, und M. Murata, *Dual localization of the RNA binding protein CUGBP-1 to stress granule and perinucleolar compartment*. Exp Cell Res, 2008. **314**(3): 543-53.

147. De Leeuw, F., et al., *The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(20): 4130-44.
148. Hou, H., et al., *Structure-functional analyses of CRHSP-24 plasticity and dynamics in oxidative stress response*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(11): 9623-35.
149. Ibrahim, H., Y.J. Lee, und N.P. Curthoys, *Renal response to metabolic acidosis: role of mRNA stabilization*. *Kidney Int*, 2008. **73**(1): 11-8.
150. Kim, J.E., et al., *Proline-rich transcript in brain protein induces stress granule formation*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(2): 803-13.
151. Kim, B., H.J. Cooke, und K. Rhee, *DAZL is essential for stress granule formation implicated in germ cell survival upon heat stress*. *Development*, 2012. **139**(3): 568-78.
152. David Gerecht, P.S., M.A. Taylor, und J.D. Port, *Intracellular localization and interaction of mRNA binding proteins as detected by FRET*. *BMC Cell Biol*, 2010. **11**: 69.
153. Mazroui, R., et al., *Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(24): 3007-17.
154. Tourriere, H., et al., *The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(6): 823-31.
155. Guil, S., J.C. Long, und J.F. Caceres, *hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(15): 5744-58.
156. McDonald, K.K., et al., *TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(7): 1400-10.
157. Fukuda, T., et al., *hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions*. *Genes Cells*, 2009. **14**(2): 113-28.
158. Quaresma, A.J., et al., *Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(6): 968-80.
159. Burry, R.W. und C.L. Smith, *HuD distribution changes in response to heat shock but not neurotrophic stimulation*. *J Histochem Cytochem*, 2006. **54**(10): 1129-38.

160. Gallouzi, I.E., et al., *HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): 3073-8.
161. Kobayashi, T., et al., *PKCalpha binds G3BP2 and regulates stress granule formation following cellular stress*. PLoS One, 2012. **7**(4): e35820.
162. Schaffler, K., et al., *A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation*. RNA, 2010. **16**(8): 1488-99.
163. Balzer, E. und E.G. Moss, *Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules*. RNA Biol, 2007. **4**(1): 16-25.
164. Kawahara, H., et al., *Neural RNA-binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP*. J Cell Biol, 2008. **181**(4): 639-53.
165. Yamaji, M., et al., *Functional reconstruction of NANOS3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of NANOS3*. Reproduction, 2010. **139**(2): 381-93.
166. Kedersha, N.L., et al., *RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): 1431-42.
167. Burgess, H.M., et al., *Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 19): 3344-55.
168. Morris, A.R., N. Mukherjee, und J.D. Keene, *Ribonomic analysis of human Pum1 reveals cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): 4093-103.
169. Vessey, J.P., et al., *Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules*. J Neurosci, 2006. **26**(24): 6496-508.
170. Wang, Y., et al., *The QKI-6 RNA binding protein localizes with the MBP mRNAs in stress granules of glial cells*. PLoS One, 2010. **5**(9).
171. Goodier, J.L., et al., *LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(18): 6469-83.
172. Goulet, I., et al., *TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(19): 3055-74.
173. Baez, M.V. und G.L. Boccaccio, *Mammalian Smaug is a translational repressor that forms cytoplasmic foci similar to stress granules*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): 43131-40.

174. Thomas, M.G., et al., *Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): 405-20.
175. Murata, T., et al., *Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain*. Exp Cell Res, 2005. **303**(2): 287-99.
176. Stoecklin, G., et al., *MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay*. EMBO J, 2004. **23**(6): 1313-24.
177. Stohr, N., et al., *ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress*. J Cell Biol, 2006. **175**(4): 527-34.
178. Okada, N., et al., *A novel Chk1/2-Lats2-14-3-3 signaling pathway regulates P-body formation in response to UV damage*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 1): 57-67.
179. James, V., et al., *LIM-domain proteins, LIMD1, Ajuba, and WTIP are required for microRNA-mediated gene silencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(28): 12499-504.
180. Wasserman, T., et al., *A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(1): 117-30.
181. Kolobova, E., et al., *Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules*. Exp Cell Res, 2009. **315**(3): 542-55.
182. Decca, M.B., et al., *Post-translational arginylation of calreticulin: a new isospecies of calreticulin component of stress granules*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): 8237-45.
183. Taniuchi, K., I. Nishimori, und M.A. Hollingsworth, *Intracellular CD24 inhibits cell invasion by posttranscriptional regulation of BART through interaction with G3BP*. Cancer Res, 2011. **71**(3): 895-905.
184. Leung, A.K., J.M. Calabrese, und P.A. Sharp, *Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): 18125-30.
185. Sabile, A.A., et al., *Caprin-1, a novel Cyr61-interacting protein, promotes osteosarcoma tumor growth and lung metastasis in mice*. Biochim Biophys Acta, 2013.
186. Ogawa, F., M. Kasai, und T. Akiyama, *A functional link between Disrupted-In-Schizophrenia 1 and the eukaryotic translation initiation factor 3*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(2): 771-6.

187. Wippich, F., et al., *Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling*. Cell, 2013. **152**(4): 791-805.
188. Sukarieh, R., N. Sonenberg, und J. Pelletier, *The eIF4E-binding proteins are modifiers of cytoplasmic eIF4E relocalization during the heat shock response*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(5): C1207-17.
189. Tsai, N.P., P.C. Ho, und L.N. Wei, *Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway*. EMBO J, 2008. **27**(5): 715-26.
190. Ash, M.R., et al., *Conserved beta-hairpin recognition by the GYF domains of Smy2 and GIGYF2 in mRNA surveillance and vesicular transport complexes*. Structure, 2010. **18**(8): 944-54.
191. Wehner, K.A., S. Schutz, und P. Sarnow, *OGFOD1, a novel modulator of eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation and the cellular response to stress*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(8): 2006-16.
192. Brehm, M.A., et al., *Intracellular localization of human Ins(1,3,4,5,6)P5 2-kinase*. Biochem J, 2007. **408**(3): 335-45.
193. Cohen-Katsenelson, K., et al., *Identification and analysis of a novel dimerization domain shared by various members of c-Jun N-terminal kinase (JNK) scaffold proteins*. J Biol Chem, 2013. **288**(10): 7294-304.
194. Langereis, M.A., Q. Feng, und F.J. van Kuppeveld, *MDA5 Localizes to Stress Granules, but This Localization Is Not Required for the Induction of Type I Interferon*. J Virol, 2013. **87**(11): 6314-25.
195. Pare, J.M., et al., *Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(14): 3273-84.
196. Leung, A., et al., *Poly(ADP-ribose) regulates post-transcriptional gene regulation in the cytoplasm*. RNA Biol, 2012. **9**(5): 542-8.
197. Arimoto, K., et al., *Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): 1324-32.
198. Tsai, N.P. und L.N. Wei, *RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granule formation and apoptosis*. Cell Signal, 2010. **22**(4): 668-75.
199. Eisinger-Mathason, T.S., et al., *Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival*. Mol Cell, 2008. **31**(5): 722-36.
200. Brown, J.A., et al., *A novel role for hSMG-1 in stress granule formation*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(22): 4417-29.

201. Hinton, S.D., et al., *The pseudophosphatase MK-STYX interacts with G3BP and decreases stress granule formation*. *Biochem J*, 2010. **427**(3): 349-57.
202. Gallois-Montbrun, S., et al., *Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules*. *J Virol*, 2007. **81**(5): 2165-78.
203. Solomon, S., et al., *Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(6): 2324-42.
204. Rojas, M., et al., *Yeast Gis2 and its human ortholog CNBP are novel components of stress-induced RNP granules*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): e52824.
205. Andersson, M.K., et al., *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response*. *BMC Cell Biol*, 2008. **9**: 37.
206. Kwon, S., Y. Zhang, und P. Matthias, *The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response*. *Genes Dev*, 2007. **21**(24): 3381-94.
207. Goncalves Kde, A., et al., *Evidence for the association of the human regulatory protein Ki-1/57 with the translational machinery*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(16): 2556-60.
208. Kunde, S.A., et al., *The X-chromosome-linked intellectual disability protein PQBP1 is a component of neuronal RNA granules and regulates the appearance of stress granules*. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(24): 4916-31.
209. Ohn, T., et al., *A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(10): 1224-31.
210. Yu, C., et al., *An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response*. *Mol Cell*, 2007. **25**(5): 765-78.
211. Linder, B., et al., *Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(20): 3236-46.
212. Weissbach, R. und A.D. Scadden, *Tudor-SN and ADAR1 are components of cytoplasmic stress granules*. *RNA*, 2012. **18**(3): 462-71.
213. Gao, X., et al., *Tudor-SN interacts with and co-localizes with G3BP in stress granules under stress conditions*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(16): 3525-32.

214. Liu, J., et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): 719-23.
215. Sen, G.L. und H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): 633-6.
216. Ingelfinger, D., et al., *The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci*. RNA, 2002. **8**(12): 1489-501.
217. Eystathiou, T., et al., *The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSM4 in cytoplasmic GW bodies*. RNA, 2003. **9**(10): 1171-3.
218. Meister, G., et al., *Identification of novel argonaute-associated proteins*. Curr Biol, 2005. **15**(23): 2149-55.
219. Scadden, A.D., *Inosine-containing dsRNA binds a stress-granule-like complex and downregulates gene expression in trans*. Mol Cell, 2007. **28**(3): 491-500.
220. Cho, H., K.M. Kim, und Y.K. Kim, *Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex*. Mol Cell, 2009. **33**(1): 75-86.
221. Unterholzner, L. und E. Izaurralde, *SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay*. Mol Cell, 2004. **16**(4): 587-96.
222. Durand, S., et al., *Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies*. J Cell Biol, 2007. **178**(7): 1145-60.
223. Onishi, H., et al., *MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules*. J Neurosci Res, 2008. **86**(9): 1994-2002.
224. Lai, M.C., Y.H. Lee, und W.Y. Tarn, *The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(9): 3847-58.
225. Chalupnikova, K., et al., *Recruitment of the RNA helicase RHAU to stress granules via a unique RNA-binding domain*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): 35186-98.
226. Thiagarajan, D., R.R. Dev, und S. Khosla, *The DNA methyltransferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress*. Epigenetics, 2011. **6**(1): 103-13.

-
227. Goodier, J.L., L.E. Cheung, und H.H. Kazazian, Jr., *MOV10 RNA helicase is a potent inhibitor of retrotransposition in cells*. PLoS Genet, 2012. **8**(10): e1002941.
228. Yang, F., et al., *Polysome-bound endonuclease PMR1 is targeted to stress granules via stress-specific binding to TIA-1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(23): 8803-13.
229. Hua, Y. und J. Zhou, *Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(1): 268-76.
230. Zhu, C.H., et al., *SGNP: an essential Stress Granule/Nucleolar Protein potentially involved in 5.8s rRNA processing/transport*. PLoS One, 2008. **3**(11): e3716.
231. Yang, W.H. und D.B. Bloch, *Probing the mRNA processing body using protein microarrays and "autoantigenomics"*. RNA, 2007. **13**(5): 704-12.
232. Baguet, A., et al., *The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 16): 2774-84.
233. Lin, J.C., M. Hsu, und W.Y. Tarn, *Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): 2235-40.
234. Welzel, F., et al., *FOX-2 dependent splicing of ataxin-2 transcript is affected by ataxin-1 overexpression*. PLoS One, 2012. **7**(5): e37985.
235. Henao-Mejia, J. und J.J. He, *Sam68 relocalization into stress granules in response to oxidative stress through complexing with TIA-1*. Exp Cell Res, 2009. **315**(19): 3381-95.
236. Hua, Y. und J. Zhou, *Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules*. FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): 69-74.
237. Delestienne, N., et al., *The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression*. FEBS J, 2010. **277**(11): 2496-514.
238. Yoon, S.P., et al., *Regulation of cellular RNA nano-particle assembly by splicing factor SRp20*. J Nanosci Nanotechnol, 2013. **13**(1): 184-7.
239. Moisse, K., et al., *Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury*. Brain Res, 2009. **1249**: 202-11.

240. Colombrita, C., et al., *TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult*. J Neurochem, 2009. **111**(4): 1051-61.
241. Dewey, C.M., et al., *TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(5): 1098-108.
242. Chang, W.L. und W.Y. Tarn, *A role for transportin in deposition of TTP to cytoplasmic RNA granules and mRNA decay*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(19): 6600-12.
243. Weinmann, L., et al., *Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs*. Cell, 2009. **136**(3): 496-507.
244. Loschi, M., et al., *Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 21): 3973-82.
245. Fujimura, K., et al., *Identification of importin alpha1 as a novel constituent of RNA stress granules*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(7): 865-71.
246. Hey, F., et al., *DEF6, a novel substrate for the Tec kinase ITK, contains a glutamine-rich aggregation-prone region and forms cytoplasmic granules that co-localize with P-bodies*. J Biol Chem, 2012. **287**(37): 31073-84.
247. Grzybowska, E.A., et al., *HAX-1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein with a possible role in mRNA processing*. FEBS J, 2013. **280**(1): 256-72.
248. Savas, J.N., et al., *Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): 10820-5.
249. Ezzeddine, N., et al., *Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(22): 7791-801.
250. Yamochi, T., et al., *SSA/Ro52 autoantigen interacts with Dcp2 to enhance its decapping activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(1): 195-9.
251. Rybak, A., et al., *The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): 1411-20.
252. Hu, J., et al., *Mouse ZAR1-like (XM_359149) colocalizes with mRNA processing components and its dominant-negative mutant caused two-cell-stage embryonic arrest*. Dev Dyn, 2010. **239**(2): 407-24.
253. Ratovitski, T., et al., *Huntingtin protein interactions altered by polyglutamine expansion as determined by quantitative proteomic analysis*. Cell Cycle, 2012. **11**(10): 2006-21.

254. Bravard, A., et al., *Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): 7430-6.
255. Hofmann, I., et al., *Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(3): 1388-98.
256. Onomoto, K., et al., *Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity*. PLoS One, 2012. **7**(8): e43031.
257. Athanasopoulos, V., et al., *The ROQUIN family of proteins localizes to stress granules via the ROQ domain and binds target mRNAs*. FEBS J, 2010. **277**(9): 2109-27.
258. Woldemichael, G.M., et al., *Lack of a functional VHL gene product sensitizes renal cell carcinoma cells to the apoptotic effects of the protein synthesis inhibitor verrucarin A*. Neoplasia, 2012. **14**(8): 771-7.
259. Deigendesch, N., F. Koch-Nolte, und S. Rothenburg, *ZBP1 subcellular localization and association with stress granules is controlled by its Z-DNA binding domains*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(18): 5007-20.
260. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, und E. Izaurralde, *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): 9-22.
261. Kervestin, S. und A. Jacobson, *NMD: a multifaceted response to premature translational termination*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(11): 700-12.
262. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes Dev, 2006. **20**(14): 1885-98.
263. Eulalio, A., F. Tritschler, und E. Izaurralde, *The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing*. RNA, 2009. **15**(8): 1433-42.
264. Dormann, D. und C. Haass, *TDP-43 and FUS: a nuclear affair*. Trends Neurosci, 2011.
265. Kim, H.J., et al., *Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS*. Nature, 2013. **495**(7442): 467-73.
266. Elden, A.C., et al., *Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS*. Nature, 2010. **466**(7310): 1069-75.
267. Wolozin, B., *Regulated protein aggregation: stress granules and neurodegeneration*. Mol Neurodegener, 2012. **7**: 56.

268. Rossoll, W., et al., *Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): 801-12.
269. Pellizzoni, L., B. Charroux, und G. Dreyfuss, *SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): 11167-72.
270. Weiler, I.J., et al., *Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(50): 17504-9.
271. De Rubeis, S. und C. Bagni, *Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability*. Mol Cell Neurosci, 2010. **43**(1): 43-50.
272. Didiot, M.C., et al., *Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): 428-37.
273. Spencer, C.M., et al., *Exaggerated behavioral phenotypes in Fmr1/Fxr2 double knockout mice reveal a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(12): 1984-94.
274. Vanderweyde, T., et al., *Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies*. J Neurosci, 2012. **32**(24): 8270-83.
275. Castellani, R.J., et al., *A novel origin for granulovacuolar degeneration in aging and Alzheimer's disease: parallels to stress granules*. Lab Invest, 2011. **91**(12): 1777-86.
276. Goggin, K., et al., *Prion protein aggregates are poly(A)+ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(3): 479-91.
277. Moreno, J.A., et al., *Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration*. Nature, 2012. **485**(7399): 507-11.
278. White, J.P. und R.E. Lloyd, *Regulation of stress granules in virus systems*. Trends Microbiol, 2012. **20**(4): 175-83.
279. Emara, M.M. und M.A. Brinton, *Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): 9041-6.
280. Baird, N.L., J. York, und J.H. Nunberg, *Arenavirus infection induces discrete cytosolic structures for RNA replication*. J Virol, 2012. **86**(20): 11301-10.

281. Fros, J.J., et al., *Chikungunya virus nsP3 blocks stress granule assembly by recruitment of G3BP into cytoplasmic foci*. J Virol, 2012. **86**(19): 10873-9.
282. Mok, B.W., et al., *The NS1 protein of influenza A virus interacts with cellular processing bodies and stress granules through RNA-associated protein 55 (RAP55) during virus infection*. J Virol, 2012. **86**(23): 12695-707.
283. Khapersky, D.A., T.F. Hatchette, und C. McCormick, *Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation*. FASEB J, 2012. **26**(4): 1629-39.
284. White, J.P., et al., *Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): 295-305.
285. Dougherty, J.D., J.P. White, und R.E. Lloyd, *Poliovirus-mediated disruption of cytoplasmic processing bodies*. J Virol, 2011. **85**(1): 64-75.
286. Ariumi, Y., et al., *Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets*. J Virol, 2011. **85**(14): 6882-92.
287. Lindquist, M.E., et al., *Respiratory syncytial virus induces host RNA stress granules to facilitate viral replication*. J Virol, 2010. **84**(23): 12274-84.
288. Raaben, M., et al., *Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies*. Cell Microbiol, 2007. **9**(9): 2218-29.
289. Sola, I., et al., *The polypyrimidine tract-binding protein affects coronavirus RNA accumulation levels and relocalizes viral RNAs to novel cytoplasmic domains different from replication-transcription sites*. J Virol, 2011. **85**(10): 5136-49.
290. Simpson-Holley, M., et al., *Formation of antiviral cytoplasmic granules during orthopoxvirus infection*. J Virol, 2011. **85**(4): 1581-93.
291. Katsafanas, G.C. und B. Moss, *Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(4): 221-8.
292. Scadden, A.D., *The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(6): 489-96.
293. Wedekind, J.E., et al., *Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business*. Trends Genet, 2003. **19**(4): 207-16.
294. Kozak, S.L., et al., *The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): 29105-19.

295. White, J.P. und R.E. Lloyd, *Poliovirus unlinks TIA1 aggregation and mRNA stress granule formation*. J Virol, 2011. **85**(23): 12442-54.
296. Fournier, M.J., C. Gareau, und R. Mazroui, *The chemotherapeutic agent bortezomib induces the formation of stress granules*. Cancer Cell Int, 2010. **10**: 12.
297. Gareau, C., et al., *p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis*. PLoS One, 2011. **6**(5): e20254.
298. Martins, I., et al., *Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress*. Oncogene, 2011. **30**(10): 1147-58.
299. Cencic, R., et al., *Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[b]benzofuran, silvestrol*. PLoS One, 2009. **4**(4): e5223.
300. Kalra, J., et al., *Suppression of Her2/neu expression through ILK inhibition is regulated by a pathway involving TWIST and YB-1*. Oncogene, 2010. **29**(48): 6343-56.
301. Mason, T.A., et al., *Darinaparsin is a multivalent chemotherapeutic which induces incomplete stress response with disruption of microtubules and Shh signaling*. PLoS One, 2011. **6**(11): e27699.
302. Fujimura, K., A.T. Sasaki, und P. Anderson, *Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(16): 8099-110.
303. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): 1417-23.
304. Stone, K.R., et al., *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*. Int J Cancer, 1978. **21**(3): 274-81.
305. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): 59-74.
306. Scherer, W.F., J.T. Syverton, und G.O. Gey, *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. J Exp Med, 1953. **97**(5): 695-710.
307. Knowles, B.B., C.C. Howe, und D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**(4455): 497-9.

308. Pulukuri, S.M., et al., *RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): 36529-40.
309. Bello, D., et al., *Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18*. Carcinogenesis, 1997. **18**(6): 1215-23.
310. Hayflick, L. und P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: 585-621.
311. Buchan, J.R., D. Muhlrad, und R. Parker, *P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): 441-55.
312. Spurr, A.R., *A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy*. J Ultrastruct Res, 1969. **26**(1): 31-43.
313. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: 248-54.
314. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): 680-5.
315. Meyer, T.S. und B.L. Lamberts, *Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips*. Biochim Biophys Acta, 1965. **107**(1): 144-5.
316. Renart, J., J. Reiser, und G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzylomethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): 3116-20.
317. Towbin, H., T. Staehelin, und J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): 4350-4.
318. Matuo, R., et al., *Saccharomyces cerevisiae as a model system to study the response to anticancer agents*. Cancer Chemother Pharmacol, 2012. **70**(4): 491-502.
319. Lum, P.Y., et al., *Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes*. Cell, 2004. **116**(1): 121-37.
320. Giaever, G., et al., *Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): 793-8.

321. Gustavsson, M. und H. Ronne, *Evidence that tRNA modifying enzymes are important in vivo targets for 5-fluorouracil in yeast*. RNA, 2008. **14**(4): 666-74.
322. Huang, R.Y., et al., *Genome-wide screen identifies genes whose inactivation confer resistance to cisplatin in Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res, 2005. **65**(13): 5890-7.
323. Tkach, J.M., et al., *Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(9): 966-76.
324. Kucsera, J., K. Yarita, und K. Takeo, *Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies*. J Microbiol Methods, 2000. **41**(1): 19-21.
325. Ralser, M., et al., *An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2*. J Mol Biol, 2005. **346**(1): 203-14.
326. Trigueros-Motos, L., et al., *Aquaporin 3 (AQP3) participates in the cytotoxic response to nucleoside-derived drugs*. BMC Cancer, 2012. **12**: 434.
327. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): 16-23.
328. Aizer, A., et al., *The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): 4154-66.
329. Nadezhdina, E.S., et al., *Microtubules govern stress granule mobility and dynamics*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(3): 361-71.
330. Chernov, K.G., et al., *Role of microtubules in stress granule assembly: microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): 36569-80.
331. Blumenthal, J., et al., *Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress*. FEBS Lett, 2009. **583**(1): 197-201.
332. Rzczkowski, K., et al., *c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies*. J Cell Biol, 2011. **194**(4): 581-96.
333. Garcia, M.A., et al., *The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**(8): e23887.
334. Kedersha, N., et al., *Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): 1257-68.
335. Uchibori, K., et al., *Establishment and characterization of two 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell lines*. Int J Oncol, 2012. **40**(4): 1005-10.

-
336. Gu, W., et al., *Characterization and resistance mechanisms of a 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell line*. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(9): 4807-14.
337. Chung, Y.M., et al., *Establishment and characterization of 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells*. Cancer Lett, 2000. **159**(1): 95-101.
338. Huang, L., et al., *Mitochondria associate with P-bodies and modulate microRNA-mediated RNA interference*. J Biol Chem, 2011. **286**(27): 24219-30.
339. Ernout-Lange, M., et al., *P-bodies and mitochondria: which place in RNA interference?* Biochimie, 2012. **94**(7): 1572-7.
340. Souquere, S., et al., *Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): 3619-26.
341. Cougot, N., et al., *The dual organization of P-bodies revealed by immunoelectron microscopy and electron tomography*. J Mol Biol, 2012. **420**(1-2): 17-28.
342. Ross, C.A. und M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: S10-7.
343. Alves-Rodrigues, A., L. Gregori, und M.E. Figueiredo-Pereira, *Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration*. Trends Neurosci, 1998. **21**(12): 516-20.
344. Naiki, H. und Y. Nagai, *Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins*. J Biochem, 2009. **146**(6): 751-6.
345. Dewey, C.M., et al., *TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key?* Brain Res, 2012. **1462**: 16-25.
346. Bentmann, E., C. Haass, und D. Dormann, *Stress Granules in Neurodegeneration - Lessons learnt from TDP-43 and FUS*. FEBS J, 2013.
347. An, Q., et al., *5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity*. Cancer Res, 2007. **67**(3): 940-5.
348. Carrico, C.K. und R.I. Glazer, *Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver*. Cancer Res, 1979. **39**(9): 3694-701.
349. Doong, S.L. und B.J. Dolnick, *5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro*. J Biol Chem, 1988. **263**(9): 4467-73.
350. Samuelsson, T., *Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(22): 6139-44.

351. van Laar, J.A., et al., *Comparison of 5-fluoro-2'-deoxyuridine with 5-fluorouracil and their role in the treatment of colorectal cancer*. Eur J Cancer, 1998. **34**(3): 296-306.
352. Pettersen, H.S., et al., *UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(19): 8430-44.
353. Hoskins, J. und J. Scott Butler, *Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2007. **24**(10): 861-70.
354. Mader, R.M., et al., *Transcription and activity of 5-fluorouracil converting enzymes in fluoropyrimidine resistance in colon cancer in vitro*. Biochem Pharmacol, 1997. **54**(11): 1233-42.
355. Hwang, I.T., et al., *Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(2): 304-10.
356. Pan, X., et al., *Autophagy Inhibition Promotes 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis by Stimulating ROS Formation in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells*. PLoS One, 2013. **8**(2): e56679.
357. Shi, H., X. Shi, und K.J. Liu, *Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis*. Mol Cell Biochem, 2004. **255**(1-2): 67-78.
358. Pritchard, D.M., et al., *Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): 1795-9.
359. Myers, L.C., et al., *The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain*. Genes Dev, 1998. **12**(1): 45-54.
360. Brody, J.R., et al., *Limits to thymidylate synthase and TP53 genes as predictive determinants for fluoropyrimidine sensitivity and further evidence for RNA-based toxicity as a major influence*. Cancer Res, 2009. **69**(3): 984-91.
361. Ewald, B., D. Sampath, und W. Plunkett, *Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death*. Oncogene, 2008. **27**(50): 6522-37.
362. Li, L.H., et al., *Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia*. Cancer Res, 1970. **30**(11): 2760-9.
363. Lepage, G.A., *Incorporation of 6-thioguanine into nucleic acids*. Cancer Res, 1960. **20**: 403-8.
364. Fujiwara, Y. und C. Heidelberger, *Fluorinated pyrimidines. 38. The incorporation of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine into the deoxyribonucleic acid of vaccinia virus*. Mol Pharmacol, 1970. **6**(3): 281-91.

365. Gandhi, V. und W. Plunkett, *Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides*. Cancer Res, 1990. **50**(12): 3675-80.
366. Huang, P., et al., *Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis*. Cancer Res, 1991. **51**(22): 6110-7.
367. Gandhi, V., et al., *Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA*. Cancer Res, 1996. **56**(19): 4453-9.
368. Ruiz van Haperen, V.W., et al., *2',2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(4): 762-6.
369. Pourquier, P., et al., *Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(8): 2499-504.
370. Heinemann, V., et al., *Gemcitabine: a modulator of intracellular nucleotide and deoxynucleotide metabolism*. Semin Oncol, 1995. **22**(4 Suppl 11): 11-8.
371. Heinemann, V., et al., *Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential*. Cancer Res, 1992. **52**(3): 533-9.
372. Heinemann, V., et al., *Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine*. Mol Pharmacol, 1990. **38**(4): 567-72.
373. Bakkenist, C.J. und M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): 499-506.
374. Krakoff, I.H., N.C. Brown, und P. Reichard, *Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea*. Cancer Res, 1968. **28**(8): 1559-65.
375. Selenius, M., et al., *Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(7): 867-80.
376. Thant, A.A., et al., *Role of caspases in 5-FU and selenium-induced growth inhibition of colorectal cancer cells*. Anticancer Res, 2008. **28**(6A): 3579-92.
377. Guan, L., et al., *Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells*. Apoptosis, 2009. **14**(2): 218-25.
378. Jolly, C., Y. Usson, und R.I. Morimoto, *Rapid and reversible relocalization of heat shock factor 1 within seconds to nuclear stress granules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): 6769-74.

379. Sengupta, S., R. Parihar, und S. Ganesh, *Satellite III non-coding RNAs show distinct and stress-specific patterns of induction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **382**(1): 102-7.
380. Holmberg, C.I., et al., *Formation of nuclear HSF1 granules varies depending on stress stimuli*. *Cell Stress Chaperones*, 2000. **5**(3): 219-28.
381. Busa, R., R. Geremia, und C. Sette, *Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(9): 3005-18.
382. Gerbasi, V.R., et al., *Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(18): 8276-87.
383. Ossareh-Nazari, B., et al., *Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy*. *EMBO Rep*, 2010. **11**(7): 548-54.
384. Gavin, A.C., et al., *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery*. *Nature*, 2006. **440**(7084): 631-6.
385. Wilmes, G.M., et al., *A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing*. *Mol Cell*, 2008. **32**(5): 735-46.
386. Lee, K.K., et al., *Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes*. *Mol Syst Biol*, 2011. **7**: 503.
387. Basmaji, F., et al., *The 'interactome' of the Knr4/Smi1, a protein implicated in coordinating cell wall synthesis with bud emergence in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*, 2006. **275**(3): 217-30.
388. Ruan, Y., et al., *Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(7): 2554-66.
389. Coller, J.M., et al., *The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes*. *RNA*, 2001. **7**(12): 1717-27.
390. Bonnerot, C., R. Boeck, und B. Lapeyre, *The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(16): 5939-46.
391. Bouveret, E., et al., *A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation*. *EMBO J*, 2000. **19**(7): 1661-71.
392. Sheth, U. und R. Parker, *Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies*. *Science*, 2003. **300**(5620): 805-8.

393. Geerlings, T.H., J.C. Vos, und H.A. Raue, *The final step in the formation of 25S rRNA in Saccharomyces cerevisiae is performed by 5'→3' exonucleases*. RNA, 2000. **6**(12): 1698-703.
394. Swisher, K.D. und R. Parker, *Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One, 2010. **5**(4): e10006.
395. Mangus, D.A., N. Amrani, und A. Jacobson, *Pbp1p, a factor interacting with Saccharomyces cerevisiae poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): 7383-96.
396. Morita, T., et al., *The stress granule protein Vgl1 and poly(A)-binding protein Pab1 are required for doxorubicin resistance in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(1): 399-403.
397. Landry, J.J., et al., *The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line*. G3 (Bethesda), 2013.
398. Macville, M., et al., *Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping*. Cancer Res, 1999. **59**(1): 141-50.
399. Shaw, G., et al., *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells*. FASEB J, 2002. **16**(8): 869-71.
400. Lloyd, R.E., *Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013.
401. Beckham, C.J. und R. Parker, *P bodies, stress granules, and viral life cycles*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): 206-12.
402. Kazemi, S., et al., *A novel function of eIF2alpha kinases as inducers of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathway*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(9): 3635-44.
403. Deng, J., et al., *Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(23): 10161-8.
404. Ke, Z.J., et al., *Ethanol promotes thiamine deficiency-induced neuronal death: involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **33**(6): 1097-103.
405. Ruvolo, P.P., et al., *Ceramide regulates protein synthesis by a novel mechanism involving the cellular PKR activator RAX*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): 11754-8.

406. Onuki, R., et al., *An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease*. EMBO J, 2004. **23**(4): 959-68.
407. Mounir, Z., et al., *Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2alpha phosphorylation pathway*. Sci Signal, 2009. **2**(102): ra85.
408. Peidis, P., et al., *Doxorubicin bypasses the cytoprotective effects of eIF2alpha phosphorylation and promotes PKR-mediated cell death*. Cell Death Differ, 2011. **18**(1): 145-54.
409. Bennett, R.L., et al., *Increased expression of the dsRNA-activated protein kinase PKR in breast cancer promotes sensitivity to doxorubicin*. PLoS One, 2012. **7**(9): e46040.
410. Boyce, M., et al., *A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress*. Science, 2005. **307**(5711): 935-9.
411. Adams, D.R., D. Ron, und P.A. Kiely, *RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: 22.
412. Ceci, M., et al., *Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly*. Nature, 2003. **426**(6966): 579-84.
413. Sengupta, J., et al., *Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(10): 957-62.
414. Jannot, G., et al., *The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both C. elegans and humans*. EMBO Rep, 2011. **12**(6): 581-6.
415. Berns, H., et al., *RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas*. FASEB J, 2000. **14**(15): 2549-58.
416. Pothof, J., et al., *MicroRNA responses and stress granule formation modulate the DNA damage response*. Cell Cycle, 2009. **8**(21): 3462-8.
417. Emara, M.M., et al., *Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2alpha phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(4): 763-9.
418. Warner, J.R. und K.B. McIntosh, *How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins?* Mol Cell, 2009. **34**(1): 3-11.
419. Baum, S., et al., *Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 3): 823-30.
420. Kim, W.J., et al., *Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): 2450-62.

421. McDunn, J.E. und J.P. Cobb, *That which does not kill you makes you stronger: a molecular mechanism for preconditioning*. Sci STKE, 2005. **2005**(291): pe34.
422. Carpio, M.A., et al., *Calreticulin-dimerization induced by post-translational arginylation is critical for stress granules scaffolding*. Int J Biochem Cell Biol, 2013.
423. Carpio, M.A., et al., *The arginylation-dependent association of calreticulin with stress granules is regulated by calcium*. Biochem J, 2010. **429**(1): 63-72.
424. Lopez Sambrooks, C., M.A. Carpio, und M.E. Hallak, *Arginylated calreticulin at plasma membrane increases susceptibility of cells to apoptosis*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): 22043-54.
425. Panaretakis, T., et al., *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. EMBO J, 2009. **28**(5): 578-90.
426. Takahashi, M., et al., *Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(4): 815-29.
427. Cande, C., et al., *Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 19): 4461-8.
428. Eystathioy, T., et al., *A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): 1338-51.
429. Bhattacharyya, S.N., et al., *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. Cell, 2006. **125**(6): 1111-24.
430. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): 259-69.
431. Haenisch, S. und I. Cascorbi, *miRNAs as mediators of drug resistance*. Epigenomics, 2012. **4**(4): 369-81.
432. Hummel, R., D.J. Hussey, und J. Haier, *MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types*. Eur J Cancer, 2010. **46**(2): 298-311.
433. Saito, K., E. Kondo, und M. Matsushita, *MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(14): 6086-99.
434. Majmundar, A.J., W.J. Wong, und M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): 294-309.
435. Aizer, A., et al., *The P body protein Dcp1a is hyper-phosphorylated during mitosis*. PLoS One, 2013. **8**(1): e49783.

436. Tong, S.W., et al., *Proteomic investigation of 5-fluorouracil resistance in a human hepatocellular carcinoma cell line*. J Cell Biochem, 2012. **113**(5): 1671-80.
437. White, J.P., L.C. Reineke, und R.E. Lloyd, *Poliovirus switches to an eIF2-independent mode of translation during infection*. J Virol, 2011. **85**(17): 8884-93.
438. Lian, X.J. und I.E. Gallouzi, *Oxidative Stress Increases the Number of Stress Granules in Senescent Cells and Triggers a Rapid Decrease in p21waf1/cip1 Translation*. J Biol Chem, 2009. **284**(13): 8877-87.
439. Tentes, I.K., et al., *Long-term persistence of acquired resistance to 5-fluorouracil in the colon cancer cell line SW620*. Exp Cell Res, 2010. **316**(19): 3172-81.
440. Cattaneo-Pangrazzi, R.M., et al., *Induction of cell cycle-dependent cytotoxicity and apoptosis by new heterodinucleoside phosphate dimers of 5-fluorodeoxyuridine in PC-3 human prostate cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2000. **60**(12): 1887-96.
441. Ensminger, W.D., et al., *A clinical-pharmacological evaluation of hepatic arterial infusions of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 1): 3784-92.
442. Temmink, O.H., et al., *Determinants of trifluorothymidine sensitivity and metabolism in colon and lung cancer cells*. Anticancer Drugs, 2005. **16**(3): 285-92.
443. Jordheim, L.P., et al., *The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer*. Lancet Oncol, 2011. **12**(7): 693-702.
444. Fontecave, M., et al., *Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase*. FEBS Lett, 1998. **421**(3): 277-9.
445. Aimiwu, J., et al., *RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(22): 5229-38.
446. Adesso, L., et al., *Gemcitabine triggers a pro-survival response in pancreatic cancer cells through activation of the MNK2/eIF4E pathway*. Oncogene, 2012.
447. Zhang, Y., Y. Li, und D.Q. Yang, *Phosphorylation of eIF-4E positively regulates formation of the eIF-4F translation initiation complex following DNA damage*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **367**(1): 54-9.

-
448. Bianchini, A., et al., *Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells*. Carcinogenesis, 2008. **29**(12): 2279-88.
449. Furic, L., et al., *eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(32): 14134-9.
450. Ivanov, P., et al., *Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation*. Mol Cell, 2011. **43**(4): 613-23.
451. Emara, M.M., et al., *Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly*. J Biol Chem, 2010. **285**(14): 10959-68.
452. Grzmil, M. und B.A. Hemmings, *Translation regulation as a therapeutic target in cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(16): 3891-900.
453. Ma, X.M. und J. Blenis, *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): 307-18.
454. Whitesell, L. und S. Lindquist, *Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy*. Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(4): 469-78.
455. McCollum, A.K., et al., *Cisplatin abrogates the geldanamycin-induced heat shock response*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(10): 3256-64.

Abkürzungsverzeichnis

aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
5-FU	5-Fluorurazil
FdUrd	Fluordesoxyuridin
FUrd	Fluoruridin
Gemz.	Gemcitabin
HSF	Hitzeschockfaktor
HSPs	Hitzeschockproteine
HU	Hydroxyurea
Kontr.	Kontrolle
M	Mitochondrium
MPI-MG	Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin)
nSBs	nukleäre Stress- <i>bodies</i>
PBs	P (<i>processing</i>)- <i>bodies</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkription- Polymerasekettenreaktion
(r)ER	(raues) Endoplasmatisches Retikulum
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	Ribonukleotidreduktase
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SGs	Stress- <i>granules</i>
si(RNA)	<i>small interfering</i> RNA
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TFT	Trifluorthymidin
ü.N.	über Nacht
Urd	Uridin
v/v	Volumen per Volumen
w/v	Gewicht per Volumen

(Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.)

Verzeichnis der Publikationen

Welzel, F., Kaehler, C., Isau, M., Hallen, L., Lehrach, H., Krobitch, S., *FOX-2 dependent splicing of ataxin-2 transcript is affected by ataxin-1 overexpression*. PLoS One, 2012. **7**(5): e37985.

Kaehler, C., Isensee, J., Nonhoff, U., Terrey, M., Hucho, T., Lehrach, H., Krobitch, S., *Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies*. PLoS One, 2012. **7**(11): e50134.