Präklinische Evaluation der MDM2-p53-FOXM1 Achse als therapeutisches Ziel bei gut differenzierten gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

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

> eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

> > vorgelegt von

FRANZISKA KATHARINA BRIEST

aus Apolda

2016

Diese Arbeit wurde angefertigt im Zeitraum vom März 2012 bis Juni 2016

In der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin

1. Gutachter: PD Dr. Patricia Grabowski

2. Gutachter: Prof. Dr. Sigmar Stricker

Disputation am

28.09.2016

MEINEM SOHN

Inhaltsverzeichnis

INHAL	TSVER	ZEICHNIS	1
ABBIL	DUNGS	SVERZEICHNIS	7
TABEL	LENVE	RZEICHNIS	11
ABKÜ	RZUNG	SVERZEICHNIS	13
1.		EINLEITUNG	21
	11	GASTROENTEROPANKREATISCHE NEUROENDOKRINE NEOPLASIEN (GEP-NEN)	21
		1 1 1 Klinisches Erscheinungshild	21
		112 Enidemiologie	21
		1.1.2 Epidemiologie	22
		1.1.5 Nussijikution	22
		1.1.4 Zytologie und neuroendokrine Charakteristika	24
		1.1.5 Molekulare Pathologie und Signaltransauktion	26
		1.1.5.1 Vorbemerkung	26
		1.1.5.2 Wachstumstaktor-abnangige Signaltransduktion	26
		1.1.5.5 Das p55 Netzwerk III GEP-NEN	29
		1.1.5.4 Chromosomac instabilitat and Epigenetik	22
	1 2		3/
	1.3	ZELLINIEN UND PRÄKLINISCHE MODELLE GASTROENTEROPANKREATISCHER NEUROENDOKRINER NEOPLASIEN	37
		1.3.1 Zelllinien und Tumormodelle	37
		1.3.2 Probleme präklinischer GEP-NEN Modelle	38
	1.4	Wissenschaftliche Fragestellungen der Arbeit	40
2.		MATERIAL UND METHODEN	43
	2.1	Geräte und Materialien	43
		2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	43
		2.1.1.1 Geräte	43
		2.1.1.2 Verbrauchsmaterial	44
		2.1.2 Puffer und Lösungen	45
		2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	49
		2.1.3.1 Chemikalien	49
		2.1.3.2 Enzyme	50
		2.1.3.3 Therapeutika und Compounds	50
		2.1.4 Antikörper	51
		2.1.5 Medien und Reagenzien zur Zellkultur	53
		2.1.6 Kits und Assays	53

	2.1.7 Oligor	nukleotide	54
	2.1.7.1	siRNA	54
	2.1.7.2	Primer	55
	2.1.8 Zelllin	ien	55
	2.1.9 Tumo	rbiopsien/Kollektive	56
	2.1.9.1	Kollektiv 1	56
	2.1.9.2	Kollektiv 2	57
	2.1.10 Softw	are und Datenbanken	59
2.2	METHODEN		60
	2.2.1 Zellbio	ologische Methoden	60
	2.2.1.1	Zellkultur	60
	2.2.1	1.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung der Zelllinien	60
	2.2.1	1.1.2 Behandlung der Zelllinien mit inhibitorischen Substanzen	61
	2.2.1.2	WST-1 Proliferations-Assay	61
	2.2.1.3	Apoptose-Nachweis und Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie	62
	2.2.1	L.3.1 Mitose-Index-Durchflusszytometrie	62
	2.2.1	L.3.2 JC-1 Durchflusszytometrie	63
	2.2.1.4	Zytotoxizitäts-Analyse mittels Laktat Dehydrogenase Assay	63
	2.2.1.5	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	64
	2.2.1.6	Immunfluoreszenz	65
	2.2.2 Protei	inbiochemische Methoden	65
	2.2.2.1	Isolation von Proteinen	65
	2.2.2	2.1.1 Gesamtzell-Lyse von GEP-NEN Zelllinien	65
	2.2.2	2.1.2 Gesamtzell-Lyse von gefrorenem primärem Tumormaterial	66
	2.2.2	2.1.3 Kern-Zytosol-Fraktionierung	66
	2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	67
	2.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
	2.2.2.4	Western Blot	68
	2.2.2.5	Immundetektion und Re-Probing	69
	2.2.3 Molek	(ularbiologische Methoden	70
	2.2.3.1	Isolation von Nukleinsäuren aus GEP-NEN Zelllinien	
	2.2.3	3.1.1 Isolation von genomischer DNA	70
	2.2.3	3.1.2 Isolation von RNA	70
	2.2.3.2	Sequenzierung von TP53	
	2.2.3.3	RNA Interferenz	
	2.2.3.4	Bestimmung der RNA Konzentration, DNAse Verdau und cDNA Synthese	
	2.2.3.5	Real-time PCR.	27 د ر
	2.2.3.0	Generali essionsandiysen	3/
	2.2.3	Ally industry and an energy and a state of the second state of the	
	2.2.3 2.2.4 Wistol	agische Methoden	
	Z.Z.4 MISLOI	טאוזרור אובנווטעבוו	

		2.2.4.1 Immunhistochemie	2	75
		2.2.5 Statistische und bioinfor	matische Auswertung	76
		2.2.5.1 Auswertung der Pla	atten-Assays	76
		2.2.5.2 Auswertung der Im	munhistochemie und der Densitometrie-Daten	77
		2.2.5.3 Auswertung der Ge	enexpressionsanalysen	77
		2.2.5.3.1 Auswertun	g des Gene 1.0 ST Microarray	77
		2.2.5.3.2 Auswertun	g der nCounter [®] PanCancer Pathway-Analyse	78
3.		ERGEBNISSE		
	3.1	VORUNTERSUCHUNGEN		81
		3.1.1 Expression von MDM2,	FOXM1 und STAT3 in gefrorenem Tumormaterial	81
		3.1.2 Charakterisierung der Ze	elllinien als geeignete in vitro Modelle für GEP-NEN	
		3.1.2.1 Wachstum		84
		3.1.2.2 Neuroendokrine N	arker	85
		3.1.2.3 Signaltransduktion		87
		3.1.2.4 TP53 Mutationen		88
		3.1.2.5 Amplifikationen vo	n MDM2	89
		3.1.2.6 Zusammenfassung		89
		3.1.3 Validierung des Immunh	nistochemie-Kollektivs	91
	3.2	FOXM1 IN GEP-NEN		92
		3.2.1 Expression von FOXM1 i	n primärem Tumormaterial	92
		3.2.2 Einfluss der Expression	von FOXM1 und MDM2 auf Proliferation und Chemose	ensitivität
		von GEP-NEN Zelllinien .		
		3.2.3 Ko-Expression von FOXN	11 mit MDM2 und STAT3 GEP-NEN Zelllinien	100
		3.2.4 Abhängigkeit der FOXM	1 Expression vom PI3K-Weg in GEP-NEN Zelllinien	104
	3.3	ABI FITUNG THERAPEUTISCHER ANSÄTZE .	, ,	106
	0.0	3 3 1 Protegsominhihitoren		107
		2 2 1 1 Auswahl der Subst	20200	107
		3 3 1 2 Sigmycin A	31/2011	107
		3 3 1 2 1 Proliferatio	unsstudien mit Siomvcin A	108
		3.3.1.2.2 Kombinatio	on von Siomvein A mit Chemotherapie	110
		3.3.1.2.3 Wirkung vo	on Siomycin A auf den Zellzyklus	111
		3.3.1.2.4 Genomexp	ressionsanalyse nach Siomycin A Behandlung	115
		3.3.1.2.5 Zusammen	fassung	125
		3.3.1.3 Bortezomib	-	126
		3.3.1.3.1 Proliferation	nsstudien	126
		3.3.1.3.2 Kombinatio	on von Bortezomib mit Cisplatin	128
		3.3.1.3.3 Wirkung vo	n Bortezomib auf den Zellzyklus	130
		3.3.1.3.4 Genexpress	sionsanayse nach Bortezomib Behandlung	132
		3.3.1.3.5 Vergleich o	ler Genexpression nach Bortezomib Behandlung und Knock	<i>down</i> von
		FOXM1		143

		3.3.1.3.6 Zusammenfassung	
		3.3.1.4 Thiostrepton	
		3.3.2 Re-Induktion der p53 Funktion durc	h MDM2-p53 Antagonisten 149
		3.3.2.1 Nutline	
		3.3.2.1.1 Auswahl der Substanze	n
		3.3.2.1.2 Proliferationsstudien m	it Nutlin-3 und Nutlin-3a150
		3.3.2.1.3 Wirkung von Nutlinen a	uf den Zellzyklus 153
		3.3.2.1.4 Genexpressionsanalyse	nach Nutlin-3a Behandlung155
		3.3.2.1.5 Kombination von Nutlir	-3a mit Cisplatin und Bortezomib164
		3.3.2.1.6 Zusammenfassung	
	3.4	VERGLEICH DER THERAPEUTISCHEN STRATEGIEN	
4.		DISKUSSION	
	4.1	GEP-NEN ZELLLINIEN SIND EINGESCHRÄNKT ALS IN VIT	RO MODELLE GEEIGNET 172
	4.2	FOXM1 wird p53-abhängig und -unabhängig vo	N MDM2 REGULIERT UND EIGNET SICH ALS
		PROGRESSIONSMARKER IN GEP-NEN	
	4.3	STAT3 UND FOXM1 STEHEN IN EINEM REGULATORISC	HEN ZUSAMMENHANG 176
	4.4	PROTEASOMINHIBITOREN WIRKEN ANTIPROLIFERATIV A	UF GEP-NEN ZELLEN, INHIBIEREN DIE FOXM1 EXPRESSION
		UND SENSIBILISIEREN GEGENÜBER CISPLATIN	
	4.5	INHIBITITION DER MDM2-P53 WECHSELWIRKUNG WI	RKT ANTIPROLIFERATIV IN P53 WT ZELLEN UND SENSIBILIERT
		GEGENÜBER CISPLATIN	
5.		ZUSAMMENFASSUNG	
6.		LITERATURVERZEICHNIS	
7.		ANHANG	CCXIII
	7.1	ANHANG 1	CCXIII
	7.2	ANHANG 2	
	7.3	Anhang 3	
	7.4	Anhang 4	
	7.5	Anhang 5	CCXLI
	7.6	Anhang 6	CCL
	7.7	ANHANG 7	CCLXIII
	7.8	ANHANG 8	
	7.9	Anhang 9	
	7.10	Anhang 10	CCLXXII
	7.11	Anhang 11	CCLXXX
	7.12	Anhang 12	ССХС
	7.13	Anhang 13	
	7 14	Anhang 14	
	· · · ·		

9.		CURRICULUM VITAE	cccxxvII
	8.2	Poster und Vorträge	CCCXXIII
	8.1	WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN IM RAHMEN DER DISSERTATION	CCCXXIII
8.		ERFOLGTE PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN	CCCXXIII
	7.19	Anhang 19	CCCXVI
	7.18	Anhang 18	CCCXIII
	7.17	Anhang 17	CCCXII
	7.16	Anhang 16	СССХ
	7.15	ANHANG 15	CCCVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Histologie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren	23
Abbildung 1-2: Schema einer neuroendokrinen Tumorzelle	25
ABBILDUNG 1-3: MÖGLICHER EINFLUSS VON IN GEP-NEN DEREGULIERTEN SIGNALPROTEINEN AUF DIE P53 UND FOXM1-AKTIV	VITÄT
	30
Abbildung 1-4: Gen- und Molekülstruktur der drei humanen FOXM1 Isoformen	35
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der nCounter® Technologie	75
ABBILDUNG 3-1: WESTERN BLOT ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION IN GEP-NEN BIOPSIEN	81
ABBILDUNG 3-2: EXPRESSION VON MDM2, FOXM1 UND STAT3 IN PRIMÄRTUMOREN UND FERNMETASTASEN	82
ABBILDUNG 3-3: KORRELATIONEN ZWISCHEN DER EXPRESSION VON FOXM1, STAT3 UND MDM2 IN TUMORBIOPSIEN	83
Abbildung 3-4: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten GEP-NEN Zelllinien	85
Abbildung 3-5: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis neuroendokriner Marker in GEP-NEN Zelllinien	86
ABBILDUNG 3-6: EXPRESSION VON FOXM1 IN GEP-NEN ZELLLINIEN	87
ABBILDUNG 3-7: EXPRESSION WEITERER MÖGLICHER INTERAKTOREN DER MDM2-P53-FOXM1 ACHSE IN GEP-NEN ZELLLINIE	N. 87
Abbildung 3-8: Analyse des TP53 Genotyps in GEP-NEN Zelllinien	88
Abbildung 3-9: <i>MDM2</i> Gen-Amplifikationen in GEP-NEN Zelllinien	89
Abbildung 3-10: Qualitative Bewertung des Immunhistochemie-Kollektivs anhand klinischer Zusammenhänge	91
Abbildung 3-11: Immunhistochemische Färbungen gegen FOXM1 und STAT3	93
ABBILDUNG 3-12: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HOHER FOXM1 EXPRESSION UND GRADING IN GEP-NEN	95
ABBILDUNG 3-13: EINFLUSS DER FOXM1 EXPRESSION AUF PROLIFERATION UND CHEMOSENSITIVITÄT GEGENÜBER CISPLATIN	97
ABBILDUNG 3-14: EINFLUSS DER MDM2 EXPRESSION AUF PROLIFERATION UND CHEMOSENSITIVITÄT GEGENÜBER CISPLATIN	98
Abbildung 3-15: Knockdown von MDM2 und FOXM1 in Kombination mit Cisplatin und dessen Auswirkung auf	
Zellzyklus und Mitose	99
ABBILDUNG 3-16: KNOCKDOWN VON FOXM1 IN KOMBINATION MIT CISPLATIN UND EXPRESSION VON PROTEINEN DER APOPTO	DSE
und DNA Reparatur	. 100
ABBILDUNG 3-17: KO-EXPRESSION VON MDM2 UND FOXM1 IN GEP-NEN ZELLLINIEN	. 101
ABBILDUNG 3-18: ABHÄNGIGKEIT DER FOXM1 EXPRESSION VON MDM2 UND P53	. 102
ABBILDUNG 3-19: KO-EXPRESSION VON STAT3 UND FOXM1 IN GEP-NEN ZELLLINIEN	. 103
Abbildung 3-20: Chemische Struktur von bpV(HOpic) und Triciribin	. 104
Abbildung 3-21: Einfluss der pharmakologisch induzierten Aktivierung des PI3K-Weges auf die Expression von	
FOXM1, p21, E2F1 und Aurora A	. 105
ABBILDUNG 3-22: EINFLUSS DER PHARMAKOLOGISCH INDUZIERTEN INHIBITION DES PI3K-WEGES AUF DIE EXPRESSION VON FOX	(M1,
P21, E2F1 UND AURORA A	. 105
Abbildung 3-23: Chemische Struktur der Proteasominhibitoren Siomycin A, Thiostrepton und Bortezomib	. 107
Abbildung 3-24: Mechanismus der WST-1 Reduktion	. 108
ABBILDUNG 3-25: ANTIPROLIFERATIVER EFFEKT VON SIOMYCIN A AUF GASTROINTESTINALE NEN ZELLLINIEN	109

ABBILDUNG 3-26: ANTIPROLIFERATIVER EFFEKT VON SIOMYCIN A AUF PANKREATISCHE NEN ZELLLINIEN	. 110
Abbildung 3-27: Kombinationseffekte von Siomycin A mit Chemotherapie	. 111
Abbildung 3-28: Siomycin A induzierte Veränderungen des Zellzyklus bei gastrointestinalen NEN Zelllinien	. 112
Abbildung 3-29: Siomycin A induzierte Veränderungen des Zellzyklus bei pankreatischen NEN Zelllinien	. 113
ABBILDUNG 3-30: FRÜHE APOPTOSEINDUKTION NACH 16 H UND 20 H BEHANDLUNG MIT SIOMYCIN A	. 114
ABBILDUNG 3-31: ROHDATEN-ANALYSE ZUR FOXM1 EXPRESSION IM MIKROARRAY	. 116
Abbildung 3-32: Cluster-Darstellung der veränderten Expression nach Siomycin A Behandlung und FOXM1	
ΚΝΟCΚDOWN	. 117
ABBILDUNG 3-33: VENN DIAGRAMM DER GLEICH UND UNTERSCHIEDLICH EXPRIMIERTEN GENE NACH SIOMYCIN A BEHANDLUNG	3
BZW. FOXM1 KNOCKDOWN	. 117
ABBILDUNG 3-34: AUFLISTUNG ALLER SOWOHL NACH SIOMYCIN A ALS AUCH NACH FOXM1 KNOCKDOWN VERÄNDERTEN GENE .	. 118
Abbildung 3-35: Cluster-Darstellung der analog exprimierten Gene nach Siomycin A Behandlung und FOXM1	
KNOCKDOWN	. 119
Abbildung 3-36: Analyse der Signalwege-Zuordnung der analog bei nach Siomycin A und FOXM1 Knockdown	
VERÄNDERTEN GENE	. 120
Abbildung 3-37: Visualisierung der veränderten Zellzyklus-Signalwege nach Siomycin A Behandlung in vitro	. 121
ABBILDUNG 3-38: FUNKTIONELLE KLASSIFIKATION UND STATISTISCHE ÜBERREPRÄSENTATION DER NACH SIOMYCIN A DIFFERENTIE	ELL
EXPRIMIERTEN GENE	. 122
Abbildung 3-39: Vergleichende Analyse der Protein-Expression nach Siomycin A Behandlung versus FOXM1	
KNOCKDOWN IM WESTERN BLOT	. 123
Abbildung 3-40: Protein-Expression Nach Siomycin A Behandlung	. 124
Abbildung 3-41: Knockdown-Effizienz der siRNA für die einzelnen FOXM1 Isoformen	. 124
Abbildung 3-42: FOXM1 Expression nach Bortezomib Behandlung	. 126
ABBILDUNG 3-43: ANTIPROLIFERATIVER EFFEKT VON BORTEZOMIB AUF GASTROINTESTINALE NEN ZELLLINIEN	. 127
Abbildung 3-44: Antiproliferativer Effekt von Bortezomib auf pankreatische NEN Zelllinien	. 128
ABBILDUNG 3-45: KOMBINATORISCHE EFFEKTE VON BORTEZOMIB UND CISPLATIN IN BON ZELLEN	. 129
Abbildung 3-46: Kombinatorische Effekte von Bortezomib und Cisplatin in KRJ-I Zellen	. 130
ABBILDUNG 3-47: WIRKUNG VON BORTEZOMIB, CISPLATIN UND EINER KOMBINATION BEIDER SUBSTANZEN AUF DEN ZELLZYKLUS	;
NEUROENDOKRINER TUMORZELLLINIEN	. 131
ABBILDUNG 3-48: FRÜHE APOPTOSEINDUKTION NACH BEHANDLUNG MIT BORTEZOMIB, CISPLATIN UND KOMBINATION IN VITRO	131
ABBILDUNG 3-49: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN VON BON NACH 24 H BORTEZOMIB, CISPLATIN UND KOMBINATION	. 132
Abbildung 3-50: Zur Normalisierung verwendete Haushaltsgene	. 133
ABBILDUNG 3-51: HEATMAP DER GENEXPRESSION ALLER 720 GENE DES PANCANCER PANELS NACH BORTEZOMIB, CISPLATIN OD)ER
Kombinationsbehandlung	. 134
ABBILDUNG 3-52: VOLCANO-BLOT DER GENEXPRESSION NACH BORTEZOMIB, CISPLATIN ODER KOMBINATIONSBEHANDLUNG	. 135
Abbildung 3-53: Veränderte Signalwege nach Bortezomib, Cisplatin und Kombinationsbehandlung in vitro	. 136
ABBILDUNG 3-54: VISUALISIERUNG DER VERÄNDERTEN ZELLZYKLUS-SIGNALWEGE NACH KOMBINATIONSBEHANDI UNG IN VITRO	. 137

ABBILDUNG 3-55: EXPRESSION VON GENEN DER ANNOTATION DNA REPARATUR NACH CISPLATIN MONOTHERAPIE	
Kombination mit Cisplatin	138
ABBILDUNG 3-56: AGGLOMERATIVE CLUSTERANALYSE DER GENEXPRESSION NACH BORTEZOMIB VERSUS KOMBINATIONSBEHA	NDLUNG
	139
ABBILDUNG 3-57: INDUKTION VON APOPTOSE UND DNA REPARATUR NACH BORTEZOMIB, CISPLATIN UND	
Kombinationsbehandlung	140
Abbildung 3-58: Veränderungen im Signalnetzwerk um FOXM1 nach Bortezomib, Cisplatin und	
Kombinationsbehandlung	141
ABBILDUNG 3-59: WIRKUNG VON BORTEZOMIB IN DEN ÜBRIGEN GEP-NEN ZELLLINIEN	142
ABBILDUNG 3-60: INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG VON FOXM1 NACH BORTEZOMIB BEHANDLUNG	143
ABBILDUNG 3-61: EXPRESSION VON FOXM1 UND FOXM1B NACH RNA INTERFERENZ	144
ABBILDUNG 3-62: ANALOG EXPRIMIERTE GENE NACH BEHANDLUNG MIT BORTEZOMIB VERSUS KNOCKDOWN VON FOXM1	145
ABBILDUNG 3-63: VERÄNDERTE EXPRESSION NACH FOXM1 KNOCKDOWN, CISPLATIN-BEHANDLUNG UND KOMBINATION IN N	/ITRO
	146
ABBILDUNG 3-64: VERGLEICH DER POTENZ VON SIOMYCIN A, THIOSTREPTON, EVEROLIMUS UND BORTEZOMIB	148
Abbildung 3-65: Wirkungsweise von Nutlinen	150
ABBILDUNG 3-66: ANTIPROLIFERATIVER EFFEKT VON NUTLIN-3 AUF GEP-NEN ZELLINIEN	151
Abbildung 3-67: Antiproliferativer Effekt von Nutlin-3a auf GEP-NEN Zelllinien	152
Abbildung 3-68: Vergleich der Potenz von Nutlin-3 und Nutlin-3a in KRJ-I Zellen	152
Abbildung 3-69: Nutlin-3a induzierte Veränderungen des Zellzyklus bei GEP-NEN Zelllinien	153
Abbildung 3-70: Zytotoxische Effekte von Nutlin-3 auf KRJ-I Zellen	154
ABBILDUNG 3-71: INDUKTION VON APOPTOSE DURCH NUTLIN-3A, CISPLATIN ODER KOMBINATION IN QGP-1 UND KRJ-I GEI	P-NEN
ZELLLINIEN	154
ABBILDUNG 3-72: EXPRESSION VON FOXM1 NACH NUTLIN BEHANDLUNG IN VITRO	155
ABBILDUNG 3-73: VERÄNDERTE EXPRESSION VON P53, MDM2 UND P21 NACH NUTLIN-3 BEHANDLUNG VON GEP-NEN ZE	LLLINIEN
	156
Abbildung 3-74: Zur Normalisierung verwendete Haushaltsgene	156
Abbildung 3-75: Darstellung der zehn am stärksten exprimierten Transkripte in Kontroll-KRJ-I Zellen	157
ABBILDUNG 3-76: HEATMAP DER GENEXPRESSION ALLER 720 GENE DES PANCANCER PANELS NACH NUTLIN-3A BEHANDLUN	G VON
KRJ-I ZELLEN	157
ABBILDUNG 3-77: VOLCANO-BLOT DER DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE NACH NUTLIN-3A INKUBATION	158
ABBILDUNG 3-78: VERÄNDERTE SIGNALWEGE IN KRJ-I ZELLEN NACH NUTLIN-3A BEHANDLUNG	159
ABBILDUNG 3-79: DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE P53 ZIELGENE NACH NUTLIN-3A BEHANDLUNG	160
ABBILDUNG 3-80: HEATMAP DARSTELLUNG DER NACH NUTLIN-3 BEHANDLUNG VERÄNDERT EXPRIMIERTEN ZELLZYKLUS-ASSO	ZIIERTEN
Gene	161
Abbildung 3-81: Visualisierung der veränderten Zellzyklus-Signalwege nach Nutlin-3a Behandlung in vitro	162
ABBILDUNG 3-82: WESTERN BLOT ANALYSE AUSGEWÄHLTER PROTEINE NACH NUTLIN-3A INKUBATION VON P53 WILDTYP UN	1D
MUTIERTEN GEP-NEN ZEULINIEN	163

ABBILDUNG 3-83: AKTIVIERUNG DER AKT-ABHÄNGIGEN SIGNALTRANSDUKTION UND PHOSPHORYLIERUNG VON RB NACH NUTLIN-3A	
Behandung	164
Abbildung 3-84: Antiproliferative Effekte von Nutlin-3a in Kombination mit Cisplatin	165
Abbildung 3-85: Dosis-Wirkungs-Kurven zu Nutlin-3a in Kombination mit Cisplatin und Bortezomib	166
Abbildung 3-86: Antiproliferative Effekte von Nutlin-3a in Kombination mit Bortezomib	167

Abbildungen des Anhangs

Abbildung A-1: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse des Zellzyklus von
1µM SIOMYCIN A VERSUS DMSOCCXIV
Abbildung A-2: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Messung der frühen Apoptoseinduktion nach 1 μ M
SIOMYCIN A VERSUS DMSO NACH 20HCCXV
Abbildung A-3: Weitere Dosis-Wirkungs-Kurven zur Demonstration der Zeitanhängigkeit der Bortezomib-Antwort
CCLXIII
Abbildung A-4: Weitere Dosis-Wirkungs-Kurven zur Demonstration der Chemosensibilität nach Bortezomib-
BehandlungCCLXIV
Abbildung A-5: Repräsentative Rohdaten zur Messung der Apoptoseinduktion nach Bortezomib-Behandlung und
KOMBINATION CCLXV
Abbildung A-6: Ergebnisse eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse des Zellzyklus von 5 μ M Nutlin-3
VERSUS DMSO ÜBER 96H CCCX
Abbildung A-7: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse des Zellzyklus von
5μM Nutlin-3aCCCXI
Abbildung A-8: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse der
Apoptoseinduktion (JC-1) von 5 μ M Nutlin-3a und Kombination mit Cisplatin versus DMSOCCCXII

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1:WHO KLASSIFIKATION 2010 FÜR NEUROENDOKRINE TUMOREN	23
TABELLE 1-2: HÄUFIGE ZYTOGENETISCHE VERÄNDERUNGEN IN GEP-NEN UND MÖGLICHE BETROFFENE GENLOCI	32
TABELLE 1-3: IN TUMOR-INITIATION, PROGRESSION UND THERAPIERESISTENZ INVOLVIERTE, FOXM1 ABHÄNGIGE GENE	37
TABELLE 2-1: VERWENDETE PRIMÄR-ANTIKÖRPER	52
TABELLE 2-2: VERWENDETE SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER	52
TABELLE 2-3: VERWENDETE SIRNA	54
TABELLE 2-4: VERWENDETE PRIMER	55
TABELLE 2-5: VERWENDETE ZELLLINIEN	56
TABELLE 2-6: KLINIKO-PATHOLOGISCHE DATEN DES KOLLEKTIVS 1	57
TABELLE 2-7: KLINIKO-PATHOLOGISCHE DATEN DES KOLLEKTIVS 2	58
TABELLE 2-8: PIPETTIERSCHEMA FÜR POLYACRYLAMID-GELE	68
TABELLE 2-9: PIPETTIERSCHEMA DER REAL-TIME PCR	72
TABELLE 2-10: TEMPERATURVERLAUFSPROTOKOLL DER REAL-TIME PCR	73
TABELLE 3-1: EXPRESSION NEUROENDOKRINER UND DIFFERENZIERUNGSMARKER IN GEP-NEN ZELLLINIEN	86
TABELLE 3-2: ZUSAMMENFASSUNG DER CHARAKTERISIERUNG DER ZELLLINIEN	90
TABELLE 3-3: TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMIE ANALYSEN	92
TABELLE 3-4: GEMEINSAME, DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE NACH SIOMYCIN A, BORTEZOMIB UND NUTLIN-3A BEHANDLUNG 1	L70

Tabellen des Anhangs

TABELLE A-1: VOLLSTÄNDIGE AUFLISTUNG DER DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE NACH SIOMYCIN A BEHANDLUNG CCXL
TABELLE A-2: VOLLSTÄNDIGE AUFLISTUNG DER DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE NACH RNAI VERMITTELTEM KNOCKDOWN VON
FOXM1CCXLIX
TABELLE A-3: ROHDATEN DES PANTHER ÜBERREPRÄSENTATIONS-TESTS NACH SIOMYCIN A BEHANDLUNG CCLXII
TABELLE A-4: Alle differenziell exprimierten Gene mit P<0,05 nach 24h Inkubation von BON Zellen mit $10\mu M$ Cisplatin
UND ASSOZIIERTE SIGNALWEGE CCLXX
TABELLE A-5: ALLE DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT FDR<0,05 NACH 24H INKUBATION VON BON ZELLEN MIT 25NM
Bortezomib und assoziierte Signalwege CCLXXIX
TABELLE A-6: ALLE DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT FDR<0,05 NACH 24H INKUBATION VON BON ZELLEN MIT 25NM
Bortezomib kombiniert mit $10\mu M$ Cisplatin und assoziierte Signalwege
TABELLE A-7: FUNKTIONELLE ZUORDNUNG DER GENE, DIE SICH IN DER AGGLOMERATIVEN CLUSTERANALYSE VON BORTEZOMIB
versus Kombinationsbehandlung als gegenläufig reguliert gezeigt haben
TABELLE A-8: ALLE DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT FDR<0,05 NACH 72H INKUBATION VON BON ZELLEN MIT 40NM SIRNA
GEGEN FOXM1CCXCVIII
TABELLE A-9: ALLE DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT FDR<0,05 NACH 24H INKUBATION VON BON ZELLEN MIT 40NM SIRNA
gegen <i>FOXM1</i> und und anschließender 48h Inkubation mit 5µM Cisplatin

TABELLE A-10: ALLE DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT FDR<0,05 NACH 24H INKUBATION VON BON ZELLEN	міт 40 NM
Kontroll siRNA und und anschließender 48h Inkubation mit $5\mu M$ Cisplatin	CCCIX
TABELLE A-11: ALLE 75 DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT P<0,05 NACH 60H INKUBATION VON KRJ-I ZELLEN	I MIT 100NM
Everolimus und assoziierte Signalwege	CCCXV
TABELLE A-12: ALLE 212 DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE MIT P<0,05 NACH 60H INKUBATION VON KRJ-I ZELLE	Ν ΜΙΤ 5μΜ
NUTLIN-3A UND ASSOZIIERTE SIGNALWEGE	CCCXXI

Abkürzungsverzeichnis

Gensymbole werden aufgrund der eindeutigen internationalen Nomenklatur im Abkürzungsverzeichnis nicht gesondert aufgeführt.

A	Adenin/Adenosin/ Desoxyadenosin
ADMET	Absorption, Verteilung, Metabolisierung,
	Elimination und Toxizität (absorption,
	distribution, metabolism, excretion and toxicity)
ALT	alternative lengthening of telomeres
AS	Aminosäure
ATRX	alpha Thalassemia/Mental retardation syndrome
	X-linked protein
BER	Basen Exzisions Reparatur
bpV(HOpic)	Di-Kalium-Diperoxo(5-Hydroxypyridin-2-
	carbonyl)-Oxo-Vanadat (V)
BRCA1/2	breast cancer susceptibility protein 1/2
BRIP1	brca1 interacting protein
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin/Cytidin/Desoxycytidin
CDK	Cyclin abhängige Kinasen
CGH	comparative genomic hybridization
CGI/ CpG	CpG islands: kurze CG-reiche Initiations-
	Sequenzen
CI	Kombinationsindex
CK2	Casein Kinase 2
c-MET	mesenchymal epithelial transition factor
c-MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene
	cellular homolog
CPC	chromosomal passenger complex
CRC	Kolorektalkarzinom
Ctrl	Kontrollprobe
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
(k)Da	(kilo) Dalton

DAXX	death domain-associated protein 6
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Leibnitz Institut - Deutsche Sammlung von
	Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
4EBP1	eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4E
	Bindeprotein 1
E2F(1)	E2F Transkriptionsfactor 1
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor
elF4E	eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4E
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ERK 1/2	extracellular signal-related kinases 1/2
et <i>al.</i>	Bibliografie: und andere (Autoren)
FA	Fanconi-Anämie
FACS	fluorescence activated cell sorting
	(Durchflusszytometrie)
FAK	focal adhesion kinase
FBS	Fetales Kälber Serum
FEN1	Flap Endonuclease 1
FFPE Gewebe	Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete
	Gewebe
(b)FGF	(basic) fibroblast growth factor
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FOXM1	Forkheadbox Familie M Protein 1
FOXO	Forkheadbox Familie O Protein
G	Guanin/Guanosin/ Desoxyguanosin
g	Gravitationskonstante g= 6,673 84·10 ⁻¹¹ m ³ ·kg ⁻¹ ·s ⁻²
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GATA3	GATA binding protein 3
GDP	Guanosindiphosphat
GLI1	Gliom Transkriptionsfaktor 1

GO	Gene Ontology
GPCR	G protein coupled receptors
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin (Färbung)
HER2	human epithelial growth factor receptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HPF	high power field (Hauptgesichtsfeld am
	Mikroskop bei 400x Vergrößerung)
HR	Homologe Rekombination
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IC50	Konzentration mit 50 % des maximalen
	inhibitorischen Effekts
IF	Immunfluoreszenz
IGF1	insulin-like growth factor 1
IHC	Immunhistochemie
IRS1	insulin receptor substrate 1
JCRB	japanese collection of research bioresources cell
	bank
LDCV	large dense-core vesicles
LDH	Laktat Dehydrogenase
LOH	loss of heterozygosity
МАРК	Mitogen aktivierte Proteinkinase
МСМ	mini-chromosome maintenance (Komplex)
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minuten
miRNA	Mikro RNA
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMR	Mismatch-Reparatur
MOR1	μ-Opioidrezeptor

MS	Microsoft®
MSH2	DNA mismatch protein 2
mTOR (C1/2)	Mammalian target of rapamycin (complex 1/2)
N/A	nicht bestimmt
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NEDD4	neural precursor cell expressed, developmentally
	down-regulated protein 4
GEP-NEN	gastroenteropankreatische neuroendokrine
	Neoplasien
NER	Nukleotid Exzisions-Reparatur
NESP55	neuroendocrine secretory protein 55
NEC	neuroendokrines Karzinom
NEN	neuroendokrine Neoplasie
NET	neuroendokriner Tumor
nM	Nanomol/Liter
NSE	neuron specific enolase
р70S6К	70 kDa ribosomal protein S6 kinase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	personal computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PGP 9.5	protein gene product 9.5
PH-Proteindomäne	Pleckstrin homology Proteindomäne
РІЗ(К)	Phosphatidylinositol 3 (-Kinase)
PLK1	polo like kinase 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAD	RAD family DNA repair protein
(H/N) RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog
RASSF1A	RAS-association domain gene family 1
Rb	Retinoblastoma-associated Protein
RCF	relative centrifugal force
RFC4	Replikationsfaktor C4
RNA	Ribonukleinsäure

RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	replication protein A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSK	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	Sekunden
SDS	Natrium dode cylsulf at
Ser	Serin
SGK	Serum/Glucocorticoid regulierte Kinase
SHP1/2	SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1/2
siRNA	small interfering RNA
SKP2	S-Phase Kinase-Associated Protein 2
Src	Rous-Sarkom-Virus-Kinase (Analogon)
SST(R)	Somatostatin (Rezeptor)
SSV	small synaptic vesicles
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
STR	short tandem repeat
SV2	synaptic vesicle protein 2
т	Thymin/Thymidin/Desoxythymidin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TGF-α/-β	transforming growth factor $lpha/eta$
TLS	translesion Synthesis
ТМА	tissue microarray
TNM Klassifikation	System zur Einteilung von malignen Tumoren
	(T=Tumor, N=Lymphknotenmetastasen,
	M=Fernmetastasen)
TP53	Gen des Tumorsuppressorproteins p53
TSC1/2	Tuberöse Sklerosekomplex-Protein 1/2
u.a.	unter anderem
UPR	unfolded protein response
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche

VHL	Von Hippel–Lindau (Syndrom)
VMAT	vesikulärer Monoamin-Transporter
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
XRCC1/2	X-Ray repair complementing defective repair
	protein 1
z.T.	zum Teil
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent
°C	Grad Celsius
μΙ	Mikroliter
μΜ	Mikromol/Liter

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, die verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Sinn und Wortlaut entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe. Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, den 20.06.2016

Franziska Briest

Vorbemerkung:

Die in dieser Arbeit verwendeten Angaben beziehen sich grundsätzlich auf die männliche wie auch auf die weibliche Form. Zur besseren Lesbarkeit wurde auf die zusätzliche Bezeichnung in weiblicher Form verzichtet.

1. Einleitung

1.1 Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien (GEP-NEN)

1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild

Die medizinisch außergewöhnliche Symptomatik gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien (GEP-NEN) fordert seit über 100 Jahren die medizinische Forschung heraus. Bereits im 19. Jahrhundert als eigentümliche kleine Geschwulst beschrieben und charakterisiert [1, 2], fand die eigentliche Abgrenzung der bis ins 21. Jahrhundert als Karzinoid bezeichneten Tumorerkrankung von herkömmlichen Karzinomen auf einem Pathologen-Kongress 1907 durch Siegfried Oberndorfer statt [3]. Diese Nomenklatur trug der Erkenntnis Rechnung, dass sich Karzinoide trotz ihrer karzinomähnlichen Histologie eher gutartig verhalten.

Typisches Merkmal funktioneller GEP-NEN, die etwa die Hälfte aller Fälle ausmachen, ist neben einer verhältnismäßig langsamen Proliferation die biochemische Aktivität. Funktionale neuroendokrine Tumoren produzieren und sezernieren Peptide und Neuroamine, abhängig von ihrer Primärlokalisation und dem Zelltyp, aus dem sie hervorgegangen sind. So vielfältig wie die sezernierten Produkte, die von Serotonin, Somatostatin und Gastrin bis hin zu Glukagon, Pro-Insulin und Calcitonin reichen [4], sind auch die Symptome der GEP-NEN-Patienten. Diese umfassen je nach Funktionalität vielfältige, diagnostisch häufig verwirrende Symptomatiken wie *Flush* Attacken und rechtsseitige Herzklappenerkrankungen ("Karzinoid Syndrom"), Diabetes Mellitus, Cholecystolithiasis, Steatorrhöe, Hypochlorhydrie, chronische Diarrhöe oder verschiedene Anämien [5] und verursachen einen enormen Leidensdruck bei den Patienten.

Die heutige Medizin betrachtet auch die langsam proliferativen NEN als potentiell bösartige Tumoren, zum einen, da ihr Wachstumsverhalten perspektivisch schwer abzuschätzen ist und verlässliche Prognosemarker fehlen, vor allem aber, weil auch die niedrig proliferativen, gut differenzierten Subtypen trotz kleiner, unauffälliger Primärtumoren häufig metastasieren. Im Zusammenhang mit der damit verbundenen erhöhten Tumorlast treten zumeist erst nach der Metastasierung deutliche Symptome auf, die v.a. bei diffuser Streuung oft nur noch palliativ behandelt werden können [6].

Das langsame Wachstum dieser Tumoren ist folglich nicht nur mit einer langsameren Progression und somit längeren Lebenserwartung verbunden als bei anderen malignen Erkrankungen, es birgt auch das Risiko einer späten Diagnose mit daraus folgender eingeschränkter therapeutischer Zugänglichkeit dieser Tumoren.

1.1.2 Epidemiologie

Neuroendokrine Neoplasien gehören mit einer Inzidenz von 21 Fällen pro 1.000.000 Einwohnern pro Jahr (EU) zu den seltenen Tumorerkrankungen [7]. Die größte Subgruppe mit 13 pro 1.000.000 Einwohnern/Jahr bilden die gut differenzierten Tumoren des Pankreas und des Gastrointestinaltraktes. Dennoch hat eine Reihe von Faktoren dazu beigetragen, dass diese seltene Erkrankung in den letzten Jahrzehnten weiter in den Fokus der präklinischen und klinischen Forschung gerückt ist. Ein Grund dafür mag, neben dem außergewöhnlichen Krankheitsbild, in der vergleichsweise hohen Prävalenz liegen. Weil ein Großteil der neuroendokrinen Tumoren verhältnismäßig langsam proliferiert und die Patienten daher ein längeres Gesamtüberleben aufweisen als viele Patienten mit anderen Krebsentitäten, sind neuroendokrine Neoplasien die zweithäufigste maligne Erkrankung des Gastrointestinaltraktes nach dem kolorektalen Karzinom [8]. Da sich die therapeutischen Möglichkeiten in den letzten Jahrzehnten jedoch nicht zugunsten einer höheren durchschnittlichen 5-Jahres Überlebensrate verbessert haben [4], ist dies vor allem auf eine weiterentwickelte Bildgebung und eine damit verbundene frühere Diagnose zurückzuführen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in der Europäischen Union derzeit etwa zwischen 41 % bei pankreatischen und 86 % bei Appendix-NEN [7].

Die meisten GEP-NEN sind sporadischer Natur, es gibt jedoch auch hereditäre Formen, die im Zusammenhang mit dem MEN1 (Multiple endokrine Neoplasie Typ 1), VHL (Von Hippel–Lindau), Tuberöse Sklerosekomplex (TSC) oder NF1 (Neurofibromatose Typ 1) Syndrom stehen und die auf autosomal-dominant vererbte Mutationen der Tumorsuppressorgene *MEN1*, *VHL* und *TSC1* oder *2* zurückgehen. Diese umfassen etwa 5-10 % der GEP-NEN [9].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich jedoch ausschließlich mit dem sporadisch auftretenden Typ dieser malignen Erkrankung.

1.1.3 Klassifikation

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien sind stark heterogen bezüglich ihrer Biologie, Symptomatik und Therapieoptionen, weshalb zunehmend zwischen pankreatischen und extrapankreatischen NEN als zwei Entitäten unterschieden wird [10]. Auch gibt es deutliche Unterschiede zwischen NEN des *foregut* (Magen, Duodenum, oberes Jejunum, Pankreas) zu denen des *midgut* (unteres Jejunum, Ileum, Appendix, Coecum, rechtes Colon) und *hindgut* (übriges Kolon, Rektum), zwischen gut und schlecht differenzierten sowie funktionellen und nichtfunktionellen NEN [5].

Innerhalb dieser Lokalisationen gilt seit 2010 eine dreistufige Klassifikation der WHO [11], die nach den Empfehlungen der ENETS durch ein TNM System ergänzt wird. Diese Klassifikation basiert

weitestgehend auf dem Proliferationsindex und/oder dem prozentualen Anteil der Mitosen in einer Gewebebiopsie und wird quantitativ durch eine Ki67 Immun-Färbung bestimmt [5]. Im Rahmen dieser Klassifikation werden G1 und G2 Tumoren als gut differenziert und G3 als schlecht differenzierte Karzinome bezeichnet (vgl. Tabelle 1-1 und Abbildung 1-1).

Tumorgrad	Anzahl der Mitosen (10 HPF)	Ki67 Index (%)
G1	<2	≤2
G2	2–20	3–20
G3	>20	>20

Tabelle 1-1:WHO Klassifikation 2010 für neuroendokrine Tumoren

Die historisch bedingte Benennung der Gruppen nach einer – im semantischen Sinne – morphologischen Eigenschaft ist wissenschaftlich umstritten. Grund dafür ist, dass die aktuelle Klassifikation anhand von Proliferations- anstatt von Differenzierungsmarkern bestimmt wird und diese deshalb hoch proliferative, aber *de facto* morphologisch gut differenzierte Fälle nicht adäquat abbilden kann. Die G3 Tumoren werden deshalb im Rahmen von Studien zunehmend in G3 Tumoren (G3-NET) und G3 Karzinome (G3-NEC) unterteilt [12-15].



Abbildung 1-1: Histologie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren

Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines A) gut differenzierten G1 Dünndarm-Tumors und B) eines schlecht differenzierten G3 Pankreas-NEC. Lichtmikroskopische Aufnahmen, 200x Vergrößerung.

Bisher ist zudem umstritten, ob es sich bei gastroenteropankreatischen G3 Tumoren und Karzinomen um zwei unabhängig voneinander entstehende Entitäten handelt, oder ob ein Subtyp in den anderen übergehen kann. Lehrmeinung ist derzeit die Theorie, dass G3 NET und NEC unabhängig voneinander entstehen, da sich beide Subtypen unabhängig voneinander aus unterschiedlich weit differenzierten neuroendokrinen (Vorläufer-)Zellen entwickeln [8]. Für die These der gemeinsamen Entitäten spricht jedoch, dass schlecht differenzierte NEC weitaus häufiger genetische und epigenetische Aberrationen aufweisen, als dies bei den gut differenzierten Subtypen der Fall ist. *TP53* oder *RB1* Mutationen bzw. epigenetische Aberrationen in den Tumorsuppressoren p53 und Rb scheinen beispielsweise weitestgehend ein Charakteristikum der schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinome zu sein [16-19]. Eine *Multi-hit* Hypothese der Kanzerogenese neuroendokriner Tumoren ist somit denkbar, bekannte frühe Treiber- oder *Trunk*-Mutationen sind jenseits der hereditären Formen jedoch nur sehr wenige bekannt. Möglicherweise spielen hier frühe chromosomale Verluste eine Rolle (vgl. Abschnitt 1.1.5.4).

1.1.4 Zytologie und neuroendokrine Charakteristika

Neuroendokrine Tumoren teilen die Eigenschaft neuroendokriner Zellen, endokrine Botenstoffe zu produzieren. Aufgrund der damit verbundenen ähnlichen Morphologie und Funktionalität wird davon ausgegangen, dass sie durch maligne Transformationen aus den Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems hervorgehen. Jene wiederum entwickeln sich vermutlich aus gemeinsamen multipotenten, gewebsspezifischen entodermalen Stammzellen, die sich zum Beispiel im Falle intestinaler neuroendokriner Zellen in den Krypten der Lamina epithelialis mucosae befinden (*Unitarian Theory* [20]). Neuroendokrine Tumoren weisen daher einen sekretorischen Phänotyp analog zu dem nichtmaligner neuroendokriner Zellen des Gastrointestinaltraktes auf (vgl. Abbildung 1-2). Dazu gehören, neben den konstitutiven Transport-Vesikeln des Trans-Golgi Systems, 40-80 nm kleine neuroendokrine Vesikel, die den *small synaptic vesicles* (SSV) von Neuronen entsprechen und niedrigmolekulare Neurotransmitter (<1kDa) enthalten. Hauptbestandteile sind Glutamat, Glycin und GABA [21]. Eine weitere Art von Vesikeln neuroendokriner Zellen sind die 100–400 nm großen neuroendokrinen Granula, Analoga der *large dense-core vesicles* (LDCV). Diese neuroendokrinen Granula enthalten Peptidhormone und Neuropeptide, wie beispielsweise Granine, Serotonin (5-HT) oder Histamin [8], und dienen zu deren Speicherung und Sekretion [21].

Als diagnostisch bedeutsame Marker für neuroendokrine Tumoren dienen das integrale Membranprotein Synaptophysin der kleinen neuroendokrinen Vesikel und die Chromogranine, die in den großen neuroendokrinen Granula vorkommen.

Synaptophysin, das häufigste Protein synaptischer Vesikel, reguliert die Kinetik der vesikulären Endozytose in Neuronen. Es besteht aus vier Transmembrandomänen mit einem langen Carboxyterminalen und einem kurzen Amino-terminalen Ende, wobei seine hexamere Struktur ähnlich der von Konnexonen vermutlich als Kanal dient und die starke Membrankrümmung der kleinen Vesikel begünstigt [22, 23]. Obwohl es das häufigste Protein der SSV darstellt, ist bisher jedoch wenig über die Funktion des etwa 38 kDa großen Proteins und die Bedeutung seiner posttranslationalen Modifikationen, wie N-Glykosylierung und Phosphorylierung, bekannt [23].





Chromogranin A kommt in der Matrix neuroendokriner Granula und im Golgi-Komplex vor [26] und ist ein saures Protein aus 439 Aminosäuren. Das humane *CgA* Gen, das sich auf Chromosom 14 befindet, umspannt etwa 12 kb und besteht aus 8 Exons. Die molekulare Masse von Chromogranin A beträgt etwa 50 kDa [27]. Chromogranin A hat zahlreiche zelluläre Funktionen. Es fördert beispielsweise die Bildung sekretorischer Granula, reguliert die Kalzium-Homöostase durch Sequestrierung und bildet die Vorstufe verschiedener Neuropeptide wie Vasostatins 1 und 2, Chromofungin, Chromacin, Pancreastatin, Catestatin, WE14, Chromostatin, GE25, Parastatin und Serpinin [27]. Interessanterweise zeigen die verschiedenen Peptidfragmente von Chromogranin A teilweise unterschiedliche Wirkungen auf maligne Mechanismen. So hemmt Vasostatin beispielsweise die VEGF-induzierte Endothelzellrekrutierung, während Catestatin die Angiogenese fördert [28, 29].

Sowohl Synaptophysin als auch Chromogranin A dienen in der Diagnostik gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren als Biomarker, wobei Synaptophysin in erster Linie histopathologisch eingesetzt wird und sich Chromogranin A für immunologische Nachweise sowohl aus Geweben als auch aus Serum eignet. Deshalb wird Chromogranin A auch zum Monitoring der therapeutischen Antwort in klinischen Studien eingesetzt [30, 31]. Weitere Biomarker, die auf den neuroiden Eigenschaften neuroendokriner Tumoren basieren, sind die neuronenspezifische Enolase (NSE), protein gene product 9.5 (PGP 9.5), die vesikulären Monoamintransporter (VMAT1 and VMAT2), neuroendocrine secretory protein 55 (NESP55), synaptic vesicle protein 2 (SV2) und neural cell adhesion molecule (N-CAM) [30].

1.1.5 Molekulare Pathologie und Signaltransduktion

1.1.5.1 Vorbemerkung

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien zeichnen sich durch ein stark aktiviertes Wachstumsfaktor-*Signaling* mit einer Vielzahl an Cross-Aktivierungen zwischen den kanonischen Signaltransduktionswegen – bei bisher nur wenigen bekannten Treibermutationen – aus. Durch die Expression von Somatostatin-Rezeptoren werden diese Signalwege zusätzlich moduliert. Obwohl das Wachstumsfaktor-*Signaling* nicht primär im Fokus dieser Arbeit liegt, beeinflusst es die MDM2-p53-FOXM1-Achse und somit zelluläre Entscheidungen in Bezug auf Induktion von Stressmechanismen und Überleben. Deshalb können Fragestellungen zur komplexen Signaltransduktion in GEP-NEN nicht gänzlich losgelöst von diesem Kontext untersucht werden und sollen deshalb auch in die Einleitung einfließen.

1.1.5.2 Wachstumsfaktor-abhängige Signaltransduktion

Sowohl pankreatische als auch gastrointestinale NEN weisen eine starke Expression von VEGF, bFGF, TGF- α und- β PDGF, IGF1, EGF, HGF und ihrer korrespondierenden Rezeptoren auf [32]. Als Folge zeigen sie ein ausgeprägtes autokrines Wachstumsfaktor-*Signaling* und pro-angiogenetisches Verhalten. Verschiedene Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind in der Vergangenheit auf ihre Expression in GEP-NEN untersucht worden [24, 33-43].

Diese weitestgehend pathologischen Studien geben jedoch wenig Aufschluss über maligne Mechanismen, da die meisten von ihnen deskriptiver Natur sind und vielmehr dazu dienten, mögliche Zielstrukturen für Inhibitoren oder monoklonale Antikörpertherapien zu identifizieren. In diesem Zusammenhang sind auch eine Reihe von RTK auf therapeutisch relevante (*"druggable"*) Mutationen untersucht worden. Neben Polymorphismen in *PDGFRA* und *EGFR* konnten u.a. Aneusomien in *EGFR* in GEP-NEN und *HER2* in pankreatischen NEN nachgewiesen werden [42, 43]. *HER2* Amplifikationen in gastrointestinalen NEN scheinen jedoch selten zu sein [42, 44]. Generell kann nach heutiger Datenlage der Schluss gezogen werden, dass gängige aktivierende Mutationen in Wachstumsfaktorrezeptoren in gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren selten sind [45-48]. Nicht nur auf der extrazellulären Seite zeigt ein Großteil der GEP-NEN Merkmale eines verstärkten Wachstumsfaktor- und Nährstoff-*Signalings*, auch konsekutive Signalwege, wie der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Signalweg, zeigen eine verstärkte Aktivierung [3, 49-51].

Der PI3K-Weg übermittelt extrazelluläre Signale von Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und reguliert fundamentale zelluläre Prozesse wie Überleben, Proteinsynthese und Motilität in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen und der Energie- und Nährstoffversorgung.

In verschiedenen Studien ist nach genetischen Ursachen für die Hyperaktivierung des PI3K-Weges in pankreatischen und intestinalen neuroendokrinen Tumoren geforscht worden. Neben den hereditären Formen neuroendokriner Tumoren, in denen durch Mutationen in *NF1* oder *TSC1/2* direkt negative Regulatoren des PI3K-Weges beeinträchtigt werden, sind in sporadischen pankreatischen NEN einige Mutationen in Mediatoren des Signalweges nachgewiesen worden, die insgesamt in etwa 15 % der analysierten Tumoren vorkamen [46]. Interessanterweise folgten die Mutationen einem vollkommen anderen Muster als die der ebenfalls analysierten duktalen Pankreas-Adenokarzinome, was den unterschiedlichen Ursprung der Entitäten unterstreicht. Für sich gesehen sind Mutationen in den bisher untersuchten PI3K *Pathway*-Genen mit 1,4 % in *PIK3CA*, 7,3 % in *PTEN* und 8,8 % in *TSC2* jedoch verhältnismäßig selten [46]. Mittels LOH-Analysen und vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) konnten zudem in einem Teil der pankreatischen NEN ein Verlust der Heterozygotie (LOH) und Chromosomenverluste in 10 q und 16 p (kodieren u.a. die Tumorsupressoren *PTEN* bzw. *TSC2*) [52-55] nachgewiesen werden.

Außerdem scheinen bisher wenig untersuchte zusätzliche epigenetische und posttranslationale regulatorische Effekte eine Rolle zu spielen, die hier zu einem Phänotyp mit aktiviertem mTOR *Signaling* führen. Beispielsweise konnten Roldo et *al.* anhand spezifischer Muster der miRNA Expression zeigen, dass die MicroRNA-21 in metastatischen pankreatischen G2 und G3 Tumoren stark exprimiert ist [56]. Diese *non-coding* RNA wird auch mit der Regulation von *PTEN* in Verbindung gebracht und kann zudem in TSC2-defizienten Zellen durch mTOR Inhibition induziert werden [57-61], was möglicherweise eine Rolle in der Therapieresistenz spielen könnte.

Der PI3K-Signalweg beeinflusst die Aktivität von p53. Durch AKT vermittelte Phosphorylierungen an Konsensus-Sequenzen in MDM2 wird dessen Translokation in den Zellkern stimuliert, wo es p53 ubiquitinylieren und somit dessen Degradation induzieren kann. Dieser Prozess kann durch PTEN inhibiert werden [62-64]. Die verminderte Expression von PTEN in etwa 60 % der untersuchten Tumoren [65] kann daher als eine Möglichkeit der p53 Inaktivierung in GEP-NEN angesehen werden.

Ebenso selten wie Mutationen im PI3K-Weg treten bei GEP-NEN bekannte aktivierende Mutationen in Genen der MAPK-Wege, wie *KRAS*, *BRAF* oder *ERK* auf [46, 66, 67]. Wildtyp (wt) MAPK-Kaskaden haben jedoch einige regulatorische Besonderheiten, beispielsweise induziert die ATP-kompetitive Inhibition von Wildtyp RAF eine paradoxe Aktivierung von MEK und ERK. Dieser Effekt zeigt sich auch bei neuroendokrinen Tumoren, *in vitro* allerdings mit einer antiproliferativen und antisekretorischen Wirkung über Induktion von p21 und morphologische Umdifferenzierung [68-71]. Zudem wird die p21 Expression p53-abhängig durch ERK1 und ERK2 stimuliert [72]. Auch die stressinduzierte p38 MAPK triggert die Stabilität und Aktivität von p53 mittels Phosphorylierung [73, 74].

Während die Inaktivierung von wt BRAF eine paradoxe Aktivierung des MAPK-Weges in endokrinen Zellen induziert, scheint die Aktivierung von BRAF, z.B. über KRAS, die nachfolgende Signaltransduktion Menin- und RASSF1A-abhängig zu inhibieren [75]. LOH des *MEN1* Genlokus sind jedoch häufig in pankreatischen neuroendokrinen Tumoren zu finden, und Methylierungen der *RASSF1A* Promotorregion scheinen in pankreatischen und intestinalen NEN mit Progression in Verbindung zu stehen [16, 76-78].

Die Komplexität der Signaltransduktion erhöht sich zudem durch die Tatsache, dass der MAPK-Weg an vielen Punkten mit dem PI3K-Weg interagiert [49, 79]. Daher kommt es bei therapeutischer Modulation des PI3K-Weges mittels Kinase-Inhibition häufig zu kompensatorischen *Cross-* Aktivierungen des MAPK-Weges und umgekehrt [80-82], die durch *Feedback-Loops* innerhalb des PI3K-Weges, z.B. nach mTOR Inhibition, noch verstärkt werden können [83, 84].

In verschiedenen Studien an neuroendokrinen Tumoren konnte nachgewiesen werden, dass sowohl in pankreatischen als auch in intestinalen NEN die neuroendokrine Markerexpression und die Sekretion sowohl durch ERK als auch durch den PI3K-Weg getriggert werden [85-88] und entsprechend auch durch die inhibitorische Somatostatin-abhängige Signaltransduktion modulierbar sind. Diese funktionelle Verknüpfung unterstützt ebenfalls die These der Konvergenz beider Signalwege in GEP-NEN. Zielgerichtete therapeutische Ansätze von wt BRAF-Tumoren bedürfen somit einer genauen Charakterisierung des molekularen Kontextes, um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden.

Zusammengefasst stellt der PI3K-Weg vor allem in pankreatischen GEP-NEN aufgrund seiner häufig starken Aktivierung und seiner Verknüpfung mit der p53 Aktivität ein valides Therapieziel dar. Verluste der Tumorsuppressoren MEN1, PTEN und TSC1/2 kommen in diesen Läsionen häufig vor. Therapeutisch angreifbare, *"druggable"* Mutationen sind jedoch derzeit in diesem Kontext nicht bekannt und generell sind Mutationen selten. Entsprechend kommen für pankreatische NEN Kinase-Inhibitoren palliativ zum Einsatz (vgl. Abschnitt 1.1.6). Die Komplexität des PI3K-abhängigen Netzwerkes und die vielfältigen Kreuzreaktionen mit anderen Signalwegen machen die bisherigen therapeutischen Ansätze, zumindest im Falle von Monotherapien, jedoch anfällig für kompensatorische Effekte und Resistenzentwicklung. Hier liegt ein großes Potential darin, mit dualen bzw. multiplen Inhibitoren kompensatorische Effekte einzudämmen. Außerdem ist es notwendig, Marker zu finden, die eine valide prädiktive Aussage über eine Therapieantwort zulassen.

1.1.5.3 Das p53 Netzwerk in GEP-NEN

Der Tumorsuppressor p53 ist ein Schlüsselregulator der zellulären Stressantwort. Er induziert verschiedenste Reparaturmechanismen, Apoptose und Zellzyklusarrest, zeigt aber unter bestimmten Umständen auch bedeutende antiapoptotische oder proangiogenetische Aktivität, die in einem therapeutischen Ansatz Beachtung finden sollten [89, 90]. In dieser Arbeit sollen neben p53, auch zwei weitere Proteine aus dem p53 Netzwerk, die p53 regulierende E3 Ubiqutin-Ligase MDM2 und ein transkriptionelles Zielprotein von p53, der Transkriptionsfaktor FOXM1, als Zielstrukturen für molekulare Therapien untersucht werden.

Aufgrund seiner generellen onkologischen Bedeutung wurde p53 bereits mehrfach im Kontext gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren untersucht. Mutationen in *TP53* finden sich in gut differenzierten GEP-NEN sehr selten, während schlecht differenzierte Tumoren häufig Mutationen aufweisen [17, 18, 91-94]. Interessanterweise konnte in schlecht differenzierten duktalen Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinien eine neuroendokrine Differenzierung durch stabile Re-Expression von p53 *in vitro* induziert werden [95]. Diese Studien könnten ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Wildtyp Tumorsuppressoren für die Aufrechterhaltung des niedrig-malignen Phänotyps bei GEP-NEN sein. Dennoch finden sich zahlreiche regulatorische, genetische und epigenetische Aberrationen *upstream* und *downstream* von p53, die mögliche Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien, aber auch für kombinatorische Behandlungen mit Chemotherapie und *targeted therapy* bieten. Eine ausführliche Erörterung zur möglichen therapeutischen Rolle des p53 Netzwerkes in GEP-NEN wurde bereits als *Review* veröffentlicht und findet sich zur Begutachtung im Anhang (vgl. Anhang 1).

Die Aktivität von p53 wird von einer Vielzahl an Proteinen reguliert (vgl. Abbildung 1-3). Ein direkter Inhibitor, die E3 Ubiquitin-Ligase MDM2, die durch Bindung an HAUSP und DAXX stabilisiert und durch p53 in einem autoregulatorischen Loop induziert wird, triggert den nukleären Export und die proteasomale Degradation von p53 [96, 97]. Sowohl MDM2 als auch die Deubiquitinase HAUSP und DAXX können durch den Tumorsuppressor ATM phosphoryliert und inaktiviert werden [98-101]. Die Phosphatase WIP1 wiederum kehrt diesen Prozess durch Dephosphorylierung um [101, 102].

29

Eine Vielzahl von direkten und indirekten Regulatoren der MDM2-p53-FOXM1-Achse ist in GEP-NEN dereguliert. Die auffälligsten Veränderungen in GEP-NEN *upstream* von p53 sind der Verlust der positiven Regulatoren ATM und p14ARF [103-107] und die Überexpression der negativen Regulatoren MDM2, MDMX und WIP1 aufgrund genetischer Amplifikationen [108]. Zudem gibt es weitere Aktivierungsmechanismen für MDM2 in GEP-NEN wie die Inaktivierung von RASSF1A [76, 77, 109], das die Auto-Ubiquitinylierung von MDM2 triggert. Außerdem kann die p53 Aktivität durch starke AKT Aktivierung MDM2-abhängig inhibiert werden [110-112] (vgl. Abbildung 1-3).



Abbildung 1-3: Möglicher Einfluss von in GEP-NEN deregulierten Signalproteinen auf die p53 und FOXM1-Aktivität

Blaue Pfeile markieren die spezifische Deregulation in GEP-NEN. Quellen: Feng et *al.* 2004 [111], Meulmeester et *al.* 2005 [98], Tang et *al.* 2006 [96], Sheeram et *al.* 2006 [102], Lu et *al.* 2007 [113], Song et *al.* 2008 [109], Tang et *al.* 2010 [97], Millour et *al.* 2011 [114], Khoronenkova et *al.* 2012-1/2 [99, 100], Zhang et *al.* 2013 [115], Brazina et *al.* 2014 [101].

Dass p53 infolge dieser Aberrationen funktionell beeinflusst wird, lässt die große Anzahl an p53 *Targets*, die in GEP-NEN dereguliert sind, vermuten. Diese umfassen u.a. Angiogenese-Regulatoren wie Cyclooxygenase 2 (COX2; gleichzeitig ein *Feedback*-Regulator von p53 [116]) oder VEGF, Wachstumsfaktorrezeptoren wie HER2, die *frühen* Transkriptionsfaktoren c-myc und c-jun, Apoptose-Regulatoren wie Bcl-2, Zellzyklus-Regulatoren wie p21 und p27 und Mitose-assoziierte Proteine wie
Aurora-Kinasen (ebenfalls involviert in eine regulatorische Schleife [117]) und Survivin [44, 93, 118-126].

Die klinische Rolle von p53 in GEP-NEN wird zudem im Zusammenhang mit Chemotherapie deutlich: Das p53 Zielprotein MGMT [127], eine Methyltransferase, die DNA Addukte an der O⁶ Position von Guanin repariert, wird derzeit als prädiktiver Marker für die Sensitivität gegenüber Temozolomide in pankreatischen NEN evaluiert [128, 129]. MGMT wird nicht nur durch p53 destabilisiert, sondern reguliert auch die Expression des Mitoseproteins und Apoptoseinhibitors Survivin, das einen bedeutenden Einfluss auf die Progression von GEP-NEN hat [121, 130]. Ein weiteres p53 Zielprotein, FOXM1 (vgl. Abschnitt 1.2), ist ebenfalls sowohl in die Regulation von Survivin als auch in die Resistenz gegenüber alkylierender Chemotherapie involviert [131, 132] und soll in dieser Arbeit näher betrachtet werden.

1.1.5.4 Chromosomale Instabilität und Epigenetik

Mutationen in bekannten Tumorsuppressoren oder Onkogenen selten in sind gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren. Auch p53 ist selten mutiert. Es tritt dennoch eine Reihe von Aberrationen auf, die im Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität stehen. Mittels CGH Analysen sind chromosomale Verluste vor allem in den Chromosomen 9, 11, 16 und 18 und Zugewinn in den Chromosomen 4, 5, 17 und 19 nachgewiesen worden [133-137]. Zudem treten in pankreatischen NEN häufig Aneuploidien auf [135, 138]. Aberrationen in Chromosom 1, 11q und 9q werden als frühe Aberrationen diskutiert, während Veränderungen in Chromosom 4, 5 und 16 mit Progression assoziiert zu sein scheinen [133, 134, 139].

Welche Gene konkret betroffen sind, ist bisher nicht detailliert untersucht worden, dennoch können aus Studien zu chromosomalen Aberrationen und Anomalien in der Expression von Proteinen in GEP-NEN durchaus Rückschlüsse auf Zusammenhänge mit aberranter Proteinexpression gezogen werden (vgl. Tabelle 1-2). Vor allem in Bezug auf mögliche therapeutische Strategien ist es durchaus relevant, ob ein Gen durch chromosomale Deletion verloren ging, oder beispielsweise durch epigenetische Veränderungen dereguliert wurde, aber immer noch vorhanden ist. In der vorliegenden Tabelle wurden die bisherigen Untersuchungen zu zytogenetischen Veränderungen bei GEP-NEN zusammengefasst und bekannten Aberrationen auf Proteinebene gegenüber gestellt (Tabelle 1-2). Wegen der geringen Anzahl bisher dazu vorliegender Studien kann ein gewisser Bias bei der Analyse häufiger chromosomaler Aberration jedoch nicht ausgeschlossen werden, vor allem aufgrund der Tatsache, dass zwei der sechs großen CGH-Studien mit Geweben des Karolinska-Institutes in Stockholm durchgeführt worden sind [134, 136]. Außerdem kann bei der Seltenheit der Tumoren auch bei den beiden deutschen Studien eine Kooperation in der Proben-Akquise angenommen oder zumindest aus den Angaben der Veröffentlichungen nicht explizit ausgeschlossen werden [135, 137]. Auch fällt auf, dass die Tumoren nicht nur im Vergleich der Studien oder Entitäten, sondern auch in sich sehr heterogen sind. Daher sind die wenigen Übereinstimmungen zwischen den Studien möglicherweise sehr stark durch Faktoren wie Geografie und Kooperation der Studienzentren geprägt, und die Tabelle 1-2 ist dementsprechend vorsichtig zu beurteilen. Zudem lässt die Heterogenität der chromosomalen Aberrationen den Schluss zu, dass genetische Instabilität vielmehr eine Folge der Tumorgenese-Mechanismen bei GEP-NEN ist als deren Auslöser.

Chromosomale		Untersuchte		
Aberration in GEP-NEN		Entitäten	Beschriebene Anomalien in GEP-NEN	
1p ⁻	[133, 135]	p-NEN, GEP-NEN		
4 ⁺ , 4p ⁺ , 4q ⁺	[134-136]	p-NEN, gi-NEN	4p14-qter: PDGFR2 [43], c-KIT [48], bFGF [34]	
			4p15-pter: FGFR3 [140]	
5⁺, 5q⁺	[54, 133-	p-NEN, gi-NEN,	5q: PI3K p85 Untereinheit, PDGFR1 [33], FGFR4 [140]	
	136]	GEP-NEN		
7⁺, 7p⁺	[54, 133,	p-NEN, GEP-NEN	7p: EGFR [42, 43], PDGF Untereinheit A [33, 34]	
	137]			
9p ⁻	[136]	gi-NEN	9p: p16INK4a/p14ARF [16, 103], Methylthioadenosine	
			Phosphorylase [141]	
9q⁺	[54, 137]	p-NEN	9q34: NOTCH1 [142], TSC1 [143]	
11q ⁻	[54, 133,	gi-NEN, p-NEN,	11q11-13: MEN1 [144], Phospholipase C [145]	
	134, 136]	GEP-NEN	11q21-23: ATM [106, 107]	
16p⁻, 16q ⁻ [133, 134, gi-NEN, GEP-NEN 16p: TSC2 [143]		16p: TSC2 [143]		
	136]		16q: E-Cadherin [146]	
17p ⁺ , 17q ⁺	[54, 133,	p-NEN, GEP-NEN	17p: Aurora Kinase B [125]	
	135, 137]		17q: NF1 [147], miRNA-21 [56], WIP1 [108], Survivin [121]	
18p ⁻ , 18q ⁻	[133-136]	gi-NEN, GEP-NEN	18q: Elongin A3 [148]	
19⁺, 19p⁺	[134, 135]	gi-NEN, GEP-NEN	9p: DNMT1 [149]	
20 ⁺ , 20p ⁺ ,	[54, 134-	gi-NEN, GEP-NEN	20q: DNMT3B [149], Aurora Kinase A [125], Stathmin	
20q⁺	136]		[150], SRC [151]	

Tabelle 1-2: Häufige zytogenetische Veränderungen in GEP-NEN und mögliche betroffene Genloci Die mittels CGH Analysen ermittelten häufigsten chromosomalen Aberrationen in GEP-NEN verdeutlichen die Heterogenität und chromosomale Instabilität der Tumoren und stehen in einem möglichen Zusammenhang mit bekannten Anomalien in GEP-NEN (Abkürzungen: Verlust: - ; Zugewinn: + ; pankreatische NEN: p-NEN; gastrointestinale NEN: gi-NEN).

Die Ursachen für die chromosomale Instabilität von pankreatischen NEN finden sich vermutlich im erhöhten Auftreten von *DAXX/ATRX* und *MEN1* Mutationen und einem daraus resultierenden veränderten *Chromatin Remodeling* bzw. einem *alternative lengthening of telomeres* (ALT) Phenotyp [46, 152-154]. Dieser ist mit Telomerase-unabhängigen Telomer-Veränderungen und -Rekombination verbunden, wobei heterogene Telomerlängen zu chromosomaler Instabilität führen [155]. Die

Rückschlüsse auf die Folgen von Mutation und Verlust von DAXX und ATRX sind im klinischen Kontext pankreatischer neuroendokriner Tumoren bisher sehr heterogen. Auf der einen Seite sind Mutationen in *DAXX/ATRX* mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht worden [46], auf der anderen Seite zeigen andere Autoren das genaue Gegenteil auf [153]. DAXX und ATRX sind neben ihrer Funktion als *chromatin remodelling* Proteine und Repressoren einer ALT Induktion auch in die Regulation von MDM2- und p53-abhängige Signaltransduktion involviert sind [96, 156] (vgl. Abschnitt 1.1.5.3). Daher wird die Rolle von *DAXX/ATRX* Mutationen in GEP-NEN im Kontext mit ihren Regulatoren, z.B. RASSF1A oder ATM, und der Expression weiterer Schlüsselproteine für chromosomale Instabilität wie Survivin oder Aurora Kinasen, die in GEP-NEN bereits beschrieben wurden [121, 125], zu analysieren sein.

Epigenetische Aberrationen sind im Gegensatz zu Mutationen häufig in gastroenteropankreatischen Tumoren zu finden. Die Inaktivierung des Tumorsuppressors RASSF1A aufgrund Promoter-Hypermethylierung ist dabei die häufigste Veränderung in pankreatischen NEN [157]. Ebenfalls sehr häufig tritt Promotermethylierung im *CDKN2A/p16INK4A* Genlokus bei pankreatischen (außer Insulinoma) und extra-pankreatischen NEN auf [104, 157, 158]. Auch die Promotoren des Matrixmetalloproteinase- Inhibitors *TIMP3*, von *hMLH1*, *CDKN2A/p14ARF*, *CTNNB1* und *MGMT*, sind in NEN häufig stark methyliert [76-78, 104, 105, 157]. Damit sind mit dem *CDKN2A* Genlokus gleich zwei Tumorsuppressoren, p16INK4A und p14ARF, betroffen, die ihrerseits die Aktivität von Rb bzw. p53 regulieren. Im Gegensatz zur Hypermethylierung von CGIs verschiedenster Promoter wurde genomweit anhand repetitiver ALU und LINE Sequenzen eine erhöhte Hypomethylierung vor allem in nicht-pankreatischen NEN gegenüber Normalgewebe nachgewiesen [159, 160]. Die Aktivität von Retrotransposons kann jedoch ebenfalls die weitere Proteinexpression beeinflussen und chromosomale Instabilität fördern [161].

1.1.6 Aktuelle therapeutische Optionen

Die therapeutischen Optionen von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren unterscheiden sich erheblich in den einzelnen Subgruppen und Tumorgraden [10].

Jedoch haben alle GEP-NEN gemeinsam, dass es neben der chirurgischen Resektion bisher keine wirkungsvolle kurative Behandlung gibt. Die Richtlinien der wichtigsten neuroendokrinen Tumorgesellschaften NANETS, ENETS und ESMO empfehlen deshalb kurative, zytoreduktive Resektion für lokale Läsionen als auch palliative Resektion für fortgeschrittene Tumorstadien [6, 162-165].

Für hoch proliferative gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien und Karzinome wird ergänzend zur Resektion Chemotherapie empfohlen [6, 166]. Die meisten NEN proliferieren jedoch zu langsam für genotoxische Therapien und zeigen zudem molekulare Muster, die die Tumorzellen vielmehr darin unterstützen, medikamentös induzierte Schäden zu reparieren. Beispielsweise konnte in pankreatischen NEN gezeigt werden, dass MGMT das Ansprechen auf alkylierende Chemotherapie beeinflusst [127, 129]. Bisher existieren neben Ki67 jedoch nur wenige etablierte prädiktive Marker, die zur therapeutischen Entscheidung herangezogen werden können.

Aufgrund der schlechten Suszeptibilität gegenüber Chemotherapien sind GEP-NEN in den Fokus für mögliche molekulare zielgerichtete Therapien gerückt.

Für niedrig proliferative *midgut* NEN mit Somatostatin-Rezeptor-Expression wird beispielsweise die Therapie mit Somatostatin-Analoga wie Octreotide und Lanreotide empfohlen [6]. Diese lösen eine antiproliferative Signaltransduktion in Zellen mit Somatostatin-Rezeptor-Expression aus. Für progrediente, höher proliferative oder metastatische pankreatische NEN wird außerdem Peptid-Radiorezeptor-Therapie gegen Somatostatin-Rezeptoren angewendet. Dabei wird ein Somatostatin-Analogon an einen Radioliganden gekoppelt und den Patienten appliziert. Nach Bindung an den Rezeptor findet somit eine lokale Strahlentherapie direkt am Tumor statt.

Zudem wird das aktive Wachstumsfaktor-*Signaling* für therapeutische Zwecke benutzt. Der mTOR Inhibitor Everolimus und der Multikinase Inhibitor Sunitinib werden bereits seit 2011 für gut differenzierte progrediente pankreatische NEN eingesetzt. Seit Anfang 2016 ist Everolimus in den USA und der Europäischen Union auch für intestinale und Lungen-NEN zugelassen. Beide Therapien verlängern jedoch lediglich das progressionsfreie Überleben, eine Reduktion der Tumormasse wird sehr selten und ein kurativer Effekt wird nicht erzielt [167].

Auch bei GEP-NEN treten die klassischen Mechanismen für Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapien und *targeted therapy* auf, beispielsweise durch Internalisierung von Somatostatin-Rezeptoren, Aktivierung von alternativen Signalwegen, Interferenz mit DNA Reparaturmechanismen, chromosomale Instabilität und Mutation [82, 129, 153, 168, 169]. Hier liegen mögliche therapeutische Perspektiven in orthogonalen Kombinationstherapien, die nicht nur unterschiedliche *Targets* eines Signalweges, sondern aus gänzlich anderen Mechanismen wie DNA Reparatur oder der Tumor-Mikro-Umgebung mit einbeziehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es derzeit für GEP-NEN, besonders für gastrointestinale neuroendokrine Tumoren kaum kurative Möglichkeiten gibt, jedoch können die Schwere der Symptomatik und die Progression durch zielgerichtete Therapien beeinflusst werden.

1.2 Das Forkheadbox Protein M1

Der Transkriptionsfaktor Forkheadbox Protein M1 (FOXM1) reguliert Schlüsselmechanismen der Proliferation und gilt als einer der Hauptmediatoren der malignen Transformation und Kanzerogenese [170]. Neben seiner Bedeutung als früh in der Tumorinitiation verstärkt exprimiertes Protein spielt

FOXM1 in einer Vielzahl von Tumorentitäten ebenfalls in allen Stadien der Progression eine Rolle und trägt somit zur Ausbildung aller Merkmale von Krebs ("*Hallmarks of cancer"*) bei [171, 172].

Das humane *FOXM1* Gen besteht aus zehn Exons und codiert mindestens drei Isoformen durch alternatives Splicing (vgl. Abbildung 1-4). Die FOXM1A Isoform enthält ein fakultatives 15 Aminosäuren



Abbildung 1-4: Gen- und Molekülstruktur der drei humanen FOXM1 Isoformen Modifiziert nach Laoukili et *al.* 2008 [173]; weitere Quellen: Wierstra 2013 [174]. NRD=N-terminale regulatorische Domäne, FKH=Forkhead-Domäne, TAD=Transaktivierungs-Domäne.

langes A1 und ein 38 Aminosäuren umfassendes A2 Exon in der DNA Bindedomäne. FOXM1C enthält nur das zusätzliche Exon A1, während FOXM1B keines der beiden besitzt [174]. FOXM1 gehört zur Familie der Forkheadbox Transkriptionsfaktoren, die sich durch ein *forkhead* (auch *winged-helix*) Motiv in ihrer DNA Bindedomäne (DBD) auszeichnen. Diese konservierte Proteindomäne kommt typischerweise in Proteinen vor, die in frühe zelluläre Entwicklungsprozesse der Embryogenese involviert sind [175]. Alle Isoformen enthalten neben der DBD und der N-terminalen Repressor-Domäne (NRD) eine starke Transaktivierungsdomäne (TAD), doch nur FOXM1B und FOXM1C besitzen Transaktivierungsaktivität [176]. Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrer DNA Bindungsaffinität und ihrer posttranslationalen Regulation durch andere Proteine. In diesem Kontext weisen sie sowohl einige Unterschiede in der funktionellen Ausrichtung der nachfolgenden Signaltransduktion auf als auch in ihrem Expressionsmuster während des Zellzyklus [174]. Während die physiologische Funktion von FOXM1A weitestgehend unbekannt ist, dominieren FOXM1B und C das klassische Transaktivierungsmuster von FOXM1 in proliferierendem Gewebe und in Tumoren. Als Proliferations-assoziiertes Protein reguliert FOXM1 den G1/S und G2/M Übergang des Zellzyklus. Entsprechend zeigt auch das Expressionsmuster von FOXM1 die deutliche Signatur Proliferationsassoziierter Gene und findet sich ausschließlich in proliferierendem Gewebe. So wird FOXM1 positiv von Proto-Oncogenen wie c-MYC, AKT, HRAS, NRAS, EGFR, HER1, HER2, Notch1, c-MET, CyclinD1/CDK4 oder GLI1 reguliert [174, 177].

Die Repression von FOXM1 wird analog durch eine Vielzahl von Tumorsuppressoren getriggert. Zu ihnen gehören u.a. RB, PTEN, GATA3, p53 und verschiedene miRNAs [177]. Weitere wichtige Regulatoren von FOXM1 sind E2F1, ERK2, PLK1, p21 und FOXM1 selbst. Der Verlust der Funktion von Tumorsuppressoren und/oder die Aktivierung von Onkogenen – als typische Mechanismen der Kanzerogenese – führen daher in einer Vielzahl von Entitäten auch zur Aktivierung von FOXM1 [177]. Ebenso kann FOXM1 unabhängig der AKT-MDM2-p53-FOXM1-Achse direkt über ein Zielprotein des PI3K-Weges, das Forkheadbox Protein 3a (FOXO3a), inhibiert werden [178].

Es stellt damit in zwei getrennten, AKT nachgeschalteten Signalwegen einen engen Zusammenhang zwischen der Nährstoffversorgung der Zelle einerseits und dem Wachstum und Überleben auf der anderen Seite her (vgl. Abbildung 1-3).

FOXM1 reguliert neben einer Vielzahl Proliferations-assoziierter Gene auch verschiedene Mechanismen, die mit Progression in Verbindung stehen (vgl. Tabelle 1-3). So triggert FOXM1 VEGFabhängig einen angiogenetischen Switch [179] und fördert somit die Vaskularisierung des Tumors. Durch Induktion der Expression verschiedener ECM-modulierender Enzyme (z.B. Matrixmetalloproteinasen), Destabilisierung des Zytoskelletts (z.B. via Stathmin), Stimulation prämetastatischer Nischenbildung (durch Lysyl-Oxidase Expression) und Regulation des Tumorzell-Homings (via CXCR4 Chemokinrezeptoren) fördert FOXM1 Motilität, Invasion und Metastasierung [172, 180]. Außerdem trägt FOXM1 zur Induktion einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bei [180].

Der für diese Arbeit wichtigste Aspekt ist die Schlüsselrolle von FOXM1 in der Reparatur von DNA Schäden mittels Induktion von Proteinen, die DNA Schäden identifizieren, diese Information weiterleiten oder zur DNA Reparatur beitragen [132]. Beispielsweise wird die Zellzyklus Checkpunkt Kinase CHK1 durch FOXM1 aktiviert. Durch Regulation der DNA-Polymerase ε , RFC4, Exonuklease 1 oder XRCC1 und in seiner Funktion als Co-Faktor für die DNA Ligase III ist FOXM1 in die BER (*base excision repair*), NER (*nucleotide excision repair*) und die Reparatur von Einzelstrangbrüchen involviert. Ebenso beeinflusst FOXM1 die Transkriptions-gekoppelte NER und MMR (*mismatch repair*) via Regulation von BCRA2, MSH6 und Exonuklease 1. Durch Regulation von XRCC2, BRIP, RAD51, BRCA2, SKP2 wird auch die Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels HR (homologer Rekombination) und NHEJ (*non-homologous end joining*) und von kovalent-quervernetzten DNA Strängen (*interstrand crosslink repair*) gesteuert [132, 177]. Durch die positive Regulation von DNA Reparaturmechanismen trägt FOXM1 Überexpression somit maßgeblich zur Resistenzentwicklung gegenüber genotoxischen Chemotherapien bei.

		Regulation
Mechanismus	Genname	durch FOXM1
Angiogenese	CXCR4, VEGFA, VEGFR2	\uparrow
Zellzyklus und	AURKA, AURKB, BIRC5, CCNB1, CDC25B, SKP2, PLK1,	\uparrow
Proliferation	BUB1B, CENPA, PLK1, KIF20A, NEK2, CENPA, CENPB,	
	CENPF, CEP55, MYC, TOP2A, CDK1, CDC25B, CDC2, JNK1,	
	IGF1, NEDD4, CCND1, SKP2, CCNB1, CCNB2, CDK2, MCM3,	
	E2F1, ATF1, E2F5, LEF1, CDKN1A, GATA3	\checkmark
Migration und Invasion	LOX1, LOXL2, MMP2, MMP9, uPaR, ROCK1, RHOC, CXCR4	\uparrow
Seneszenz	BMI1	\uparrow
DNA damage response	BRCA2, XRCC1, BRIP1, CHEK1 ,EXO1, PLK4, RFC4, RAD51,	\uparrow
	POLE, XRCC2, FANC	
Therapie Resistenz	STMN1	\uparrow
EMT	CAV1, SNAI1, CTNNB1	\uparrow
	CDH1 (Isoform-spezifisch)	$\downarrow \uparrow$
Oxidativer Stress	CAT, SOD2	\uparrow
Signaltransduktion	AXIN2	\checkmark
	JNK1	\uparrow
Stammzellerneuerung	K15, OCT4, SOX2	\uparrow
und Differenzierung		
Tumorsuppression	GATA 3	\checkmark
Ubiquinylierung	NEDD4	\uparrow
Vaskuläre Reparatur	CTNNB1	\uparrow

Tabelle 1-3: In Tumor-Initiation, Progression und Therapieresistenz involvierte, FOXM1 abhängige Gene Modifiziert nach Lam et *al.* 2013 [181]; weitere Quellen: Park et *al.* 2011 [180], Wierstra 2013 [177], Zona et *al.* 2014 [132]. Die Liste umfasst eine Auswahl wichtiger, bisher bekannter Zielgene und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

1.3 Zelllinien und präklinische Modelle gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien

1.3.1 Zelllinien und Tumormodelle

Derzeit existieren wenige etablierte gastrointestinale humane neuroendokrine Tumorzelllinien: GOT1 (Ileum), KRJ-I (Ileum), P-STS (Ileum), L-STS (Lymphknoten Lebermetastase), H-STS (Ileum Lebermetastase), CNDT2 (Ileum-Metastase), LCC-18 und COLO320DM (Kolonkarzinome mit neuroendokriner Differenzierung) [182, 183]. Pankreatische humane NEN Zelllinien sind die gut

differenzierten BON und QGP-1 (beide aus Metastasen generiert) [183, 184]. Derzeit werden zudem drei neue Zelllinien im Labor unserer Kooperationspartner charakterisiert, NT-3 (Primärtumor) sowie NT-18P und NT-18LM, die aus einem pankreatischen Primärtumor und seiner Metastase generiert wurden (unveröffentlicht). Aus Mangel an pankreatischen NEN Zelllinien wird häufig auf Insulinoma-Linien (wie CM) zurückgegriffen, die allerdings eine Sonderstellung bei den pankreatischen NEN einnehmen, oder auf Äquivalente aus anderen Spezies (wie RIN oder INS1). Die im Jahr 2014 vorgestellten, schlecht differenzierten NEC-DUE1 und NEC-DUE2 Zelllinien (ebenfalls metastatisch), repräsentieren Metastasen von großzelligen Tumoren des Oesophagusübergangs und des Dickdarms [185].

Für gut differenzierte pankreatische neuroendokrine Tumoren existiert eine Reihe von gentechnisch modifizierten Insulinom- oder Glucagonom-Tiermodellen, die auf der Expression eines Onkogens (wie das *simian virus 40 large T* Antigen, MyrAKT1 oder Bcl-x_L) unter der Kontrolle des Insulin- oder des Preproglucagon Promoters basieren. Die am weitesten verbreiteten davon sind RIP-Tag Mäuse. Außerdem existieren einige weitere Mausmodelle mit heterozygotem *MEN1* oder homozygotem Glucagon Rezeptor *knockout*, die multiple endokrine Tumoren entwickeln [186]. Auf Seiten der gastrointestinalen NEN Modelle wurde in der afrikanischen Ratte Mastomys natalensis (Vielzitzenratte) und der japanischen Baumwollratte ein häufiges Auftreten von neuroendokrinen Tumoren des Magens beschrieben. Zudem kann durch Induktion von Hypergastrinämie und Hypoazidie in Mäusen die Bildung von Magen NEN stimuliert werden [187, 188]. Diese Modelle werden jedoch, u.a. aufgrund des unbekannten Genoms [4], praktisch kaum genutzt, weshalb es in den meisten Fällen zur Durchführung von verschiedenen Xenograft-Studien kommt. Der generelle Mangel an NEN Zelllinien sowie der Einfluss der Xenobarriere [183] sind die Hauptursachen für die begrenzte Verfügbarkeit auch an Xenograftmodellen.

1.3.2 Probleme präklinischer GEP-NEN Modelle

GEP-NEN sind seltene Tumoren, die sich durch ein langsames Wachstum und eine geringe Häufigkeit an Mutationen auszeichnen. Entsprechend gibt es derzeit nur eine sehr begrenzte Anzahl an GEP-NEN Zelllinien, und die wenigsten von ihnen sind ausführlich charakterisiert, dokumentiert und in Zellbanken hinterlegt. Zelllinien als präklinische *in vitro* Tumormodelle sollten jedoch charakteristische Tumoreigenschaften möglichst nah an der Realität, stabil und reproduzierbar widerspiegeln. Bei neuroendokrinen Tumoren bedeutet das:

- a. langsames Wachstum,
- b. die Expression neuroendokriner Marker,
- c. vergleichbare Aberrationen in der Signaltransduktion, beispielsweise Hyperaktivierung des PI3K-Weges,
- d. ein vergleichbares Muster/Fehlen von Mutationen, z.B. Wildtyp p53.

Um diese Eigenschaften *in vitro* stabil zu halten, sind standardisierte Kulturbedingungen, vor allem aufgrund der starken Abhängigkeit der GEP-NEN Signaltransduktion von der Nährstoffversorgung, unbedingt zu gewährleisten.

Auch der selektive Vorteil von Treibermutationen bei der *de novo* Generierung von Zelllinien hat beachtlichen Einfluss auf die Genetik der derzeitig verfügbaren Zelllinien. Das Kriterium der neuroendokrinen Marker-Expression reicht für ein gutes Modell zur Analyse von Signaltransduktionszusammenhängen und zielgerichteter Therapie jedoch nicht aus, da auch der genetische Kontext ein möglichst genaues Modell der Krebszelle wiedergeben sollte. Es schafft beispielweise keine wissenschaftliche Evidenz, wenn *in vitro* Untersuchungen zur p53-abhängigen Signaltransduktion einer Erkrankung, die sich durch wt p53 Expression auszeichnet, an *TP53* mutierten Zelllinien durchgeführt wird.

Fast alle GEP-NEN Zelllinien sind nicht in Zellbanken hinterlegt (Ausnahme: QGP-1 und COLO 320DM) und ein Großteil davon ist nur über Kooperationen zu erhalten. Aufgrund dieses eingeschränkten Zugangs sind GEP-NEN Zelllinien häufig nur noch in hohen Passagen, oder – infolge kompetitiver Interessenslagen - gar nicht zu erhalten. Viel problematischer ist jedoch die Tatsache, dass viele *in vitro* Daten, die mit seltenen GEP-NEN Zelllinien generiert worden sind, kaum reproduziert werden können (und sich somit auch der wissenschaftlichen Überprüfbarkeit entziehen), weil nur wenige Labore Zugang zu den Zelllinien haben. Deshalb soll in dieser Arbeit an weltweit etablierten Linien festgehalten werden, auch wenn frühe Passagen von BON und LCC-18 Zelllinien nicht mehr verfügbar sind. Die damit verbundenen Unzulänglichkeiten der verfügbaren Modelle müssen daher in die kritische Interpretation der Ergebnisse einfließen.

1.4 Wissenschaftliche Fragestellungen der Arbeit

Gut differenzierte gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren zeigen eine geringe Anzahl an Mutationen. Die häufigsten, Mutationen in DAXX oder ATRX, stehen im Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität und möglicherweise mit der Deregulation von MDM2 und p53. Durch chromosomale Instabilität treten in pankreatischen NEN zudem häufig Verluste von PTEN und TSC1/2, den negativen Regulatoren des PI3K-Weges auf. Dieser Signalweg ist in den meisten Tumoren stark überaktiviert und kann beispielsweise über die Kinase AKT zur weiteren Stabilisierung von MDM2 führen (vgl. Abschnitt 1.1.5). Der Tumorsuppressor p53 selbst ist in gut differenzierten GEP-NEN nur äußerst selten mutiert [78, 92, 93, 189]. Jedoch führt die Überexpression seiner negativen Regulatoren, u.a. aufgrund genetischer Amplifikation von MDM2, die starke Aktivierung des PI3K-Signalweges sowie der epigenetische Verlust von Aktivatoren zu einem möglichen funktionellen Verlust, der sich in einer Deregulation von direkten und indirekten p53 Zielgenen, wie beispielsweise *BIRC5* (Surivivin), widerspiegelt (vgl. Abschnitt 1.1.5.3). Die therapeutische Stabilisierung von Wildtyp p53 in GEP-NEN Tumorzellen mit dem Ziel einer tumorsuppressiven Wirkung scheint daher möglich.

Das p53 Zielprotein FOXM1 ist bisher in GEP-NEN nicht beschrieben worden. In neuroendokrinen Lungentumoren konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die FOXM1 Expression mit steigender Malignität der Subtypen erhöht [190]. Da es die Signale sowohl des PI3 Kinase-Weges als auch der MDM2-p53-Achse integriert und zur Aktivierung von Aurora Kinasen und Survivin, als Regulatoren der chromosomalen Stabilität, führt, könnte FOXM1 in GEP-NEN eine mögliche verknüpfende Rolle haben und sich somit als Marker und im besten Falle als therapeutisches Zielprotein eignen.

FOXM1 reguliert SKP2, welches als Teil des SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 Ubiquitin Ligase Komplexes den endogenen S-Phase CDK Inhibitor p27 destabilisiert, dessen Verlust widerum in NEN des Intestinums einen starken prognostischen Marker darstellt [93, 131, 191]. Zudem könnte die SKP2 Expression klinisch interessant sein, da dessen Dysregulation mit Rapalog-Resistenz in Verbindung gebracht wird [192].

Als stark mit Proliferation assoziiertes Protein, sollte FOXM1 auch in GEP-NEN mit steigendem Tumorgrad stärker exprimiert werden. Da es gleichzeitig in nicht proliferierendem Gewebe nicht vorkommt, stellt es zudem ein interessantes Ziel für molekulare Therapien dar. Leider sind direkte Inhibitoren von FOXM1 erst kürzlich beschrieben worden und daher bisher kaum erforscht.

Für gut differenzierte GEP-NEN, vor allem für den gastrointestinalen Subtyp, existieren bisher kaum kurative Therapien. Neben der Resektion stellen palliative Formen der Biotherapie mit Somatostatin-

Analoga, Peptid-Radiorezeptor-Therapie und Interferon sowie bei den pankreatischen NEN die zielgerichtete Therapie mit Kinase-Inhibitoren und teilweise Chemotherapie eine Möglichkeit zur Symptomkontrolle und temporären Verhinderung der Progression, aber nicht zur Heilung dar. Neue therapeutische Ansätze werden daher dringend benötigt. Da FOXM1, neben seiner Rolle im G2/M Übergang des Zellzyklus, verschiedene DNA Reparaturmechanismen kontrolliert, könnte seine Inhibition dazu beitragen, bereits etablierte genotoxische Therapien wie die Peptid-Radiorezeptor-Therapie und bestimmte Chemotherapieansätze in Kombination therapeutisch zu verstärken.

Die vorliegende Arbeit widmet sich daher der in der Präklinik üblichen *Proof of Principle* Analyse der möglichen therapeutischen und prognostischen Relevanz von MDM2, p53 und FOXM1 unter folgenden Fragestellungen:

- Kann durch Analyse von primärem Tumormaterial dargestellt werden, dass FOXM1 in einem klinisch relevanten Zusammenhang mit Malignitätsparametern (beispielsweise Grading oder Metastasierung) in GEP-NEN steht? Lassen sich diese klinischen Zusammenhänge auch für MDM2 bestätigen?
- Kann durch Modulation der MDM2 oder FOXM1 Expression *in vitro* Einfluss auf die Chemosensitivität von GEP-NEN Zellen genommen werden?
- Kann FOXM1 auch unabhängig von p53 durch MDM2 reguliert werden?
- Welche therapeutischen Optionen lassen sich daraus ableiten und wie effektiv sind diese *in vitro*?
- Welche Effekte haben die verschiedenen inhibitorischen Ansätze in GEP-NEN und welche mechanistischen Gemeinsamkeiten gibt es? Zeigen sie verstärkende Effekte bei der Kombination mit platin-basierter Chemotherapie?
- Eignet sich die MDM2-p53-FOXM1-Achse somit als antineoplastisches therapeutisches Ziel, und welche Abhängigkeiten ergeben sich in Bezug auf den Mutationsstatus von p53 *in vitro*?
 Welche untersuchten therapeutischen Ansätze eignen sich zur weiteren translationalen Analyse mit Blick auf welche Patientengruppen und sollten *in vivo* weiter evaluiert werden?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Geräte

Abzug	
Bioanalyzer	Agilent technologies
Chemilumineszenz-Detektor	Fujifilm Las 4000 Mini
Computer	
Cytospin-Zentrifuge	Shandon Cytospin 4 (Thermo Scientific)
Dampfkochtopf	
Dewargefäß	
Durchflusscytometer	FACSCalibur E 1973 (BD Biosciences)
Eismaschine	
Elektrophorese-Kammer	BioRad Mini-PROTEAN Tetra cell
Fluidics Station 450	Affymetrix
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axio-Imager Z1, Olympus BX60
Gelfärbeschalen	
GeneChipScanner 3000 G7	Affymetrix
Glasgeräte	
Heizrührer	
Hybridisierungsofen	Affymetrix
Ion Torrent PGM system	Thermo Fisher
Kühlschränke 4°C, -20°C, -80°C	
Kühlzentrifuge	
Labor-Feinwaage	
Laborglas	
Laborschüttler	
Laborwaage	
Laborwecker	
Lichtmikroskope	
Magnetrührstäbchen	
Mehrkanal-Pipetten	
Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan Sunrise
nCounter PrepStation	Nanostring [®] Technologies

	nCounter Scanner	Nanostring [®] Technologies
	Neubauerkammer	
	pH-Meter	
	Pinzetten	
	Pipetten, elektronisch	Eppendorf Xplorer [®] Pipette
	Pipetten, manuell	
	Pipettierhilfen	
	Real-Time PCR System 7900HT Fast	Applied Biosystems
	RT-PCR Maschine	StepOne (Thermo Fisher)
	Sequenzierer	Applied Biosystems ABI 3130 Genetic Analyzer
	Sonifikator	
	Spektrophotometer	Nanodrop 2000
	Sterilbank	
	Stickstofftank	
	Stromversorgungsgerät	
	Thermocycler	
	Thermometer	
	Tischzentrifuge	
	UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Sprectronic Genesys 6
	Vortexer	
	Wärmeschrank	
	Wasserbad	
	Western-Blot-Kammer	BioRad Mini-PROTEAN Tetra cell
	Zellkulturschrank	
	Zentrifuge für Mikrotiterplatten	
	Zentrifugen	
2	2.1.1.2 Verbrauchsmaterial	
	Autoklavierband	
	Bad Stabil	
	Beschriftungsband	
	Deckgläser	
	Descosept	
	FACS-Röhrchen	
	Faltenfilter	
	Färbeschalen	
	Gefrierröhrchen	

Handschuhe Human/Mouse/Rat Gene 1.0ST Array (Affymetrix) Klebeetiketten Küvetten, Einweg MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well PCR Reaction Plate, 0.1 mL (Thermo Fisher) **MICROLITER Spritze** Mikrotiter-Platten (6-Well, 96-Well) Nitrozellulose-Membran Amersham Protran Premium 0.45 (GE Healthcare) Objektträger (12-Well) Objektträger Super Frost Pipetten, Einweg Pipettenspitzen Reaktionsgefäße verschiedene Volumina Reservoirs Rotilabo Spritzenfilter Roti-Liquid Barrier Marker, rot SecurLine Lab Marker Skalpelle, Einweg Thick-Blot-Paper (BioRad) Vernichtungsbeutel Zellkulturflaschen

2.1.2 Puffer und Lösungen

Antikörper-Lösung für FACS

	1 % (w/v) BSA 0,1 % (v/v) Triton-X 100 Antikörper	
Antikörper-Lösung für	PBS	
Immunfluoreszenz	0,1 % (w/v) BSA	
	0,5 % (v/v) Triton-X 100	
	Antikörper	

PBS

Antikörper-Lösung	destilliertes Wasser
für Western Blot	1 x TBS-T
	5 % (w/v) BSA
	0,01 % (w/v) Natriumazid (nur für Primärantikörper)
	Antikörper

Blockpuffer 2 % für Immunfluoreszenz PBS 2 % (v/v) Magermilchpulver

Blockpuffer für Western Blot destilliertes Wasser 1 x TBS-T 5 % (w/v) Milchpulver Die fertige Lösung wurde filtriert.

Elektrophorese-Puffer (10 x)

destilliertes Wasser 2 M Glycin 0,25 M Tris 35 mM SDS

Gefriermedium

Zellkulturmedium 40 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO

Hypotonischer Puffer

20 mM HEPES Pufferlösung (pH 7,9) 10 mM KCl 10 % (v/v) Glycerol 1 mM EDTA 0,2 % (v/v) NP-40

frisch zugesetzt werden: Phosphotaseinhibitor-Mix PhosStop Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini (nach Herstellerangaben)

Lysepuffer NP-40	destilliertes Wasser
	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 % (v/v) NP-40
	frisch zugesetzt werden:
	Phosphotaseinhibitor-Mix PhosStop
	Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini
	(nach Herstellerangaben)
Ponceau S	destilliertes Wasser
Färbelösung (10 x)	2 % (w/v) Ponceau S
	30 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA)
	30 % (v/v) Sulfosalicylsäure
Propidiumiodid	1 x PBS
Färbelösung	20 µg/ml Propidiumiodid
	10 µg/ml Ribonuclease A
	Lösung frisch ansetzen
Protein-Ladepuffer (4 x)	destilliertes Wasser
	250 mM Tris (pH 6,8)
	40 % (v/v) Glycerol
	4 % (v/v) SDS 20 %
	Spatelspitze Bromphenolblau
	Vor dem Gebrauch 10 % an 2-Mercaptoethanol frisch
	zusetzen.
RIPA Puffer	destilliertes Wasser
	150 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl pH 8.0
	1 mM EDTA
	1 % (v/v) NP-40
	1 % (w/v) Natriumdesoxycholat
	0,1 % (w/v) SDS
	frisch zugesetzt werden:
	Phosphataseinhibitor-Mix PhosStop
	Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini
	(nach Herstellerangaben)

Sammelgelpuffer	destilliertes Wasser
	0,5 M Tris (pH 6,8)
Stripp-Puffer	destilliertes Wasser
	0,2 M Glycin
	1 % (v/v) SDS
	0,1 % (w/v) Tween 20
	рН 2,2
Synchronisationsmedium	Zellkulturmedium
	0,1 % (v/v) FBS
TBS (10 x)	destilliertes Wasser
	1,54 M NaCl
	1,3 M Tris
	рН 7,5
	Zur Herstellung von TBS-T der 1 x Lösung 1 % (v/v)
	Tween 20 zusetzen.
Transferpuffer (10 x)	destilliertes Wasser
	250 mM Tris
	2 M Glycin
	Der 1 x-Lösung werden 20 % Methanol frisch zugeben.
Transform	
Trenngelputter	destilliertes wasser
	2 M Tris (pH 8,0)
M/a a a b 1 % a a	DDC
waschlosung	
fur immuntiuoreszenz	0,1 % (W/V) BSA
	0,5 % (V/V) TritonX100
Zitratauffor 0.1 M	DDC
	r r r r r r r r r r
	0,5 /λ (ν/ν) ΠΙΟΠ Λ 1 % (ν/ν) BSA
	1 / 0 (A/V) DJA 0.2 % (M/V) Zitroponsäure
	$N_2 \cap (w/v)$ zittoriensaure

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

2.1.3.1 Chemikalien

Aceton

Acrylamide 40 %/ Bis Lösung 19:1 (5 % crosslinker) (Bio Rad) Ammoniumperoxodisulfat (APS) Ampuwa Spüllösung Aqua ad inject BluEye Prestained Protein Marker (FT) (Jena Bioscience) Bradford Reagenz Quick Start (BioRad) Bromphenolblau BSA Albumin Fraktion V (>98 %) (Carl Roth) CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) (Abcam Biochemicals) Descosept destilliertes Wasser Dinatriumhydrogenphosphat DMSO, steril ECL-Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) EDTA Essigsäure Ethanol (70 %) Ethanol (96 %) FBS steril Filterpapier Glycerol Glycin HEPES 1 M JC-1 (5,5,6,6-Tetrachlor-1,1,3,3-Tetramethyl Benzimidazolyl Carbocyanine iodid) (AAT Bioquest) Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Magermilchpulver 2-Mercaptoethanol Methanol Natriumazid Natriumchlorid Natriumdesoxycholat Natriumhydroxid fest

Natriumhydroxid flüssig N-Ethylmaleimide Noninet P 40 (NP-40) Ponceau S Propidiumiodid 1 mg/ml (Invitrogen) Roti-Mount Fluor Care DAPI (Carl Roth) Salzsäure 1 M Salzsäure 1 M Salzsäure, konzentriert SDS ultra pure für Elektrophorese Sulfosalicylsäure Tetramethylethylendiamin (TEMED) Trichloressigsäure Tris (neu) Triton X 100 Tween[®] 20

2.1.3.2 Enzyme

Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease	
DNase I peqGOLD	Peqlab
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich
Uracil DNA Glycosylase (UDG)	

2.1.3.3 Therapeutika und Compounds

Bortezomib (Velcade®)	Janssen-Cilag (Bezug über Charité Apotheke)	
bpV(HOpic)	Calbiochem	
Cisplatin	TEVA Generics GmbH (Bezug über Charité Apotheke)	
Everolimus (RAD001)	Cell Signaling	
LY294002	Santa Cruz	
Nutlin-3	Santa Cruz Biotech	
Nutlin-3a	Selleck Chemicals Co.	
Siomycin A, Streptomyces sioyaensis	Sigma-Aldrich	
Temozolomide	Santa Cruz	
Thiostrepton	Santa Cruz	
Triciribinhydrat	Sigma-Aldrich	

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Akt (11E7)	Cell Signaling	1:1000 WB
Aktin (pan)	Cell Signaling	1:1000 WB
α-Aktin	Santa Cruz Biotech	1:1000 WB
β-Aktin	Sigma	1:1000 WB
Aurora A	Abcam	1:1000 WB
Aurora B	Abcam	1:1000 WB
ВАХ	Cell Signaling	1:1000 WB
BID	Cell Signaling	1:1000 WB
BRCA1	Santa Cruz	1:200 WB
BRCA2	Santa Cruz	1:200 WB
Caspase 6	Cell Signaling	1:1000 WB
Caspase 8	Cell Signaling	1:1000 WB
Caspase 9	Cell Signaling	1:1000 WB
Chromogranin A (klon LK2H10)	Progen	1:10 IF
CK2	Cell Signaling	1:1000 WB
CXCR4	Novus	1:5000 WB
Cyclin A2	Cell Signaling	1:1000 WB
Cyclin D2	Cell Signaling	1:1000 WB
Cytokeratin	BMA Biomedicals	1:200 IF
E2F1	Cell Signaling	1:1000 WB
FADD	BD Biosciences	1:1000 WB
FANCC	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
FEN1	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
FOXC2	sigma	1:1000 WB
FOXM1 (C-20)	Santa Cruz Biotech	1:500 WB; 1:50 IF
FOXM1 (D12D5)	Cell Signalin	1:1000 WB
FOXM1 (G-5)	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
FOXM1 (H-300)	Santa Cruz Biotech	1:100 IHC
FOXO1 (C29H4) Rabbit mAb	Cell Signaling	1:1000 WB
FOXO3a (75D8)	Cell Signaling	1:1000 WB
GAPDH	GeneTex	1:1000 WB
Histon H3 (3H1)	Cell Signaling	1:1000 WB
Lamin A/C	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
MDM2 (SMP-14)	Santa Cruz Biotech	1:500 WB; 1:50 IF
MMP1	R&D Systems	1:50 IF
MMP2 (42-5D11)	Calbiochem	1:50 IF
MMP9	Cell Signaling	1:1000 WB
mTOR	Cell Signaling	1:1000 WB
p15/p16 (H-43)	Santa Cruz Biotech	1:1000 WB
p21 (C19)	Santa Cruz Biotech	1:500 WB
p27	Cell Signaling	1:1000 WB
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling	1:200 WB
p53	Cell Signaling	1:1000 WB

p70S6 Kinase (49D7)	Cell Signaling	1:1000 WB
PARP	Cell Signaling	1:1000 WB
PCNA	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP®	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-AKT (Thr308)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-FOXM1(Ser35)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-FOXO1 (Thr24)/FOXO3a (Thr32)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-Histon H2AX	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-Histon H3 (Ser10) (D2C8) XP	Cell Signaling	1:1000 WB; 1:1600 FACS
Phospho-MDM2(Ser166)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-p53 (Ser20)	Cell Signaling	1:1000 WB
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2)	Cell Signaling	1:1000 WB
phospho-PTEN (Thr366/S370)	GeneTex	1:1000 WB
Phospho-Rb (Ser780)	Cell Signaling	1:1000 WB
PTEN (138G6)	Cell Signaling	1:1000 WB
PUMA	Cell Signaling	1:1000 WB
RAD51	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
Rb	Cell Signaling	1:1000 WB
Rb	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
RCF4	Santa Cruz Biotech	1:200 WB
SKP2	Cell Signaling	1:1000 WB
STAT3	BD Biosciences	1:2500 WB; 1:100 IHC
Survivin	Abcam	1:5000 WB
Synaptophysin	Biogenex	1:10 IF
Syntaxin	Santa Cruz Biotech	1:50 IF
TRADD	BD Biosciences	1:1000 WB
α-Tubulin	genetex	1:1000 WB
β-Tubulin	Sigma Aldrich	1:1000 WB
Vinculin	Cell Signaling	1:1000 WB
VMAT 1 (N-19)	Santa Cruz Biotech	1:50 IF

Tabelle 2-1: Verwendete Primär-Antikörper

Die eingesetzten Verdünnungen sind angeben für WB=Western Blot, IF=Immunfluoreszenz, IHC=Immunhistochemie und FACS=Durchflusszytometrie.

Antikörper	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse	Invitrogen	1:200 IF
Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit	Invitrogen	1:200 IF und 1:500 FACS
Alexa Fluor 594 Goat anti-mouse	Invitrogen	1:200 IF
Anti-mouse IgG HRP-linked	Dako Cytomation	1:2000 WB
Anti-rabbit IgG HRP-linked	Dako Cytomation	1:1000 WB

Tabelle 2-2: Verwendete Sekundär-Antikörper

Die eingesetzten Verdünnungen sind angeben für WB=Western Blot, IF=Immunfluoreszenz und FACS=Durchflusszytometrie.

2.1.5 Medien und Reagenzien zur Zellkultur

Accutase steril	PAA
Dulbecco's MEM high Glucose, with stable Glutamine	PAA/Gibco
Dulbecco's MEM/ Ham's F12 with stable Glutamine	Biochrom
Dulbecco's PBS	Gibco
FBS Gold (Lot: A11-151)	PAA
OPTI-MEM	Gibco
Penicillin/ Streptomycin	PAA
Quantum für Tumorzellen	PAA
RPMI 1640 with stable Glutamine	PAA/Gibco
Trypsin/EDTA Solution 0,5 %/ 0,2 % (10 x)	Biochrom

2.1.6 Kits und Assays

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
BD FACSClean™	BD Biosystems
BD FACSFlow [™]	BD Biosystems
BD FACSRinse™	BD Biosystems
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BLUeye Prestained Marker	Jena Bioscience
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
DAKO-Kit-AP (K5005)	DAKO Deutschland GmbH
DNAeasy Blood and tissue Kit	Qiagen
Fast SYBR [®] Green Master Mix	Thermo Fisher
High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Thermo Fisher
Histologie FISH Accessory Kit 7599	DAKO Deutschland GmbH
Hybridization Wash and Stain Kit	Affymetrix Inc
Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Panel v2	Life Technologies
Ion AmpliSeq Library Kit 2.0	Life Technologies
Ion Library TaqMan Quantitation Kit	Life Technologies
Lipofectamin 2000 und 3000	Thermo Fisher
LSI/WCP [®] hybridization buffer	Abbott Molecular
Phosphotaseinhibitor-Mix PhosStop	Roche
Proteaseinhibitor-Mix Complete Mini	Roche
Protein-Eichlösungen Standard Set (0,125; 0,75;2 mg/ml)	Bio-Rad
Quick Start™ Bovine Gamma Globulin	Sigma-Aldrich

Quick Start™ Bradford 1 x DyeReagent	Bio-Rad
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Venor [®] GeM Mycoplasmen-Test	Minerva Biolabs
WT Expression Plus Kit	Affymetrix Inc
WT terminal labeling kit	Affymetrix Inc

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 siRNA

Qiagen
Minerva Biolabs
Affymetrix Inc
A CC

Ziel-	Hersteller/	Referenz-		
Transkript	Produkt	Sequenz	Ziel-Sequenz 5'-3'	
		NM_001243088,		
	Oiagan ElaviTuba	NM_001243089,		
FOXM1		NM_021953,	AAC ATC AGA GGA GGA ACC TAA	
		NM_202002,		
		NM_202003		
		NM_001243088,		
		NM_001243089,		
FOXM1	Qiagen Flexi lube	NM_021953,	TGG GAT CAA GAT TAT TAA CCA	
	Hs_FOXM1_7	NM 202002,		
		NM 202003		
			TGC CCA GCA GTC TCT TAC CTT CCC TGA	
			TCT TTG CAG GGT GGT CCG TGT AAA TAG	
			TAT AAA TTC TCC AAA TTA TCC TCT AAT	
			TAT AAA TGT AAG CTT ATT TCC TTA GAT	
			CAT TAT CCA GAG ACT GCC AGA AGG	
			TGG GTA GGA TGA CCT GGG GTT TCA	
	Sigma	NNA 024052	ATT GAC TTC TGT TCC TTG CTT TTA GTT	
	EHU124431	NM_021953	TTG ATA GAA GGG AAG ACC TGC AGT	
FOXM1	FOXM1 esiRNA library	NM_202002	GCA CGG TTT CTT CCA GGC TGA GGT ACC	
	(siRNA Pool)	NM_202003	TGG ATC TTG GGT TCT TCA CTG CAG GGA	
			CCC AGA CAA GTG GAT CTG CTT GCC	
			AGA GTC CTT TTT GCC CCT CCC TGC CAC	
			CTC CCC GTG TTT CCA AGT CAG CTT TCC	
			IGC AAG AAG AAA ICC IGG IIA AAA	
			AAG ICI III GIA IIG GGI CAG GAG IIG	
Kontrolle	Oiagen AllStars Negative			
Kontrolle		keine	Patentschutz	
	Sigma			
Kontrolle		koino	Datantechutz	
	Nagative Control #1	Keine	Patentschutz	
	Negative Control #1			
MDM2	Qiagen Flexi lube	NM_001145336	AAC CTG AAA TTT ATT CAC ATA	
	Hs_MDM2_10	-		

Tabelle 2-3: Verwendete siRNA

2.1.7.2 Primer

Ziel-Transkript	Sequenz 5'-3'	Bezug von
TP53 forward	GAA GAC CCA GGT CCA GAT GA	Metabion
TP53 reverse	GAC TTG GCT GTC CCA GAA TG	Metabion
FOXM1 forward	GGA GCA GCG ACA GGT TAA GG	Metabion
FOXM1 reverse	GTT GAT GGC GAA TTG TAT CAT GG	Metabion
FOXM1A forward	TGG GGA ACA GGT GGT GTT TGG	Metabion
FOXM1A reverse	GCT AGC AGC ACT GAT AAA CAA AG	Metabion
FOXM1B forward	CAA TTG CCC GAG CAC TTG GAA TCA	Metabion
FOXM1B/C reverse	TCC TCA GCT AGC AGC ACC TTG	Metabion
FOXM1C forward	CCA GGT GTT TAA GCA GCA GA	Metabion
GUS forward	GAA AAT ATG TGG TTG GAG AGC TCA TT	Metabion
GUS reverse	CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A	Metabion

Tabelle 2-4: Verwendete Primer

2.1.8 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zellinien verwendet:

Name	Beschreibung und Quelle	Bezug über	Nachweis der Identität
BON	adhärente Zelllinie aus der	Labor AG Prof.	als einzigartig authentifiziert
	Lymphknoten-Metastase eines gut	Wiedenmann, Charité	mittels STR Genotyping an
	differenzierten neuroendokrinen	Berlin	der DSMZ Braunschweig;
	Pankreastumors [193].		neuroendokrine Marker
QGP-1	adhärente pankreatische Zelllinie aus	Labor AG Prof.	Bezug von Japanese
	einem gut differenzierten	Wiedenmann, Charité	Collection of Research
	metastatischen Somatostatinom	Berlin	Bioresources (JCRB) und
	[184, 194]		authentifiziert mittels STR
			Genotyping an der DSMZ
			Braunschweig;
			neuroendokrine Marker
LCC-18	semi-adhärente Zelllinie aus einem	Labor AG Prof.	als einzigartig authentifiziert
	unbehandelten schlecht	Wiedenmann, Charité	mittels STR Genotyping an
	differenzierten Kolonkarzinom	Berlin	der DSMZ Braunschweig;
	(Primarius) mit neuroendokriner		neuroendokrine Marker
	Differenzierung [182]		
KRJ-I	nicht adhärente Zelllinie aus einem	Labor AG Prof.	als einzigartig authentifiziert
	mäßig differenzierten	Wiedenmann, Charité	mittels STR Genotyping an
	metastatischen neuroendokrinen	Berlin	der DSMZ Braunschweig;
	lleum-Primärtumor [195]		neuroendokrine Marker

U-2 OS	adhärente humane, nicht-	Labor AG Dragun,	Keine, da ausschließlich zur
	neuroendokrine, mäßig	Medizinische Klinik mit	Kontrolle der FOXM1
	differenzierte Osteosarkom-Zelllinie	Schwerpunkt	Expression verwendet.
	mit starker FOXM1 Expression [196]	internistische	
		Intensivmedizin, Charité	
		Berlin	

Tabelle 2-5: Verwendete Zelllinien

Im ersten Teil der Versuche (Charakterisierung der Zellen und Versuche mit Siomycin A) erfolgte die Kultivierung der Zellen auf Quantum-Medium. Da dieses während der Anfertigung der Arbeit aus dem Sortiment genommen wurde, wurden die Zellen anschließend wie folgt kultiviert: BON und KRJ-I: DMEM/ Ham's F12, QGP-I: RPMI und LCC-18: DMEM. Eine fünfte Zelllinie (MIP-101), die gemeinsam mit LCC-18 die schlecht differenzierten Tumoren abbilden sollte, wurde aufgrund einer Kreuzkontamination, die auch alle kooperierenden Labore betraf, weshalb die Zelllinie nicht wiederbeschafft werden konnte, von den Studien ausgeschlossen. Alle Zelllinien wurden zu Beginn der Arbeit am Leibniz-Institute DSMZ, Braunschweig, mittels STR DNA Typisierung authentifiziert. Außer bei QGP-1, die bei der JCRB gelistet sind (JCRB0183), konnten die Zelllinien lediglich als "einzigartig" authentifiziert werden.

Die verifizierten frühen Passagen wurden anschließend nicht länger als 25 Passagen kultiviert.

2.1.9 Tumorbiopsien/Kollektive

2.1.9.1 Kollektiv 1

Die Biopsien von 23 Patienten (ingesamt 34 Biopsien, z.T. Paare aus Primarius und Metastasen, 25 Biopsien mit gastrointestinalem Primarius) des Proben-Kollektivs 1 wurden zwischen 2009 und 2013 in der Abteilung Allgemeine und Viszerale Chirurgie des Zentralklinikums Bad Berka GmbH prospektiv zur Analyse von Tumormarkern gesammelt. Alle Proben wurden in Übereinstimmung mit dem vorliegenden Votum der zuständigen Ethikkommission zusammengetragen. Die NEN Diagnose (laut WHO 2010) wurde morphologisch und immunhistochemisch anhand der Chromogranin A und Synaptophysin Expression sowie des Ki67 Index durch die zuständige Pathologie gestellt. Von den Biopsien wurden direkt nach Abnahme des Gewebes für die nachfolgenden Untersuchungen ebenfalls Gefrierschnitte hergestellt und durch die Pathologie Bad Berka H&E gefärbt. Ausschließlich Tumorproben mit einem Tumoranteil >80 Prozent wurden für die nachfolgenden Analysen verwendet (Tabelle 2-6).

GEP-NEN:			
Gewebetyp		Primärtumoren	Metastasen
N=34		14	20
Grading	G1	9	14
	G2	2	4
	G3	3	2
Lokalisation des Primarius	pankreatisch	4	4
	gastrointestinal	10	15
	CUP	-	1
Lokalisation der	Lymphknoten	-	5
Metastasen	Fernmetastasen	-	15
Geschlecht	männlich	8	8
	weiblich	6	12
Alter (bei Diagnose)	min	42	53
	max	77	79
	mittel	61,7	64,5
GASTROINTESTINALE NEN:			
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp		Primärtumoren	Metastasen
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25		Primärtumoren 10	Metastasen 15
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading	G1	Primärtumoren 10 7	Metastasen 15 13
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading	<u>G1</u> G2	Primärtumoren 10 7 1	Metastasen 15 13 0
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading	G1 G2 G3	Primärtumoren 10 7 1 2	Metastasen 15 13 0 2
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius	G1 G2 G3 Ileum	Primärtumoren 10 7 1 2 6	Metastasen 15 13 0 2 14
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius	G1 G2 G3 Ileum Duodenum	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 2	Metastasen 15 13 0 2 14 0
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon Lymphknoten	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 2 -	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1 4
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius Lokalisation der Metastasen	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon Lymphknoten Fernmetastasen	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 6 2 -	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1 4 11
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius Lokalisation der Metastasen Geschlecht	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon Lymphknoten Fernmetastasen männlich	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 6 2 6 2 6 2 6 2 6 2 6 2 6 6 6 6	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1 4 11 6
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius Lokalisation der Metastasen Geschlecht	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon Lymphknoten Fernmetastasen männlich weiblich	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 6 2 6 2 6 2 6 2 6 4	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1 4 11 6 9
GASTROINTESTINALE NEN: Gewebetyp N=25 Grading Lokalisation des Primarius Lokalisation der Metastasen Geschlecht Alter (bei Diagnose)	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon Lymphknoten Fernmetastasen männlich weiblich min	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 - - 6 4 42	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1 4 11 6 9 55
GASTROINTESTINALE NEN:GewebetypN=25GradingLokalisation des PrimariusLokalisation derMetastasenGeschlechtAlter (bei Diagnose)	G1 G2 G3 Ileum Duodenum Kolon Lymphknoten Fernmetastasen männlich weiblich min max	Primärtumoren 10 7 1 2 6 2 - - 6 4 42 77	Metastasen 15 13 0 2 14 0 1 4 11 6 9 55 79

Tabelle 2-6: Kliniko-pathologische Daten des Kollektivs 1

Prospektives Kollektiv aus frisch gefrorenen Tumor-Biopsien gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren von 23 Patienten: Biopsien N=34; davon gastrointestinale neuroendokrine Tumoren: N=25. Metastasen umfassen Lymphknoten- und Fernmetastasen.

2.1.9.2 Kollektiv 2

Die in Paraffin gebetteten Biopsien (FFPE) von 131 GEP-NEN Patienten wurden mit Zustimmung der lokalen Ethikkommissionen retrospektiv am Universitätsklinikum Jena (N=82, in Form eines 0,6 cm TMA) und an der Charité Universitätsmedizin (N=49, in Form von 1-2 µM-Schnitten) zusammengetragen. Die Fünfjahres-*Follow-up* Daten waren für alle Patienten vorhanden. Einschlusskriterien waren die Positivität auf neuroendokrine Marker und das Vorhandensein notwendiger klinischer Daten. Alle Tumoren wurden vor der Analyse durch das jeweilige Institut für Pathologie nach WHO 2010 reklassifiziert [197].

GEP-NEN:				
Grading		G1	G2	G3
N=131		85	27	19
Gewebetyp	Primärtumor	82	22	18
	Metastase	3	5	1
Lokalisation des Primarius	pankreatisch	30	10	3
	gastrointestinal	55	17	16
Differenzierung	gut	85	27	0
	schlecht	0	0	19
Geschlecht	männlich	42	14	17
	weiblich	43	13	2
Alter (bei Diagnose)	min	17	33	29
	max	84	84	87
	mittel	56,6	59,1	56,7
GASTROINTESTINALE NEN:				
Grading		G1	G2	G3
N=88		55	17	16
Gewebetyp	Primärtumor	53	13	15
	Metastase	2	4	1
Lokalisation des Primarius	lleum	38	12	1
	Kolon	9	2	8
	Rektum	4	1	6
	andere	4	2	1
Metastasierungsstatus	M0	38	6	5
	M1	14	11	11
	N/A	3	0	0
Differenzierung	gut	55	17	0
	schlecht	0	0	16
Geschlecht	männlich	32	10	14
	weiblich	23	7	2
Alter (bei Diagnose)	min	17	33	29
	max	84	84	87
	mittel	58,4	58,6	56,4

Tabelle 2-7: Kliniko-pathologische Daten des Kollektivs 2

Retrospektives Kollektiv aus FFPE Tumor-Biopsien gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore von 131 Patienten: Biopsien N=131 (entsprechend 1 Biopsie pro Patient); davon gastrointestinale neuroendokrine Tumore: N=88

2.1.10 Software und Datenbanken

Folgende Software wurde zur Datenauswertung und Anfertigung dieser Arbeit verwendet:

BD CellQuest™ Pro	Version 5.2	BD Biosciences
Cell^D	Version 2.7	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH
CompuSyn	Version 1.0	ComboSyn, Inc.
Endnote	Version x7	Thomson Reuters
FlowJo	Version 8.7	FlowJo, LLC
Genomics Suite®	Version 6.6	Partek®
InDesign	Version CS	Adobe
ISIS	Version 5.3.1	MetaSystems
Microsoft [®] Office	Version Profession	Microsoft®
	Plus 2013	
MultiGauge	Version 5.2	Fujifilm®
NanoDrop 2000	Version 2000C	Thermo Scientific
nSolver	Version 2.5	NanoString [®] Technologies
Photoshop	Version CS3	Adobe
Prism	Version 6	Graphpad
SPSS	Versionen 20 und 22	IBM
StepOne™	Version 2.3	Applied Biosystems
Torrent Suite™	Version 4.2	ThermoFisher Scientific
XFluor™	Version 4.51	Tecan

Außerdem wurden folgende Datenbanken verwendet:

ENCODE: The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE Consortium) [198, 199]	http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizo me/	Stand 29.12.2015
Ensembl	http://www.ensembl.org	
p53FamTaG [200]	http://p53famtag.ba.itb.cnr.it/	Stand: 05/2015
Gene Ontology database	http://geneontology.org/	Stand: 6.08.2015
PANTHER Classifications [201, 202]	http://pantherdb.org/	v10.0; 15.05.2015
Primer3	http:// http://primer3.ut.ee/	v1.1.4

Pubchem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

2.2 Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht explizit anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Notwendige Arbeitsschutzmaßnahmen wurden stets eingehalten und werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gesondert aufgeführt.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

2.2.1.1.1	Kultivierung u	ind Kryol	konservierung d	ler Zelllinien
-----------	----------------	-----------	-----------------	----------------

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien, Accutase, Trypsin, Penicillin/Streptomycin, FBS, diverse Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturflaschen, Gefrierröhrchen und Reaktionsgefäße, FBS
Puffer/Kits	Dulbecco's PBS, zellspezifisches Gefriermedium, Venor®GeM Mycoplasmen- Test
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifuge, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C/-80°C Kühlschrank, Stickstofftank, Pipettierhilfe, Pipetten

Zellkulturmedien wurden mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt. Gefrorene Zellen wurden aufgetaut und zügig in Zellkulturmedium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min bei 800 x RCF) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte im Zellkulturschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Die Passagierung der Zellen erfolgte spätestens bei 80 % Konfluenz der adhärenten Zellen. Dazu wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und die Zellen mit Accutase oder Trypsin proteolytisch bei 37°C abgelöst. Anschließend wurde die gewünschte Menge Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Kulturflaschen weiter kultiviert. KRJ-I Zellen waren stark von präkonditioniertem Medium abhängig, weshalb die Passagierung über teilweisen Medienwechsel erfolgte. Die Zellen benötigten zudem intensive Zell-Zell-Kontakte, weshalb sie stets in möglichst geringem Volumen kultiviert wurden. Alle Zelllinien wurden maximal 25 Passagen über die authentifizierten Stocks hinaus passagiert. Die regelmäßige Kontrolle der neuroendokrinen Marker-Expression erfolgte mittels Immunfluoreszenz (vgl. Abschnitt 2.2.1.6). Die Freiheit von Mycoplasmen wurde ebenfalls mittels DAPI Immunfluoreszenzfärbung oder alternativ mittels Venor®GeM Mycoplasmen-Test PCR-basiert

dokumentiert. Zur Kryokonservierung wurden ca. 500.000 Zellen zentrifugiert und in 1 ml Gefriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde in Gefrierröhrchen zügig auf -80°C überführt. Zur Langzeitlagerung wurden die gefrorenen Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.1.1.2 B	Behandlung c	ler Zelllinien	mit inhibitorisc	hen Substanzen

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, Inhibitor, Kontrollsubstanz, zellspezifische Zellkulturmedien, FBS, diverse Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturflaschen und Reaktionsgefäße, Accutase
Puffer/Kits	Zellspezifisches Synchronisationsmedium
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifuge, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten

Zur Behandlung der Zelllinien mit diversen Substanzen wurden die Zelllinien - sofern nötig - in einer Neubauerkammer gezählt. Dazu wurde eine Zellsuspension angefertigt und 15 μl einer 1:1 Verdünnung mit Trypanblau auf eine vorbereitete Kammer (mit adhäriertem Deckgläschen) gegeben. Die Anzahl der lebenden Zellen in einem Großquadrat ergab mit dem Faktor 2 x 10⁴ die Zellzahl pro ml. Die gewünschte Anzahl Zellen wurde zentrifugiert und in Synchronisationsmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen im vorgesehenen Maßstab (T25 Zellkulturflaschen, 6-Well Format) ausgesät und zwischen 6 und 24 Stunden im Zellkulturschrank bei 37°C synchronisiert (KRJ-I: 6 h, übrige Zelllinien: 24 h). Anschließend wurde das Medium gegen 10 % FBS haltiges Zellkulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin ausgetauscht und der Inhibitor bzw. entsprechende Kontrollen hinzu gegeben.

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien ohne Phenolrot, FBS, 96-Well Platten, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, sterile Reservoirs, Accutase
Puffer/Kits	WST-1 Proliferations-Reagenz, Dulbecco's PBS
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifuge, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Mehrkanalpipette, PC, Mikrotiterplatten- Photometer Tecan Sunrise™

	2.2.1.2	WST-1	Proliferations-Assay
--	---------	-------	-----------------------------

Die Zellen wurden synchronisiert, gezählt und in farblosem Medium in 95-Well Platten überführt. Es wurde folgende Zellzahl der jeweiligen Zelllinie eingesät: BON und LCC-18: je 10.000 Zellen pro Well, QGP-1: 15.000 Zellen pro Well, KRJ-I: 25.000 Zellen pro Well. Es wurde pro Messpunkt mit fünf Replikaten gearbeitet. Die äußeren Wells der 96-Well Platten wurden mit PBS gefüllt, um Verdunstungseffekte zu minimieren. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen und eine

Medienkontrolle zur Hintergrundbestimmung. Anschließend wurden die Zellen zwischen 12 und 24 Stunden bei 37°C im Kulturschrank weiter kultiviert, um ein Adhärieren zu ermöglichen. Nun wurden die Substanzen und Medium auf ein Gesamtvolumen von 100 µl zugegeben und über den gewünschten Zeitraum im Zellkulturschrank inkubiert. Die Messung erfolgte mittels WST-1 Reagenz entsprechend den Angaben des Herstellers. Es wurden dazu 10 µl WST-1 Reagenz pro Well in abgedunkelter Umgebung in das Medium gegeben und vorsichtig resuspendiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C im Zellkulturschrank erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1 min, 2000 x RCF), um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden die Platten in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels XFluor4 Software ausgelesen. Die Daten wurden im MS Excel-Format exportiert und analysiert. Dabei wurde die Mediumkontrolle von den Messwerten subtrahiert, und die so prozessierten Werte wurden mit der Negativkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die weitere Auswertung erfolgte mittels MS Excel, SPSS und Prism 6 Software.

2.2.1.3 Apoptose-Nachweis und Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Untersuchungen wurden die Zellen nicht synchronisiert, um die einzelnen Zellzyklusphasen in den Kontrollen deutlich identifizieren zu können.

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien, FBS, 6-Well Platten, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, FACS- Röhrchen, Accutase, Phospho(Ser10)-Histon H3 Primärantikörper, fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, 99,9 % Ethanol, Propidiumiodidlösung, RNAse A
Puffer/Kits	Dulbecco's PBS, BD FACSFlow [™] , BD FACSClean™, BD FACSRinse™, FACS- Antikörper-Lösung
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifugen, Zellkulturschrank, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, PC, BD FACS Calibur™, Eismaschine

2.2.1.3.1 Mitose-Index-Durchflusszytometrie

Zellen wurden in 6-Well Platten mit Wirkstoff inkubiert, geerntet und mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 400 x RCF wurden die Zellen auf Eis in 0,3 ml eiskaltem PBS resuspendiert und anschließend 0,7 ml -20°C kalter Ethanol unter Schwenken zugetropft. In dieser Lösung wurde 30 min auf Eis fixiert. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 0,5 ml Antikörperlösung (ohne Antikörper) sehr vorsichtig gewaschen. Dann wurde der Primärantikörper in 0,1 ml Antikörperlösung verdünnt, die Zellen darin resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 0,5 ml Antikörperlösung (ohne Antikörper) zugegeben und der Überstand abzentrifugiert. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers in 0,1 ml

Antikörperlösung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt in Antikörperlösung wurden die Zellen in 0,5 ml PBS (mit 20 µg/ml Propidiumjodid und 10 µg/ml RNAse A) 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Daten der Färbung wurden am Durchflusszytometer erhoben und mittels FloJo, Excel und Prism 6 Software ausgewertet. Gezählt wurden zwischen 30.000 und 100.000 Zellen.

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien, FBS, 6-Well Platten, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, FACS- Röhrchen, Accutase
Puffer/Kits	Dulbecco's PBS, BD FACSFlow [™] , BD FACSClean [™] , BD FACSRinse [™] , 50 mM CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon), JC-1 (5,5,6,6-Tetrachlor- 1,1,3,3-Tetramethyl Benzimidazolyl Carbocyanin iodid)
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifugen, Zellkulturschrank, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, PC, BD FACS Calibur™

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten mit gewünschten Substanzen einschließlich Kontrollen behandelt, geerntet und in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Positiv-Kontrollprobe mit 100 μ M des Mitochondrien-Membran-Depolarisierers CCCP versetzt und 5 min inkubiert. Alle Zellensuspensionen, außer einer Doppel-Negativ-Kontrolle, wurden mit JC-1 (1:500) versetzt und 30 min bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS wurde 5 min bei 400 x RCF zentrifugiert, der Überstand verworfen, ein weiteres Mal mit PBS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen die Zellen in 500 μ M PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde sofort durchflusszytometrisch analysiert und mittels FloJo ausgewertet. Gezählt wurden zwischen 25.000 und 50.000 Zellen. Die Ergebnisse wurden anschließend nach Abzug der Negativkontrolle mit der Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die weitere Auswertung erfolgte mit MS Excel und Prism 6.

2.2.1.4 Zytotoxizitäts-Analyse mittels Laktat Dehydrogenase Assay

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien ohne Phenolrot, FBS, 96-Well Platten, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, sterile Reservoirs, Accutase
Puffer/Kits	Dulbecco's PBS, LDH Cytotoxicity Detection Kit
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifugen, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Mehrkanalpipette, PC, Mikrotiterplatten- Photometer Tecan Sunrise

Die Zellen wurden geerntet, gezählt und je 20.000 Zellen pro Zelllinie wurden in 1 % FBS haltigem farblosem Medium in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 12-24 Stunden Inkubation bei 37°C im Zellkulturschrank wurden die zu testenden Substanzen hinzugegeben und das Volumen auf 200 µl pro Well adjustiert. Die Zellen wurden weitere 4 und 24 Stunden bei 37°C mit dem Wirkstoff inkubiert. Anschließend wurden die Positivkontrollen mit 2 % Triton X versetzt und die Zellen bei 250xRCF für 10 min zentrifugiert und 100 µl des Überstandes abgenommen. Dieser wurde in eine neue 96-Well-Platte überführt und 1:1 mit LDH Detektionsreagenz über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte bei 490 nM im Mikrotiterplatten-Photometer. Die Messwerte wurden gegen die Kontrollen mittels MS Excel und SPSS 20 ausgewertet.

2.2.1.5	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
---------	------------------------------------

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien, FBS, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Accutase, Ethanol, fluoreszenzmarkierte Sonden, Objektträger und Deckgläschen, destilliertes Wasser
Puffer/Kits	Dulbecco's PBS, Histology FISH Accessory Kit, 10 % (v/v) gepuffertes Formalin
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifugen, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Fluoreszenz-Mikroskop, PC, Cytospin-Zentrifuge, Wärmeschrank

Die FISH Analyse wurde nicht selbst durchgeführt, sondern erfolgte als Auftrag in der Pathologie der Charité. Dazu wurden die Zellen kultiviert, geerntet und in der Cytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht. Dann wurden die Zellen in gepuffertem Formalin über Nacht fixiert und anschließend je 2 min in 70 % (v/v), 80 % (v/v) und 90 % (v/v) Ethanol bei 56°C im Wärmeschrank getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit dem FISH Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers behandelt. Die Sonden zur Markierung von *MDM2* und Alpha Satelliten DNA (12p11.1-q11) zur Quantifizierung der Chromosamenzahl wurden 10 min bei 80°C denaturiert und über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer hybridisiert. DAPI zur Gegenfärbung der Kerne war bereits im Kit enthalten. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolge am Fluoreszenz-Mikroskop.

2.2.1.6 Immunfluoreszenz

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, zellspezifische Zellkulturmedien, FBS, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Accutase, Ethanol, Methanol, Aceton, destilliertes Wasser, Primärantikörper, fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper, (Multitest-)Objektträger und Objektträger und Deckgläschen, Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser
Puffer/Kits	Dulbecco's PBS, PBS Blockpuffer 2 %, IF-Antikörperlösung: PBS mit 0,1 % (w/v) BSA und 0,5 % (v/v) TritonX100, Roti-Mount FluorCare DAPI Einschlussmittel
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifugen, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Fluoreszenz-Mikroskop, PC, Cytospin-Zentrifuge, feuchte Kammer

Die Zellen wurden kultiviert, geerntet und in der Cytospin-Zentrifuge auf Objektträger aufgebracht oder 48 Stunden auf einem Multitest-Objektträger wachsen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger in einer 1:1 Lösung aus Methanol und Aceton für 2 min fixiert und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach erfolgten zwei Waschschritte für 5 min in PBS und ein Blockschritt in 2 % Blockpuffer über 30 min. Anschließend wurde erneut 2 x 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Primärantikörper in der IF-Antikörperlösung verdünnt und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 4 x 5 min Waschen in PBS wurde der Sekundärantikörper in IF-Antikörper-Verdünnungslösung für 60 min im Dunkeln inkubiert. Nach 2 x 5 min Waschen in PBS wurden die Objektträger für 2 min in 96 % (v/v) Ethanol fixiert, getrocknet und mit Roti-Mount DAPI Einschlussmittel eingebettet. Die Auswertung erfolgte gegen Kontrollen (nur Sekundärantikörper) am Fluoreszenz-Mikroskop. Die Aufnahmen erfolgten am Olympus BX60 mittels Cell^D Software.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Isolation von Proteinen

Material Humane GEP-NEN Tumorzellen, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Accutase, Flüssigstickstoff Puffer/Kits PBS, NP-40 Puffer, Phosphataseinhibitor Dulbecco's PhosStop, Proteaseinhibitor Complete Mini Geräte und Chemikalien Sterilbank, Zentrifuge, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C/-20°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Stickstofftank, Dewargefäß, Wasserbad, Eismaschine, Kühlzentrifuge

2.2.2.1.1 Gesamtzell-Lyse von GEP-NEN Zelllinien

Zellen wurden geerntet, in PBS gewaschen und 5 min bei 800 x RCF zentrifugiert. Der NP-40 Puffer wurde entsprechend den Angaben des Herstellers frisch mit Phosphatase- und Proteaseinhibitor versetzt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im 3-5fachen Volumen Lysepuffer NP-40 aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich durch sechsmaliges Wechselbad in flüssigem Stickstoff und 37°C Wasserbad lysiert. Um die Proteine von den Zellfragmenten abzutrennen, wurde bei maximaler Drehzahl und 4°C 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übergeben, und die Lysate bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Material	Geforenes GEP-NEN Biopsie-Material, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße
Puffer/Kits	NP-40 Puffer, Phosphataseinhibitor PhosStop, Proteaseinhibitor Complete Mini
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifuge, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C/-80°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Eismaschine, Kühlzentrifuge, Sonifikator

22212	Gocomtzoll L		gofroronom	nrimärom	Tumormatorial
2.2.2.1.2	Gesanntzen-L	yse von	genorenen	primarent	Tunnonnatenai

Die gefrorenen Tumorproben wurden auf Eis in NP-40 Puffer (einschließlich Phosphatase- und Proteaseinhibitor) überführt und 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mittels Sonifikator (70 % Intensität). Anschließend wurde bei maximaler Drehzahl und 4°C 30 min lang zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig, ohne mögliche Fettphasen mit aufzunehmen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und die Lysate aliquotiert bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße
Puffer/Kits	Hypotonischer Puffer, RIPA-Puffer Phosphataseinhibitor PhosStop, Proteaseinhibitor Complete Mini
Geräte und Chemikalien	Sterilbank, Zentrifuge, Zellkulturschrank, Mikroskop, 4°C/-20°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Stickstofftank, Wasserbad, Dewargefäß, Eismaschine, Kühlzentrifuge

2.2.2.1.3	Kern-Zytosol-Fraktionierung
-----------	-----------------------------

Zellen wurden geerntet, in PBS gewaschen und 5 min bei 800 x RCF zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im etwa 3-5fachen Volumen des hypotonischen Puffers vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation 5 min auf Eis, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt über 2 min bei 2000 x RCF und 4°C. Der resultierende Überstand enthielt die
Proteine des Zytoplasmas. Nach einem Waschschritt in 1 ml PBS wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellkerne wurden nun in RIPA Puffer aufgenommen und analog Abschnitt 2.2.2.1.1 im Wechselbad lysiert. Anschließend wurden die Lysate 10 min bei 2000 x RCF und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Kernproteine. Die Lysate wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration

Material	Proteinlysate, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Einmalküvetten
Puffer/Kits	Bradford-Reagenz, Lysepuffer, Proteinstandardlösungen
Geräte und Chemikalien	4°C/-20°C Kühlschrank, Pipetten, UV-Vis Spektrophotometer

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford [203]. Die Lysate wurden auf Eis aufgetaut und gevortext. Danach wurden Einmalküvetten mit 990 μ l Bradford-Reagenz für die Standardproben und 999 μ l für die Messproben versetzt. Anschließend wurden für die Leerprobe 10 μ l des verwendeten Lysepuffers und je 10 μ l der Proteinstandardlösungen zu den 990 μ l und je 1 μ l Messprobe zu den 999 μ l Volumina gegeben. Nach 5 min Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im Spektrophotometer. Die ermittelten Werte ergaben mit dem Faktor 10 die Proteinkonzentration in μ g/ μ l.

2223	SDS-Polvac	rvlamid-Gelelektro	nhorese (SDS-PAGE)
2.2.2.3	JDJ I Olyuc	giunnu Ocicickuo		

Material	Proteinlysate, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, destilliertes Wasser, 40 % (v/v) Glycerin, 40 % (w/v) Acrylamid (19:1), 20 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) APS, Tetramethylethylendiamin (TEMED), 70 % (v/v) Ethanol
Puffer/Kits	4x Proteinladepuffer, Trenngelpuffer, Sammelgelpuffer, Proteingrößen- Standard, Elektrophorese-Puffer
Geräte und Chemikalien	4°C/-20°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Elektrophorese-Kammer, Stromversorgungsgerät, Gießstand, Glasplatten, Glasgeräte, Heizblock, Zentrifuge, Vortexer, Eismaschine

Die zur Elektrophorese notwendigen Gele wurden im Gießstand des Mini-Protean Systems gegossen. Dazu wurde zunächst ein Trenngel entsprechend Tabelle 2-8 angefertigt und zwischen die Glasplatten gegossen. Analog wurden auch Schichtgele mit mehreren Konzentrationen gegossen. Überschichtet wurde mit 70 % Ethanol. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Ethanol abgenommen, das Sammelgel angefertigt und auf das Trenngel gegeben. Anschließend wurden die Ladekämme installiert. Das Gel wurde nach dem Aushärten bis zu 3 Tage in Elektrophoresepuffer bei 4°C gelagert. Zur Durchführung der Gelektrophorese wurden die Lysate auf Eis aufgetaut und gevortext. Anschließend wurde die Proteinlösung mit destilliertem Wasser und mit 25 % des Gesamtvolumens 4x Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Außerdem wurden ein Protein-Größenstandard aufgetragen und leere Taschen mit 4 µl Ladepuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 60 V und wurde dann sukzessive auf 140 V gesteigert.

Komponenten	Trenngel		Sammelgel		
	8%	10%	12%	16%	
Wasser	3,3 ml	2,8 ml	2,2 ml	1,1 ml	2,0 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	2,0 ml				1,3 ml
Acrylamid (40 %)	2,2 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,4 ml	700 µl
Glycerin (40 %)	4,0 ml				1,0 ml
SDS (20 %)	50 μl				25 μl
APS (10 %)	50 μl				40 µl
TEMED	10 µl				10 µl

Tabelle 2-8: Pipettierschema für Polyacrylamid-Gele

2.2.2.4 Western Blot

Material	Gele nach SDS-Elektrophorese aus Abschnitt 2.2.2.3, Nitrozellulose- Membran, Filterpapier
Puffer/Kits	Transferpuffer, Ponceau S Färbelösung, WB-Blockpuffer, TBS-T
Geräte und Chemikalien	4°C/-20°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Elektrophorese-Kammer, Stromversorgungsgerät, Glasgeräte, Magnetrührer und Magnetstäbchen, Färbeschalen, Schalen, Pipetten

Um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen, wurden sie mittels Western Blot-Verfahren [204, 205] auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Gele wurden dazu aus der Elektrophorese-

Apparatur entnommen, in Transferpuffer äquilibriert und anodenseitig der Nitrozellulosemembran zwischen feuchtem Filterpapier in eine mit Transferpuffer gefüllte *Wet Blot* Kammer eingebaut. Anschließend wurde der Transfer unter Kühlung bei 200-300 mA für 70 min oder bei 150 mA über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde die Übertragung mittels Ponceau-Färbung geprüft. Dazu wurden die Membranen 15 min in 1 x Ponceau S Färbelösung geschwenkt und anschließend vorsichtig mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Färbung wurde durch Scannen dokumentiert, und die Membranen wurden anschließend mindestens eine Stunde in WB-Blockpuffer blockiert.

Material	geblockte Nitrocellulose-Membran, Primärantikörper, HRP-gekoppelte Sekundärantikörper, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße
Puffer/Kits	WB-Antikörperlösung, ECL-Lösung, Stripppuffer, TBS-T, WB-Blockpuffer
Geräte und Chemikalien	4°C/-20°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Glasgeräte, Färbeschalen, Wasserbad, Laborbesteck, Chemilumineszenzdetektor, PC, Laborschüttler

2.2.2.5 Immundetektion und Re-Probing

Um die geblotteten Proteine zu visualisieren, wurden die Membranen nach Auswaschen des Blockpuffers über Nacht bei 4°C in einer Primärantikörperlösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden der Antikörper 3 x 10 min in TBS-T ausgewaschen und die Membran bei Raumtemperatur für 90 min in Sekundärantikörperlösung geschwenkt. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschritt wurde die Peroxidase-Reaktion der Sekundärantikörper auf den Membranen mit ECL-Lösung nach Herstellerangaben im Chemilumineszenzdetektor visualisiert und dokumentiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte bei Bedarf mittels MultiGauge-Software. Zum Entfernen der Antikörper und erneuter Analyse wurden die Membranen bis zu vier Mal bei 65°C für 25 min in Stripppuffer geschwenkt und anschließend mindestens 1 Stunde in WB-Blockpuffer geblockt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Nukleinsäuren aus GEP-NEN Zelllinien

2.2.3.1.1 Isolation von genomischer DNA

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Filterspitzen
Puffer/Kits	PBS, DNA Isolationskit, DNAse freies Wasser
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Zellkulturschrank, Zentrifuge, Pipetten

Die Zellen wurden geerntet und in warmem PBS gewaschen. Die genomische DNA wurde anschließend mit dem DNeasy DNA Isolationskit entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert.

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, Reaktionsgefäße, Filterspitzen	, diverse	Verbrauchsmaterialien	wie
Puffer/Kits	PBS, RNA Isolationskit, RNase freies	Wasser		
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Pipetten, Zel	lkulturschra	ank, Zentrifuge	

2.2.3.1.2 Isolation von RNA

Die Zellen wurden geerntet und in warmem PBS gewaschen. Die RNA wurde anschließend sehr zügig entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem RNeasy RNA Isolationskit isoliert.

2.2.3.2	Seauenzieruna von	TP53

Material	Genomische DNA, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, AmpliTaq Gold Polymerase, Primer TP53
Puffer/Kits	Library mittels Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Panel v2, Ion AmpliSeq Library Kit 2.0, Ion Library TaqMan Quantitation Kit, Gold Puffer (1,5 mM MgCl ₂), BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Pipetten, Zentrifuge

Die Sequenzierung von *TP53* wurde nicht selbst durchgeführt und erfolgte in der Pathologie der Charité. Verwendet wurde das *Torrent PGM HTS (high throughput sequencing) multiplex PCR System*

entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu wurden 10 ng genomische DNA zur Erstellung der Library mittels Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Panel v2 und Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 durch Multiplex PCR mit überlappenden Primern amplifiziert und nach Verdau mit einem Barcode-Adapter ligiert. Die Library wurde unter Verwendung des Ion Library TaqMan Quantitation Kit im 7900HT Fast Real-Time PCR System aufgereinigt und quantifiziert. Die anschließende Emulsions-PCR und Anreicherung an ISP Beads wurde mittels OneTouch 2 System durchgeführt, und für das HTS wurde der 318v2-Chip entsprechend des Herstellers verwendet. Die Daten wurden mit Torrent Suite Software ausgewertet. Die genomische Region von TP53 wurde mittels folgender Amplikons abgedeckt: chr17:7579351-7579485, chr17:7578517-7578601, chr17:7579854-7579960, chr17:7578353-7578483. chr17:7578181-7578298, chr17:7577509-7577612, chr17:7577016-7577151, chr17:7573924-7574035.

Da anschließend qualitative Zweifel an den Ergebnissen der HTS-Analyse von QGP-1 blieben (Deletion in beide Leserichtungen an Position 17:7579396 (G/-; frame shift)), wurden nach Rücksprache Primer für die betroffene Region designet (mittels Primer3 v1.1.4) und eine Sanger Sequenzierung der Region chr17:7.579.343 to chr17:7.579.503 in Auftrag gegeben. Diese führte ebenfalls die Pathologie der Charité durch. Dazu wurden 50 ng genomischer DNA bei 56°C amplifiziert. Nach der Aufreinigung wurde unter Verwendung des *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* im *ABI Genetic Analyzer* entsprechend den Herstellerangaben sequenziert.

2.2.3.3 RNA Interferenz

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, siRNA Oligos (vgl. Abschnitt 2.1.7)
Puffer/Kits	OPTI-MEM Medium, Lipofectamine 2000 oder Lipofectamine 3000
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Pipetten, Zellkulturschrank, Zentrifuge

Die Zellen wurden kultiviert, bis sie die exponentielle Phase erreichten. Starvierte Zellen konnten nicht transfiziert werden, weshalb auf die Synchronisation verzichtet wurde. Die Transfektion wurde entweder mit Lipofectamine 2000 oder Lipofectamine 3000 entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden zwischen 30 und 50 pmol/ml siRNA eingesetzt, wobei die Transfektionseffizienz zwischen den beiden Reagenzien, aber auch im Vergleich der siRNA Oligos deutlich variierte. Die Sequenzen der verwendeten siRNA finden sich in Abschnitt 2.1.7. Die Zeiten der Inkubation variierten zwischen 24 und 96 Stunden und sind jeweils angegeben. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und Weiterkultur oder die Ernte der Zellen.

2.2.3.4 Bestimmung der RNA Konzentration, DNAse Verdau und cDNA Synthese

Material	RNA Lösung, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Filterspitzen, EDTA, bidestilliertes und RNAse freies Wasser
Puffer/Kits	DNAse I (1U/µI), RNA-to-cDNA Kit
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Nanodrop, Eismaschine, Thermocycler, Pipetten, Heizschüttler

Die isolierte RNA wurde am Nanodrop spektrophotometrisch quantifziert.

Vor der reversen Transkription wurden DNA-Verunreinigungen mit 0,1 µl DNAse I/100 ng RNA für 30 min bei 37°C entfernt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 2,5 mM EDTA und zehnminütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Danach wurden 500-1000 ng RNA im Thermocycler (60 min bei 37°C, 5 min 95°C) in cDNA umgeschrieben.

2.2.3.5 Real-time PCR

Material	cDNA Lösung, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Filterspitzen, bidestilliertes und RNAse freies Wasser, Primer
Puffer/Kits	Fast SYBR [®] Green Master Mix
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Eismaschine, Pipetten, RT-PCR Maschine

Die cDNA wurde auf 25 ng/ μ l verdünnt und der PCR Ansatz in 96-Well PCR Platten nach folgendem Schema pipettiert:

Komponenten	Volumen
Master Mix	5 μl
Forward Primer (10 μM)	0,15 μl
Reverse Primer (10 µM)	0,15 μl
Wasser	3,7 μl
cDNA (25 ng/μl)	1 μΙ

Tabelle 2-9: Pipettierschema der Real-time PCR

Die Real-time PCR (einschließlich Aufzeichnung der Schmelzkurven) erfolgte im Anschluss nach folgendem Protokoll:

Dauer	Temperatur	
10 min	95°C	
15 s	95°C	
15 s	60°C	maximal 40 Zyklen
30 s	72°C	
∞	4°C	

Tabelle 2-10: Temperaturverlaufsprotokoll der Real-time PCR

Die Auswertung erfolgte mittels *StepOne* Software als relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

2.2.3.6 Genexpressionsanalysen

2.2.3.6.1 Human GeneChip® Gene 1.0 ST Arrays (Affymetrix)

Material	QGP-1 Zellen, Siomycin A, DMSO, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Uracil DNA Glycosylase, <i>Apurinische</i> /Apyrimidinische Endonuklease
Puffer/Kits	RNA Isolationskit, All-Stars-negative Control siRNA, Flexitube Hs_FOXM1_6 siRNA, WT Expression Plus Kit, WT terminal labeling Kit, Hybridization Wash and Stain Kit, Human/Mouse/Rat Gene 1.0ST Array
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Zellkulturschrank, Bioanalyzer, Hybridisierungsofen, Fluidics Station 450, GeneChipScanner 3000 G7, PC, Pipetten

Die Zellen wurden über 72 Stunden mit 1 μ M Siomycin A oder DMSO sowie mit siRNA gegen FOXM1 (siRNA FOXM1_6) oder einer Kontroll-siRNA ohne Zielsequenz (*All-Stars-negative Control siRNA*) behandelt, geerntet und die RNA mittels RNAeasy Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Die technischen Arbeitsschritte der cDNA Synthese, Hybridisierung, Rohdatenauswertung und Pathwayanalyse wurden im Labor für funktionelle Genomforschung (LFGC) der Charité Berlin durchgeführt.

Zunächst wurde die Qualität der RNA im Bioanalyzer bestätigt. In einem ersten Amplifikationszyklus wurde aus 300 ng RNA cDNA synthetisiert, und in einem zweiten Zyklus wurden mittels *WT Expression Plus Kit* DNA Einzelstränge mit Desoxyuridin-Inkorporierung synthetisiert. Anschließend wurden 5,5 µg

der Einzelstrang DNA durch einen Uracil DNA Glycosylase (UDG) /Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease (APE1) – Mix fragmentiert und mit *WT terminal labeling Kit* biotinyliert. Anschließend wurde die DNA im Hybridisierungsmix (*Hybridization Wash and Stain Kit, Affymetrix*) bei 45°C und 60 rpm für 16 Stunden auf den Human/Mouse/Rat Gene 1.0ST Array entsprechend den Herstellerangaben hybridisiert. Danach erfolgten Färbung und Waschen in der *Fluidics Station 450* und das Auslesen der Daten mittels *GeneChipScanner 3000 G7*, ebenfalls entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Datenanalyse der CEL Files erfolgte mittels Partek Genomics Suite 6.6 Software und mittels Analysetool der *Panther Pathway* Datenbank.

2.2.3.6.2	nCounter®	PanCancer	Pathway	Analyse	(Nanostring)
-----------	-----------	-----------	---------	---------	--------------

Material	Humane GEP-NEN Tumorzellen, diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße
Puffer/Kits	RNA Isolationskit, PanCancer Panel (nCounter®)
Geräte und Chemikalien	Diverse Kühlschränke, Zellkulturschrank, Thermocycler, nCounter® Prepstation und Scanner, Zentrifuge, Eismaschine, Plattenzentrifuge, Nanodrop, Pipetten

Die nCounter[®] Technologie erlaubt Multiplex-Genexpressionsanalysen und bildet somit eine Zwischentechnologie zwischen genomweitem (Mikroarrays) und gezieltem Expressions-Profiling PCRbasierter Methoden [206]. Es wird direkt mit RNA ohne Zwischenschritte über cDNA oder Amplifikation gearbeitet (Abbildung 2-1). Dabei binden die 35-50 Basen langen Sonden des Codesets, die Capture Probes, durch Hybridisierung an die mRNA Moleküle. Die Visualisierung findet über die Biotin-Streptavidin vermittelte Bindung von Reporter-Sonden statt, die 5' an einen fluoreszierten Farb-Barcode gekoppelt sind, der nach Immobilisierung und Ausrichtung mittels eines Scanners in absoluter Molekülzahl ausgelesen werden kann [207].

Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und nach Angaben des Herstellers wurde die mRNA isoliert. Anschließend wurde der RNA Gehalt im Nanodrop vermessen. Danach wurden 60 ng RNA zur Hybridisierung nach Angaben des Herstellers eingesetzt und 21 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte das Beladen der Prepstation nach Anleitung. Die beladenen Kartuschen wurden nach dem Lauf gescannt und die Daten mittels nSolver Software und Excel ausgewertet (vgl. Abschnitt 2.2.5.3).



Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der nCounter® Technologie mRNA Lösung und Sonden werden A) gemischt und nach B) Hybridisierung und C) Waschen auf eine D) Oberfläche immobilisiert. Anschließend werden die Barcodes ausgerichtet und ausgelesen. Bildquelle: modifiziert aus Fortina und Surrey, 2008 [207].

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Immunnistochemie	2.2.4.1	Immunhistochemie
--------------------------	---------	------------------

Material	FFPE Paraffin-Schnitte (Kollektiv 2), diverse Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Primärantikörper (FOXM1 H-300)
Puffer/Kits	Zitratpuffer, TBS-T, DAKO-Kit-AP (K5005), Hämalaun-Färbelösung
Geräte und Chemikalien	4°C/-20°C Kühlschrank, Pipettierhilfe, Pipetten, Färbeschalen, Wasserbad, Dampfkochtopf, feuchte Kammern

Alle technischen Arbeitsschritte der Immunhistochemie wurden nicht durch mich selbst, sondern in der Pathologie der Charité durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden 5 min im Dampfkochtopf mit Zitratpuffer behandelt, um die Antigene zu renaturieren. Anschließend wurde die Immunhistochemie nach Herstellerangaben mit dem DAKO-Kit

nach der APAAP Methode durchgeführt. Der Primärantikörper (FOXM1 H-300) wurde 1:100 eingesetzt. Die Kerne wurden mittels Hämalaun gegengefärbt.

Die Auswertung zur Anti-FOXM1 Färbung erfolgte verblindet unter Anleitung und Gegenprobe durch erfahrene Pathologen. Dazu wurden zunächst der zytoplasmatische und der nukleäre Score getrennt erfasst. Der zytoplasmatische Score wurde wie folgt ermittelt: 0 = negativ, 1 = schwache Färbung, 2 = moderate Färbung, 3 = starke Färbung. Der nukleäre Score wurde einer bereits veröffentlichten Arbeit an neuroendokrinen Lungentumoren entnommen [190] und berechnete sich wie folgt: der Anteil der Zellen mit positiver Kernfärbung wurde ermittelt als 0 (0 %), 1 (1 % - 10 %), 2 (11 % - 50 %) und 3 (>50 %) und multipliziert mit der Intensität 0 = negativ, 1 = schwache, 2 = stark. Anschließend wurden Schnitte, die eine starke Kern- und Zytoplasmafärbung aufwiesen, als hohe FOXM1 Expression eingestuft, alle anderen Fälle als niedrige Expression.

Die Bewertung von STAT3 und phospho-STAT3 lag zu Beginn des Projekts bereits vor und war wie folgt vorgenommen worden: 0 = negativ, 1 = schwache Färbung, 2 = moderate Färbung, 3 = starke Färbung. Die Dichtomisierung der Variable erfolgte in die Gruppe 0 und 1 = negativ, 2 und 3 = positiv. Die übrigen einbezogenen Scores, beispielsweise für Survivin, sind bereits publiziert [93, 121].

2.2.5 Statistische und bioinformatische Auswertung

Als signifikant wurden prinzipiell Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 bezeichnet.

2.2.5.1 Auswertung der Platten-Assays

Die Auswertung der WST-1 Platten-Assays erfolgte mittels Prism 6 Software. Dazu wurden die Messwerte der 5 biologischen Replikate zunächst mittels Kolmogorow-Smirnow-Test darauf überprüft, ob die Annahme einer Normalverteilung verworfen werden muss. Anschließend wurden die Daten mittels Grubbs (ESD) Test [208] auf Ausreißer getestet. Aufgrund der Seltenheit wurden die Ausreißer in der Regel nicht entfernt, allerdings möglichst Datensätze ohne Ausreißer verwendet. Zur besseren Darstellung der Verteilung der Daten wurden weitestgehend der Median und der Interquartilenabstand gewählt, so dass Ausreißer in der Grafik zu erkennen sind, jdoch nicht überproportional ins Gewicht fallen.

Bei Datensätzen, für die die Annahme der Normalverteilung nicht verworfen werden musste, wurde eine einfache oder zweifache Varianzanalyse (ANOVA) – je nach Struktur des Datensatzes – durchgeführt. Als Posttests wurden je nach Fragestellung Sidak, Dunnett, Turkey oder Bonferroni-Korrekturen durchgeführt. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mittels Kruskal-Wallis oder Friedman-Test ausgewertet. Die Berechnung der IC50 erfolgte mittels nichtlinearer Regression der log-transformierten Daten. Als Parameter zur Kurvenanpassung wurde *log(inhibitor) variable slope* verwendet. Die auf die Kontrollen normalisierten Daten wurden zur Berechnung der relativen IC50 auf ihr internes Minimum (0 %) und Maximum (100 %) normalisiert, da die Plateaus in der Regel nicht identisch waren [209]. Zur Visualisierung der absoluten Effekte werden die Daten zusätzlich im Balken- und Liniendiagramm gezeigt. Zur Bewertung von Kombinationseffekten wurde die Methode nach Chou und Talaly mittels *CompuSyn* 1.0 Software angewendet [210, 211].

2.2.5.2 Auswertung der Immunhistochemie und der Densitometrie-Daten

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte mittels SPSS. Für die univariate Analyse wurden die Messwerte dichotomisiert (vgl. Abschnitt 2.2.4.1) und die nun nominalskalierten Variablen mittels Pearson-Chi-Quadrat Test ausgewertet. Für Analysen mit geringen Erwartungswerten (<5) wurde in einer 2 x 2 Kreuztabelle die exakte Signifikanz (2-seitig) mittels exaktem Test nach Fisher errechnet. Die multivariate Analyse erfolgte durch vorwärts und rückwärts gerichtete binäre logistische Regression. Das Gesamtüberleben wurde mittels Kaplan-Meier-Methode visualisiert (beginnend am Tag der Diagnose); das Überleben wurde mittels Mantel-Cox log rank-Test berechnet.

Die Daten densitometrischer Auswertungen wurden nicht dichotomisiert, sondern (im Falle nominaloder ordinalskalierter Gruppenzuordnung) mittels Mann-Whitney U-Test/Kruskal-Wallis-Test – je nach Anzahl der Gruppen – auf Unterschiede zwischen den Gruppen ausgewertet. Metrische Daten wurden mittels linearer Regression auf Abhängigkeiten untersucht.

2.2.5.3 Auswertung der Genexpressionsanalysen

2.2.5.3.1 Auswertung des Gene 1.0 ST Microarray

Die Rohdatenauswertung der Microarray-Daten wurde im Labor für funktionelle Genomforschung (LFGC) der Charité Berlin durchgeführt. Die CEL Files wurden mit den zugehörigen Library Files in Partek Genomics Siute 6.6 importiert. Anschließend wurde nach folgenden Algorithmen normalisiert: *Robust Multichip Average* (RMA) mit Quantil-Normalisierung, Log2 Transformation [212, 213] und *Median Polish Probe Set Summarization* [214]. Es wurde zudem eine Dekonvolution als RMA-Hintergrundkorrektur durchgeführt.

Differentiell exprimierte Gene wurden mittels mehrfaktorieller ANOVA bestimmt [215], der Cut-off für *False Discovery Rate* (FDR) wurde nach Benjamini und Hochberg bestimmt [216]. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl fielen jedoch keine Gene unter dieses Kriterium. Die Bewertung der p-Werte ohne Korrektur auf multiples Testen kann daher nur vorsichtig als Schätzung betrachtet werden.

Die Varianzanalyse erfolgte als zweifache ANOVA mit gepaarten Stichproben nach Eisenhart [217]. Als Kontrastmethode wurde die *Fishers Least Significant Difference* (LSD)-Methode angewendet [218]. Verglichen wurden jeweils die Siomycin A behandelten Proben mit den DMSO Kontrollen sowie die FOXM1 siRNA behandelten Proben mit den Proben, die mit Kontroll siRNA behandelt wurden. Die Pathway-Darstellung im KEGG Format sowie die hierarchische Clusteranalyse (mittels k-Means-Algorithmus, euklidischer Abstand) wurden ebenfalls mit Partek ermittelt.

In der weiter gehenden Analyse wurden eine *PANTHER Pathway* Zuordnung der Ergebnisse vorgenommen sowie ein PANTHER *Overrepresentation* Test der differentiell exprimierten Gene nach Siomycin A. Die Daten wurden dazu mit der GO Ontology Datenbank abgeglichen (Stand 06.08.2015).

2.2.5.3.2 Auswertung der nCounter[®] PanCancer Pathway-Analyse

Das PanCancer Codeset umfasst Gene aus 13 kanonischen krebsassoziierten Signalwegen [219] und stellt somit eine fokussierte Alternative zu aufwändigen Gesamtgenomexpressionsanalysen dar. Die Auswertung der nCounter Rohdaten wurde mit der nSolver Analyse-Software Version 2.5 durchgeführt. Dazu wurden die RLF Rohdaten importiert und der Hintergrund abgezogen. Dazu wurde der Durchschnitt (Abschnitt 3.3.2.1.4) oder das Maximum (Abschnitt 0) aller internen negativen Standardproben von den Messwerten subtrahiert. Anschließend wurde auf den Durchschnitt der internen Positiv-Kontrollen normalisiert und ein Normalisierungsfaktor zwischen 0,3 und 3 als Qualitätskriterium definiert. Die prozessierten Rohdaten wurden in Log2 der Counts festgehalten. Für die Pathway-Analyse wurden die nicht normalisierten Rohdaten verwendet, da die Software einen dynamischen geNorm-Algorithmus [220] zur Auswahl der stabilsten maximal 40 Haushaltsgene enthält und eine doppelte Normalisierung ausgeschlossen werden sollte. Nach Vergabe der Behandlungsgruppenannotation wurde diese dynamische Normalisierung ausgewählt sowie ein Grenzwert von 20 Counts und einer Beobachtungsfrequenz von 0,5 gesetzt. Anschließend wurde eine Hauptkomponentenanalyse (first principal component) durchgeführt [221], in der der Log2-fold Change der behandelten Proben gegenüber den Kontrollen berechnet und mittels Regression und FDR-Korrektur nach Benjamini und Yekutieli [216] statistisch bewertet wurde. Da die einzelnen Experimente immer auf einer Kartusche ausgeführt wurden, die Replikate zum gleichen Zeitpunkt entstanden und jeweils mit einer Zelllinie gearbeitet wurde, wurden keine weiteren Kovariaten einbezogen.

Außerdem wurde eine *Pathway Gene Significance Analysis* (GSA) durchgeführt. Dieser Algorithmus wird aus den T-Statistiken der einzelnen Signalwege errechnet und ähnelt im Prinzip den GSEA-Analysen von Microarray Daten [222]. Dabei errechnet sich die *Global Significance Statistic* für jede Kovariate als Quadratwurzel der durchschnittlichen quadrierten T-Statistik der einzelnen Signalwege:

global significance statistic =
$$\left(\frac{1}{p}\sum_{i=1}^{p}t_{i}^{2}\right)^{1/2}$$

t_i = *T*-Statistik des i-ten Genes.

Die gerichtete *Global Significance Statistic* hingegen bewertet die überwiegende Richtung der differentiellen Expression und berechnet sich aus der Quadratwurzel der durchschnittlichen quadrierten T-Statistik mit entsprechendem Vorzeichen (*sign*: -1 für *U* ist negativ, 1 für *U* ist positiv):

directed global significance statistic = $sign(U)|U|^{1/2}$

$$U = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^{p} sign(t)_{i} \cdot t_{i}^{2}$$

(Entnommen von Nanostring.com).

Zudem wurden alle signifikanten Gene mittels Pathview [223] in KEGG Diagrammen optisch aufgearbeitet. Weitere Informationen zur nSolver Software finden sich im *White Paper* auf Nanostring.com [224].

3. Ergebnisse

3.1 Voruntersuchungen

3.1.1Expression von MDM2, FOXM1 und STAT3 in gefrorenem Tumormaterial

Die Literatur zur Rolle von MDM2 in der Progression gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren beschränkt sich bisher auf die pankreatische Subgruppe, die verfügbaren Daten zu FOXM1 lediglich auf eine Veröffentlichung zu neuroendokrinen Tumoren der Lunge [190]. *TP53* ist hingegen bereits mehrfach untersucht worden (zusammengefasst in [19]). Zu Beginn des Projekts war deshalb zur Auswahl der Zelllinien und des Immunhistochemie-Kollektivs zunächst die Frage zu klären, ob der



Abbildung 3-1: Western Blot Analyse der Proteinexpression in GEP-NEN Biopsien

Beispielhafte Western Blots der ersten 4 Patientenbiopsien. Biologische Replikate (biol. Repl.) wurden zunächst getrennt erfasst. pNEC = pankreatisches neuroendokrines Karzinom, iNEN/C = ileale/s neuroendokrine/s Neoplasie/Karzinom. Bei Patient 1 zeigte sich besonders deutlich die Heterogenität der Tumoren.

Expression von FOXM1 und MDM2 auch in gastrointestinalen NEN eine klinische Bedeutung zukommt. Zudem sollten Daten zu möglichen Regulator- oder Effektor-Proteinen aus dem Netzwerk der MDM2p53-FOXM1 Achse bzw. deren posttranslationalen Modifikationen für eine weitere Evaluierung generiert werden.

Deshalb wurde in einem kleinen, prospektiv gesammelten GEP-NEN Kollektiv (Kollektiv 1, vgl. Abschnitt 2.1.9.1) aus frischem, gefrorenem Tumorgewebe die Expression von MDM2 und pan-FOXM1 sowie von STAT3, FOXO3a, phospho-(Thr32) FOXO3a, ERK1/2, phospho-(Thr202/Tyr204) ERK1/2, PTEN, phospho-(Thr366/S370) PTEN, p70S6K, phospho-(Thr389)p70S6K, Aurora A, p21, FOXO1, phospho-(Thr24)-FOXO1, FOXC2, mTOR, phospho-(Ser2448)mTOR, CK2 und pan-Aktin im Western Blot untersucht und verblindet densitometrisch quantifiziert (Abbildung 3-1).



Abbildung 3-2: Expression von MDM2, FOXM1 und STAT3 in Primärtumoren und Fernmetastasen

Die MDM2 Expression zeigte sich sowohl in der pankreatischen und gastrointestinalen Mischgruppe (A) wie auch in der gastrointestinalen Subgruppe (B) signifikant höher in den Fernmetastasen als in den Primärtumoren. In Lymphknotenmetastasen lagen die Werte etwa zwischen denen der Fernmetastasen und denen von Primärtumoren. Ebenfalls konnte für FOXM1 (C) und STAT3 (D) eine höhere Expression in den Fernmetastasen gegenüber den Primärtumoren gezeigt werden (Whitney U bzw. Kruskal-Wallis Test).



Abbildung 3-3: Korrelationen zwischen der Expression von FOXM1, STAT3 und MDM2 in Tumorbiopsien

Die Expression von FOXM1 korrelierte in den analysierten Tumorproben signifikant mit der Expression von STAT3 (A). Ein linearer Zusammenhang zwischen MDM2 und STAT3 (B) oder FOXM1 (C) konnte nicht gezeigt werden. N ergab sich aus der Anzahl der auswertbaren Banden in drei Versuchen für je beide Antikörper. Zur Identifikation geeigneter Haushaltsproteine zum Zweck der Normierung wurden Antikörper gegen β -Tubulin, β -Aktin, α -Aktin, Vinculin und pan-Aktin getestet und mit den Ponceau S Färbungungen abgeglichen. Die besten Ergebnisse wurden mit pan-Aktin erzielt, die übrigen Proteine schwankten trotz gleichmäßiger Gesamtproteinfärbung mit Ponceau S erheblich zwischen den einzelnen Patienten.

Phospho-Threonin 24 und 32 wurden ausgewählt, da die FOXO Proteine an diesen Aminosäuren von AKT phosphoryliert und inaktiviert werden [225] und somit eine potentielle Schnittstelle von AKT auf FOXM1 vorliegt. Threonin 202 und Tyrosin 204 sind aktivierende Phosphorylierungsstellen in der Aktivierungsschleife von ERK1 und 2.

Phosphorylierung an Threonin 366 und Serin 370 hingegen destabilisieren PTEN [226]. Threonin 389 Phosphorylierung der p70S6K korreliert mit der Aktivität dieser Kinase, und phospho-Serin 2448 in mTOR markiert dessen Aktivierung durch den PI3K-AKT Weg.

Die Biopsien wurden dazu in NP-40 Puffer überführt, mechanisch im Sonifikator homogenisiert und der zentrifugierte Überstand in -80°C gelagert. Von den meisten Tumoren wurden mehrere Tumorproben genommen, um verschiedene Tumorareale abzudecken.

Die Proben wurden getrennt im Western Blot analysiert, die Daten anschließend vor der Auswertung auf den Median aller identischen Proben aggregiert. Die Auswertung erfolgte dann auf Gewebeebene. Dazu wurde das Chemo-Lumineszenzsignal der Expression zunächst von allen Proteinen aus einem, im Anschluss von MDM2, FOXM1 und STAT3 aus drei bzw. vier verschiedenen Western Blot Experimenten pro Protein densitometrisch erfasst und der Durchschnitt der auf pan-Aktin und eine interne Kontrollprobe normierten Proben mittels Whitney U bzw. Kruskal-Wallis Test ausgewertet. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Chemilumineszenz-Signal von MDM2 in GEP-NEN Primärtumoren signifikant niedriger war als in Fernmetastasen (p=0,036). Diese Ergebnisse konnten in der gastrointestinalen Subgruppe bestätigt werden (p=0,049). Ebenso konnte für FOXM1 (p=0,041) und STAT3 (p=0,033) eine differentielle Expression zwischen Primärtumoren und Fernmetastasen nachgewiesen werden (Abbildung 3-2). Für die übrigen untersuchten Antigene ergaben sich keine Korrelationen mit klinischen Parametern. Außerdem zeigte sich, dass die Expression von FOXM1 in einem positiven linearen Zusammenhang mit der Expression von STAT3 steht (Abbildung 3-3; Pearson Koeffizient=0,894; p<0.001).

Aufgrund der relativ hohen Streuungen zwischen den Replikaten, die mit der erhöhten Fehleranfälligkeit densitometrisch quantifizierter Western Blot Daten einhergeht, bestand die Notwendigkeit, diese Vordaten im weiteren Verlauf alternativmethodisch abzusichern.

3.1.2 Charakterisierung der Zelllinien als geeignete in vitro Modelle für GEP-NEN

Aufgrund der begrenzten Datenlage und der fehlenden Dokumentation neuroendokriner Zelllinien durch Zellbanken sollte zunächst eine grundhafte Definition der verwendeten Zellkulturmodelle erstellt werden. Notwendige, in Absatz 1.3.2 definierte Charakteristika, wurden im Folgenden überprüft und dokumentiert.

3.1.2.1 Wachstum

BON und QGP-1 Zellen wuchsen als adhärente einschichtige Kultur. LCC-18 zeigten sich teilweise adhärent, teilweise nicht-adhärent, wobei die adhärenten deutlich stärker neuroendokrine Marker exprimierten. KRJ-I Zellen formten sich als nicht-adhärente Zelllinie hingegen zu dreidimensionalen Spheroid-Kulturen (Abbildung 3-4). BON Zellen lagen mit einer Verdopplungszeit von 17 h deutlich unter den Abgaben in der Literatur [227] und sogar unter der Verdopplungszeit der als Kontrolle verwendeten kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29 mit 25 h. QGP-1 und LCC-18 Zellen lagen mit 35 h bzw. 30 h deutlich darüber. KRJ-I Zellen variierten je nach Passagenzahl und Präkonditionierung des Mediums von 32 h bis mehrere Tage (alle Wachstumsdaten sind allgemeine, unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Bei der BON Zelllinie, die bereits vor 25 Jahren generiert wurde und von der junge Passagen nicht mehr verfügbar sind, ergab sich somit eine deutliche Differenz zur Literatur in Hinsicht auf die Wachstumsgeschwindigkeit, die in die Interpretation der Ergebnisse einfließen muss.



Abbildung 3-4: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten GEP-NEN Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet: A) BON: adhärente Zelllinie aus der Lymphknotenmetastase eines gut differenzierten neuroendokrinen Pankreastumors [193]. B) QGP-1: adhärente pankreatische Zelllinie aus einem gut differenzierten metastatischen Somatostatinom [184, 194]. C) LCC-18: semi-adhärente Zelllinie aus einem unbehandelten, schlecht differenzierten Kolonkarzinom (Primarius) mit neuroendokriner Differenzierung [182]. D) KRJ-I: nicht-adhärente Zelllinie aus einem mäßig differenzierten metastatischem neuroendokriner lieum-Primärtumor [195]. Vergrößerung 100 x.

3.1.2.2 Neuroendokrine Marker

Die weitere neuroendokrine Charakterisierung der Zelllinien erfolgte regelmäßig anhand des Expressionsmusters neuroendokriner und Differenzierungsmarker mittels Fluoreszenzmikroskopie (Tabelle 3-1, Abbildung 3-5).

Dabei konnten deutliche Unterschiede in der Expression von Sekretions- und Differenzierungsmarkern festgestellt werden. Während die gut differenzierten pankreatischen Zelllinien BON und QGP-1 verstärkt Chromogranin A, Synaptophysin A und epitheliale Zytokeratine exprimierten, zeigten sich bei den mäßig differenzierten, nicht-adhärenten KRJ-I eine deutliche Expression des mesenchymalen Markers Vimentin sowie ein deutlich schwächeres Immunfluoreszenzsignal in den sekretorischen Markern. LCC-18 Zellen exprimierten sowohl Vimentin als auch Zytokeratin, zeigten jedoch nur eine schwache Immunoreaktivität für neuroendokrine Marker.



Abbildung 3-5: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis neuroendokriner Marker in GEP-NEN Zelllinien

Die Immunfluoreszenzfärbung neuroendokriner Tumorzelllinien zeigte die charakteristische Marker-Expression der verwendeten Zelllinien und eine Abnahme der sekretorischen Proteine Chromogranin A, Syntaxin und Synaptophysin A in den schlechter differenzierten Zelllinien LCC-18 und KRJ-I. Zudem konnte die deutliche Verschiebung von der Expression des epithelialen Markers Zytokeratin hin zur Expression des mesenchymalen Vimentins in KRJ-I und LCC-18 gegenüber BON und QGP-1 gezeigt werden. KRJ-I wurden mittels Cytospin auf den Objektträger aufgebracht. Fluoreszenzmikroskopie; sekundärer Antikörper Alexa Fluor[®]488 (grün) gekoppelt mit DAPI Gegenfärbung (blau); Vergrößerung: 200-400 x.

	Chromo-	Synapto-			Synapto-			pan-
Zelllinie	granin A	physin A	Vimentin	Syntaxin	brevin	VMAT1	Survivin	Cytokeratin
BON	++	++	++	+	+	(+)	+	+++
QGP	++	+++	+++	+++	(+)	-	+	+++
KRJ	+	(+)	+++	-	+	(+)	++	-
LCC	-	+	+++	+	+	(+)	+	+++

Tabelle 3-1: Expression neuroendokriner und Differenzierungsmarker in GEP-NEN Zelllinien

Die Expression neuroendokriner Marker (Chromogranin A, Synaptobrevin, VMAT1, Syntaxin und Synaptophysin A) und von Differenzierungsmarkern (Cytokeratin, Vimentin) sowie von Survivin wurde in regelmäßigen Abständen in den verwendeten Zelllinien wie folgt mittels Immunfluoreszenzfärbung verifiziert: keine Färbung: -; schwache Färbung: +; mäßige Färbung: ++; starke Färbung: +++. Die semi-quantitative Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.1.2.3 Signaltransduktion

Zur Analyse der nativen FOXM1 Expression der Zelllinien wurden verschiedene Antikörper im Western Blot getestet (FOXM1 C-20, FOXM1-H300, FOXM1 D12D5, FOXM1 G-5). Als Positivkontrolle wurden Lysate der Osteosarkom Zelllinie U-2 OS mitgeführt, die FOXM1 stark exprimiert.

Alle Zelllinien exprimierten FOXM1. Der verwendete polyklonale Antikörper (FOXM1 C-20) wurde ausgewählt, weil er das am deutlichsten unterscheidbare Bandesmuster zeigte, die als FOXM1 Isoformen interpretiert wurden und damit auch dem monoklonalen FOXM1 D12D5 Antikörper überlegen war (Abbildung 3-6). Später wurde auch der neue monoklonale FOXM1 G-5 Antikörper verwendet.



Abbildung 3-6: Expression von FOXM1 in GEP-NEN Zelllinien

Die Western Blot Analyse nativer, nicht starvierter GEP-NEN Zelllinien mit einem pan-FOXM1 Antikörper zeigte mehrere Banden, bei denen es sich mutmaßlich um die drei verschieden FOXM1 Isoformen und im Falle der Doppelbanden um deren phosphorylierte Formen handelte.

Zur weiteren Charakterisierung der Zelllinien im Hinblick auf die Expression und den Aktivierungszustand möglicher weiterer Regulatoren von FOXM1 wurden verschiedene FOXM1-Netzwerk Proteine und Mediatoren des PI3K-Weges in den nativen, nicht starvierten Zelllinien im Western Blot analysiert (Abbildung 3-7).



Abbildung 3-7: Expression weiterer möglicher Interaktoren der MDM2p53-FOXM1 Achse in GEP-NEN Zelllinien

Die präliminäre Analyse der nativen Zelllinien zeigte deutliche Unterschiede in der Expression von p53, Aurora A und Lamin A/C sowie Regulatoren zellulärer von Proliferation [228]. Auch die Expression und **AKT-abhängige** Ser166-Phosphorylierung von MDM1 variierte zwischen den Zelllinien. Zudem zeigten KRJ-I und QGP-1 eine Aktivierung PI3K-Weges, des beispielweise durch die Phosphorylierung von AKT, mTOR und den FOXM1 Regulator FOXO3a [229].

Hierbei zeigte sich beispielweise, dass p53, MDM2 und CHK2 Expression deutlich zwischen den Zelllinien variieren. Auch weitere Regulatoren des Zellzyklus und der Chromatin-Organisation, Aurora A sowie Lamin A und C [230], weisen in den Zelllinien eine sehr unterschiedliche Expression auf. Der PI3K-Weg scheint vor allem in KRJ-I und QGP-1 aktiviert zu sein, was an der deutlichen Phosphorylierung von FOXO3a, AKT und mTOR zu erkennen war.

3.1.2.4 TP53 Mutationen

Da GEP-NEN klinisch selten p53 Mutationen tragen, wurde zum Abgleich genomische DNA aus allen Zelllinien isoliert, die Sequenzierung von *TP53* in den Zelllinien in Auftrag gegeben und in der Pathologie der Charité Berlin durchgeführt. Als Ergebnis des *Deep Sequencing* zeigten sich funktionell relevante Mutationen in drei von vier Zelllinien (Abbildung 3-8). Die ermittelte AS-Substitution (R282W) bei LCC-18 wurde bereits in der Literatur beschrieben [231]. Diese destabilisiert die H2 Helix von p53 und führt zu Konformationsänderungen in der DNA Bindedomäne.

Die Mutationen in BON und QGP-1 induzieren einen Translationsabbruch durch ein verführtes Stop-Codon und induzieren somit eine verkürzte und mutmaßlich funktionell eingeschränkte Variante von p53. Bei BON ist davon das Tetramerisierungsmotiv und bei QGP-1 sind das Tetramerisierungsmotiv und die DNA Bindedomäne betroffen. Bei QGP-1 konnte auch in allen folgenden Analysen im Western Blot kein p53 dargestellt werden [232].



Abbildung 3-8: Analyse des TP53 Genotyps in GEP-NEN Zelllinien

A) Mittels *Deep Sequencing* wurde in KRJ-I Zellen Wildtyp *TP53* nachgewiesen, während eine Aminosäure-Substitution an Position 282 (R282W) in LCC-18 Zellen auftrat. In BON Zellen zeigte sich eine *Nonsense*-Mutation an Position 342 (R342*), die zu einem verfrühten Stop Codon führt. QGP-1 Zellen zeigten eine Einzelbasen-Deletion in Exon 4, jedoch wurden nicht alle Qualitätskriterien erfüllt. B) Eine anschließende Sanger-Sequenzierung der betroffenen Region bestätigte die Deletion, in deren Folge eine Leserahmenverschiebung (*Frame shift*) an Position 98 von p53 auftritt und zu einem verfrühten Translationsstop an Position 122 (P98fs*25) führt. Alle Mutationen traten zu 100 % auf, waren also entweder homozygot vorhanden oder durch LOH auf das mutierte Allel reduziert. Bildquelle: Dr. Markus Möbs, modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

3.1.2.5 Amplifikationen von MDM2

Um zusätzlich weitere Aussagen zur MDM2 Expression treffen zu können, wurde zudem eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gegen *MDM2* in Auftrag gegeben und im Labor unserer Kooperationspartner in der Pathologie durchgeführt.



Abbildung 3-9: *MDM2* Gen-Amplifikationen in GEP-NEN Zelllinien

BON (A) und KRJ-I (B) wiesen keine Amplifikation im MDM2 Gen (orange) auf. Bei LCC-18 (C) konnte eine Trisomie des Chromosomens 17 und somit eine dritte Kopie von MDM2 nachgewiesen werden. In QGP-1 Zellen (D) zeigten sich sowohl eine Pentasomie 17 als auch ein MDM2 Amplifikations-Cluster, so dass etwa 25 Kopien fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden konnten. Fluoreszenzmikroskopie mit 400 x Vergrößerung; orange: *MDM2*, grün: alpha-Satellit DNA zur Bestimmung der Chromosomenzahl. Bildquelle: Stefanie Mende; modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Durch FISH konnte gezeigt werden, dass die Zahl der *MDM2* Genkopien in BON und KRJ-I Zellen keine Aberrationen aufwiesen, während LCC-18 eine Trisomie 17-bedingte Erhöhung der Anzahl der *MDM2*-Kopien aufwies. Bei QGP-1 konnten pro Zelle ca. 25 Kopien von *MDM2* nachgewiesen werden, die sich sowohl aufgrund einer Pentasomie 17 als auch aus Amplifikationen des Genes selbst ergaben (Abbildung 3-9). Da QGP-1 im Western Blot die stärkste MDM2 Protein-Bande zeigte, stimmen die Daten diesbezüglich mit den Ergebnissen in Abbildung 3-7 überein. Dass LCC-18 trotz höherer Kopienzahl im Western Blot schwächere MDM2 Banden zeigte als KRJ-I, erklärt sich möglicherweise aus regulatorischen Zusammenhängen wie beispielsweise der deutlich stärkeren PI3K-Weg Aktivierung in KRJ-I.

3.1.2.6 Zusammenfassung

Die Charakterisierung der Zelllinien zeigte vor allen, dass *TP53* in drei von vier Zelllinien ungewöhnlich häufig mutiert war. Untersuchungen, die Wildtyp *TP53* voraussetzen, können demnach nur an einer Zelllinie (KRJ-I) durchgeführt werden. KRJ-I Zellen bilden die Charakteristika neuroendokriner Tumoren von allen Zelllinien am besten ab und wuchsen zudem in Spheroiden, was die Simulation pharmakologischer Zusammenhänge wirklichkeitsnaher ermöglicht als in einschichtigen Zellkulturen. Zur Untersuchung von p53-unabhängigen, aber MDM2-induzierten Effekten und als p53^{-/-} Kontrolle boten sich QGP-1 Zellen aufgrund der *MDM2* Amplifikationen an.

Die am häufigsten verwendete BON Zelllinie schien aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate und den häufigen Mutationen ein weniger gutes Modell zu sein. Die hohe Wachstumsrate wiederum dürfte ein selektiver Vorteil bei der Generierung von Xenograft-Modellen sein, die sich bei neuroendokrinen Tumoren entsprechend als eher schwierig darstellt [183]. Die Auswahl der Zelllinien musste also dem Kontext der Fragestellung angepasst werden.

		Neuroendo- krine Marker-		Mutmaßlich relevante Mutationen und chromosomale
Zelllinie	Wachstum	Expression	Signaltransduktion	Aberrationen
BON	schnell	stark	schwache Aktivierung des	100% TP53 (COSM11073:
	(VZ: 17h)		PI3K-Weges, FOXM1	p.R342*; c.1024C>T);
			Expression (weitestgehend	100 % <i>NRAS</i> (COSM584: p.Q61R;
			nukleäre Signale, vgl.	c.182A>G);
			Abbildung 3-17)	Weitere: Verlust CDKN2A [233] ,
				CDKN2B [233], 100% ATRX
				(p.Q929E; g.77682471C>G)
				[234]; TSC2 (3x missense) [234]
QGP-1	langsam	stark	deutliche Aktivierung des	100 % <i>TP53</i> (p.P98fs*25;
	(VZ: 35h)		PI3K-Weges, FOXM1 und	c.293delC);
			Aurora A Expression, keine	71 % KRAS (COSM520: p.G12V;
			Expression von p53	c.35G>T); MDM2 Amplifikation
			nachweisbar	und Pentasomie 17;
				weitere: ATM (p.K2749I;
				c.8246A>T) [235]; <i>ATRX</i> 100 %
				(g.77682716A>G; p.F847S)
				[234]
LCC-18	mäßig	schwach	schwache Aktivierung des	100 % <i>TP53</i> (COSM10704:
	(VZ: 30h)		PI3K-Weges, FOXM1 und	p.R282W; c.844C>T);
			Aurora A Expression,	53 % BRAF (COSM476: p.V600E;
			Expression von p53	c.1799T>A); Trisomie 17 (<i>MDM2</i>)
KRJ-I	langsam	mäßig	deutliche Aktivierung des	Wildtyp <i>TP53</i>
	(VZ: >32h)		PI3K-Weges, FOXM1 und	
			Aurora A Expression	
			(weitestgehend	
			zytoplasmatische FOXM1	
			Signale, vgl. Abbildung	
			3-17), Expression von p53	

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Charakterisierung der ZelllinienVZ=Verdopplungszeit

3.1.3 Validierung des Immunhistochemie-Kollektivs

Um die Güte des für die Immunhistochemie vorgesehenen Kollektivs 2 (vgl. Abschnitt 2.1.9.2) zu validieren, wurden zunächst bekannte klinische Parameter auf ihre Plausibilität geprüft. Die erwarteten Abhängigkeiten, wie das vermehrte Auftreten von Metastasen bei einem Proliferationsindex >2 und prognostische Zusammenhänge zwischen Differenzierung, Grading und dem Auftreten von Metastasen, konnten bestätigt werden (Abbildung 3-10).

Das Kollektiv 2 war entsprechend der Zusammensetzung repräsentativ für GEP-NEN und wurde zur weiteren Analyse von FOXM1 in GEP-NEN heran gezogen.



Abbildung 3-10: Qualitative Bewertung des Immunhistochemie-Kollektivs anhand klinischer Zusammenhänge Das für die Immunhistochemie vorgesehene Kollektiv 2 (vgl. Abschnitt 2.1.9.2) wurde zunächst auf die Plausibilität der klinischen Daten geprüft. A) Zusammenhang zwischen Ki67 Proliferationsindex und Metastasierung: das Auftreten von Metastasen steigt beim Übergang von G1 auf G2 stark an; gestrichelte Linien bei Ki67=2 und Ki67=20 (Übergang G1/G2 und G2/G3). B-D) Prognosemarker (Log Rank Mantel Cox Test): das kumulative Überleben und somit die Prognose hängt von folgenden Faktoren ab: B) Differenzierung (p=0,000), C) Grading (p=0,000) und D) Auftreten von Metastasen (p=0,000).

3.2 FOXM1 in GEP-NEN

3.2.1 Expression von FOXM1 in primärem Tumormaterial

Bisher wurden zur klinischen Relevanz der FOXM1 Expression in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren, im Gegensatz zu Untersuchungen von MDM2 und p53, keine Daten erhoben. FOXM1 könnte aber als mögliches Bindeglied zwischen der aberranten Aktivierung der PI3K-AKT-mTOR Achse und der Überexpression von Regulatoren chromosomaler Instabilität (wie Survivin und Aurora Kinasen) ein mögliches therapeutisches Ziel und/oder einen klinischen Marker darstellen. Deshalb wurde zunächst in einem Kollektiv aus 131 GEP-NEN paraffinierten Tumorbiopsien die Expression von FOXM1 evaluiert. Zudem wurde zur Bestätigung der Vordaten aus dem prospektiven Kollektiv 1 ein Teilkollektiv von 36 Proben gegen STAT3 und phospho-(Tyr705) STAT3 gefärbte Schnitte ausgewertet. Die Färbungen wurden in der Pathologie der Charité Universitätsmedizin durchgeführt. Anschließend wurden sowohl das Gesamtkollektiv als auch Teilkollektive (separiert nach pankreatisch und gastrointestinal sowie separiert nach Herkunft der Proben) analysiert. Grund dafür war die Notwendigkeit, pankreatische und nicht-pankreatische GEP-NEN auch als getrennte Entitäten zu betrachten und um einen möglichen Bias, der beispielsweise durch die unterschiedliche Präparation der beiden Teilkollektive aus Jena und Berlin entstanden sein könnte, auszuschließen.

		Nukleäres		M0/M1
Parameter	Nukleäres STAT3	Suvivin	Grading	Status
FOXM1 Expression	N=36	N=49	N=131	N=128
	<i>p</i> =0,001*	<i>p</i> =0,030*	G1 vs. G2/G3:	n.s.*
			<i>p</i> =0,017*	
			<i>p</i> =0,030**	
Nukleäres STAT3		N=36	N=36	N=36
		n.s.*	G1/G2 vs. G3:	<i>p</i> =0,007*
			n.s.*	<i>p</i> =0,017**
Nukleäres Survivin			N=49	N=46
			G1/G2 vs. G3:	<i>p</i> =0,000*
			<i>p</i> =0,000*	<i>p</i> =0,000**
			<i>p</i> =0,000**	

Tabelle 3-3: Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Immunhistochemie Analysen Dargestellt wurden die Analysen der FOXM1 (N=131), STAT3 (N=36) und Survivin (N=49) Färbungen. Niedrigere Fallzahlen resultierten aus unbekanntem MO/M1 Status. Bewertet wurden positive Zusammenhänge zwischen Spalten und Zeilen mittels Chi-Quadrat Test oder Exaktem Test nach Fisher. Vorhersagewerte der multivariaten Analysen (STAT3 vs. FOXM1 vs. Survivin): MO/M1: 83,3 %; Differenzierung G1/G2 vs. G3: 94,4 %; Differenzierung G1 vs. G2/G3: 80,6 %. Legende: *univariate Analyse, **multivariate Analyse; modifiziert nach Briest et *al.* 2015 [197].



Abbildung 3-11: Immunhistochemische Färbungen gegen FOXM1 und STAT3

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Primärtumoren bei 200 x Vergrößerung: A) ilealer G1 NEN mit Lebermetastasierung, schwache FOXM1 und STAT3 Färbung; B) ilealer G2 NEN ohne Metastasierung, mittlere Färbung; C) G1 NEN des Duodenums ohne Metastasen, FOXM1 nur nukleäre Färbung, STAT3 mittlere Färbung; D) schlecht differenzierter Magen G3 NEC mit Lebermetastasierung, starke Färbung. Modifiziert nach Briest et *al.* 2015 [197].

In die Auswertungen wurden ebenfalls bereits veröffentlichte Daten zur Survivin (N=49), p16 (N=31), p21 (N=31), p27 (N=32) und BAX (N=31) Expression zur Analyse möglicher regulatorischer Zusammenhänge mit einbezogen [93, 121].

Eine starke FOXM1 Färbung (Abbildung 3-11) konnte in 30/131 (22.9 %) der GEP-NEN Fälle nachgewiesen werden. Hierbei gab es jedoch deutliche Unterschiede zwischen pankreatischen und gastrointestinalen NEN:

In einer zunächst univariaten Analyse zeigten insgesamt 9/72 (12,5 %) der gut differenzierten gastrointestinalen G1 und G2 Tumoren und 6/16 (37,5 %) der schlecht differenzierten G3 gastrointestinalen Tumoren eine hohe FOXM1 Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren eine hohe Expression von FOXM1 sowohl mit dem Proliferationsindex Ki67 (p=0,000) und damit auch dem Grading (p=0,001) und der Differenzierung (Exakter Test nach Fisher; p=0,026) assoziiert ist. Aufgrund der geringen Fallzahlen von niedrig malignen Tumoren mit hoher FOXM1 Expression wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet, um entsprechend robuste Erwartungswerte zu erhalten. Die Signifikanzwerte bei den nicht dichotomisierten Variablen (Grading und Ki67) sind somit vorsichtig zu beurteilen.

Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich G2 Tumoren mit 6/17 (35,3 %) Biopsien mit hoher FOXM1 Expression eher wie G3 Tumoren verhalten. Die FOXM1 Expression unterscheidet sich also maßgeblich zwischen G1 und G2/G3 Tumoren (p=0,000). Diese Daten konnten sowohl im Teilkollektiv aus Jena (Exakter Test nach Fisher; p=0,012) als auch im Teilkollektiv aus Berlin (Exakter Test nach Fisher; p=0,012) als auch im Teilkollektiv aus Berlin (Exakter Test nach Fisher; p=0,007) getrennt bestätigt werden. Außerdem konnte der Anstieg der FOXM1 Expression von G1 auf G2/G3 auch am gesamten GEP-NEN Kollektiv (N=131) in univariater (p=0,017) und multivariater Analyse (p=0,030 mit 80,6 % Voraussagewert) bestätigt werden.

Wenn man nun die G1 Tumoren mit hoher und niedriger FOXM1 Expression getrennt nach gastrointestinal und pankreatisch genauer betrachtet (Abbildung 3-12), fällt auf, dass bei pankreatischen NEN der Anteil an FOXM1 hoch exprimierenden G1 Tumoren bei 37 % und somit in der Dimension von G2 und G3 Tumoren lag. Der signifikante Unterschied zwischen G1 und G2/G3 Tumoren im GEP-NEN Gesamtkollektiv beruhte demzufolge auf dem insgesamt höheren Anteil an gastrointestinalen Tumoren, da bei letzteren der Anteil an FOXM1 hoch exprimierenden G1 Tumoren mit 5 % sehr niedrig war (Abbildung 3-12). FOXM1 steht also nur bei gastrointestinalen Tumoren mit dem Übergang von G1 auf G2/G3 in Verbindung, während die aggressiveren pankreatische NEN generell eine hohe FOXM1 Expression zeigen.



Abbildung 3-12: Zusammenhang zwischen hoher FOXM1 Expression und Grading in GEP-NEN

A) Der Zusammenhang zwischen dem Proliferationsindex Ki67 und FOXM1 Expression in GEP-NEN und gastrointestinalen NEN zeigte signifikante Unterschiede zwischen Tumoren mit hoher und niedriger FOXM1 Expression. Diese Unterschiede fielen deutlicher bei den gastrointestinalen NEN aus. Bei den pankreatischen Tumoren zeigte sich ein auffälliger Anteil niedrig maliger Tumoren mit hoher FOXM1 Expression im Vergleich zu den gastrointestinalen NEN (rot); gestrichelte Linien bei Ki67=2% und Ki67=20% (Übergang G1/G2 und G2/G3). B) Während die Verteilung der verschiedenen Grading Subgruppen (G1-G3) in den FOXM1 niedrig exprimierenden Tumoren zwischen pankreatischen und gastrointestinalen NEN nahezu identisch war, zeigte sich bei den FOXM1 hoch exprimierende Tumoren ein deutlich höherer Anteil an G1 Tumoren bei den gemischten GEP-NEN. C) FOXM1 hoch exprimierende G1 Tumoren stellten bei den pankreatischen NEN etwa 37 % dar, im Gegensatz zu den gastrointestinalen NEN, bei denen nur 5 % der G1 NEN eine hohe FOXM1 Expression aufwiesen. Grafik teilweise und modifiziert aus Briest et *al.* 2015 [197].

Klinisch gesehen stellt der Übergang von G1 auf G2 auch eine starke Erhöhung der Metastasierungswahrscheinlichkeit dar. Im vorliegenden gastrointestinalen Kollektiv waren 26 % der G1 Tumoren metastasiert gegenüber 66,7 % der G2 und G3 Tumoren. Entsprechend korrelierte die hohe Expression von FOXM1 hier auch mit dem Auftreten von Metastasen (*p*=0,007). Im Gesamtkollektiv und in multivariater Analyse konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigt werden.

Sowohl für starkes nukleäres Survivin als auch für eine starke nukleäre STAT3 Färbung (Abbildung 3-11) konnte in uni- und multivariater Analyse ein Zusammenhang mit Metastasierung in GEP-NEN gezeigt werden (Tabelle 3-3). Die bereits publizierten Daten zu nukleärem Survivin als prognostischer Marker in Bezug auf das kumulative Überleben [121] konnten in einer multivariaten Analyse inhaltlich konsistent unterstützt werden. In dieser wurde entsprechend gezeigt, dass Survivin mit Differenzierung und Metastasierung (ebenfalls starke prognostische Marker) korreliert (Tabelle 3-3).

Des Weiteren konnte die starke FOXM1 Expression mit einer starken nukleären Lokalisation von STAT3 sowohl in GEP-NEN (p=0,001) als auch in gastrointestinalen NEN (p=0,005) in Verbindung gebracht werden (Exakter Test nach Fisher), womit die Vordaten aus Kollektiv 1 bestätigt werden konnten (vgl. Absatz 3.1.1). Auch zwischen nukleärem Survivin und FOXM1 Expression konnte in gastrointestinalen NEN (p=0,030) und dem Gesamtkollektiv (p=0,029) ein Zusammenhang hergestellt werden (Exakter Test nach Fisher).

Aufgrund der Tatsache, dass Survivin durch FOXM1 reguliert wird [131], kann diese Ko-Regulation leicht erklärt werden, für einen regulatorischen Zusammenhang zwischen STAT3 und FOXM1 gibt es bisher jedoch nur wenige Hinweise [236].

Weitere Zusammenhänge, beispielsweise mit starker Immunreaktivität gegen phosphoryliertes STAT3 oder p16, p21, p27 und BAX, konnten in dieser Analyse nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann also die Schlussfolgerung gezogen werden, dass FOXM1 in gastrointestinalen NEN mit dem Übergang von G1 auf G2/G3 in Verbindung steht. Außerdem konnte der lineare Zusammenhang zwischen FOXM1 und STAT3 Expression aus Abschnitt 3.1.1 auch in diesem Immunhistochemie-Kollektiv bestätigt werden. Auch die Korrelation mit der Expression von Survivin konnte gezeigt werden und diese legt nahe, dass Survivin auch in GEP-NEN in Abhängigkeit von FOXM1 reguliert wird. In pankreatischen NEN wird FOXM1 bereits in G1 Tumoren in erhöhtem Maße exprimiert.

3.2.2 Einfluss der Expression von FOXM1 und MDM2 auf Proliferation und Chemosensitivität von GEP-NEN Zelllinien

FOXM1 beeinflusst die zelluläre Proliferation und die Regulation von DNA Reparaturmechanismen. Diese Mechanismen tragen zur Resistenz gegenüber genotoxischen Therapien und therapeutischer Bestrahlung bei. GEP-NEN sprechen verhältnismäßig schlecht auf Chemotherapeutika an, beispielsweise liegt die IC50 für Cisplatin *in vitro* im ein- bis zweistelligen Mikromolarbereich. Ob die Reduktion der FOXM1 Expression durch gezielten *Knockdown* der *FOXM1* mRNA mittels RNA Interferenz (RNAi) die generelle Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin steigert, wurde in einem WST-1 Proliferation Assay getestet. Hier zeigte sich, dass in QGP-1 Zellen der *Knockdown* von *FOXM1* allein (im Vergleich zu einer *non-targeting* Kontroll siRNA) die Proliferation bereits deutlich reduziert. Die Zugabe von Cisplatin senkte die Zellzahl zusätzlich leicht ab (Abbildung 3-13).

Ein vergleichbarer Effekt konnte bei KRJ-I Zellen, bei denen der Transkriptionsfaktor auch im Zellkern nicht nachgewiesen werden konnte, nicht gezeigt werden. Es kann also vermutet werden, dass eine hohe FOXM1 Expression (und Aktivität) einen selektiven Vorteil für Zellen hat und dass FOXM1 an den zellulären Mechanismen beteiligt ist, die die Antwort auf Cisplatin abschwächen. Der Grund hierfür könnte in der synthetischen Letalität von Cisplatin in Kombination mit DNA Reparatur-Defizienz liegen, da FOXM1 diese Mechanismen beeinflusst [132, 237].



Abbildung 3-13: Einfluss der FOXM1 Expression auf Proliferation und Chemosensitivität gegenüber Cisplatin QGP-1 und KRJ-I Zellen wurden über 24 h mit 30 nM siRNA gegen *FOXM1* (HU-12443-1) und einer Kontroll siRNA (*MISSION® siRNA Universal Negative Control #1*) mittels Lipofectamin 3000 transfiziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit steigenden Konzentrationen an Cisplatin über 48 h, 72 h und 96 h. Die Daten der Proliferationsanalysen für QGP-1 (96 h) und KRJ-I (72 h) werden exemplarisch gezeigt. A) Der *Knockdown* von *FOXM1* bewirkte bereits in den QGP-1-Kontrollen eine starke Wachstumsinhibition. Diese verstärkte zudem den Effekt von Cisplatin. B) Bei KRJ-I konnte kein Unterschied zwischen Zellen mit *FOXM1 Knockdown* und Kontrollen nachgewiesen werden. Zweifache ANOVA; Balken kennzeichnen Median und Interquartilenabstand Legende: *p<0.05; die gestrichelte Linie kennzeichnet den Median der unbehandelten Kontrolle mit *FOXM1 Knockdown*. Auch der *Knockdown* von *MDM2* zeigte bei QGP-1 Zellen deutliche antiproliferative Effekte (Abbildung 3-14). Da sich die Werte jedoch immer um die der *Knockdown* Probe ohne Cisplatin bewegten bzw. bei $>5 \ \mu$ M im Bereich der Kontrollproben lagen, konnte kein verstärkender Effekt in Bezug auf die Chemosensitivität gezeigt werden. Bei KRJ-I Zellen verhielten sich bis auf die Cisplatin-freien Proben die *Knockdown* Proben wie die Kontrollproben.



Abbildung 3-14: Einfluss der MDM2 Expression auf Proliferation und Chemosensitivität gegenüber Cisplatin QGP-1 und KRJ-I Zellen wurden über 24 h mit 30 nM siRNA gegen *MDM2* (Hs_MDM2_10) und einer Kontroll siRNA (*MISSION® siRNA Universal Negative Control #1*) mittels Lipofectamin 3000 transfiziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit steigenden Konzentrationen an Cisplatin über 72 h. A) Der *Knockdown* von *MDM2* zeigte in QGP-1 Zellen eine starke Wachstumsinhibition im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Kontroll-siRNA. Eine weitere Verstärkung durch Cisplatin konnte jedoch nicht gezeigt werden, da die Effekte bei 50µM und 500µM Cisplatin-abhängig waren. B) Bei KRJ-I konnte, außer bei den Kontrollen, kein Unterschied zwischen Zellen mit *MDM2 Knockdown* und Kontrollen nachgewiesen werden. Zweifache ANOVA; Balken kennzeichnen Median und Interquartilenabstand Legende: *p<0.05; die gestrichelte Linie kennzeichnet den Median der unbehandelten Kontrolle mit *FOXM1 Knockdown*.

Mittels Durchflusszytometrie wurden anschließend die Zellzyklusveränderungen in *FOXM1* und *MDM2 Knockdown*-Zellen mit und ohne Kombination mit Cisplatin untersucht (Abbildung 3-15). Dabei zeigte sich, dass die Zellen, die mit FOXM1 siRNA und Cisplatin behandelt worden waren, die deutlichste Reduktion an mitotischer Aktivität aufwiesen. Zudem konnte bei QGP-1 eine signifikante Vergrößerung der S- und G2-Phase Population gezeigt werden. Ein S-Phase Arrest konnte auch bei KRJ-I Zellen gezeigt werden, dieser trat jedoch in vergleichbarer Ausprägung auch nach Cisplatinbehandlung mit KontrolsiRNA auf.



Abbildung 3-15: *Knockdown* von *MDM2* und *FOXM1* in Kombination mit Cisplatin und dessen Auswirkung auf Zellzyklus und Mitose

QGP-1 und KRJ-I Zellen wurden über 24 h mit siRNA gegen *FOXM1* (HU-12443-1), *MDM2* (Hs_MDM2_10) oder mit Kontroll-siRNA (*MISSION® siRNA Universal Negative Control #1*) behandelt. Anschließend erfolgte eine 72 h Inkubation mit 10 μ M Cisplatin oder PBS. Als weitere Kontrolle wurde Cisplatin in Monotherapie auf KontrollsiRNA behandelten Zellen mitgeführt. Durchgeführt wurde eine Mitose-Index-Durchflusszytometrie. A) QGP-1 Zellen zeigten nach *Knockdown* von *FOXM1* und nach Cisplatin Monotherapie einen deutlichen S-Phase Arrest. Zudem stieg die Zahl der Zellen in der G2 Phase an. Die Kombination mit Cisplatin verstärkte die Effekte auf die S und G2 Phase, so dass sich signifikante Effekte gegenüber den Kontrollen zeigten. B) Bei KRJ-I Zellen lag der Kombinationseffekt (ebenfalls Anstieg der S-Phase) nur schwach über den Werten der Cisplatinbehandlung. C+D) Beide Zelllinien zeigten eine deutliche Reduktion der Mitosen, sowohl nach *Knockdown* allein (nur QGP-1) als auch nach Kombination mit Cisplatin und Cisplatin Monotherapie. Die Effekte der Kombinationen waren jeweils am deutlichsten gegenüber den Kontrollen. Legende: **p*<0.05 gegenüber Kontrolle (Kruskal-Wallis Test). -Dargestellt ist der Median aus 3 Replikaten.

Abbildung 3-16: *Knockdown* von *FOXM1* in Kombination mit Cisplatin und Expression von Proteinen der Apoptose und DNA Reparatur

QGP-1 und KRJ-I Zellen wurden über 24 h mit siRNA gegen FOXM1 (HU-12443-1), MDM2 (Hs MDM2 10) oder mit KontrollsiRNA (MISSION[®] siRNA Universal Negative Control #1) behandelt. Anschließend wurde nach Mediumwechsel über 48 h mit 10 µM Cisplatin inkubiert. In KRJ-I Zellen zeigten sich insgesamt nur eine schwache FOXM1 Expression und ein ensprechend schwacher Effekt des Knockdown. Die Induktion von p21 erfolgte hier Cisplatinabhängig. Allerdings war bei der Kombination eine stärkere Spaltung von Caspase 8 und PARP zu verzeichnen, was auf eine extrinsische Apoptoseinduktion hindeutet. Zudem zeigte sich eine verstärkte Histon H2AX Phosphorylierung als Marker für genotoxischen Stress. QGP-1 Zellen induzierten keine Marker einer Apoptoseinduktion. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass typische FOXM1 Ziele wie E2F1 und Aurora A FOXM1-abhängig reguliert waren. Zudem wurde SKP2, erwartungsgemäß FOXM1abhängig exprimiert.



Im Western Blot konnte anschließend gezeigt werden, dass die Induktion von Apoptosemechanismen, wie die Spaltung von Caspase 8 und PARP sowie auch die Induktion von p21, bei KRJ-I Zellen weitestgehend Cisplatin-abhängig induziert wurde. Auffällig war jedoch die deutlich stärkere Serin-139 Phosphoryleriung von Histon H2AX, was auf das verstärkte Vorhandensein von genotoxischem Stress in Cisplatin-behandelten Zellen mit *FOXM1 Knockdown* hindeutete (Abbildung 3-16). In QGP-1 Zellen konnte eine deutliche Assoziation des FOXM1 Proteingehaltes mit der Expression von SKP2 festgestellt werden. SKP2 stellt einen Teil des Zellzyklus-abhängigen E3 Ligasekomplexes SCF dar, welcher p27 reguliert und zudem in die Reparatur von DNA Schäden involviert ist [191, 238].

3.2.3 Ko-Expression von FOXM1 mit MDM2 und STAT3 GEP-NEN Zelllinien

An zwei unabhängigen Kollektiven primären Materials konnte bisher die Ko-Expression von STAT3 und FOXM1 quantitativ gezeigt werden. Eine Assoziation der FOXM1 Expression mit MDM2 konnte im Kollektiv 1 zwar nicht nachgewiesen, aufgrund der Datenlage aber angenommen werden, da FOXM1 durch p53 reprimiert wird [239, 240].

Die Ko-Expression von MDM2 und FOXM1 wurde mittels Immunfluoreszenz an BON und KRJ-I Zellen untersucht, um sowohl eine p53 mutierte als auch eine p53 wt Zelllinie in die Untersuchungen

einzuschließen. Immunfluoreszenz erlaubt (im Gegensatz zum Western Blotting) die Analyse der Lokalisation eines Antigens auf subzellulärer Ebene.



Abbildung 3-17: Ko-Expression von MDM2 und FOXM1 in GEP-NEN Zelllinien

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen MDM2 (grün) und FOXM1 (rot) in KRJ-I Zellen (A+B) wies eine deutliche Ko-Expression von FOXM1 in Zellen mit starker nukleärer MDM2 Färbung auf. FOXM1 war hier zytoplasmatisch lokalisiert. Deutlich zu erkennen war die Mehrkernigkeit der Zellen unter A. Auch bei BON (C+D) konnte die Ko-Lokalisation von MDM2 und FOXM1 dargestellt werden. MDM2 zeigte sich wieder primär kernlokalisiert. Hier ließ sich jedoch keine deutlich intrazelluläre Lokalisation für FOXM1 abgrenzen, was darauf schließen lässt, dass FOXM1 in den p53 mutierten Zellen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorliegt. Unter konnte eine tetranukleäre Zelle mit starkem Fluoreszenzsignal festgehalten C werden. Fluoreszenzmikroskopie/Lichtmikroskopie in 400 x Vergrößerung mit DAPI Gegenfärbung (blau). Modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Es konnte gezeigt werden, dass FOXM1 in beiden Zelllinien besonders stark in Zellen mit ebenfalls starker nukleärer MDM2 Färbung auftritt (Abbildung 3-17). Nukleäres MDM2 kann beispielsweise den Transkriptionsfaktor p53 ubiquitinylieren und damit dessen Kernexport triggern. FOXM1 zeigte bei den p53 wt Zellen (KRJ-I) eine primär zytoplasmatische intrazelluläre Lokalisation, während es bei den p53 mutierten BON Zellen in beiden Kompartimenten vorlag. Zudem waren doppelt positive Zellen sehr häufig multinukleär.



Abbildung 3-18: Abhängigkeit der FOXM1 Expression von MDM2 und p53

A) TP53 Wildtyp KRJ-I und p53defiziente QGP-1 Zellen wurde über 24 h mit siRNA gegen MDM2 und Kontrollen und anschließend mit 5 µM Nutlin DMSO behandelt. oder Im Western Blot erfolgte die Analyse der Expression und Serin-35 Phosphorylierung von FOXM1. Als Kontrolle für die erfolgreiche Nutlin-Behandlung dienten MDM2 und p21. Aurora A wurde als transkriptionelles Ziel von p53 und FOXM1 mitgeführt, und SKP2 diente als Marker für die FOXM1 Aktivität. Die FOXO-inhibitorische AKT Aktivierung an Serin-473 zeigte eine leichte Veränderung.

Zwischen der ersten und zweiten Bande von QGP-1 wurde jeweils eine falsche Bande entfernt. Modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [226]. B) Zur Bestätigung der Western Blot Daten von KRJ-I wurde die Expression von FOXM1 und FOXM1B sowie von CDKN1A (p21) nach Knockdown von MDM2 mittels Realtime PCR analysiert. Die klare Abhängigkeit der FOXM1 p53 Expression wird von deutlich, dieses da nach Knockdown von MDM2 und nach Nutlin-3a negativ reguliert wird, während MDM2 und p21 als klare p53 Antwort unter Nutlin-3a verstärkt exprimiert werden.

Um die Abhängigkeit der FOXM1 Expression von MDM2 und p53 in GEP-NEN weiter zu charakterisieren, wurden p53 Wildtyp KRJ-I und p53-defiziente QGP-1 Zellen nach Knockdown von *MDM2* mit und ohne Aktivierung von p53 mittels Nutlin-3a untersucht (Abbildung 3-18). KRJ-I exprimierten MDM2 nach Nutlin-3a Behandlung infolge einer p53-abhängigen Feedback-Regulation von MDM2. QGP-1 Zellen hingegen exprimierten MDM2 in beiden siRNA Kontrollproben, nicht jedoch nach Nutlin-Behandlung, da diese kein funktionelles p53 enthielten. Die Expression von p21 nach
Nutlin-Behandlung diente als weiterer Marker der p53 Aktivität. In KRJ-I Zellen zeigten sich die FOXM1 Expression und Aktivierung sowie die Expression der FOXM1 Zielproteine Aurora A und SKP2 in der Folge weitestgehend von p53 abhängig. Beide Zielproteine wurden ausgewählt, da Aurora A auch von p53 reguliert werden kann [117], eine Abhängkeit von SKP2 jedoch bisher nur von der FOXM1 Expression bekannt ist [131]. In Wildtyp p53 Zellen wurden die FOXM1 Expression und Aktivität somit p53-abhängig reguliert, obwohl es nach Nutlin-Behandlung auch zu einer verstärkten Expression von MDM2 kam.

Im Gegensatz dazu zeigten die QGP-1 Zellen keine Anzeichen einer p53 Aktivierung (keine MDM2 oder p21 Induktion nach Nutlin). Hier war die Expression von FOXM1 sowie der Zielproteine Aurora A und SKP2 entsprechend nach Nutlin-Behandlung gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Jedoch kam es infolge des *Knockdown* von *MDM2* zu einer deutlichen Reduktion der FOXM1 Expression und der nachfolgenden Signaltransduktion. FOXM1 wird in GEP-NEN Zellen also primär von p53 reguliert, zeigt aber auch einen p53- unabhängigen Regulationsmechanismus über MDM2. Der Mechanismus ist unklar, jedoch ist beispielsweise eine mögliche Vermittlung über AKT und FOXO3a denkbar. Hier geben KRJ-I und QGP-1 jedoch widersprüchliche Daten, da die *MDM2 Knockdown* Zellen bei QGP-1 zwar weniger AKT Phosphorylierung zeigen, bei KRJ-I jeodoch gerade die DMSO Proben mit *MDM2 Knockdown* die stärkste Serin-473 Phosphorylierung aufweisen.



Abbildung 3-19: Ko-Expression von STAT3 und FOXM1 in GEP-NEN Zelllinien

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen STAT (grün) und FOXM1 (rot) in KRJ-I (A) und BON (B) Zellen zeigt eine Ko-Expression von STAT3 und FOXM1 auch in GEP-NEN Zelllinien. In den KRJ-I Zelllinien wurden beide Proteine deutlich im Zytoplasma nachgewiesen. Fluoreszenzmikroskopie/Lichtmikroskopie in 200-400 x Vergrößerung mit DAPI Gegenfärbung (blau).

Die Ko-Expression von STAT3, die bereits in beiden Biopsie-Kollektiven gezeigt werden konnte, wurde auch in den Zelllinien BON und KRJ-I bestätigt (Abbildung 3-19). Dabei zeigten sich in den BON Zellen

insgesamt sehr wenige Zellen mit STAT3 Immunreaktivität. Die Lokalisation von STAT3 und FOXM1 erschien weitestgehend nukleär. Bei KRJ-I Zellen konnten hingegen viele, jedoch größtenteils zytoplasmatische Signale detektiert werden.

3.2.4 Abhängigkeit der FOXM1 Expression vom PI3K-Weg in GEP-NEN Zelllinien

Für eine Aktivierung der MDM2-p53-FOXM1 Achse in GEP-NEN sind nach der bisherigen Datenlage, neben einer Amplifikation des MDM2 Genes selbst, vor allem zwei molekulargenetische Ursachen besonders wahrscheinlich: sowohl der funktionelle Verlust von PTEN als auch der Verlust von TSC1/2 führen zur Hyperaktivierung des PI3K-Weges [46]. Die Aktivierung der Kinase AKT wiederum stabilisiert MDM2, inaktiviert FOXO3a und triggert somit mutmaßlich die Expression von FOXM1.

Um die Abhängigkeit der FOXM1 Expression vom PI3K-Weg zu überprüfen, wurden die GEP-NEN Zelllinien mit zwei verschiedenen Inhibitoren behandelt und im Western Blot analysiert:





Der PTP und PTEN Inhibitor bpV(HOpic) wurde zur Aktivierung des PI3K-Weges verwendet, LY294002 wurde als als PI3K $\alpha/\delta/\beta$ Inhibitor eingesetzt. Quelle: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

Die Oxo-Diperoxo-Vanadat-Verbindung bpV(HOpic) inhibiert Phospho-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) und PTEN und aktiviert somit nicht nur den PI3K-Weg, sondern imitiert auch weitere funktionelle Einschränkung in vielen GEP-NEN Tumoren mit PTEN Mutation, die nicht über den PI3Kinase-Weg vermittelt werden. LY294002 hingegen inhibiert die α , δ und β Untereinheit von PI3 Kinasen und wurde als Inhibitor des Signalweges verwendet (Abbildung 3-20). Die eingesetzten Konzentrationen wurden aus der vorhandenen Literatur abgeschätzt [241, 242], als Kontrolle diente DMSO.

Eine Aktivierung des PI3K-Weges konnte anhand der Phosphorylierung von AKT nachgewiesen werden. Ein Anstieg der FOXM1 Expression nach bpV(HOpic) wurde in BON und KRJ-I Zellen deutlich sichtbar. Dieser ging mit einer erhöhten E2F1 Expression einher. In QGP-1 und LCC-18 Zellen zeigte sich kein eindeutiger Trend, jedoch konnte ein Anstieg im FOXM1 Zielprotein Aurora A beobachtet werden (Abbildung 3-21).



Abbildung 3-21: Einfluss der pharmakologisch induzierten Aktivierung des PI3K-Weges auf die Expression von FOXM1, p21, E2F1 und Aurora A

GEP-NEN Zelllinien wurden über 4-12 h mit 10 μM bpV(HOpic) zur Stimulierung des PI3K-Weges inkubiert und im Western Blot analysiert. Als Indikator für die Aktivierung des PI3K-Weges wurde die Serin 473 Phosphorylierung von AKT detektiert. Diese stieg in allen Zelllinien nach Behandlung mit bpV(HOpic) zeitabhängig an (obere Bande). Ebenso nahm die Expression von FOXM1 in BON Zellen stark, in KRJ-I Zellen hingegen schwach zu. In QGP-1 und LCC-18 gab es keinen eindeutigen Trend in der Expression von FOXM1 nach Aktivierung des PI3K-Weges. E2F1 und p21 sind sowohl Regulatoren als auch Zielproteine von FOXM1, Aurora A stellt ein Zielprotein dar [177]. In BON und KRJ-I Zellen war ein deutlicher Anstieg in der Expression von E2F1 nach 12 h zu erkennen. Bei QGP-1 und LCC-18 konnte hingegen ein Anstieg der Expression des FOXM1 Zielproteins Aurora A detektiert werden. Die Expression des CDK Inhibitors p21 wurde durch bpV(HOpic) nicht beeinflusst.

Im umgekehrten Falle, nach Inhibition mit LY294002, konnte ein Rückgang der FOXM1, Aurora A und CK2 Expression einhergehend mit einer konzentrationsabhängig zurückgehenden AKT Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 3-22). Ebenfalls nahm die Serin-35 Phosphorylierung von FOXM1 in der N-terminalen Repressor-Domäne mit steigender Konzentration ab. Veränderungen in der Expression von E2F1 konnten nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von FOXM1 in GEP-NEN auch durch den PI3K-Weg reguliert werden kann.



Abbildung 3-22: Einfluss der pharmakologisch induzierten Inhibition des PI3K-Weges auf die Expression von FOXM1, p21, E2F1 und Aurora A Die GEP-NEN Zelllinien KRJ-I und QGP-1 wurden über 24 h mit 1 μ M und 10 μ M LY294002 inkubiert. Eine Inhibition des PI3K-Weges wurde mittels abnehmender Serin-473 Phosphorylierung von AKT nachgewiesen. FOXM1 und Aurora A sowie CK2 nahmen mit zunehmender Inhibitorkonzentration ab. Die E2F1 Expression wurde durch Inhibition des PI3K-Weges nicht beeinflusst.

3.3 Ableitung therapeutischer Ansätze

Für den Transkriptionsfaktor FOXM1 existierten zu Beginn des Projekts keine direkten niedrigmolekularen Inhibitoren. Es war jedoch bekannt, dass FOXM1 über verschiedene Proteasominhibitoren gehemmt werden kann, die zunächst als FOXM1 Inhibitoren identifiziert worden sind und denen später auch deren Proteasominhibitoreigenschaften zugeschrieben wurden [243, 244]. Die dem zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher hypothetisch. Es wird beispielsweise diskutiert, dass durch Proteasominhibition ein negativer Regulator von FOXM1 stabilisiert wird. Auch die eigene Autoregulation wird als sekundärer inhibierender Effekt vermutet [245].

Das Ubiqutin-Proteasom-System selbst ist stark in die Regulation von DNA Reparaturmechanismen involviert. Eine essentielle Rolle spielt auch hier wieder das Protein p53, das u.a. nach Ubiquitinylierung durch MDM2 proteasomal abgebaut werden kann. Aber auch die (Poly-)Ubiquitinylierung von Histonen und einer großen Anzahl von Reparaturproteinen nimmt Einfluss auf die Regulation von DNA Reparaturprozessen [246]. Widersprüchliche Daten existieren hingegen bezüglich der Wirkung von beispielsweise Bortezomib auf DNA Reparaturprozesse. Offenbar bleiben frühe Reparaturmechanismen, wie die Bildung von phospho-H2AX oder RPA-Foci intakt, während die fortgeschrittenen Stadien durch Proteasominhibitoren gehemmt werden [246-250].

Proteasominhibitoren haben in Bezug auf die Fragestellungen und die technischen Möglichkeiten der vorliegenden Arbeit den enormen Nachteil, dass nicht deutlich differenziert werden kann, ob und wie stark die Wirkungsmechanismen von der MDM2-p53-FOXM1 abhängig sind, oder ob die beobachtete negative Regulation von FOXM1 nur ein Indikator für Proliferationshemmung aufgrund anderer molekularer Ursachen ist. Sie haben jedoch für die Präklinik einen entscheidenden Vorteil: Sie sind z.T. klinisch erheblich weiterentwickelt und könnten somit sehr viel früher in klinischen Studien evaluiert werden als neue Substanzen, deren Pharmakodynamik und -kinetik völlig unerforscht sind.

Kürzlich veröffentlichten Gormally et *al.* eine Studie zu einem *Small molecule* Inhibitor namens FDI-6 (NCGC00099374), der keine *Off-target*-Effekte auf das 20S Proteasom zeigen soll [251]. Dieser wirkt *in vitro* allerdings erst in sehr hohen Dosen mit einer IC50 von etwa 20 μM. Die Arbeiten mit dieser Substanz wurden in unserem Labor erst vor kurzem begonnen und sind somit nicht mehr Teil dieser Arbeit.

Da also neben einem mechanistisch nicht klar abgrenzbaren inhibitorischen Ansatz auch ein möglichst spezifischer Inhibitor getestet werden sollte, wurde in einem späteren Teil dieser Arbeit versucht, durch Inhibition der MDM2-p53 Interaktion Einfluss auf die Aktivität von p53 und FOXM1 zu nehmen. Die regulatorische Aktivität von STAT3 auf FOXM1 wird derzeit in einem gesonderten Projekt als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt untersucht.

3.3.1 Proteasominhibitoren

3.3.1.1 Auswahl der Substanzen



Siomycin A; MW: 1648.84g/mol; C₇₁H₈₁N₁₉O₁₈S₅



Thiostrepton; MW: 1664.89g/mol; C₇₂H₈₅N₁₉O₁₈S₅



Bortezomib (Velcade®); MW: 384.24g/mol $C_{19}H_{25}BN_4O_4$

Abbildung 3-23: Chemische Struktur der Proteasominhibitoren Siomycin A, Thiostrepton und Bortezomib

Quelle: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

In dieser Arbeit wurden im Folgenden drei Proteasominhibitoren in vitro untersucht: Siomycin A, Thiostepton und Bortezomib (Abbildung 3-23). Siomycin A und Thiostrepton sind Thiazol-Antibiotika aus Streptomyces sioyaensis bzw. Streptomyces azureus und inhibieren die 20S Proteasomuntereinheit und die FOXM1 Expression, u.a. mutmaßlich über autoregulatorische Mechanismen [252-254]. Thiostrepton ist zudem in den USA veterinärmedizinisch als Antibiotikum zugelassen. Bortezomib (Velcade®, PS-341) ist als Proteasominhibitor in Deutschland bereits zur Behandlung des Multiplen Myeloms (und in den USA zusätzlich des Mantelzelllymphoms) zugelassen und zeigt ebenfalls inhibitorische Wirkung auf FOXM1 [252]. Zudem wird eine Abhängigkeit der Bortezomib Wirkung vom p53 Status diskutiert, bisher mit widersprüchlichen Ergebnissen [255-257].

Als weiterer Vorteil von Proteasominhibitoren gilt die Eigenschaft, verhältnismäßig spezifisch auf maligne Zellen, aber nicht auf gesundes Gewebe zu wirken. Dieser Effekt wird auch mit der Wirkung auf FOXM1 und dessen vorrangiger Expression in proliferierenden Zellen in Verbindung gebracht [258].

3.3.1.2 Siomycin A

3.3.1.2.1 Proliferationsstudien mit Siomycin A

Zunächst wurde der klinisch bisher nicht relevante experimentelle Inhibitor Siomycin A getestet und dessen Einfluss auf das Tumorzellwachstum mittels WST-1 Proliferationsassay analysiert.

In allen Zelllinien konnten bei Konzentrationen unterhalb der individuellen IC50 starke überproportionale Schwankungen der Werte und z.T. Gesamtzahlen vitaler Zellen gemessen werden, die über denen der Kontrollen lagen. Diese Effekte zeigten sich im Folgenden deutlich bei allen Proteasominhibitoren, aber nicht bei anderen Substanzen. Das Proteasom interferiert mit dem Glukose Stoffwechsel [259] und der WST-1 Assay basiert auf einer NADH-abhängigen Farbreaktion (Abbildung 3-24). Daher ist eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt, dass infolge einer Störung der Glukosehomöostase aufgrund der Proteasominhibition die mitochondriale Enzymaktivität des Zitratzyklus ebenfalls beeinflusst wurde. Dieser Effekt wird vermutlich mit steigender Konzentration und somit steigender Zytotoxizität nivelliert. Zudem ist, da der Effekt bei allen Proteasominhibitoren auftrat, als mögliche Ursache für die biphasische Dosis-Wirkungs-Kurve auch ein hormetischer Effekt denkbar [260, 261].



Abbildung 3-24: Mechanismus der WST-1 Reduktion

Über einen intermediären Elektronenakzeptor (EC) wird WST-1 durch NADH und NADPH zu Formazan reduziert. Quelle: Berridge et *al.* 2005 [262]; Bildquelle: Jang et *al.* 2012 [263].

Insgesamt zeigten die Werte für KRJ-I in allen Experimenten die größten Schwankungen. Dieser Effekt ist mutmaßlich auf die sphäriode Struktur der Zellcluster zurückzuführen, deren Größe entsprechend der Stärke der Resuspension vor dem Einsäen der Zellen in die 96-Well Platten variierte und somit zu unterschiedlichen Diffusionsbarrieren führte.

Bei den gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren zeigte Siomycin A einen starken antiproliferativen Effekt (Abbildung 3-25). Die IC50 für 48 h bzw. 72 h lag sowohl bei KRJ-I als auch bei LCC-18 bei knapp unter 1 μ M und somit im Bereich der bisher mit Siomycin A publizierten *in vitro* Studien [264]. Der Effekt war konzentrationsabhängig (*p*<0,0001; Abbildung 3-25C+D). Eine Zeitabhängigkeit zeigte sich nur bei KRJ-I (Abbildung 3-25C), basierte hier allerdings auf der großen

Varianz im Sub-IC50 Bereich. Der inhibitorische Effekt war also über 48 h und 72 h vergleichbar stark, was den Schluss zuließ, dass er möglichweise bereits früher einsetzte.



Abbildung 3-25: Antiproliferativer Effekt von Siomycin A auf gastrointestinale NEN Zelllinien A+B) KRJ-I und LCC-18 Zellen wurden in jeweils 5 Replikaten über 48 h und 72 h mit 0,5; 1; 2 und 5 μ M Siomycin A behandelt und anschließend die Zahl vitaler Zellen im WST-1 Assay gegen eine 0,2 % v/v DMSO Kontrolle analysiert. C+D) Bei beiden Zelllinien ergaben sich signifikante antiproliferative Effekte bei Konzentrationen über 1 μ M (Zweifache ANOVA bei wiederholten Messungen; *p*<0,0001). Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. E+F) Normalisierte Dosis-Wirkungs-Kurve: Die relative IC50 für 72 h wurde auf 0,89 μ M bei KRJ-I (E) und 0,91 μ M für LCC-18 (F) bestimmt. Legende: **p*<0.05 (gegenüber DMSO Kontrolle).

Bei den pankreatischen GEP-NEN Zelllinien konnte ebenfalls ein signifikanter antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 3-26). Dieser war in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig (p<0,0001; Abbildung 3-26C+D) und bei BON Zellen zudem zeitabhängig (p=0,0001; Abbildung 3-26C). Die relative IC50 lag bei BON Zellen ebenfalls bei rund 1 µM, während sie bei QGP-1 mit etwa 2 µM doppelt so hoch war als bei den übrigen GEP-NEN Zelllinen. Bei BON konnte außerdem ein sehr starker unspezifischer stimulierender Effekt in den niedrigen Konzentrationen gezeigt werden.

Insgesamt konnten mit Siomycin A in allen Zelllinien signifikante inhibitorische Effekte auf das Zellwachstum erzielt werden. Diese Effekte waren gemessen an der relativen IC50 in den gastrointestinalen Zelllinien etwas stärker als in BON Zellen. Deutlich schlechter als die anderen Zelllinien sprach die Zelllinie QGP-1 an.



Abbildung 3-26: Antiproliferativer Effekt von Siomycin A auf pankreatische NEN Zelllinien A+B) BON und QGP-1 Zellen wurden analog Abbildung 3-25 analysiert. C) Bei BON Zellen ergaben sich signifikante antiproliferative Effekte bei Konzentrationen über 1 μ M nach 72 h bzw. 2 μ M nach 48 h (Zweifache ANOVA bei wiederholten Messungen; *p*<0,0001). D) Für QGP-1 ergab sich erst ab 2 μ M eine signifikante Reduktion der Zellzahl (Zweifache ANOVA bei wiederholten Messungen; *p*<0,001). Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. E+F) Normalisierte Dosis-Wirkungs-Kurve: Die relative IC50 für 72 h wurde auf 0,99 μ M bei BON (E) und 1,98 μ M für QGP-1 (F) bestimmt. Legende: **p*<0.05 (gegenüber DMSO Kontrolle).

3.3.1.2.2 Kombination von Siomycin A mit Chemotherapie

FOXM1 gilt als starker Regulator der zellulären Stressantwort und reguliert zahlreiche Gene, die zur Reparatur von DNA Schäden beitragen. In zahlreichen Krebsentitäten stellt es somit ein Schlüsselprotein bei der Überwindung von Reparaturmechanismen dar, die zur Resistenz gegenüber alkylierender Chemotherapie oder gegenüber Strahlentherapie führen [132, 265].

Die Kombinationsanalyse von Siomycin A mit Cisplatin (*cis*-Diamminplatin(II)-dichlorid), einem DNA-Crosslinker, oder Temozolomide (3,4-Dihydro-3-methyl-4-oxoimidazo[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-8carboxamid), einem DNA-Alkylanz, zeigten additive bis sehr stark synergistische kombinatorische Effekte von Siomycin A und Cisplatin (Abbildung 3-27). Bei Kombination mit Temozolomide verhielten sich pankreatische und gastrointestinale GEP-NEN Zelllinien gegensätzlich: Bei den pankreatischen NEN induzierte die Kombination deutliche antagonistische Effekte (Abbildung 3-27A+B), bei den gastrointestinalen Zelllinien wurden synergistische Effekte beobachtet (Abbildung 3-27C+D).



Abbildung 3-27: Kombinationseffekte von Siomycin A mit Chemotherapie

GEP-NEN Zelllinien wurden über 72 h mit Siomycin A, Cisplatin, Temozolomide und Kombinationen behandelt und anschließend im WST-1 Assay analysiert. Die Bewertung der Kombinationseffekte erfolgte nach der Methode von Chou und Talaly mittels *CompuSyn* 1.0 Software [210, 211]. A) BON: Siomycin A + Cisplatin: CI (Kombinationsindex)=0,996; Siomycin A + Temozolomide: CI=1,538. B) QGP-1: Siomycin A + Cisplatin: CI=0,548; Siomycin A + Temozolomide: CI=2,627; C) KRJ-1: Siomycin A + Cisplatin: CI=1,066; Siomycin A + Temozolomide: CI=0,526. D) Siomycin A + Cisplatin: CI=0,062; Siomycin A + Temozolomide: CI=0,645. Legende: +++++ sehr starker Synergismus, ++++ starker Synergismus, +++ Synergismus, ++ mäßiger Synergismus, + schwacher Synergismus, ---- sehr starker Antagonismus. Teilweise und modifiziert aus Briest et al. 2015 [197].

3.3.1.2.3 Wirkung von Siomycin A auf den Zellzyklus

Die Effekte von Siomycin auf den Zellzyklus von GEP-NEN Zelllinen wurden zunächst mittels Mitose-Index-Durchflusszytometrie nach 96 h Inkubation mit 2 µM Siomycin gemessen. Dabei zeigte sich bei den gastrointestinalen Zelllinien ein deutliches Anwachsen der Sub-G1 Population im Vergleich zu den DMSO Kontrollen (Abbildung 3-28). Zudem konnte hier eine deutliche Abnahme der mitotischen Population gezeigt werden.

Da in der Sub-G1 Population nicht genau zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden kann (Anhang 2), wurde zusätzlich die Freisetzung von

Laktat Dehydrogenase (LDH) in die Zellkulturmedien bestimmt. Im Gegensatz zu früher Apoptose ist Nekrose, allerdings auch späte Apoptose, durch einen Verlust der Zellmembranintegrität gekennzeichnet. Zytoplasmatische Proteine wie LDH werden somit freigesetzt und können im Medium über eine Farbreaktion quantifiziert werden.



Abbildung 3-28: Siomycin A induzierte Veränderungen des Zellzyklus bei gastrointestinalen NEN Zelllinien Gastrointestinale NEN Zellinien wurden über 96 h mit 2 μ M Siomycin A inkubiert, mit Propidiumiodid (DNA Gehalt) und gegen p(Ser10)-Histon H3 (Mitosemarker) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zudem wurde der Zellkulturüberstand nach 4 h bzw. 24 h Inkubation mit 1 μ M und 2 μ M Siomycin, 0,01 μ M und 1 μ M Everolimus, 0,2 % DMSO als Negativ- und 2 % Triton X-100 als Positivkontrolle kolorimetrisch auf seinen LDH Gehalt analysiert. A+B) Bei KRJ-I und LCC-18 konnte ein starker Anstieg der Sub-G1 Population und Reduktion der Mitosen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. C) Im Zellkulturüberstand der KRJ-I Zelllinie wurden große Mengen LDH nachgewiesen, mit einem signifikant höheren Gehalt nach 1 μ M Siomycin A im Vergleich zu DMSO (Friedman Test; *p*=0,0108). D) Bei LCC-18 wurden keine Unterschiede in der LDH Freisetzung zwischen behandelten Zellen und Kontrollen nachgewiesen. Legende: **p*<0.05.

Da die Halbwertszeit von LDH in Medien nur ca. 9-10 h beträgt, wurde ein Zeitraum gewählt, der eine sofortige Induktion von Nekrose nachweisen würde (4 h), und ein Zeitraum, der ein späteres Einsetzen eines nekrotischen Effekts oder eine späte Apoptose detektieren würde (24 h). Als Kontrollen wurden

0,2 % DMSO, eine physiologische Konzentration des für pankreatische NEN zugelassenen Wirkstoffs Everolimus, sowie eine Vergleichskonzentration Everolimus von 1 µM mitgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass bei den KRJ-I nach 24 h ein starker Anstieg der Zytotoxizität bei beiden Konzentrationen an Siomycin A, aber auch bei Everolimus und DMSO auftrat (Abbildung 3-28C). Bei 1 µM Siomycin A war der LDH Gehalt signifikant gegenüber DMSO erhöht. Insgesamt konnte bei KRJ-I in allen Proben zu beiden Zeiten eine erhöhte Zytotoxizität festgestellt werden, die möglicherweise auf die notwendige Resuspension der Zellen vor dem Einsäen zurückzuführen ist. Auch die starke Reduktion von FBS (wie vom Hersteller aufgrund unspezifischer Effekte empfohlen) könnte die Zytotoxizität verstärkt haben. Bei LCC-18 lag die Zytotoxizität von Siomycin A nur schwach über der der Trägersubstanz DMSO (Abbildung 3-28D).



Abbildung 3-29: Siomycin A induzierte Veränderungen des Zellzyklus bei pankreatischen NEN Zellinien
Pankreatische NEN Zellinien wurden analog Abbildung 3-28 analysiert. A) Bei BON konnten ein starker Anstieg der Sub-G1 Population und eine deutliche Reduktion der Mitosen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.
B) Signifikante Änderungen der Sub-G1 oder M Phase konnten bei QGP-1 nicht gezeigt werden, die verwendete Konzentration entsprach jedoch gerade der IC50 bei dieser Zelllinie. C+D) Bei BON und QGP-1 wurden keine Unterschiede in der LDH Freisetzung zwischen behandelten Zellen und Kontrollen nachgewiesen.

Bei den pankreatischen Zelllinien zeigten sich nur bei BON Zellen nach 96 h eine deutliche Reduktion der mitotischen Population und ein Anstieg der Sub-G1 Population (Abbildung 3-29A). Sowohl für BON als auch für QGP-1 konnte kein Anstieg von LDH in Medium nachgewiesen werden (Abbildung

3-29C+D). Für BON Zellen kann somit der Schluss gezogen werden, dass Siomycin A eine Apoptose induziert.

Die Induktion von Apoptose konnte für KRJ-I und BON ebenfalls mittels JC-1-Färbung detektiert werden (Abbildung 3-30 und Anhang 3). Der Farbstoff, der Mitochondrien-Depolarisation detektiert und somit frühe Apoptose nachweisen kann, zeigte bei KRJ-I bereits nach 16 h und 20 h sehr deutliche Apoptose-Effekte. Der nach 24 h gemessene LDH-Gehalt im Zellkulturmedium kann daher ein Marker für bereits eingetretene späte Apoptose-Stadien oder Nekrose sein. Insgesamt kann festgehalten werden, dass Siomycin A bei KRJ-I sehr früh Apoptose induziert. Der Effekt scheint bei BON Zellen hingegen deutlich später einzutreten und ist nach JC-1 nach 20 h nur leicht zu erkennen. QGP-1 Zellen zeigten keine Anzeichen von apoptotischen Effekten.





Da jedoch auch für QGP-1 antiproliferative Effekte nachgewiesen worden waren (vgl. Abschnitt 3.3.1.2.1), kann vermutet werden, dass QGP-1 Zellen keine Apoptose, aber Zellzyklusarrest induzieren. Da auch in Abbildung 3-26D zu erkennen war, dass bei 1 μ M und 2 μ M der Effekt nach 72 h schwächer ist als nach 48 h, tritt hier möglicherweise eine Inaktivierung der Substanz nach einer gewissen Zeit auf und die Zellen beginnen wieder zu proliferieren, so dass nach 96 h kein Arrest mehr durchflusszytometrisch festzustellen ist. Diese Daten sind auch konsistent mit der Beobachtung, dass QGP-1 (möglichweise aufgrund ihres p53 Defektes und im Gegensatz zu den übrigen GEP-NEN Zellen) nach Inhibition des PI3K-Weges keine Apoptose, sondern lediglich einen G0/G1 Arrest induzieren [266].

3.3.1.2.4 Genomexpressions analyse nach Siomycin A Behandlung

Bisher konnte die *in vitro* Wirksamkeit von Siomycin A auf GEP-NEN Zelllinien gezeigt werden. Über welche Mechanismen Siomycin A, das ursprünglich durch Screening zunächst als FOXM1 Inhibitor beschrieben und später um die Proteasominhibitor-Eigenschaft ergänzt wurde [244, 267], letztendlich in GEP-NEN wirkt, ist bisher nicht untersucht worden. Ob und welche Effekte von Siomycin A tatsächlich auf eine Inhibition von FOXM1 zurückzuführen sind, sollte demzufolge als nächstes untersucht werden. Deshalb wurden Veränderungen der Signaltransduktion nach Siomycin A Behandlung *in vitro* mit denen nach RNA Interferenz (RNAi) verglichen, um einen Überblick über die Wirkungsmechanismen und mögliche kompensatorische Aktivierungen zu gewinnen.

Dazu wurden QGP-1 Zellen mit 1 μM Siomycin A bzw. DMSO behandelt und gegen QGP-1 mit einem *FOXM1 Knockdown* mittels RNAi bzw. Kontrollen im Mikroarray und Western Blot analysiert. QGP-1 wurden ausgewählt, da diese die stärkste Beeinträchtigung der p53 Funktion zeigten (vgl. Abschnitt 3.1.2.4) und somit den p53-unabhängigen Effekt von Siomycin A zeigen sollten. Der Einfluss von p53 sollte deshalb möglichst gering sein, weil einige wichtige Zielgene in GEP-NEN, beispielweise *BIRC5* (Survivin) oder die Aurora Kinasen, bisher als sowohl von p53 als auch von FOXM1 reguliert beschrieben wurden [117, 177, 268] und p53 als Zielmolekül von Ubiquitin-Ligasen durch Proteasominhibition stabilisiert werden kann. Gleichzeitig sollte der Gehalt an endogenem FOXM1 aber nicht zusätzlich (z.B. durch einen gleichzeitigen *Knockdown* von p53) moduliert werden müssen.

Die gewählte Konzentration von Siomycin A lag mit 1 μ M deutlich unter der IC50 für QGP-1. Da die Zellen bei dieser Konzentration trotzdem bereits eine deutliche Reduktion von FOXM1 zeigten, sollten weitere *off-Target* Effekte minimiert werden.

Verwendet wurden Human GeneChip[®] Gene 1.0 ST Arrays von Affymetrix. Die Hybridisierung und Aufarbeitung der Rohdaten sowie der Pathway-Analyse erfolgte als Auftrag durch das Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGC) der Charité Berlin (*Core Unit*).

Die verwendeten *small interfering RNA* (siRNA) gegen *FOXM1* (Qiagen) erkannten folgende Zielsequenzen:

- Hs_FOXM1_6: 5'-AACATCAGAGGAGGAACCTAA-3' (Chr12:2874280-2874299)
- Hs_FOXM1_7: 5'-TGGGATCAAGATTATTAACCA-3' (Chr12:2874381-2874401).

Laut Herstellerangaben und anhand eines Sequenzabgleichs (Ensembl.org) binden beide siRNA an die vier FOXM1 Transkripte ENST00000627656, ENST00000342628, ENST00000361953 und ENST00000359843. Diese entsprechen FOXM1B (ENST00000627656 und ENST00000361953), FOXM1A (ENST00000342628), FOXM1C (ENST00000359843), wobei die beiden Transkripte, die das

748 Aminosäure-Protein FOXM1B kodieren, sich in sechs Basenpaaren (entsprechend einem zusätzlichen Glutamin an Position 326 bzw. einem fehlenden Alanin an Position 168) unterscheiden. Beide siRNA binden im Exon II und somit im ersten kodierenden Exon aller *FOXM1*-Isoformen. Ein laut Datenbank existierendes weiteres Transkript, das für ein 206 Aminosäuren enthaltendes Protein kodiert, wird von der siRNA nicht erkannt. Diese Isoform ist in der Literatur bisher jedoch auch noch nicht beschrieben.

Für die Expressionsanalysen wurden je zwei Proben (QGP-1 in unterschiedliche Passagen in zwei unabhängigen Experimenten als biologische Replikate) mit 75 nM der siRNA FOXM1_6 oder einer *nonsilencing* Kontroll-siRNA (*All-Stars-negative Control siRNA*, Qiagen) bzw. 1 μM Siomycin oder DMSO über 72 h behandelt, in cDNA konvertiert und mittels quantitativer Echtzeit (*realtime*) PCR auf die Stärke des *Knockdown* getestet. Es zeigte sich in der PCR eine Reduktion der FOXM1 cDNA auf 32,6 % (± 1,9 %) nach RNAi bzw. 57,0 % (± 6,6 %) nach Siomycin A Behandlung in Bezug auf die Kontrollen. Anschließend wurde die RNA nach Qualitätskontrolle mittels Human GeneChip® Gene 1.0 ST Array analysiert.





Bei der Auswertung der Gesamtgenomexpression nach Siomycin A bzw. *FOXM1* Knockdown zeigte sich deutlich, dass beide Behandlungen unerwartet wenige Übereinstimmung zeigten. Bereits die Clusteranalyse verdeutlichte für Siomycin A sehr starke, vor allem negativ-regulatorische Effekte auf die zelluläre Genomexpression, während der *Knockdown* von *FOXM1*, trotz stärkerer Reduktion der

FOXM1 Expression selbst (Abbildung 3-31), insgesamt deutlich weniger Einfluss darauf hatte (Abbildung 3-32).



Abbildung 3-32: Cluster-Darstellung der veränderten Expression nach Siomycin A Behandlung und *FOXM1* Knockdown

Dargestellt ist die Expression von 342 Codesets mit p<0,05 und einem *fold-change* <-2 / >2. Es zeigen sich starke Unterschiede zwischen 1 µM Siomycin A behandelten und *FOXM1 Knockdown* Proben. Am deutlichsten beeinflusste Siomycin A die Genexpression trotz geringerem Einfluss auf die *FOXM1* Expression. Blau: schwach exprimierte Gene bis rot: stark exprimierte Gene.

Insgesamt wurden bei einem Cut-off von 1,5-facher differentieller Expression unter Siomycin A Behandlung 792 Codesets (Anhang 4) und unter *FOXM1 Knockdown* 266 Codesets (Anhang 5) signifikant differentiell exprimiert. Die weitere Analyse soll in erster Linie qualitativ erfolgen, da aufgrund der geringen Stichprobenzahl von N=2 (zwei biologische Replikate, unterschiedliche Passagen und Zeitpunkte) keine Korrekturen der statischen Unschärfen durch multiple Testung durchgeführt werden konnten. Dadurch (z.B. durch fehlende Definition der FDR) wurde eine hohe Anzahl falsch positiver Ergebnisse in Kauf genommen.



Abbildung 3-33: VENN Diagramm der gleich und unterschiedlich exprimierten Gene nach Siomycin A Behandlung bzw. *FOXM1 Knockdown*

Dargestellt sind alle Codesets, die mit p<0,05 und einem *fold-change* <-1,5 / >1,5 verändert exprimiert wurden. Überlappungen gab es bei 41 Codesets, davon 34 mit gleichem Vorzeichen (komplette Auflistung vgl. Anhang 4 und 5).



Abbildung 3-34: Auflistung aller sowohl nach Siomycin A als auch nach *FOXM1 Knockdown* **veränderten Gene** Dargestellt sind 41 Codesets mit einer veränderten Expression <-1,5/>1,5-fach (*p*<0,05). Codesets ohne Namen (nur ID) stellen Pseudogene dar und werden zur Vollständigkeit aufgelistet. Dopplungen von Gennamen stehen für verschiedene Codesets, die dasselbe Gen abdecken. Insgesamt 34 Codesets (26 Gene) zeigen eine veränderte Expression mit dem gleichen Vorzeichen in beiden Behandlungsgruppen.

Die Anzahl an Codesets, die in beiden Behandlungsgruppen gleichzeitig signifikant differentiell exprimiert wurden, war mit 41 sehr gering (Abbildung 3-33). Davon waren 34 Codesets (entsprechend insgesamt 26 Genen und 1 Pseudogen) auch mit gleichem Vorzeichen differentiell reguliert (Abbildung 3-34). Aus dieser geringen Anzahl von Genen funktionelle Zusammenhänge abzuleiten und somit darzustellen, welche Mechanismen der Siomycin A-Antwort auf die Inhibition von FOXM1 zurückzuführen sind, war mit großer Unsicherheit behaftet und sollte in seiner Interpretation lediglich als präliminär eingestuft werden, da rein statistisch jedes dieser Gene ein falsch positives Ergebnis zeigen könnte. Mit Genen, die das zelluläre Trafficking, die Signaltransduktion und die Mitose-Regulation/Chromatin-Integrität beeinflussen, wurden in beiden Behandlungsgruppen vor allem zelluläre Prozesse wie Wachstum und Proliferation negativ beeinflusst (Abbildung 3-35). Typische FOXM1 Zielgene fanden sich neben *CCNA2* (Cyclin A2), *CCNB1* (Cyclin B1) und *CDC14A* in dieser Liste nicht.



Abbildung 3-35: Cluster-Darstellung der analog exprimierten Gene nach Siomycin A Behandlung und *FOXM1 Knockdown*

Dargestellt ist die Expression der 34 Codesets in der Cluster-Analyse mit p<0,05 und einem fold-change <-1,5 / >1,5. Der gegenüber den Kontrollen negativ regulierte Cluster enthält u.a. Gene des zellulären Traffickings und der Mitoseregulation sowie von replikationsabhängigen Histonen und Signaltransduktions-Mediatoren. Der positiv regulierte Cluster umfasst vor allem nicht codierende RNA Gene, darunter mehrere mitochondriale Aminoacyl-tRNA Gene, die u.a. Bewegungsprozessen zugeordnet werden.

Insgesamt kann für die Analyse analoger Genexpressionsmuster nach Siomycin A Behandlung und *FOXM1 Knockdown* festgehalten werden, dass es neben wenigen proliferationsassoziierten Genen

keine deutlichen gemeinsamen Auswirkungen auf das Genexpressionsmuster nach Siomycin A Behandlung und *FOXM1 Knockdown* gibt. Die Ursache dafür lag im siRNA Datenset, das nahezu keine Muster zeigte und auch im PANTHER Überrepräsentationstest keine signifikante Häufung von Gensets mit bestimmten GO Annotationen aufwies (Abbildung 3-36). Die gleichmäßige Verteilung deutet auf eine statistische Verteilung und somit auf ein Zufallsergebnis hin.



Abbildung 3-36: Analyse der Signalwege-Zuordnung der analog bei nach Siomycin A und FOXM1 Knockdown veränderten Gene PANTHER Pathway Zuordnung der in beiden Behandlungsgruppen differentiell exprimierten Gene [269-271].

Da die Daten zur Auswirkung von FOXM1 RNA Interferenz und auch die in beiden Behandlungsgruppen analog veränderten Gene keine eindeutige Schlussfolgerung erlaubten, die Signaltransduktion nach Siomycin jedoch weiterhin von Interesse war, wurde die Genexpression nach Siomycin auch getrennt analysiert. Insgesamt zeigte die Liste der nach Siomycin A Behandlung differentiell exprimierten Gene (Anhang 4) einen hohen Anteil an bereits identifizierten FOXM1 Zielgenen [198]. Hier konnte gezeigt werden, dass 514 der 792 differentiell exprimiertes Gen-Codesets (65%) FOXM1 Zielgenen zugeordnet werden können (Anhang 4). Zudem war eine deutliche Übereinstimmung mit Veränderungen, wie sie auch nach Nutlin-3a Behandlung und somit Aktivierung von wt p53 auftrat (vgl. Abschnitt 3.3.2.1.4), zu erkennen.

Erwartungsgemäß befanden sich unter den differentiell exprimierten Genen nach Siomycin A Behandlung eine große Anzahl negativ regulierter Gene von Zellzyklusregulatoren und Mitose-Proteinen wie von Cyclinen, Cylin-abhängigen Kinasen, Centromerproteinen, Kinesinen, Proteinen des *Chromosomalen Passenger Komplexes* (CPC) und des Kondensin Komplexes (Abbildung 3-37 und Anhang 4). Außerdem zeigte sich eine deutliche Überrepräsentation an Genen, die mit Replikation, Mitose oder p53 Signaltransduktion in Verbindung stehen (Abbildung 3-38, Anhang 6). Letzteres ist insofern interessant, als dass eine p53 Aktivität bei QGP-1 Zellen nicht angenommen werden konnte, FOXM1 jedoch ebenfalls eine Vielzahl an Genen im p53 Netzwerk reguliert. Zudem war die Expression von einer Vielzahl an replikationsassoziierten Genen (replikationsabhängige Histon-Gene, *cell division cycle* Gene, Gene des MCM Komplexes, DNA Polymerasen) und DNA Reparaturgenen erniedrigt. Entsprechend war auch der Proliferationsmarker und etablierter Prognosemarker in GEP-NEN, *MKI67* (Ki67), nach Siomycin A stark negativ reguliert (-2,56 fach).

Dass in QGP-1 Zellen wiederum kaum klassische Gene des intrinsischen Apoptoseweges durch Siomycin A induziert werden konnten, deckte sich mit den Beobachtungen aus den Zellzyklusuntersuchungen, in denen QGP-1 Zellen keine signifikante Induktion von Apopose zeigten.



Abbildung 3-37: Visualisierung der veränderten Zellzyklus-Signalwege nach Siomycin A Behandlung *in vitro* KEGG-basierte Visualisierung der differenziell exprimierten Zellzyklus-Gene mittels Pathview [223]. Dunkelgrün: DE≥-1,5; Hellgrün: DE<-1,5; rot: DE≥1,5; grau: p>0,05.

FOXM1 ist ein Schlüsselregulator verschiedender DNA Reparaturmechanismen und kann somit zur Resistenzentwicklung gegenüber genotoxischen Therapien beitragen [132]. Nach Siomyicn A Behandlung zeigte sich eine Verringerung der Expression von Genen verschiedenster DNA Reparaturproteine wie BRCA1 und 2, EXO1, XRCC1, FEN1, RAD1, RAD18, RAD51AP1, RAD51C, RAD54B RAD54L, CHK1 und 2.



Abbildung 3-38: Funktionelle Klassifikation und statistische Überrepräsentation der nach Siomycin A differentiell exprimierten Gene

PANTHER Pathway Zuordnung der differentiell exprimierten Gene und statistische Überrepräsentation molekularer Funktionsannotationen im Vergleich zur Homo sapiens Referenzliste mittels Panther Klassifikation. Annotation Data Set: PANTHER GO-Slim Biological Process; die gesamte Tabelle der Gene Ontology Analyse befindet sich im Anhang 6. Über-/Unterrepräsentation bezieht sich jeweils auf den Erwartungswert, der sich für eine Kategorie aus der Referenzliste des Gesamtgenoms ergibt [269-271].

Nach der Analyse der Gesamtgenomexpression wurden die Zelllinien LCC-18 QGP-1 und BON mit 2 μ M Siomycin behandelt und die Lysate gegen *FOXM1 Knockdown* Lysate im Western Blot analysiert.

STAT3 wurde ausgewählt, da es in den bisherigen Experimenten mit FOXM1 ko-reguliert wurde.

Survivin und Aurora A sind Malignitätsmarker und FOXM1 Zielgene. Chromogranin A wurde als Marker für neuroendokrine Eigenschaften gewählt.

Insgesamt konnten nach Behandlung mit Siomycin A ein starker Rückgang der FOXM1 Expression sowie der Expression von STAT3, Survivin, Aurora A in allen Zelllinien und eine Abnahme der Chromogranin A Expression bei BON Zellen gezeigt werden (Abbildung 3-39).

Interessanterweise trat nach Siomycin A Behandlung eine Hyperphosphorylierung der p70S6 (S6) Kinase an Threonin-389 und somit eine Aktivierung auf. Diese steht im Kontrast zur Abnahme der Threonin-32 Phosphorylierung von FOXO3a, da beide Phosphorylierungsstellen, abhängig von der AKT Aktivität, einen aktiven PI3K-Weg detektieren. Da mTOR jedoch auch über eine Vielzahl anderer Signalwege aktiviert werden kann, ist eine mögliche Erklärung, dass die p70S6K Aktivierung andere Ursachen hatte. Da ERK1/2, soweit getestet, nach Siomycin A leicht schwächer phosphoryliert war, ist eine Interferenz mit dem MAPK-Weg allerdings ebenfalls wenig wahrscheinlich. Zudem wurde eine Phosphorylierung von Threonin-389 der S6 Kinase auch mit der *Feedback*-Inaktivierung von IRS1 und



Abbildung 3-39: Vergleichende Analyse der Protein-Expression nach Siomycin A Behandlung versus *FOXM1 Knockdown* im Western Blot

In A) BON Zellen, B) QPG-1 und C) LCC-18 wurden über 72 h mit 2 µM Siomycin A inkubiert oder mit 40 pmol/ml siRNA gegen *FOXM1* transfiziert. Gezeigt werden je eine repräsentative Kombinationsbehandlung (siRNA/Siomycin A) und Kontrolle (Kontroll-siRNA/DMSO) aus mehreren parallelen Experimenten auf identischen Blots. Alle Blots enthalten zudem identische Lysate. Siomycin A induzierte eine starke Reduktion der Expression von STAT3, FOXM1, Survivin und Aurora A in allen Zelllinien. Der Effekt der siRNA zeigte sich deutlich schwächer und schien nur die FOXM1 A Isoform zu inhibieren. RNA Interferenz (RNAi) wies hier keinen Effekt auf STAT3 und Survivin auf. Dennoch konnte in den Zelllinien QGP-1 und LCC-18 eine leichte Reduktion der Aurora Kinase A Expression (D) und der ERK1/2 Phosphorylierung auch nach RNAi gezeigt werden. In BON Zellen konnte zudem ein Rückgang der Chromogranin A Expression nach Siomycin A Behandlung nachgewiesen werden. Die p70S6 Kinase zeigte nach Siomycin A, aber nicht nach RNA Interferenz eine erhöhte Threonin-389 Phosphorylierung in allen Zelllinien. Die Phosphorylierung von FOXO3a zeigte einen Rückgang nach Siomycin A Behandlung von BON und QGP-1 Zellen. Teilweise und modifiziert aus Briest et *al.* 2015 [197].

somit des PI3K-Weges in Verbindung gebracht [272], was die fehlenden phospho-FOXO3a Signale erklären könnte. Wodurch die S6 Kinase letztlich aktiviert wurde, konnte nicht geklärt werden. Darüber hinaus waren nach Siomyicn A Behandlung die Expression von p21 im Western Blot erhöht, die Histon H3 Expression und die Phosphorylierung von Rb reduziert (Abbildung 3-40). Die Phosphorylierung von Rb an Serin-780 wird u.a. durch Aurora Kinasen vermittelt [273].

Die Western Blot Auswertung legte für die untersuchten Proben mit *FOXM1 Knockdown* nahe, dass eine FOXM1 Isoform nicht per siRNA gehemmt werden konnte. Bei allen Zelllinien und bei beiden verwendeten siRNA (Qiagen Hs_FOXM1_6 und Hs_FOXM1_7) zeigten sich z.T. noch sehr starke FOXM1



Banden. In allen drei Zelllinien schien der *Knockdown* vor allem die mutmaßliche FOXM1A Isoform zu betreffen (Abbildung 3-39). Die Vermutung, dass die siRNA einen unzureichenden *Knockdown* einer bestimmten FOXM1 Isoform induziert haben könnte, wurde anschießend mittels Isoform-spezifischer *Real time* PCR für beide Replikate bestätigt. Hier zeigte sich, dass die B-Isoform nur leicht reduziert wurde, während die FOXM1A Expression am deutlichsten zurückging (Abbildung 3-41). Aus diesem Grund wurden anschließend alternative siRNA (Sigma) eingesetzt. Die Microarrays konnten aus Ressourcengründen jedoch nicht wiederholt werden.

Entsprechend dem unzureichenden *Knockdown* fiel auch die Auswirkung auf die übrigen untersuchten Proteine schwach aus. Ein leichter Effekt konnte jedoch für Aurora A gezeigt werden, dessen Expression bei den Zelllinien LCC-18 und QGP-1 nach *FOXM1 Knockdown* leicht zurückging (Abbildung 3-39D), sowie für Chromogranin A in BON Zellen.



Abbildung 3-41: *Knockdown*-Effizienz der siRNA für die einzelnen FOXM1 Isoformen

Mittels Isoform-spezifischer *Real time* PCR konnte gezeigt werden, dass die FOXM1B Isoform, die in der Literatur als die Isoform mit dem stärksten malignen Potential beschrieben wird [274], keine ausreichende Reduktion nach RNA Interferenz aufwies. Am deutlichsten reduziert zeigten sich die Transkripte für die FOXM1A Isoform.

3.3.1.2.5 Zusammenfassung

Der Proteasominhibitor Siomycin A zeigte eine starke inhibitorische Wirkung auf die Expression von FOXM1 in allen getesteten GEP-NEN Zelllinien. Unabhängig vom p53 Status der Zelllinien wies er starke antiproliferative Effekte mit einer IC50 von etwa 1 µM auf und induzierte Apoptose in KRJ-I, BON und LCC-18 Zellen. QGP-1 Zellen reagierten schwächer auf Siomycin A Behandlung, dennoch konnten in einer Gesamtgenomexpressionsanalyse Hinweise auf die Reduktion von verschiedensten Genen nachgewiesen werden, die an Proliferation, DNA Reparatur und Wachstum beteiligt sind. Zudem war eine Vielzahl von Genen betroffen, die nach GO Zuordnung zum p53 Netzwerk gehört und/oder FOXM1 abhängig reguliert wird, obwohl QGP-1 kein funktionelles p53 exprimiert.

3.3.1.3 Bortezomib

Der Proteasominhibitor Bortezomib, der bereits zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen ist, sollte als klinisch relevante Alternative zu Siomycin A ebenfalls in GEP-NEN getestet werden. Seine FOXM1-inhibitorische Aktivität wurde bereits *in vitro* beschrieben [252] und konnte mittels Western Blot und PCR auch für GEP-NEN Zelllinien bestätigt werden (Abbildung 3-42).



Abbildung 3-42: FOXM1 Expression nach Bortezomib Behandlung

A) Western Blot der FOXM1 Expression nach 48 h Bortezomib Behandlung von KRJ-I (20 nM Bortezomib), LCC-18 (500 nM Bortezomib), BON (25 nM Bortezomib) und QGP-1 (5 μ M Bortezomib) GEP-NEN Zelllinien. In allen Zelllinien konnte eine Reduktion der FOXM1 Expression bei Konzentrationen über der relativen IC50 gemessen werden. B) Die *Real-time* PCR Analyse der FOXM1 mRNA Expression bei BON Zellen nach 48 h Bortezomib Behandlung (25 nM) bestätigte die Ergebnisse des Western Blot. Es konnte eine signifikant reduzierte Expression (Mann-Whitney-U Test; *p*= 0,0238) von FOXM1 gegenüber der Kontrolle gezeigt werden. Legende: **p*<0,05

3.3.1.3.1 Proliferationsstudien

Zunächst wurde auch für Bortezomib im WST-1 Proliferationsassay das Wachstum der Zellen unter verschiedenen Konzentrationen von Bortezomib gemessen.

Insgesamt zeigte sich die Substanz in drei von vier Zelllinien bezüglich der notwendigen Dosierung Siomycin A weit überlegen. Für BON und KRJ-I Zellen lag die IC50 deutlich unter 10 nM, bei LCC-18 mit 270 nM ebenfalls weit unter der IC50 von Siomycin A (Abbildung 3-43 und Abbildung 3-44, weitere Dosis-Wirkungs-Kurven nach 24 h und 50 h Inkubation finden sich im Anhang 7, Abbildung A-3). Bei QGP-1 Zellen hingegen zeigte sich kein deutlich konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt. Die relative IC50 lag zwar bei rund 11 nM, es traten jedoch in mehreren unabhängigen Experimenten biphasische Dosis-Wirkungs-Kurven auf, so dass eine Bestimmung der IC50 nur als Schätzwert möglich war. QGP-1 zeigten sich demnach deutlich unempfindlicher gegenüber Bortezomib, während KRJ-I, BON und LCC-18 Zellen ein sehr gutes Ansprechen bereits bei niedrigen Konzentrationen aufwiesen.



Abbildung 3-43: Antiproliferativer Effekt von Bortezomib auf gastrointestinale NEN Zelllinien

A+B) LCC-18 und KRJ-I Zellen wurden in jeweils fünf Replikaten über 72 h mit steigenden Konzentration Bortezomib behandelt und anschließend im WST-1 Assay gegen eine unbehandelte Kontrolle analysiert. C+D) Bei beiden Zelllinien ergaben sich signifikante antiproliferative Effekte (Kruskal Wallis ANOVA; p<0,0001). Balken kennzeichnen Median und Interquartilenabstand. E+F) Normalisierte Dosis-Wirkungs-Kurve: Die relative IC50 für 72 h wurde auf 270,3 nM für LCC-18 (E) und 4,7 nM für KRJ-I (F) bestimmt. Legende: *p<0,05 (gegenüber Kontrolle).



Abbildung 3-44: Antiproliferativer Effekt von Bortezomib auf pankreatische NEN Zelllinien A+B) BON und QGP-1 Zellen wurden in jeweils fünf Replikaten über 72 h mit steigenden Konzentration Bortezomib behandelt und anschließend im WST-1 Assay gegen eine unbehandelte Kontrolle analysiert. C+D) Bei beiden Zelllinien ergaben sich insgesamt signifikante antiproliferative Effekte (Kruskal Wallis ANOVA; *p*<0,0001). Allerdings traten diese bei QGP-1 biphasisch und daher schlecht quantifizierbar auf. Balken kennzeichnen Median und Interquartilenabstand. E+F) Normalisierte Dosis-Wirkungs-Kurve: Die relative IC50 für 72 h wurde auf 7,5 nM für BON (E) und 11 nM für QGP-1 (F) bestimmt. Legende: **p*<0,05 (gegenüber Kontrolle).

3.3.1.3.2 Kombination von Bortezomib mit Cisplatin

Die These, dass die Kombination von Proteasominhibitor-vermittelter FOXM1 Inhibition mit DNA schädigenden Agentien zu synergistischen inhibitorischen Effekten und zur Sensibilisierung der Zellen gegenüber Chemotherapie führen könnte, wurde zunächst im WST Proliferationsassay an BON Zellen analysiert. Auch wenn die Effekte auf die relativen IC50 Werte (d.h. die Konzentrationen für den halbmaximalen Effekt, wobei die Extrema auf 100 und 0 normiert werden) bei 24 h zu vernachlässigen waren, zeigten sich bei den absoluten Effekten deutliche Reduktionen der Zellzahl, die über additive Effekte hinausgingen und mittels Berechnung des Kombinationsindex bestätigt werden konnten. Nach 50 h zeigte sich der Synergismus auch in Bezug auf die Höhe der relativen IC50, die bei Bortezomib von 31,4 nM auf 14,8 nM deutlich absank (Abbildung 3-45).

Deutlich anders verhielt sich die p53 Wildtyp Zelllinie KRJ-I. Hier konnten zwar deutliche Effekte in der Monotherapie nachgewiesen werden, jedoch führte eine Kombination mit Cisplatin nicht zu einer verstärkten Bortezomib-Wirkung (Abbildung 3-46). Bei LCC-18 und QGP-1 Zellen zeigte sich eine verstärkende Wirkung in Kombination mit Cisplatin bei Bortezomib-Konzentrationen >100nM (vgl. Anhang 7, Abbildung A-4).



Abbildung 3-45: Kombinatorische Effekte von Bortezomib und Cisplatin in BON Zellen

BON Zellen wurden über 24 h und 50 h mit Bortezomib, Cisplatin oder einer 1:10 Kombination beider Substanzen in jeweils dekadisch (von 1 nM Bortezomib + 10 nM Cisplatin) steigender Konzentration inkubiert. Die absoluten Effekte nach 24 h (A) und 50 h (B) zeigten deutliche synergistische inhibitorische Effekte. Die Berechnung der Kombinationsindizes (CI) erfolgte nach der Methode von Chou und Talaly mittels *CompuSyn* 1.0 Software [210, 211]. C+D) Wachstumskurven nach 24 h und 50 h der *in vitro* in Abhängigkeit von der Konzentration (dekadische Verdünnungsreihe; höchste Konzentrationen: Bortezomib 10 μ M, Cisplatin 100 μ M; Median und Interquartilenabstand). E+F) Normalisierte Dosis-Wirkungs-Kurven: Nach 24 Stunden konnte keine Auswirkung auf die relativen IC50 Werte von Bortezomib durch Kombination mit Cisplatin gezeigt werden, während sich die Werte nach 50 h deutlich (keine Überlappung der Konfidenzintervalle) unterschieden. Legende: +++++ *sehr starker Synergismus*, ++++ *starker Synergismus*, +++ *Synergismus*, ++ *mäßiger Synergismus*, + *schwacher Synergismus*, +/- *additiv*, - *schwacher Antagonismus*, --- *mäßiger Antagonismus*, ---- *Antagonismus*, ---- *sehr starker Antagonismus*; *p<0,05 (Zweifache ANOVA).



Abbildung 3-46: Kombinatorische Effekte von Bortezomib und Cisplatin in KRJ-I Zellen

KRJ-I Zellen wurden über 24 h und 50 h mit Bortezomib, Cisplatin oder einer 1:10 Kombination beider Substanzen in jeweils dekadisch steigender Konzentration (von 0,5 nM Bortezomib + 5 nM Cisplatin) inkubiert. Die absoluten Effekte nach 24 h (A) und 50 h (B) zeigten nur bei vereinzelten Konzentrationen synergistische inhibitorische Effekte. Die Berechnung der Kombinationsindizes (CI) erfolgte nach der Methode von Chou und Talaly mittels *CompuSyn* 1.0 Software [210, 211]. Die Berechnung der CI C+D) Wachstumskurve *in vitro* in Abhängigkeit von der Verdünnung (höchste Konzentrationen: Bortezomib 10 μ M, Cisplatin 100 μ M; Median und Interquartilenabstand). E+F) Normalisierte Dosis-Wirkungs-Kurven: Weder nach 24 h noch nach 50 h konnte eine Auswirkung auf die relativen IC50 Werte von Bortezomib durch Kombination mit Cisplatin gezeigt werden. Legende: ++++ sehr starker Synergismus, +++ starker Synergismus, +++ Synergismus, ++ mäßiger Synergismus, + schwacher Synergismus, +/- additiv, - schwacher Antagonismus, --- mäßiger Antagonismus, --- Antagonismus, ---starker Antagonismus, ----- sehr starker Antagonismus; *p<0,05 (Zweifache ANOVA).

3.3.1.3.3 Wirkung von Bortezomib auf den Zellzyklus

Nachdem die Wirksamkeit von Bortezomib auf GEP-NEN Zelllinien *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollten die genaueren Mechanismen der Wirkung weiter untersucht werden. Dazu wurden zwei ansprechende Zelllinien (KRJ-I und BON) und eine resistente Zelllinie (QGP-1) mittels Mitose-Index-Durchflusszytometrie auf Veränderungen des Zellzyklus analysiert. Hierbei zeigte sich, dass Cisplatin einen S-Phase Arrest induzierte, während Bortezomib bei BON und QGP einen G2/M Arrest und bei den p53 Wildtyp Zellen KRJ-I einen Anstieg der Sub-G1 Population induzierte. Interessanterweise schien die Kombination mit Cisplatin bei BON Zellen den Übergang vom G2/M-Arrest zur Apoptose zu induzieren, während die Kombination bei KRJ-I Zellen keine deutlichen Veränderungen gegenüber Bortezomib-Monotherapie auslöste (Abbildung 3-47).



Abbildung 3-47: Wirkung von Bortezomib, Cisplatin und einer Kombination beider Substanzen auf den Zellzyklus neuroendokriner Tumorzelllinien

Die Zellen wurden für 24 h mit 50 nM Bortezomib, $10 \,\mu$ M Cisplatin oder einer Kombination von 50 nM Bortezomib und 10 μ M Cisplatin untersucht. A) Bortezomib induzierte bei KRJ-I Zellen einen Anstieg der Sub-G1 Population und bei B) BON und C) QGP-1 einen G2/M Arrest. Durch Zugaben von Cisplatin konnte bei BON Zellen eine Veränderung in Richtung Apoptoseinduktion gezeigt werden. D-F) Histogramme der Propidiumjodid Durchflusszytometrie. Die M-Phase wurde zur Unterscheidung von G2 mittels Phospho-Histon H3 Antikörperreaktion zusätzlich gefärbt.



Abbildung 3-48: Frühe Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Bortezomib, Cisplatin und Kombination in vitro

A) Durch JC-1-Färbung konnte in KRJ-I Zellen nach 16 h und 20 h Behandlung mit 50 nM Bortezomib und Kombination von 50 nM Bortezomib und 10 μ M Cisplatin eine deutliche Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test; 16 h: *p*=0,0107). B) In BON zeigten sich nach dieser Inkubationszeit nur sehr schwache Effekte, während C) QGP-1 Zellen keine Apoptose induzierten. Balken kennzeichnen Median und Spannweite. Legende: **p*<0,05

Um die Präsenz von Apoptose, die sich (in der Propidiumjodid-Färbung) in fortgeschrittenen Stadien durch morphologische Veränderungen und einen Anstieg der Sub-G1 Population äußert, besser zu evaluieren, wurden die drei Zelllinien anschließend auf die Induktion von früher Apoptose mittels JC-1-Färbung untersucht. Während KRJ-I Zellen bereits nach 16 Stunden eine deutliche Induktion von Apoptose zeigten, wurden bei BON nach 20 Stunden nur sehr schwache Effekte und bei QGP-1 auch nach 20 Stunden Inkubation keine apoptotischen Effekte sichtbar (Abbildung 3-48 und Anhang 8).

3.3.1.3.4 Genexpressionsanayse nach Bortezomib Behandlung

Zur Untersuchung der zugrunde liegenden Signaltransduktionsveränderungen bei Bortezomib Monotherapie und Kombination mit Cisplation in GEP-NEN *in vitro* wurde mit dem Multiplex-Genexpressionsanalyse-System nCounter[®] von Nanostring[®] Technologies [207] gearbeitet und anschließend die Expression ausgewählter Proteine im Western Blot verifiziert.



Abbildung 3-49: Morphologische Veränderungen von BON nach 24 h Bortezomib, Cisplatin und Kombination BON Zellen wurden 24 h mit folgenden Wirkstoffen inkubiert: A) Kontrolle, B) 10 μ M Cisplatin, C) 25 nM Bortezomib, D) 25 nM Bortezomib + 10 μ M Cisplatin. Es konnten deutliche Veränderungen in der Morphologie bei C und D gezeigt werden. Die anschließend lysierten Zellen wurden mittels Genexpressionsanalyse weiter analysiert. Lichtmikroskopie, 200 x Vergrößerung.

Die Technologie basiert, im Gegensatz zu gängigen Mikroarray-Formaten, nicht auf einem zu quantifizierenden Intensitäts-*Readout*, sondern auf der tatsächlichen Zählung von Einzelmolekülen, die mit an Barcodes gekoppelten Sonden hybridisieren, in *Counts*. Sie wird im Abschnitt Material und Methoden intensiver erläutert.

Die Analysen wurden mit den PanCancer Panel durchgeführt, dessen Sonden gegen 730 Transkripte bekannter Krebs-assoziierter Gene hybridisieren (eine komplette Auflistung findet sich unter Nanostring.com). Es wurde die Zelllinie BON ausgewählt, da für diese bereits über Kooperation ein Zugang zu einem *in vivo* Xenograft Modell besteht, in dem weiter gehende Studien durchgeführt werden können.

Die Zellen wurden über 24 h mit 25 nM Bortezomib, 10 µM Cisplatin, einer Kombination aus 25 nM Bortezomib und 10 µM Cisplatin und PBS als Kontrolle inkubiert. Nach dieser Zeit waren bereits morphologische Veränderungen zu erkennen (Abbildung 3-49). Die isolierte RNA wurde im nCounter[®] System analysiert und mittels nSolver[®] Software R-basiert ausgewertet. Die Übersicht über die verwendeten Haushaltsgene findet sich in Abbildung 3-50.

Bereits in der Clusteranalyse zeigte sich in der Kombinationsbehandlung ein deutlicher Trend zur Inhibition einer Großzahl der untersuchten Gene (Abbildung 3-51).

Durch Cisplatin zeigten sich verhältnismäßig wenige Gene ($N_{p<0,05}=154$; $N_{FDR<0,05}=18$) differentiell exprimiert (Anhang 9). Dieses Ergebnis war aufgrund des sehr geringen Effekts von Cisplatin nach 24 Stunden zu erwarten (vgl. Abschnitt 3.3.1.3.2). Auch hielten sich hier Aktivierung und Inaktivierung von Genen weitestgehend die Waage (Abbildung 3-52).



Abbildung 3-50: Zur Normalisierung verwendete Haushaltsgene

Mittels geNorm Algorithmus [220] der nSolver® Software wurden folgende Transkripte Normalisierung zur des nCounter® Arrays verwendet: AGK, DDX50, EIF2B4, ZC3H14, CNOT10, MRPS5, PRPF38A, NUBP1, AMMECR1L, PIAS1, HDAC3, ACAD9, EDC3, RBM45, NOL7, USP39, COG7, ZNF384, SF3A3, VPS33B, SAP130, PIK3R4, TLK2, SLC4A1AP, ZKSCAN5, ZNF346, MTMR14, ERCC3. CNOT4, TMUB2, C10orf76. Die Abbildung der verwendeten zeigt die Varianz Haushaltsgene (braun) und der untersuchten Gene zur Qualitätskontrolle. Die Transkripte mit der höchsten Varianz sind benannt.



Abbildung 3-51: Heatmap der Genexpression aller 720 Gene des PanCancer Panels nach Bortezomib, Cisplatin oder Kombinationsbehandlung

Die Heatmap der differentiell exprimierten Gene nach 24 h 25 nM Bortezomib, 10 μ M Cisplatin oder Kombination beider Wirkstoffe zeigte deutliche Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Behandlungsgruppen. Bei Cisplatin konnten zudem nur wenige Veränderungen zu den Kontrollen dargestellt werden. Ein biologisches Replikat der Behandlungsgruppe Bortezomib wurde von der Analyse ausgeschlossen, da sich bereits bei der Normalisierung der Rohdaten deutliche qualitative Mängel (Normalisierungsfaktor >3) in der Probe zeigten. Rot: niedrige Expression, gelb: hohe Expression.

Der Vergleich von Bortezomib mit der Kombination aus Bortezomib und Cisplatin zeigte unerwartet deutliche Parallelen zwischen beiden Behandlungsgruppen. Die Signifikanzniveaus selbst konnten wegen des Ausschlusses einer der drei biologischen Replikate bei Bortezomib aufgrund qualitativer Kriterien (Normalisierungsfaktor weit über 3) nicht verglichen werden. Es waren nach Bortezomib 217 Gene (FDR<0,05) und nach Kombination 278 Gene (FDR<0,05) signifikant verändert (Anhang 10 und Anhang 11). Der *Volcano Blot* zeigte hier vor allem, dass die Effekte (in Bezug auf den *Fold-change*) in der Kombinationstherapie etwas ausgeprägter waren (Abbildung 3-52).

In der *Pathway significance Analyse* (Abbildung 3-53) wurde deutlich, dass durch die Kombinationstherapie am stärksten Zellzyklus-Gene (Abbildung 3-54) und Mediatoren der TGF-β Signaltransduktion betroffen waren, die jeweils stark negativ reguliert waren.

Nach Cisplatin konnte ein leichter Anstieg der Expression von DNA Reparatur- und Zellzyklusgenen gezeigt werden. Typisch für Cisplatin-induzierte DNA-Schäden ist beispielsweise die Induktion von *DDB2* (Abbildung 3-55) [275].







Abbildung 3-52: Volcano-Blot der Genexpression nach Bortezomib, Cisplatin oder Kombinationsbehandlung

Auch die Darstellung im Volcano-Blot, welcher sowohl die *p*-Werte als auch die Stärke der veränderten Expression (*logfold-change*) einbezieht, verdeutlichte, dass Cisplatin nur wenig Effekt in BON Zellen unter den verwendeten experimentellen Parametern hatte, worunter u.a. die Induktion von p21 (*CDKN1A*) fiel (A). Bortezomib Monotherapie (B) sowie die Kombination von Bortezomib und Cisplatin (C) zeigten deutliche Übereinstimmungen. Vor allem konnte in dieser Darstellung anschaulich gemacht werden, dass in der Kombination die *Logfold-change* Werte, also die Höhe der differentiellen Expression, stärker zu den Seiten hin, also zu höheren Werten streuten.

Auch die *p*-Werte erreichten bei der Kombination niedrigere Bereiche, die Ursache dafür muss aber vor allem in der verringerten (Stich-)probenzahl bei der Bortezomib Monotherapie gesehen werden.



Abbildung 3-53: Veränderte Signalwege nach Bortezomib, Cisplatin und Kombinationsbehandlung *in vitro Global Significance* Scores stellen die Stärke der differentiellen Expression von Genen eines Signalweges/Mechanismus A) ohne Beachtung der Vorzeichen oder B) mit Kennzeichnung der Richtung der differentiellen Expression dar. Cisplatin induzierte nahezu keine Veränderungen, es zeigten sich jedoch eine leichte Aktivierung der Expressionen von Genen mit der Annotation Zellzyklus (CC) und DNA Reparatur sowie eine Reduktion der Expression MAPK, RAS und Notch-assoziierter Signalwege. Die stärksten Veränderungen nach Bortezomib und Kombination traten bei Genen mit der Annotation TGFβ, Notch und Zellzyklus auf, die negativ reguliert wurden. Legende A): Rot: wenige differentiell exprimierte Gene, gelb: stark veränderte Genexpression. Legende B) Rot: positive Regulation, blau: negative Regulation. Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog.

Das DDB2 Protein ist in die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) involviert und sein Verlust vermittelt Resistenz gegenüber Apoptose. Zellen mit niedriger DDB2 Expression induzieren trotz intakter p53 Antwort keine Apoptose, sondern p21-vermittelten Zellzyklus-Arrest [276, 277]. Dass DDB2 neben vielen weiteren Genen der DNA Reparatur nach Bortezomib und auch in der Kombination beider Substanzen negativ reguliert wurde (Abbildung 3-55), dürfte somit den unerwünschten Effekt haben, dass hier eine Verschiebung von Apoptoseinduktion hin zu Zellzyklus-Arrest verstärkt werden könnte. Dieser Effekt lässt sich auch annehmen, wenn man in Abbildung 3-53B die Richtung der Genexpression der kanonischen Signalwege der Apoptose und des Zellzyklus betrachtet. Hier ist jedoch ein detaillierter Blick in die einzelnen Gensets notwendig, da in der GSA Analyse (Zuordnung von Genen zu einzelnen kanonischen GO Signalwegen) keine Differenzierung dahingehend vorgenommen wurde, ob die einzelnen Mediatoren aktivierend oder inhibierend auf den jeweiligen Signalweg wirken.

So zeigt beispielweise ein Blick in die Liste der nach Cisplatin und Kombinationstherapie veränderten DNA Reparaturgene deutlich, dass hier tatsächlich Reparaturgene induziert (Cisplatin) bzw. reprimiert (Kombination) wurden (Abbildung 3-55), während sich hinsichtlich der DNA Schaden-Antwort beim Vergleich von Bortezomib mit der Kombination nahezu keine Unterschiede ergaben (Daten nicht gezeigt). Bortezomib hemmt demnach die Expression von Genen, die zur Reparatur von DNA Schäden notwendig sind, unabhängig davon, ob tatsächlich DNA Schäden (z.B. durch Cisplatin) induziert werden oder nicht. Gleichzeitig, und dieser Fakt ist relevant für eine mögliche therapeutische Anwendung, werden die inhibitorischen Effekte, nicht durch die Zugabe von Cisplatin nivelliert und sind somit auch unter Induktion von DNA Schaden (zumindest durch Cisplatin) andauernd.



Abbildung 3-54: Visualisierung der veränderten Zellzyklus-Signalwege nach Kombinationsbehandlung *in vitro* KEGG-basierte Visualisierung der differenziell exprimierten Zellzyklus-Gene mittels Pathview [223] nach Behandlung mit Bortezomib und Cisplatin. Weiß: Gen-Sonden nicht im PanCancer® Panel enthalten.

Anders sah es beispielsweise bei Genen der GO Annotation Apoptose aus. Hier legte Abbildung 3-53 nahe, dass Bortezomib möglicherweise stärker Apoptose induziert als die Kombinationsbehandlung. Tatsächlich fanden sich bei Bortezomib 16 negativ (davon nur *ENOG, BCL2* und *NFKB1* mit einem *fold-change* <-1,5fach) und 6 positiv regulierte (davon *CASP7, BID, IKBK, CAPN2* und *MAP3K14* mit einem *fold-change* >1,5fach) mit Apoptose annotierte Gene (Anhang 10). Dem gegenüber standen 22 negativ (davon *ENDOG, PRKAR1B, BCL2, NFKB1, FASLG, PIK3CB, PPP3CB, PIK3R2, IL1RAP, PPP3CA* und *AKT2* mit *fold-change* <-1,5) und 9 positiv regulierte Apoptose-Gene (*CASP8, CAPN2, CASP7, BID, IKBKG, TNFRSF10A, MAP3K14, TNFRSF10D* und *FAS* mit einem *fold-change* >1,5fach) bei der

Kombinationsbehandlung (Anhang 11). Die Liste zeigt jedoch, dass unter den negativ regulierten Genen auch eine Vielzahl von Genen bedeutender anti-apoptotischer Proteine (BCL2, AKT2, Untereinheiten von NF-κB und PI3K, PKA) zu finden war. Dazu schienen bei der Kombinationsbehandlung mit den Genen der Caspasen 7 und 8, der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren, der IκB Kinase Untereinheit γ, von Calpain, BID und FAS deutlich mehr Gene der extrinsischen Apoptoseinduktion beeinflusst zu werden. Zusätzlich fanden sich in der Agglomerativen Clusteranalyse zwei Gencluster, die bei der Kombinationstherapie negativ reguliert waren, während die Proben der Bortezomib Monotherapie sich analog der Kontrollen verhielten (Abbildung 3-56). Diese umfassten ebenfalls einige mit DNA Reparatur-assoziierte Gene sowie Gene aus dem Kontext der Transkription.



Abbildung 3-55: Expression von Genen der Annotation DNA Reparatur nach Cisplatin Monotherapie und Kombination mit Cisplatin

Dargestellt ist der *Volcano*-Blot aller Gene mit der Annotation DNA Reparatur (blau). A) Cisplatin induzierte eine verstärkte Expression von DNA Reparaturgenen wie *DDB2, Rad51* oder *RCF4* (rote Pfeile). B) Die Kombination mit Bortezomib konnte diesen Effekt umkehren. Nach Bortezomib (nicht gezeigt) und Kombination wurde die Mehrheit der DNA Reparaturgene negativ reguliert. Gestrichelte Linien markieren Schwellenwerte im Bereich der *p*-Werte (*p*<0.01 und *p*<0.001).


Abbildung 3-56: Agglomerative Clusteranalyse der Genexpression nach Bortezomib versus Kombinationsbehandlung

Bei der Clusteranalyse zeigten sich zwei Gencluster (A), die sich nach Bortezomib und der Kombinationsbehandlung deutlich unterschieden. Die Gene (B) wurden einer funktionellen GO-Klassifikation unterzogen [269-271]. Der Abgleich mit der *PANTHER GO-Slim Biological Process* Datenbank und eine detaillierte Auflistung der biologischen Funktionen befinden sich in Anhang 12 und enthalten eine Reihe von DNA Reparaturgenen und Transkriptions-assoziierter Gene.

Insgesamt konnte in den Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass die Zugabe von Bortezomib die durch Cisplatin induzierte DNA Reparaturaktivität deutlich inhibiert. Bortezomib Monotherapie und Kombination mit Cisplatin unterscheiden sich zudem vor allem durch generell deutlichere Effekte in der Kombinationsbehandlung in Bezug auf die Stärke der differentiellen Expression.

Im anschließenden Western Blot (Abbildung 3-57) konnte bestätigt werden, dass Bortezomib die Phosphorylierung von Histon H2AX als Marker für zellulären Stress durch DNA Schädigung induziert. Die Serin-139 Phosphorylierung von Histon H2AX zeigte sich nach Kombination, im Vergleich zu Bortezomib oder Cisplatin Monotherapie, deutlich erhöht, was auf eine maßgebliche Induktion von DNA Schäden hindeutete. In den mit Bortezomib behandelten Proben konnte eine deutliche Reduktion der FOXM1 Expression nachgewiesen werden, die Serin-35 Phosphorylierung nahm jedoch zu und spiegelt möglicherweise einen kompensatorischen Mechanismus wider. In der Kombinationsbehandlung konnte außerdem eine gegenüber Bortezomib Monotherapie deutlich erhöhte Induktion FAS-abhängiger extrinsischer Apoptose-Mechanismen, u.a. durch eine stärkere Spaltung von Caspase 8 und PARP sowie eine stärkere Expression von FADD, bestätigt werden. Hingegen konnten zumindest anhand von BID und BAX kaum Hinweise auf die Induktion intrinsischer Apoptose nachgewiesen werden, was möglicherweise in der *TP53* Mutation der BON Zellen begründet ist.



Abbildung 3-57: Induktion von Apoptose und DNA Reparatur nach Bortezomib, Cisplatin und Kombinationsbehandlung

BON Zellen wurden über 24 h mit 25 nM Bortezomib, 10 μ M Cisplatin einer Kombination aus 25 nM Bortezomib und 10 μ M Cisplatin inkubiert. Im Western Blot wurden A) die FOXM1 Expression und Phosphorylierung, B) die Induktion extrinsischer und C) intrinsischer Apoptose-Mechanismen sowie D) die Expression von DNA Reparatur-Proteinen untersucht. Nach Bortezomib Behandlung und Kombination zeigte sich zudem eine leichte Reduktion von in DNA Reparatur involvierten Proteinen wie BRCA2, FEN1, RFC4 und SKP2. Die Hemmung von DNA Reparatur, wie sie im Array gezeigt werden konnte, wurde somit auch auf Protein-Ebene stichprobenartig bestätigt (Abbildung 3-57). Ähnlich den Effekten von Siomycin A konnte auch bei Bortezomib eine starke Aktivierung der p70S6 Kinase gezeigt werden (Abbildung 3-58). Außerdem war die Aktivierung von ERK1/2 und des PI3K-Weges auffällig. Trotz Merkmalen einer AKT Aktivierung war die Expression



Abbildung 3-58: Veränderungen im Signalnetzwerk um FOXM1 nach Bortezomib, Cisplatin und Kombinationsbehandlung

BON Zellen wurden über 24 h mit 25 nM Bortezomib, 10 μ M Cisplatin einer Kombination aus 25 nM Bortezomib und 10 μ M Cisplatin inkubiert. Im Western Blot wurden A) direkte Regulatoren und transkriptionelle Ziele von FOXM1 untersucht sowie B) das Signalnetzwerk um den PI3K-Weg. Unter C) konnte gezeigt werden, dass beide Monotherapien wie auch die Kombinationstherapie die Expression des neuroendokrinen Markers Chromogranin beeinflussen.



Abbildung 3-59: Wirkung von Bortezomib in den übrigen GEP-NEN Zelllinien

A) LCC-18, BON, QGP-1 und B) KRJ-I Zellen wurden über 48 h mit Bortomib (LCC-18: 500 nM, BON: 25 nM, QGP-1: 5 µM bzw. KRJ-I: 20 nM) behandelt und im Western Blot analysiert. Es zeigten sich auch hier ein Anstieg von p21 und eine verstärkte Serin-139 Phosphorylierung von Histon H2AX. Außerdem konnten in KRJ-I Zellen eine Reduktion von DNA Reparatur-Proteinen und der Rb Expression sowie eine Induktion von extrinsischer Apoptose (Pro-Caspase 8 Spaltung) gezeigt werden. C) LCC-18. QGP-1 und BON Zellen wurden mit 250nM, 500nM bzw. 25nM Bortezomib in Kombination mit Cisplatin über 48h behandelt. Die verstärkte Serin-139 Phosphorylierung von Histon H2AX, Spaltung von PARP und verminderte Expression von SKP2 und FEN1 konnte in der Kombinationbehandlung bei allen nachgewiesen werden. (PARP Bande bei BON Zellen ist Abbildung 3-57

Zellen ist Abbildung 3-57 entnommen und wurde aus Übersichtsgründen umarrangiert).

von FOXO3a nicht negativ beeinflusst, sondern vielmehr schien die Kombination die Expression von FOXO3a zu verstärken. Die Phosphorylierung von Rb zeigte sich nicht beeinflusst, jedoch nahm die Expression von Rb selbst nach Bortezomib ab. Da Bortezomib vor allem G2/M Arrest oder Apoptose induzierte, ist eine Abnahme dieses G1 Phase-Regulators nahe liegend. Trotzdem war eine deutlich verstärkte Expression von p21 zu erkennen. Die Expression des FOXM1 Zielproteins Aurora Kinase A

stieg nach Bortezomib und Kombination leicht an und ließ sich somit vielmehr mit dem Aktivierungsstatus von FOXM1 als mit dessen Expression selbst in Verbindung bringen (Abbildung 3-58). Auch an den anderen Zelllinien konnte ein Großteil der beobachteten Wirkungen von Bortezomib, wie die negative Regulation von DNA Reparatur-Proteinen, Induktion von p21 und Aurora A, Spaltung von Pro-Caspase 8, Reduktion der Rb Expression und Hyperphosphorylierung von Histon H2AX, bestätigt werden (Abbildung 3-59). Zudem zeigte sich eine verstärkte Spaltung von PARP als Zeichen der Induktion von Apoptose nach der Kombinationsbehandlung von Bortezomib mit Cisplatin.

Abschließend wurde die eingangs geäußerte These, dass FOXM1 auch durch nukleären Export und Sequestrierung im Zytoplasma funktionell reguliert sein könnte, am Bespiel von Bortezomib untersucht. Zumindest konnte für mit Bortezomib behandelte BON Zellen festgestellt werden, dass keine Veränderung der subzellulären Lokalisation von FOXM1 vorlag (Abbildung 3-60).



Abbildung 3-60: Intrazelluläre Verteilung von FOXM1 nach Bortezomib Behandlung

Subzelluläre Lokalisation von FOXM1 nach Bortezomib Behandlung versus Kontrolle. Die klare Kernlokalisation von FOXM1 in BON Zellen wird nicht Sequestrierung durch ins Cytoplasma beeinflusst. Die Wirkung von Bortezomib in BON Zellen beruht somit auf der Reduktion der FOXM1 Expression. Die schwache Bande im Cytosol der Kontrollen auf basiert einer leichten Verunreinigung der Cytosolfraktion mit Kernproteinen, wie auch der PCNA Kontrolle zu entnehmen ist. Es wird erwartungsgemäß ebenfalls deutlich sichtbar, dass eine Induktion und Kernlokalisation von aktiven Caspase 8-Spaltfragmenten nur nach Bortezomib auftrat. Die leichten Banden der ungespaltenen (Pro-) Caspase 8 im Nukleus der Kontrollproben basiert ebenfalls auf einer nicht vollständigen Trennung der Komponenten (vgl. GAPDH).

3.3.1.3.5 Vergleich der Genexpression nach Bortezomib Behandlung und Knockdown von FOXM1

Um zu untersuchen, welche Rolle die negative Regulation von FOXM1 für die Bortezomib-Wirkung ingesamt spielt, wurde die Genexpression nach 24h Bortezomib Behandlung mit der Genexpression

nach 72h Knockdown von FOXM1 mittels Genexpressionsanalyse-System nCounter[®] von Nanostring[®] Technologies [207] verglichen.

Dazu wurde zunächst die Expression von pan FOXM1 und FOXM1B zur Bestätigung der Knockdown-Effizienz mittels Realtime PCR gemessen (Abbildung 3-61).

In der anschließenden Genexpressionsanalyse zeigte sich, dass die Inhibition Zellzyklus-regulierender Gene als Folge der Bortezomib Exposition auch durch FOXM1 vermittelt werden konnte, da sich unter bei den analog differentiell exprimierten Genen in beiden Behandlungsgruppen eine erhöhte Anzahl von Zelllzyklus-assoziierten Genen befand (Abbildung 3-62, Anhang 13). Die GO Überrepräsentationsanalyse (pantherdb.org; Panther v10.0 GO slim biological process) bestätigte die Daten. Von den 39 analog betroffenen Genen konnten 24 Gene (61,5%) der GO Annotation *"cellular process"* (GO:0009987) zugeordnet werden, was einer Überrepräsentation von 2,01-fach entsprach



Abbildung 3-61: Expression von FOXM1 und FOXM1B nach RNA Interferenz Zur Kontrolle des Kockdowns wurde die relative FOXM1 Expression aller biologischen Triplikate (ein Punkt entspricht dem Median zusätzlicher technischer Triplikate, die hier nicht einzeln gezeigt werden) mittels Real time PCR gemessen.

(*p*=1.04E-02). Von diesen konnten 10 Gene (25,6%) mit der Annotation "cell cycle" assoziiert werden (GO:0007049) mit einer Überrepräsentation von 5,08-fach (*p*=3.69E-03). Ein Zusammenhang mit einer verstärkten Inhibition der DNA-Reparatur, wie bei Bortezomib, konnte im Falle des *FOXM1 Knockdowns* jedoch nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Genexpression nach Kombination von 24h *FOXM1 Knockdown* gefolgt von 48h Inkubation mit 5µM Cisplatin (Anhang 14) gegen eine *non-target* siRNA Kontrolle gefolgt von Cisplatin

(Anhang 15) konnte im Kontext der Apoptoseinduktion ein leicht verstärkender Effekt bei der Kombinationsbehandlung nachgewiesen werden. Hier zeigte sich in der Kombination ein deutlich stärkerer Anstieg der Expression der Gene von FAS und TRAIL-R2, MYD88 und BAX, sowie eine niedrigere Expression von BCL-2 und dem inhibitorischen TNF Decoy Rezeptor [278] TRAIL-R4 als bei Cisplatin oder *Knockdown* von *FOXM1* alleine.

s F N	iRNA OXM1 N=39 I=121	9 Borte N=21	zomib 7
positiv regulierte	Signalwege	negativ regulierte	Signalwege
Gene		Gene	
CASP7	Арор	AKT1	MAPK, STAT, PI3K, RAS, Apop
CASP8	Арор	CCNA2	СС
DUSP5	МАРК	CCNB1	СС
FLNA	МАРК	CCNE1	РІЗК, СС
FOSL1	Wnt	CCNE2	PI3K, CC
GADD45B	MAPK, CC	CDK6	PI3K, CC
HSPA1A	МАРК	CDKN2C	TXmisReg, CC
HSPB1	МАРК	CXXC4	Wnt
IL6R	STAT, PI3K	DLL1	Notch
MET	TXmisReg, PI3K, RAS	DNMT3A	
SHC1	RAS	ETS2	RAS
SHC4	RAS	GNG4	PI3K, RAS
SPP1	РІЗК	H3F3A	TXmisReg
		HDAC2	Notch, ChromMod, TXmisReg, CC
		HIST1H3B	TXmisReg
	-	HIST1H3G	TXmisReg
	-	ID2	TXmisReg, TGFB
	-	POLR2D	DNARepair
	-	PTTG2	СС
	-	RAD21	00

Abbildung 3-62: Analog exprimierte Gene nach Behandlung mit Bortezomib versus Knockdown von FOXM1 BON Zellen wurden über 72h mit 40 nM siRNA gegen FOXM1 (EHU124431) versus Kontroll siRNA (MISSION® siRNA Universal Negative Control) behandelt. Der Vergleich erfolgte mit über 24h mit 25 nM Bortezomib behandelten BON Zellen. Von den individuell differentiell exprimierten Genen gegenüber den Kontrollen fanden sich 39 analog differentiell exprimierte Gene in beiden Behandlungsgruppen, die vor allem mit einer Regulation des Zellzyklus in Verbindung stehen.

RET

RPS27A

WHSC1

SHC3

SYK TBL1XR1 DNARepair

TXmisReg

RAS

PI3K

Wnt

Auffällig war zudem der starke Anstieg der Expression von STAT1, sowohl nach RNA Interferenz, als auch in der Kombination. STAT1 fungiert als Gegenspieler zu STAT3 und hat anti-proliferative und proapoptotische Funktionen [279].

Eine negative Regulation des Zellzyklus oder der DNA Reparatur konnte bei der Kombinationsbehandlung nicht gezeigt werden (Abbildung 3-63).



Abbildung 3-63: Veränderte Expression nach FOXM1 Knockdown, Cisplatin-Behandlung und Kombination in vitro

A) Die Heatmap der differentiell exprimierten Gene nach 24h siRNA gegen *FOXM1* (EHU124431) + 48h PBS, 24h Kontroll siRNA + 48h 5 μM Cisplatin oder Kombination beider Wirkstoffe zeigte deutliche Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrolle (24h Kontroll siRNA + 48h PBS). B+C) *Global Significance* Scores stellen die Stärke der differentiellen Expression von Genen eines Signalweges/Mechanismus dar. Hier zeigte sich, dass nur die Proben mit *FOXM1 Knockdown* eine negative Regulation von Zellzyklusassoziierten Genen aufweisen. Die Kombination zeigt eine leichte Verstärkung der Expression Apoptoseregulierender Gene (C).

Bortezomib zeigte eine deutlich potentere Wirkung auf GEP-NEN Zelllinien als der Naturstoff Siomycin A. In allen vier Zelllinien bewirkte Bortezomib im Nanomolarbereich eine mäßig bis starke Proliferationsinhibition in Form einer Induktion von Apoptose oder von G2/M Arrest.

Zudem konnte bei den p53 mutierten BON Zellen eine synthetische Letalität in Kombination mit Cisplatin in Form von synergistischen antiproliferativen Effekten und verstärkter extrinsischer Apoptoseinduktion nachgewiesen und auch in LCC-18 und QGP-1 Zellen bestätgt werden. Die Genexpressionsanalysen und Western Blot Daten legen den Schluss nahe, dass diese Effekte vor allem über die Inhibition von DNA Reparaturmechanismen ausgelöst wurden. Im Vergleich zum *Knockdown* von *FOXM1* zeigten sich Überschneidungen bei der differentiellen Genexpression im Bereich der Zellzyklusregulation. Jedoch konnte hier keine analoge Regulation von Genen der DNA-Reparatur festgestellt werden. Ob Bortezomib somit maßgeblich auch über FOXM1 Inhibition wirkt, muss durch tiefergehende gentechnische Studien (Wirkung von *Knockout* und Überexpression von FOXM1 auf die Bortezomib-Antwort) weiter untersucht werden. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass es im Zusammenhang mit den Bortezomib-induzierten DNA Schädigungen zu einem Zellzyklusarrest kommt, in dessen Zusammenhang nachgeordnet auch FOXM1 negativ reguliert wird.

3.3.1.4 Thiostrepton

Der Proteasominhibitor Thiostrepton zeigte in drei untersuchten Zelllinien deutlich schlechtere Wirksamkeit und einen sehr starken Anstieg der Zellzahl bei 1 μ M. Die Messwerte ließen den Schluss zu, dass die IC50 von Thiostrepton bei BON und KRJ-I zwischen 1 μ M und 2 μ M liegen sollte, während sie bei LCC-18 zeitabhängig für 48 h über 2 μ M und bei 72 h ebenfalls zwischen 1 μ M und 2 μ M liegt (Abbildung 3-64).

Die Substanz Thiostrepton wurde aufgrund dieser schlechteren Eigenschaften in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.



Abbildung 3-64: Vergleich der Potenz von Siomycin A, Thiostrepton, Everolimus und Bortezomib BON (A), KRJ-I (B) und LCC-18 (C) Zellen wurden mit 1 μ M und 2 μ M Siomycin A, 1 μ M und 2 μ M Thiostrepton und je 100 nM Everolimus und Bortezomib über 48 h und 72 h behandelt. Die Analyse erfolgte im WST-1 Assay. Für Thiostrepton zeigte sich bei 1 μ M und 2 μ M ein deutlich schlechterer Effekt als für Siomycin A und Bortezomib, die jeweils signifikante Effekte gegenüber der DMSO Kontrolle aufwiesen (zweifache ANOVA; *p<0,05). Bei 1 μ M zeigte sich ein deutlicher Anstieg über 100 % der DMSO Kontrolle. Balken zeigen den Median und den Interquartilsabstand.

3.3.2Re-Induktion der p53 Funktion durch MDM2-p53 Antagonisten

3.3.2.1 Nutline

3.3.2.1.1 Auswahl der Substanzen

Ein Großteil der gut differenzierten GEP-NEN exprimiert Wildtyp p53 (vgl. Abschnitt 1.1.5.3) und ist somit prinzipiell für eine p53 aktivierende Therapie geeignet. Zudem wurde in pankreatischen NEN eine aberrant hohe Expression von MDM2 gezeigt. In primärem Patientenmaterial konnte in Abschnitt 3.1.1 für gastrointestinale NEN gezeigt werden, dass eine erhöhte MDM2 Expression zumindest mit dem Auftreten von Metastasen und somit mit Progression assoziiert ist. Ein regulatorischer Zusammenhang von MDM2 und FOXM1 konnte zudem in den Zelllinien gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.2.3).

Da jedoch die starken antiproliferativen Effekte von Proteasominhibitoren möglicherweise auf weitere Effekte als die Inhibition der FOXM1 Expression zurückzuführen waren und diese im experimentellen Vergleich mit *FOXM1 Knockdown*-Effekten nicht eingegrenzt werden konnten, sollte ein zweiter, spezifischerer Ansatz zur Inhibition der MDM2-p53-FOXM1 Achse untersucht werden.

Dazu wurden die cis-Imidazolin-Analoga Nutlin-3 und Nutlin-3a als Inhibitoren der MDM2-p53 Interaktion ausgewählt. Diese binden die hydrophobe Tasche von MDM2 mit höherer Affinität als die Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26 in der Transaktivierungsdomäne von p53 [280] (Abbildung 3-65). Obwohl Nutline vermutlich nicht als Monotherapie zum Einsatz kommen werden, zeigen sie doch in vielen Krebsarten mit dysfunktionalem wt p53 synergistische inhibitorische Effekte in Kombination mit anderen molekular zielgerichteten Therapien und mit Chemotherapie [281-288]. Verschiedene weitere MDM2 Inhibitoren mit zum Teil besserer Bioverfügbarkeit und Pharmakodynamik befinden sich bereits in klinischen Studien [280], sind jedoch derzeit weitestgehend nur über Kooperationen mit den Herstellern erhältlich.

Nutlin-3 ist ein Racemat aus einem aktiven (-)-Nutlin-3 Enantiomer (Nutlin-3a) und einem etwa 150-fach weniger aktiven (+)-Nutlin-3 Enantiomer (Nutlin-3b) [289].

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden sowohl das racemische Gemisch Nutlin-3 als auch das (-)-Enantiomer Nutlin-3a verwendet.



Abbildung 3-65: Wirkungsweise von Nutlinen

Chemische Struktur von Nutlin-3a, das aktive (-)-Enantiomer von Nutlin-3 (A). Eine hydrophobe Tasche im MDM2 Molekül, die sonst mit der TAD von p53 interagiert und somit die Ubiquitinylierung von p53 durch MDM2 ermöglicht (B), wird durch Nutlin mit einer höheren Affinität gebunden (C). Orange: hydrophobe Tasche von MDM2, Rot: mit MDM2 interagierende Kette der Transaktivierungsdomäne von p53. Quellen: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; http://www.rcsb.org: PDB ID 1YCR: Kussie et *al.* 1996 [290], PDB ID 4HG7: Anil et *al.* 2013 [291].

3.3.2.1.2 Proliferationsstudien mit Nutlin-3 und Nutlin-3a

Die antiproliferative Wirkung von Nutlinen wurde zunächst im WST-1 Experiment analysiert. Dabei zeigte sich lediglich in den wt p53 Zelllinien KRJ-I eine inhibitorische Wirkung von Nutlin-3 (Abbildung 3-66). Die relative IC50 für Nutlin-3 über 72 Stunden lag dabei im unteren Mikromolarbereich (und somit im Rahmen bereits publizierter Studien mit Nutlin-3 für *in vitro* Zellkultur) mit einem hohen Konfidenzintervall von 6,0 - 12,6 µM.

Bei BON Zellen konnte zwar nach 72h ein signifikanter Effekt dargestellt werden (p= 0,0009), jedoch lagen Potenz und Effizienz von Nutlin-3 in BON Zellen in einem Bereich, der unter dem Gesichtspunkt einer möglichen therapeutischen Einsetzbarkeit als nicht relevant einzustufen ist.

Im Anschluss wurde die Wirkung des potenteren (-)-Enantiomers Nutlin-3a getestet. Auch hier zeigten sich nur bei der KRJ-I Zelllinie starke inhibitorische Effekte auf die zelluläre Proliferation mit einer relativen IC50 von etwa 1,3 μM (Abbildung 3-67).

Auch für dieses Experiment stellte sich die Reduktion von Schwankungen in den biologischen Replikaten von KRJ-I als sehr schwierig dar. Die Effekte, die die Zellclusterbildung von KRJ-I auf die Pharmakokinetik der ohnehin nur sehr kurzlebigen (und damit auch pharmakodynamisch schwankungsanfälligen) [292]) Nutline ausübte, ließ keine schärfere Bestimmung der Konfidenzintervalle zu. Das R² der Dosis-Wirkungs-Kurven lag für KRJ-I zwischen 0,7 bei Nutlin und 0,9 bei Siomycin A. Da es sich jedoch um die einzige p53 wt Zelllinie handelte, konnte diese nicht aus qualitativen Gründen ausgeschlossen werden.





GEP-NEN Zelllinien wurden mit steigender Konzentration an Nutlin-3 und zu Vergleichszwecken mit 2 μ M Siomycin A und 0,5 μ M Everolimus über 24 h und 72 h behandelt und mittels WST-1 Assay analysiert. A) BON Zellen zeigten zwar eine signifikante Reduktion der Proliferation nach 72 h Nutlin-3 (einfache ANOVA; *p*=0,0009), jedoch mit einem sehr schwachen maximalen Effekt. B+C) QGP-1 und LCC-18 Zellen zeigten keine Antwort auf Nutlin-3. D+E) KRJ-I Zellen reagierten mit signifikant eingeschränkter Proliferation auf Nutlin-3 (beide Zeitpunkte: einfache ANOVA; *p*<0,001). Jedoch war die relative IC50 nach 24 h mit 212 μ M als sehr hoch anzunehmen. Eine genauere Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurve nach 24 h konnte nicht erfolgen, da Konzentrationen >20 μ M Nutlin-3 aufgrund der ebenfalls steigenden Konzentration des toxischen Trägers DMSO über 0,4 % v/v nicht sinnvoll erschienen. Die relative IC50 für Nutlin-3 über 72 h betrug 8,7 μ M (Konfidenzintervall: 6,0 - 12,6 μ M). Legende: **p*<0.05 (ohne Klammer: gegenüber DMSO Kontrolle). Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. Modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].



Abbildung 3-67: Antiproliferativer Effekt von Nutlin-3a auf GEP-NEN Zelllinien

Im WST-1 Assay wurde der Effekt von Nutlin-3a nach 72 h Behandlung an BON und KRJ-I Zellen analysiert. A) Die zwar signifikante (Kruskal-Wallis ANOVA; p=0,0012), jedoch im Gesamteffekt schwache Wirkung von Nutlin-3a auf BON Zellen konnte mit einer theoretischen absoluten IC50 von über 1000 µM vernachlässigt werden. B) Bei KRJ-I zeigte sich ein deutlicher antiproliferativer Effekt (Kruskal-Wallis ANOVA; p=0,0002) mit einer IC50 von 1,3 µM (Konfidenzintervall: 0,95 - 1,76 µM). Legende: *p<0.05 (gegenüber DMSO Kontrolle). Balken kennzeichnen Median und Interquartilenabstand. Teilweise und modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Der anschließende direkte Vergleich der Potenz von Nutlin-3 mit Nutlin-3a (Abbildung 3-68) bestätigte die bessere Wirksamkeit von Nutlin-3a in KRJ-I Zellen gegenüber dem Racemat Nutlin-3 (zweifache ANOVA; Substanz und Konzentration: *p*<0,0001).



Abbildung 3-68: Vergleich der Potenz von Nutlin-3 und Nutlin-3a in KRJ-I Zellen

Der Vergleich der IC50 zeigte eine etwa 6-fach höhere Potenz für Nutlin-3a gegenüber dem Racemat Nutlin-3 in der wt p53 GEP-NEN Zelllinie KRJ-I. Legende: **p*<0.05 (gegenüber DMSO Kontrolle). Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. Modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

3.3.2.1.3 Wirkung von Nutlinen auf den Zellzyklus

In der vergleichenden Analyse des Zellzyklus von Nutlin-3a behandelten Zellen gegen DMSO Kontrollen konnten die Daten der Proliferationsstudien bestätigt werden (Abbildung 3-69). Bei den Zelllinien BON, LCC-18 und QGP-1 wurde kein Einfluss von Nutlin-3a auf den Zellzyklus nachgewiesen. In KRJ-I Zellen zeigten sich ein signifikanter Rückgang der Mitosen und eine erhöhte Sub-G1 Population nach Nutlin-3a Inkubation. Analoge Ergebnisse konnten auch nach Inkubation aller Zellinien mit 5µM Nutlin-3 über 96h gezeigt werden (Anhang 16).



Abbildung 3-69: Nutlin-3a induzierte Veränderungen des Zellzyklus bei GEP-NEN Zelllinien

GEP-NEN Zelllinien wurden über 72 h mit 5 μ M Nutlin-3a inkubiert und mittels Mitoseindex-Durchflusszytometrie analysiert. Bei BON (A), LCC-18 (B) und QGP-1 (C) Zellen konnten keine Veränderungen in den Zellzyklusphasen dargestellt werden. D) In KRJ-I Zellen zeigten sich eine signifikante Zunahme der Sub-G1 Zellpopulation (Mann-Whitney Test, *p*=0,0022) sowie eine Abnahme der G0/G1 (Mann-Whitney Test, *p*=0,0022) und S Phase (Mann-Whitney Test, *p*=0,0087) und der Mitosen (Mann-Whitney Test, *p*=0,0022). Legende: **p*<0.05 (gegenüber DMSO Kontrolle). Um eine weitere Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose vornehmen zu können, wurden zusätzlich Messungen der LDH Konzentration im Zellkulturüberstand vorgenommen. Die Zytotoxizität lag für zwei getestete Konzentrationen von Nutlin-3 auch nach 24 Stunden im Bereich der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 3-70). Ein unspezifischer zytotoxischer Effekt, beispielsweise das Auftreten von Nekrose, kann somit ausgeschlossen werden. Nutlin-3 hemmt daher in der wt p53 GEP-NEN Zelllinie den Zellzyklus und induziert Apoptose, und zwar unabhängig von weiteren Triggern wie Induktion von Zellschäden oder exogene Aktivierung von Onkogenen.



Abbildung 3-70: Zytotoxische Effekte von Nutlin-3 auf KRJ-I Zellen

Nach 4 h (A) und 24 h (B) Inkubation fanden sich weder bei 1 μ M noch bei 5 μ M Nutlin-3 höhere LDH Konzentrationen im Medium als in der DMSO Kontrolle.

In einem weiteren Experiment wurde die Depolarisation der Mitochondrien-Membranen als Indikator für eine frühe Apoptoseinduktion nach Nutlin-3a Monotherapie und Kombination mit Cisplatin mittels JC-1 quantifiziert. Dazu wurden KRJ-I und QGP-1 Zellen über 16 h und 20 h mit 5 μM Nutlin-3a, DMSO, Cisplatin oder einer Kombination aus Nutlin-3a und 10 μM Cisplatin inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.



Abbildung 3-71: Induktion von Apoptose durch Nutlin-3a, Cisplatin oder Kombination in QGP-1 und KRJ-I GEP-NEN Zelllinien

Die Induktion von Apoptose wurde mittels JC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. A) Bei QGP-1 konnte erhöhte keine Induktion von Apoptose im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. B) In KRJ-I Zellen wurden nach 16 h und 20 h Inkubation ein Anstieg der Apoptose nachgewiesen. Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. Modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Hier zeigte sich nach beiden Untersuchungszeiträumen nur in KRJ-I Zellen eine Apoptoseinduktion (Abbildung 3-71 und Anhang 17). Bei einer Inkubation über 20 Stunden konnte zudem eine verstärkte Induktion von Apoptose bei der Kombination von Nutlin-3a mit Cisplatin gegenüber den jeweiligen Monotherapien nachgewiesen werden.

3.3.2.1.4 Genexpressionsanalyse nach Nutlin-3a Behandlung

Im Gegensatz zum im vorherigen Kapitel beschriebenen verhältnismäßig unspezifischen Ansatz, FOXM1 über Proteasominhibition zu hemmen, sollte mit Nutlin der Versuch unternommen werden, direkt an der MDM2-p53-FOXM1 Achse anzugreifen. Damit sollte der therapeutische Effekt sowohl durch die Induktion von p53 selbst als auch mutmaßlich durch eine p53-abhängige Hemmung von FOXM1 induziert werden.



Abbildung 3-72: Expression von FOXM1 nach Nutlin Behandlung in vitro

KRJ-I und QGP-1 Zellen wurden über 95 h mit 5 μM Nutlin-3a versus Kontrollen behandelt. A) Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass Nutlin in KRJ-I Zellen die FOXM1 Expression reduziert. B) Mittels Isoformspezifischer *Real time* PCR behandelter KRJ-I Zellen konnten die Ergebnisse bestätigt werden.

Bei ersten Voruntersuchungen konnte im Western Blot gezeigt werden, dass Nutlin in KRJ-I Zellen die FOXM1 Expression auf mRNA und Proteinebene reduziert (Abbildung 3-72) und eine verstärkte Induktion von p21 in LCC-18 und KRJ-I Zellen induziert (Abbildung 3-73). BON und QGP-1 zeigten nahezu keine p21 Induktion. Die Expression von p21 unterschied sich in KRJ-I Zellen zudem bei Nutlin-3 Behandlung mit und ohne zusätzliche Induktion von genotoxischem Stress mittels Cisplatin. Die Expression von p53 hingegen konnte in BON und KRJ-I Zellen durch Nutlin-3, Cisplatin und in der Kombination beider Substanzen stimuliert werden, während QGP-1 Zellen keine p53 Expression und LCC-18 eine unverändert hohe Expression, unabhängig von der Behandlung zeigten (Abbildung 3-73).



Abbildung 3-73: Veränderte Expression von p53, MDM2 und p21 nach Nutlin-3 Behandlung von GEP-NEN Zelllinien

A) Western Blot Analyse der p53 und p21 Induktion in allen vier GEP-NEN Zelllinien nach Inkubation mit 5 μ M Nutlin-3, 10 μ M Cisplatin oder Kombination über 72 h. B) Die stärkste p21 Induktion bei KRJ-I erfolgte nach Nutlin Monotherapie. Dies lässt auf mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion bezüglich Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose nach Nutlin-3 Behandlung mit und ohne genotoxische Stressinduktion schließen. Auch die Induktion von MDM2 nach Nutlin Monotherapie, aber nicht nach Kombination mit Cisplatin, deutet eine Verschiebung der zellulären Stressantwort zu einer schwächeren Pro-Überlebens-Signaltransduktion hin nach Kombinationstherapie an.

Um einen genaueren Überblick über den Einfluss von Nutlinen auf die Genexpression in wt p53 GEP-NEN Zellen *in vitro* zu bekommen, wurde mit dem Multiplex-Genexpressionsanalyse-System nCounter[®] von Nanostring[®] Technologies [207] gearbeitet und anschließend die Expression ausgewählter Proteine im Western Blot verifiziert.

Die Analysen wurden analog den Untersuchungen an Bortezomib mit dem PanCancer Panel durchgeführt. Die Wildtyp KRJ-I Zelllinie wurde über 60 h mit 5 μM Nutlin-3a behandelt. Als Kontrollen wurden Zellen nativ belassen bzw. mit DMSO oder mit 100 nM Everolimus inkubiert. Die isolierte RNA



Abbildung 3-74: Zur Normalisierung verwendete Haushaltsgene

Mittels geNorm Algorithmus [220] der nSolver® Software wurden folgende Transkripte zur Normalisierung des nCounter® Arrays verwendet: HDAC3, SAP130, DDX50, PIAS1, FCF1, PRPF38A, TLK2, USP39, EIF2B4, ACAD9, CNOT10, EDC3, NOL7, C10orf76, DNAJC-14, CNOT4, TTC31, ZC3H14, PIK3R4, AGK, ZNF384, FTSJ2, ZNF143, MRPS5, MTMR14, SLC4A1AP, SF3A3, AMMECR1L, ERCC3. Die Abbildung zeigt die Varianz der verwendeten Housekeeper (braun) und der untersuchten Gene. Die Transkripte mit der höchsten Varianz sind benannt. wurde im nCounter[®] System analysiert (Ergebnisse weitestgehend übernommen aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232]). Die Varianz der verwendeten Haushaltsgene findet sich in Abbildung 3-74.



Abbildung 3-75: Darstellung der zehn am stärksten exprimierten Transkripte in Kontroll-KRJ-I Zellen

MDM2 befindet sich unter den zehn Transkripten mit der höchsten Anzahl an Counts des PanCancer Panels. Dies gibt zumindest einen Hinweis darauf, dass die *MDM2* Expression trotz normaler Genkopienzahl eine einflussreiche Variable in der Regulation von p53 in KRJ-I Zellen darstellen könnte. Modifiziert aus Briest et *al.*, in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Zunächst konnte festgestellt werden, dass sich *MDM2* in unbehandelten und in DMSO Kontrollen unter den zehn am stärksten exprimierten Transkripten des Panels befand (Abbildung 3-75). Zu den Weiteren zählten *B2M* (β -2-Mikroglobulin), Transkripte des Histones H3, *NFKBIA* (das IKB/MAD3 kodiert), *STAT1* und Gene, die in die Ubiquitin-Homöostase involviert sind. Dieser Vergleich allein reichte nicht zur tatsächlichen Quantifizierung der MDM2 Expression, deutete aber zumindest darauf hin, dass trotz normaler Anzahl an Genkopien in KRJ-I Zellen eine aberrante Regulation zu einer erhöhten Expression führt.



RAD=Everolimus.

Im Vergleich von Nutlin-3a mit Everolimus zeigte sich, dass Everolimus (das zur Behandlung pankreatischer NEN bereits seit 2011 zugelassen ist und dessen FDA Zulassung für *Midgut-* und Lungen-NEN mit den Ergebnissen der RADIANT-4 Studie im März 2016 erfolgte) keine bedeutenden Änderungen in der zellulären Signaltransduktion induzierte. Die Anzahl der Gene mit *p*<0,05 lag bei N=75; die Anzahl der Gene, die zusätzlich eine FDR<0,05 erreichten, war N=0 (Anhang 18). Es ist anzunehmen, dass dieses Ergebnis jedoch vor allem damit zusammenhängt, dass das PanCancer Panel krebsassoziierte Gene umfasst, und mTOR vor allem zunächst Gene des Metabolismus reguliert und somit onkogene Signaltransduktion nur indirekt induziert.

Nutlin-3a induzierte eine signifikante differentielle Expression bei 212 der 720 möglichen Gene (Abbildung 3-76, Abbildung 3-77 und Anhang 19). Von diesen wiesen 17 eine FDR von <0,05 auf. Diese geringe Zahl ist zunächst auf die kleine Anzahl biologischer Replikate zurückzuführen. Vor allem waren Gene verändert, die Prozessen der Zellzykluskontrolle, transkriptioneller Regulation, DNA Reparatur und der Modifikation von Chromatin (die häufig auch im Zusammenhang mit DNA Repataur steht) zugeordnet waren. Die Wirkung von Nutlin-3a zeigte sich größtenteils in einer negative Regulation dieser Mechanismen (Abbildung 3-78).



Abbildung 3-77: *Volcano*-Blot der differentiell exprimierten Gene nach Nutlin-3a Inkubation

Auf der oberen vertikalen Achse oben befinden die die hoch signifikant veränderten Gene, der Fold-change findet sich auf der horizonalen Achse. Nach Nutlin-3a konnte Reihe eine stark veränderter Transkripte nachgewiesen werden. beispielsweise für Histon H3 (bis zu -42-fach), Cyclin A2 (-12,6-fach), MCM Proteine (bis zu -8,9-fach), (-2,6-fach), p21 MSH2 (+3,3-fach) und MDM2 (+6,6-fach). Modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].



Abbildung 3-78: Veränderte Signalwege in KRJ-I Zellen nach Nutlin-3a Behandlung

Global Significance Scores stellen die Stärke der differentiellen Expression von Genen eines Signalweges/Mechanismus dar A) ohne Beachtung der Vorzeichen oder B) mit Kennzeichnung der Richtung der differentiellen Expression. Nach Nutlin-3a Behandlung sind am stärksten Gene betroffen, die den Zellzyklus, die Transkriptionsregulation, Chromatin-Modifikationen und DNA Reparatur steuern sowie Gene des Notch Signalweges (A). Dabei sind Zellzyklus, Chromatin-Modifikation und DNA Reparatur deutlich negativ beeinflusst, während Notch einen positiven Score zeigt (B). Legende A): Rot: wenige differentiell exprimierte Gene, gelb: stark veränderte Genexpression. Legende B) Rot: positive Regulation, blau: negative Regulation. Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen HH=Hedgehog; Fett gedruckte Gene markieren eine differenzielle Expression mit einer FDR<0.05. Modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Abbildung 3-79 zeigt eine Auflistung der am stärksten verändert exprimierten p53 Zielproteine. Als wichtigste Indikatoren für die Induktion einer primären p53 Antwort konnte gezeigt werden, dass typische Zielgene wie *CDKN1A* (p21) und *MDM2* stark und hoch signifikant positiv reguliert waren.

Weitere Zielgene umfassen u.a. Gene des *Minichromosome-maintenance* Komplex (MCM), die als eukaryotische Replikations-Helikasen dienen und durch FOXM1 reguliert werden [177]. Zudem war eine große Anzahl an weiteren Replikations- oder Zellzyklus-assoziierten Genen negativ reguliert, wie beispielsweise Gene der Flap Endonuclease 1 (FEN1), DNA Polymerase ε , Cyclin A2, Cyclin B1, SKP2, CDK2, TTK, CDC6, CDC7, CDC25A und B oder RFC4 (Abbildung 3-80). Der Großteil dieser Gene wird ebenfalls durch FOXM1 aktiviert [177]. FEN1, RFC4, DNA Polymerase ε und SKP2 sind zudem in die DNA-Reparatur involviert [132, 238, 293, 294].

Außerdem waren nach Nutlin-3a Gene des Histon H3.1 (*HIST1H3B, HIST1H3G* und *HIST1H3H*) negativ reguliert. Dies ist insofern interessant, als dass dieses Histon replikationsabhängig und seine Expression somit auf die S-Phase beschränkt ist. Das bestätigten die Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchungen, in denen ebenfalls eine Abnahme der S-Phase Population in der Durchflusszytometrie zu erkennen war



Abbildung 3-79: Differentiell exprimierte p53 Zielgene nach Nutlin-3a Behandlung

Dargestellt sind experimentell oder *in silico* validierte p53 Zielgene mit einer differentiellen Expression von <-1,5/>1,5-fach und *p*<0,005. Gene mit einer FDR<0,05 sind dunkelblau markiert; Fehlerbalken markieren die 95 % Konfidenzintervalle. Referenz: p53FAMTag Datenbank [200]. Modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].



Abbildung 3-80: Heatmap Darstellung der nach Nutlin-3 Behandlung verändert exprimierten Zellzyklusassoziierten Gene

Bei den Nutlin-3a behandelten Proben ist deutlich eine Veränderung an der Expression zu erkennen. Die meisten Zellzyklus-assoziierten Gene sind nach Nutlin-3a negativ schwächer exprimiert als in den Kontrollen. Rot: niedrige Expression, gelb: hohe Expression. RAD=Everolimus.

(vgl. Abschnitt 3.3.1.2.3). Die grafische Darstellung der Signalwege der Zellzyklusregulation zeigt deutlich eine überwiegend negative Regulation der Zellzyklusprogression (Abbildung 3-81).

Zudem war eine große Anzahl weiterer Genen, die in die DNA Reparatur oder die zellulare Antwort auf DNA Schäden involviert sind, schwächer exprimiert. *CHEK1, BRCA1* und *2, BRIP1, RAD5, SKP2,* MSH und FANC Proteine, *SUV39H2, RFC* oder *PRKDC* sind zudem ebenfalls FOXM1 Zielgene [132, 174, 177, 295, 296]. Hierbei war auffällig, dass vor allem Mediatoren des Fanconi Anämie (FA) Signalweges, der die Reparaturwege NER und HR sowie den DNA Schaden Bypass-Mechanismus *Translesion Synthesis* (TLS) koordiniert [297], betroffen waren.

Gene, die die p53-abhängige Apoptose steuern, wie *BAX, BAD* und *BID*, waren leicht positiv reguliert, allerdings zeigten sich einige Mediatoren des intrinsischen Apoptose-Weges (*BNIP3, E2F1, BCL-X*_l) auch in antiapoptotischer Weise beeinflusst.

Gleichzeitig fanden sich einige Mediatoren der TNF/NF-κB-Signaltransduktion und des extrinsischen Apoptose-Weges verändert exprimiert. Beispielsweise waren die Gene für die TNF-Rezeptoren TRAILR1 und 2 (*TNFRSF10A/B*), aber auch die des Decoy-Rezeptors DCR1 (*TNFRSF10C*) sowie von FAS

positiv reguliert. Außerdem wurden mit *DTX4, NFKBIA, NFKBIZ* und *TNFAIP3* einige Regulatoren der NF-κB Signaltransduktion positiv reguliert.

Als interessantes Ergebnis im Kontext neuroendokriner Neoplasien zeigte sich in den Expressionsstudien eine veränderte Expression bei zwei kürzlich beschriebenen neuen Tumormarkern: Stathmin und AXIN2 (Anhang 19). Stathmin wurde u.a. als Proliferationsmarker in pankreatischen GEP-NEN beschreiben, reguliert die Stabilität von Mikrotubuli und wird selbst durch FOXM1 reguliert [150, 177]. Die Expression von Stathmin wird durch Nutlin-3a Behandlung stark negativ reguliert. Der Wnt Antagonist und FOXM1 Zielprotein AXIN2 [177], das in GEP-NENs als transkriptionell stillgelegt beschrieben wurde, [298] wurde hingegen nach Nutlin-3a Inkubation verstärkt exprimiert. Diese Ergebnisse müssten jedoch bei Weiterverfolgung noch alternativmethodisch abgesichert werden.



Abbildung 3-81: Visualisierung der veränderten Zellzyklus-Signalwege nach Nutlin-3a Behandlung *in vitro* KEGG-basierte Visualisierung der differentiell exprimierten Zellzyklus-Gene mittels Pathview [223]. Grün: negative Regulation, rot: positive Regulation, grau: unverändert, weiß: nicht im PanCancer Panel enthalten.



Abbildung 3-82: Western Blot Analyse ausgewählter Proteine nach Nutlin-3a Inkubation von p53 Wildtyp und mutierten GEP-NEN Zelllinien

A) Die Expression verschiedener Proteine zeigte nach 72h 5 μ M Nutlin-3a Behandlung nur in den p53 wt KRJ-I Zellen deutliche Unterschiede. Die STAT3 Expression wurde von Nutlin-3a nicht beeinflusst.

konnte Es eine verstärkte Induktion von Apoptose-Proteinen in KRJ-I Zellen nach Nutlin-3a gezeigt werden werden: BAX und BID- Spaltfragmente zeigten im Western Blot ein deutlicheres Signal als bei den Kontrollen. Zudem konnte eine verstärkte Serin-139 Phosphorylierung von Histon H2AX als Indikator verstärkter DNA Schädigung nachgewiesen werden. B) Nach Nutlin Behandlung zeigte sich zudem eine Reduktion der FOXM1 Expression sowie verschiedener DNA-Reparatur-Proteine wie SKP2, RAD51 oder FEN1. Darüber hinaus zeigte sich eine sehr schwache Spaltung von Pro-Caspase 8 als Zeichen der Induktion von Apoptose. C) Es konnte auch eine Reduktion der Serin-35 Phosphorylierung von FOXM1 im Zusammenhang mit der Gesamtproteinexpression dargestellt werden. Modifiziert aus Briest et al. (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

In der Western Blot Analyse der Proteinexpression nach Nutlin-3a Behandlung konnte bestätigt werden, dass sich die Effekte nur in der Wildtyp p53 KRJ-I, jedoch nicht in den p53 mutierten QGP-1 Zellen zeigen (Abbildung 3-82). Es konnte der Anstieg von MDM2 und p21 sowie von BAX bestätigt werden. Zudem konnten leichte Spaltungsfragmente von BID und Caspase 8 im Western Blot nachgewiesen werden, die auf eine Aktivität von Caspase 8 und somit auf eine schwache Apoptoseaktivität schließen lassen. Die Abnahme der Expression des replikationsabhängigen Histon H3 konnte ebenfalls gezeigt werden. Interessanterweise nahm auch die Serin-139 Phosphorylierung von Histon H2AX als Indikator für DNA Doppelstrangbrüche (und somit fortgeschrittene DNA Schäden)

nach Nutlin-3a Behandlung zu, was eine Folge der verminderten Expression von DNA Reparaturgenen und somit einer Akkumulation von geschädigter DNA und H2AX Foci sein könnte.

Als weitere Folgen der Nutlin Behandlung konnte in KRJ-I Zellen eine Reduktion der Rb Phosphorylierung (und somit der Inaktivierung) sowie die Reduktion der Expression des p53 und FOXM1 Zielproteins Aurora A gezeigt werden. Eine Aktivierung des PI3K-Weges wurde nicht detektiert (Abbildung 3-83).



3.3.2.1.5 Kombination von Nutlin-3a mit Cisplatin und Bortezomib

Eine klinische Anwendung von Nutlin-3a erfolgt bisher nicht. Es ist jedoch zu erwarten, dass andere MDM2 Inhibitoren, von denen sich derzeit zahlreiche in frühen klinischen Studien befinden [299], zumindest in Kombinationstherapie für eine klinische Anwendung weiterentwickelt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass Nutlin-3a DNA Reparaturgene hemmt, aber selbst nicht deutlich Apoptose induziert, wurde die Substanz in GEP-NEN Zelllinien ebenfalls in Kombinationstherapie mit Cisplatin und mit Bortezomib getestet.

Cisplatin wurde als Induktor von DNA Schäden ausgewählt, um die Beeinträchtigung von DNA Reparaturmechanismen nach Nutlin-3a Behandlung therapeutisch auszunutzen. Da in GEP-NEN Zellen bisher keine starke Onkogenaktivierung bekannt ist, sollte Cisplatin als exogener Trigger Stress induzieren, der in den Zellen eine verstärkte p53 Antwort (beispielsweise durch eine Verschiebung der Antwort von Zellzyklusarrest zu Apoptoseinduktion) auslöst. Synergistische Effekte von Chemotherapie und MDM2-Inhibition sind in anderen Krebsarten bereits verhältnismäßig lange bekannt [300-302].



Abbildung 3-84: Antiproliferative Effekte von Nutlin-3a in Kombination mit Cisplatin

A) KRJ-I Zellen wurden über 72 h mit steigenden Konzentrationen einer 1:5 Kombination aus Nutlin-3a und Cisplatin inkubiert und mittels WST-Assay analysiert. Ausgangskonzentrationen der seriellen 1:2 Verdünnung war 20 μ M Nutlin-3a und 100 μ M Cisplatin. B) Für die Kombinationen zeigte sich eine deutliche Reduktion des Wachstums gegenüber Nutlin-3 Monotherapie (zweifache ANOVA, *p*<0,0001). Die Bewertung der Kombinationseffekte erfolgte nach der Methode von Chou und Talaly mittels *CompuSyn* 1.0 Software [210, 211]. Hierbei zeigten sich für die Mehrheit der Konzentrationen synergistische Effekte. C) Proliferationsanalyse von KRJ-I Zellen unter 1:2 serieller Verdünnung von Cisplatin (Ausgangkonzentration 200 μ M) mit konstant 5 μ M Nutlin: hier konnten ebenfalls weitestgehend synergistische Effekte gezeigt werden. Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. Legende: Cl=Kombinationsindex; ++++ sehr starker Synergismus, +++ starker Synergismus, ++ Synergismus, ++ mäßiger Synergismus, + schwacher Synergismus, +/- additiv, - schwacher Antagonismus, ---- starker Antagonismus, ---- sehr starker Antagonismus. Modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Für die Kombination aus Cisplatin und Nutlin-3a ergaben sich überwiegend additive bis synergistische Effekte (Abbildung 3-84). So konnte beispielsweise die relative IC50 von Cisplatin in KRJ-I Zellen durch Zugabe von Nutlin-3a im Verhältnis 5:1 auf etwa ein Drittel gesenkt werden. Im umgekehrten Falle zeigte die IC50 für 72 h Nutlin-3a eine Reduktion um etwa das Achtfache (Abbildung 3-85).

Auch für die Kombination mit Bortezomib ergaben sich verstärkende antiproliferative Effekte (Abbildung 3-86). Die IC50 für 72 h Nutlin-3a Behandlung von KRJ-I Zellen konnte durch Zugabe von



Abbildung 3-85: Dosis-Wirkungs-Kurven zu Nutlin-3a in Kombination mit Cisplatin und Bortezomib

A) Die Zugabe von Nutlin-3a im Verhältnis 5:1 senkte die relative IC50 von 72 h Cisplatin in KRJ-I Zellen von 3,06 μ M Cisplatin (95 % Konfidenzintervall: 2,44 μ M bis 3,82 μ M) auf 0,95 μ M (95 % Konfidenzintervall: 0,57 μ M bis 1,60 μ M). B) Im umgekehrten Falle zeigte die IC50 für 72 h Nutlin-3a eine Reduktion von 1,29 μ M (95 % Konfidenzintervall: 0,95 μ M bis 1,76 μ M) auf 0,1689 μ M (95 % Konfidenzintervall: 0,10 μ M bis 0,29 μ M). C) Für Bortezomib, dessen relative IC50 bei 72 h Monotherapie (hier unter Zugabe DMSO) bei 2,85 nM (95 % Konfidenzintervall: 2,31 nM bis 3,51 nM) lag, ergab sich eine Absenkung durch Zugabe von Nutlin-3a 1:200 eine niedrigere relative IC50 von 1,39 nM (95 % Konfidenzintervall: 1,08 μ M bis 1,80 nM). D) Die IC50 für 72 h Nutlin-3a Behandlung von KRJ-I Zellen lag in diesem Versuch in Monotherapie bei 1,15 μ M Nutlin-3a (95 % Konfidenzintervall: 0,27 μ M bis 0,47 μ M) abgesenkt werden. Bestimmt wurde die relative IC50, die Daten wurden dazu zusätzlich intern auf ihre Extrema normalisiert.



Abbildung 3-86: Antiproliferative Effekte von Nutlin-3a in Kombination mit Bortezomib

A) KRJ-I Zellen wurden analog Abbildung 3-84 analysiert. Die Ausgangskonzentrationen der seriellen Verdünnung betrugen 20 μ M für Nutlin-3a und 100 nM für Bortezomib. B) Hier konnte der stimulierende Effekt des Proteasominhibitors bei Konzentrationen unterhalb der IC50 von Bortezomib durch Nutlin-3a gehemmt werden (zweifache ANOVA, *p*<0,0001). Die Analyse nach Chou und Talaly ergab weitestgehend synergistische Effekte, allerdings erst im Bereich niedriger Konzentrationen und somit rechnerisch auf den starken Anstieg im Sub-IC50 Bereich von Bortezomib in Monotherapie zurückzuführen. C) Deshalb wurde für eine weitere Messung Bortezomib konstant bei 10 nM gehalten und nur die Konzentrationen bestätigt werden. Balken kennzeichnen Mittelwert und Standardabweichung. Modifiziert aus Briest et *al.* (in Revision bei Endocrine Related Cancer 2016) [232].

Bortezomib 200:1 auf ein Drittel gesenkt werden. Umgekehrt ergab sich für Bortezomib eine Absenkung der IC50 durch Zugabe von Nutlin-3a 1:200 um etwa die Hälfte (Abbildung 3-85). Insgesamt waren die Schwankungen in den KRJ-I Zellen bei den Kombinationen besonders hoch, so dass die IC50 Werte der Kombinationen nur als Schätzwerte zu interpretieren sind.

3.3.2.1.6 Zusammenfassung

Nutline wirkten – erwartungsgemäß – nur bei der *TP53* Wildtyp GEP-NEN Zelllinie KRJ-I. Trotz einiger technischer Schwierigkeiten, die sich durch das sphäriode Wachstum dieser Zelllinie ergaben, konnte gezeigt werden, dass Nutline im Bereich unter 10 µM durch Induktion einer p53-Stressantwort wirkten. Diese umfasste vor allem die Inhibition der Zellzyklusprogression. Ebenfalls wurden einige Regulatoren der DNA Reparatur negativ reguliert. Apoptose wurde eher schwach induziert. Nutlin bewirkte zudem eine Reduktion der FOXM1 Expression. Die antiproliferativen Effekte von Nutlinen ließen sich durch Kombination mit Cisplatin und Bortezomib verstärken.

3.4 Vergleich der therapeutischen Strategien

Im Vergleich der therapeutischen Strategien, Proteasominhibition als indirekten, aber klinisch etablierteren therapeutischen Ansatz, und Nutlin als p53 Stabilisator, zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Potenz der einzelnen Substanzen. Hier wirkte Bortezomib deutlich niedriger konzentriert als Siomycin A und Nutline. Die Fragen zur Bioverfügbarkeit müssen jedoch *in vivo* genauer untersucht werden, da eine Übertragbarkeit aus Zellkulturexperimenten fraglich ist.

Alle drei gestesteten Substanzen wirkten antiproliferativ, wobei die Proteasominhibitoren deutlich stärker Apoptose induzierten. Während Proteasominhibition im Ergebnis unabhängig vom Mutationsstatus von p53 wirkte (wobei die Wildtyp Zellen durchaus auf alle Substanzen am empfindlichsten reagierten, aber aus nur einer Zelllinie keine generelle Aussage abgeleitet werden kann), zeigten Nutline erwartungsgemäß nur einen Effekt bei den Wildtyp Zellen. Interessanterweise trat bei allen drei Substanzen der Effekt auf, dass DNA Reparaturgene negativ reguliert wurden. Entsprechend konnten für alle drei Substanzen synergistische Effekte mit Cisplatin nachgewiesen werden.

Andererseits zeigte sich in den p53 Wildtyp KRJ-I Zellen, die FOXM1 nicht kernlokalisiert (und somit mutmaßlich inaktiv) enthielten, kein synergistischer Effekt bei Kombination mit DNA schädigenden Substanzen. Weder der *Knockdown* von *MDM2* oder *FOXM1* noch Siomycin oder Bortezomib konnten in ihrer Wirkung durch Zugabe von Cisplatin verstärkt werden. Nur bei Nutlin-3a in Kombination mit Cisplatin zeigten sich synergistisch verstärkende Effekte.

Allerdings ist es gelungen, darzustellen, dass der Effekt von Proteasominhibitoren auch über die MDM2-p53-FOXM1 Achse vermittelt wird. Beim Vergleich von Bortezomib-induzierter Genexpression mit der Genexpression nach RNAi gegen *FOXM1* konnten in erster Linie Übereinstimmungen im Bereich der Zellzyklusregulation gefunden werden. Am Beispiel von Siomycin A zeigte sich lediglich, dass ein deutlicher Anteil der differentiell exprimierten Gene bereits bekannte FOXM1 Zielgene waren. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, welche Gene bei beiden Proteasominhibitoren und bei Nutlin gleichermaßen differentiell exprimiert worden sind. Für diese Gene kann angenommen werden, dass die beobachtete Wirkung

a) Gene betrifft, die abhängig von p53 reguliert werden können (entsprechend der Überlappung mit Nutlin-induzierten Effekten),

- b) in Bezug auf die Proteasominhibition weniger Off target und Zelllinien-abhängige Effekte birgt als die Wirkstoffe einzeln betrachtet (entsprechend der Verwendung unterschiedlicher Stoffklassen und Zelllinien),
- c) Gene betrifft, die wiederum auch unabhängig von p53 beeinflusst werden können und somit in der Signalkette zwar p53 nachgeordnet aber auch alternativ regulierbar sind (entsprechend der Tatsache, dass die Regulation dieser Gene auch in p53 defizienten QGP-1 Zellen auftrat).

Interessanterweise waren 18/33 (54,5 %) der identifizierten Gene mit DNA Reparatur assoziiert und zu 94,4 % auch FOXM1 Zielgene (Tabelle 3-4). Zudem konnten 31/33 Genen mit DNA Replikation (GO:0006260), Chromosomensegregation(GO:0007059), Chromatin Organisation (GO:0006325) und Mitose (GO:0007067) assoziiert werden. Am stärksten überrepräsentiert waren dabei die Annotationen DNA Replikation (41.70-fach, *p*=6,48E-12) und Chromosomensegregation (29.51-fach, *p*=2,31E-03) und somit S-Phase und Mitose-assoziierte Gene. Offen bleibt jedoch die Fragestellung, welches funktionelle Gewicht die beobachteten Effekte in Bezug auf die Relevanz der MDM2-p53-FOXM1 Achse für die Wirksamkeit der Proteasominhibitoren ingesamt haben.

Gene Symbol	Target von	Siomycin A		Bort	Bortezomib		Nutlin-3a	
		Fold-	p-Wert	Fold-	p-Wert	Fold-	p-Wert	
		Change		Change		Change		
BRCA2	p53, FOXM1	-2,40	1,23E-02	-1,42	1,84E-03	-1,93	4,46E-03	
BRIP1	p53, FOXM1	-2,72	1,27E-02	-1,57	4,47E-04	-3,17	3,36E-04	
CCNA2	p53, FOXM1	-2,75	8,07E-03	-2,30	1,67E-06	-12,65	1,05E-03	
CCNB1	p53, FOXM1	-2,47	5,30E-03	-1,37	7,95E-04	-5,09	1,20E-03	
CDC25A	p53, FOXM1	-2,21	2,90E-03	-1,86	1,28E-04	-2,71	2,05E-02	
CDC6	p53, FOXM1	-2,68	4,76E-03	-1,50	3,74E-04	-9,00	7,75E-04	
CDC7	FOXM1	-2,24	3,35E-02	-2,46	8,70E-07	-2,79	1,47E-02	
DNMT1	p53, FOXM1	-1,67	1,54E-02	-1,35	7,94E-04	-2,45	2,05E-03	
DUSP5	p53, FOXM1	2,40	1,60E-02	1,52	6,77E-04	1,47	2,87E-04	
FEN1	FOXM1	-2,54	8,50E-03	-2,07	4,78E-05	-4,45	5,05E-04	
H2AFX	p53, FOXM1	-1,44	3,04E-04	-1,83	4,25E-04	-2,61	8,93E-03	
HDAC2	p53, FOXM1	-1,38	3,76E-03	-1,43	1,16E-03	-1,28	9,01E-03	
HELLS	FOXM1	-2,90	1,20E-02	-1,74	3,00E-04	-2,36	1,36E-04	
HIST1H3B	FOXM1	-2,51	1,18E-03	-2,34	1,06E-03	-42,11	9,75E-05	
HIST1H3G	FOXM1	-2,12	3,53E-03	-3,19	4,20E-05	-42,22	3,16E-04	
MAD2L2	p53	-1,54	3,86E-02	-1,29	6,71E-05	-1,24	7,85E-04	
МСМ4	p53, FOXM1	-2,12	4,43E-03	-1,57	1,10E-03	-8,92	6,94E-06	
МСМ5	p53, FOXM1	-2,41	2,22E-03	-1,65	7,85E-04	-2,17	3,94E-03	
MCM7	p53, FOXM1	-2,62	2,00E-02	-1,50	1,43E-03	-4,98	8,38E-06	
МҮВ	p53, FOXM1	-2,03	1,46E-02	-6,50	5,01E-08	-3,38	1,39E-03	
PBRM1	FOXM1	-1,47	1,37E-02	-1,43	1,52E-03	-1,19	2,75E-02	

PLA2G4C	p53	1,80	1,03E-02	2,18	4,45E-04	2,90	1,02E-03
POLE2	p53, FOXM1	-3,29	1,90E-02	-1,86	1,71E-03	-2,28	1,49E-02
RAD21	p53, FOXM1	-1,32	1,84E-02	-1,42	6,34E-06	-1,51	3,87E-04
RBX1	p53, FOXM1	-1,50	3,90E-03	-1,35	5,75E-04	-1,11	2,65E-02
RFC3	p53, FOXM1	-2,26	1,06E-02	-1,25	4,91E-04	-3,01	5,14E-03
RFC4	p53, FOXM1	-1,93	3,41E-02	-1,63	9,57E-07	-4,11	4,12E-03
SKP2	FOXM1	-2,07	9,80E-03	-3,45	2,92E-10	-1,57	6,32E-03
SMC3	FOXM1	-1,36	2,64E-03	-1,44	7,91E-05	-1,73	1,04E-03
STMN1	p53, FOXM1	-1,90	6,60E-02	-1,85	2,01E-06	-8,82	6,46E-04
SUV39H2	p53, FOXM1	-1,57	1,61E-02	-1,92	2,06E-04	-1,46	2,09E-02
TFDP1	p53, FOXM1	-1,64	1,11E-02	-2,29	2,98E-06	-1,65	1,06E-03
WHSC1	p53, FOXM1	-1,41	2,72E-02	-1,24	1,33E-04	-2,75	1,70E-03

Tabelle 3-4: Gemeinsame, differentiell exprimierte Gene nach Siomycin A, Bortezomib und Nutlin-3a Behandlung

Bei der vergleichenden Analyse der Genexpressionsdaten nach Siomycin A Behandlung von QGP-1 Zellen, Bortezomib Behandlung von BON Zellen und Nutlin-3a Behandlung von KRJ-I Zellen fanden sich trotz der Varianzen, die durch die unterschiedlichen Zelllinien angenommen werden mussten, 33 Übereinstimmungen. Die Gene wurden mit der *p53FamTaG* [200] Datenbank und mit dem *FOXM1 ENCODE Transcription Factor Targets Gene Set* (Messung der Transkriptionsfaktor DNA-Binding mittels ChIP-seq)[198, 199] abgeglichen, um bisher bekannte p53 und FOXM1 Zielgene zu identifizieren. Alle Gene mit *DNA-Repair* Annotation im PanCancer[®] Panel oder publizierter Beteiligung an DNA Reparaturprozessen [132, 238, 303-311] sind blau hervorgehoben. Zur Vereinfachung erfolgte bei Bortezomib und Nutlin-3a die Umrechnung des *log2-fold change* in den *fold change*.

4. Diskussion

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien sind selten diagnostizierte Tumoren und doch betreffen sie aufgrund ihrer günstigeren Prognose und der daraus folgenden verhältnismäßig hohen Prävalenz mehr Patienten als bespielweise nicht-neuroendokrine Pankreas- oder Magenkarzinome [312]. Die vermeintliche Seltenheit der Erkrankung und das Paradigma des "gutartigen" Tumors führten jedoch dazu, dass diese Krankheit jahrzehntelang nahezu unerforscht blieb und auch für die industrielle Wirkstoffentwicklung lange keine Rolle spielte.

Dabei bieten GEP-NEN wissenschaftlich herausfordernde Fragestellungen, beispielsweise welche therapeutischen Ansätze sich für eine Krebserkrankung eignen, die keine therapeutisch angreifbaren Treibermutationen zeigt, die sich nahezu allen chemotherapeutischen Ansätzen entzieht und die trotz kleiner Primärläsion stark metastasieren kann.

In dieser Arbeit wurden gezielt therapeutische Ansätze untersucht, die translational weiterverfolgt werden können. Dieses Vorgehen wurde gewählt, obwohl es maßgebliche Schwierigkeiten bereiten würde, die einzelnen Mediatoren betroffener Signalwege trennscharf zu beschreiben. Rückschlüsse nach gezieltem *Knockdow*n oder Überexpression einzelner Signalmoleküle sind in der Regel leichter zu ziehen als nach indirekter pharmakologischer Modulation. Aussagekräftige Ergebnisse mit experimentellen Inhibitoren oder durch gentechnische Modulation werden jedoch in der Regel translational und klinisch nicht weiterverfolgt, solange es keine geeigneten Pharmaka gibt. Es wurden große Teile dieser Arbeit deshalb nach translationalen Gesichtspunkten ausgerichetet, auch wenn dadurch ein ein Grundproblem, nämlich die Frage, ob FOXM1, als drittes Glied der untersuchten Achse, als Tumortreiber oder nur als Proliferationsmarker in der Zelle fungiert, nicht endgültig geklärt werden konnte.

Trotz massiver Fortschritte in der Entwicklung zielgerichteter Therapien in den letzten beiden Jahrzehnten sind es vor allem die Transkriptionsfaktoren wie FOXM1, die als Knotenpunkte ganzer Signaltransduktions-Netzwerke fungieren, sich aber gleichzeitig aufgrund vorwiegender Kernlokalisation und fehlender potentieller Bindungsstellen für niedrigmolekulare Inhibitoren als schlechte therapeutische Ziele darstellen. Es wird daher immer wieder versucht, diese indirekt anzugreifen, was die Kenntnis molekularer Zusammenhänge voraussetzt, aber auch immer ein deutliches Risiko von *Off-Target* Effekten birgt.

4.1 GEP-NEN Zelllinien sind eingeschränkt als in vitro Modelle geeignet

Vor diesem Hintergrund wurden als Grundlage zur vorliegenden Arbeit zunächst die Zelllinien detailliert charakterisiert. Als problematisch stellten sich vor allem das Alter und die sehr begrenzte Anzahl an verfügbaren Zelllinien dar. Auch Stiftungen der neuroendokrinen Tumorforschung, wie beispielsweise die amerikanische CFCF (*Caring for Carcinoid Foundation*), haben dieses Problem erkannt und stellen deshalb seit Jahren regelmäßig Förderkulissen zur Generierung neuer Zelllinien zur Verfügung. Die Problematik besteht dessen ungeachtet jedoch weiterhin.

Insgesamt konnten die GEP-NEN Zelllinien als ausreichend valide *in vitro* Modelle charakterisiert werden, da in allen Zelllinien die neuroendokrine Differenzierung erhalten war. In Hinsicht auf die spezifische Fragestellung mussten jedoch in der Folge einzelne Zelllinien ausgewählt werden, beispielsweise bei Effekten, die wt p53 erfordern. Leider war nur die KRJ-I Zelllinie nicht in *TP53* mutiert und spiegelte somit das für p53 klinisch relevanteste Profil wider. Auch weitere Mutationen wie RAS oder BRAF, die ebenfalls klinisch selten vorkommen [67], konnten bei KRJ-I Zellen ausgeschlossen werden. Da diese in der Regel starke onkogene Treiber darstellen, oder über paradoxe Mechanismen BRAF Inhibition gegensätzliche Effekte bei Wildtyp und mutierten Zellen zeigen [313], ist eine Vergleichbarkeit der molekularen Zusammenhänge in BON und QGP-1 Zellen mit denen in pankreatischen NEN *in vivo* fraglich. Die von uns gefundenen Mutationen in BON und QGP-1 Zellen deckten sich dabei mit vor kurzem veröffentlichten *in vitro* Daten [234, 314]. Alle Arbeiten, die mit den pankreatischen NEN Zelllinien durchgeführt wurden, müssen daher sehr vorsichtig interpretiert werden. Derzeit wartet die Arbeitgruppe auf die Freigabe der neu etablierten Zelllinien NT-3 und NT-18 durch unsere Kooperationspartner, um diese zu sequenzieren und um unsere Ergebnisse absichern zu können.

Die im Vergleich zu BON und QGP-1 jüngere KRJ-I Zelllinie schien daher das am besten geeignete Modell zu sein, da sie als einzige Linie alle vier in Abschnitt 1.3.2 definierte Kriterien erfüllte. Zudem wuchsen KRJ-I Zellen in Sphäroiden, was im Rahmen von präklinischen Studien mit möglichen Therapeutika einen Vorteil gegenüber den 2D Kulturen, z.B. in Bezug auf eine physiologischere Zellarchitektur und veränderten Massetransport darstellt. Für die Untersuchungen zur Wirkung von Nutlin wäre allerdings mindestens eine weitere Wildtyp p53 Zelllinie sinnvoll gewesen, um allgemeingültigere Aussagen treffen zu können. Grundsätzlich waren alle Versuche mit KRJ-I Zellen geprägt von starken Varianzen zwischen den untersuchten Replikaten. Diese sind vermutlich vor allem auf Schwankungen in der Größe der einzelnen Zellcluster zurückzuführen, zu denen sich die Zellen in Kultur spontan zusammenlagern. Als dritte Problematik trat auf, dass KRJ-I Zellen besonders stark ausgeprägte Probleme mit der Xenobarriere zeigen [183]. Trotz dieser Problematiken hat unsere Arbeitsgruppe zum jetzigen Zeitpunkt keine Kenntnis von einer weiteren wt p53 GEP-NEN Zelllinie, die alternativ oder ergänzend hätte verwendet werden können.

4.2 FOXM1 wird p53-abhängig und -unabhängig von MDM2 reguliert und eignet sich als Progressionsmarker in GEP-NEN

Die aus der vorhandenen Literatur abgeleitete These, dass die MDM2-p53-FOXM1 Achse maßgeblich in die Signaltransduktion gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren eingebunden sein könnte, basierte auf der präliminären Fragestellung, über welche Wege der überaktivierte PI3K-Weg (als ein ungünstiger klinischer Marker) mit der Deregulation von Mitoseproteinen wie Survivin und Aurora Kinasen (die ebenfalls Progressionsmarker darstellen) in Verbindung gebracht werden könnten. Bei einem kausalen Zusammenhang müsste sich für diese vermittelnden Moleküle ebenfalls eine Assoziation mit klinischen Progressionsparametern ergeben.

Aus den verschiedenen Möglichkeiten wurden zunächst mögliche Mediatoren einer Achse ausgewählt und in einem kleinen prospektiven Kollektiv im Western Blot analysiert. Hier zeigten sich die Proteine MDM2, FOXM1 und STAT3 signifikant in den Metastasen erhöht. Im Anschluss wurde eine mögliche direkte oder indirekte MDM2-FOXM1 Wechselwirkung untersucht. Zumindest die Wechselwirkung des MDM2 Zielproteins p53 mit FOXM1 ist bereits wissenschaftlich bekannt: FOXM1 wird von p53 transkriptionell reprimiert, und die Inhibition der MDM2-p53 Interaktion führt entsprechend zur Reduktion der FOXM1 Expression durch Stabilisierung von p53 gegenüber MDM2 [177, 239]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MDM2 FOXM1 nicht nur indirekt über p53 zu modulieren scheint, sondern in QGP-1 Zellen (also im Kontext eines genetischen und funktionellen p53 Verlustes) der Knockdown von MDM2 die FOXM1 Expression ebenfalls beeinflusst. Es gibt demnach also einen p53-unabhängigen Weg der FOXM1 Regulation durch MDM2. Da Proteasominhibition in den p53 defizienten Zellen die FOXM1 Expression ebenfalls reduziert, liegt nahe, dass ein weiterer negativer Regulator von FOXM1 durch MDM2 ubiquitinyliert und inaktiviert werden kann und dessen Abbau nach Proteasominhibiton inhibiert wird. Die These, dass es sich an dieser Stelle um einen AKTabhängigen Mechanismus über FOXO3a handelt [315] konnte nicht reproduzierbar bestätigt werden, da sich nach MDM2 Knockdown von KRJ-I und QGP-1 widersprüchliche Ergebnisse zeigten.

Obwohl im Rahmen der Vorversuche sowohl für FOXM1 als auch für MDM2 eine höhere Expression in den Fernmetastasen festgestellt wurde, konnte im untersuchten Kollektiv keine Assoziation beider Marker nachgewiesen werden. In den Zelllinien zeigte sich jedoch eine klare Ko-Expression sowohl in p53 mutierten BON als auch in p53 wt KRJ-I Zellen. Dabei unterschied sich die subzelluläre Lokalisation von FOXM1 erheblich, denn in den Wildtyp Zellen war FOXM1 deutlich zytoplasmatisch lokalisiert und somit mutmaßlich nicht aktiv. Möglicherweise liegt die Ursache dafür in der unterschiedlichen Aktivität von p53 in den Zelllinien. Denkbar ist aber auch die verstärkte nukleäre Lokalisation von FOXM1 in BON, weil diese schlichtweg deutlich schneller proliferieren als KRJ-I. Dass FOXM1 in KRJ-I trotzdem eine starke zytoplasmatische Immunreaktivität zeigte, wirft die Frage auf, ob zytoplasmatisches FOXM1 eine bisher nicht bekannte Funktion hat, oder ob es sich um regulatorische Sequestrierungsprozesse handelt. In einem Projekt an neuroendokrinen Lungentumoren konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass hier in den immunhistochemischen Untersuchungen von Patientenbiopsien der zytoplasmatische FOXM1 Gehalt klinisch genau gegenläufig zum nukleären Anteil verläuft [316]. Eine Sequestrierung als posttranslationaler Regulationsmechanismus von FOXM1 konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Untersuchung der Kern- und Zytosolfraktionen zumindest in BON Zellen nach Bortezomib Behandlung allerdings ausgeschlossen werden.

Zudem war auffällig, dass die Ko-Expression von MDM2 und FOXM1 vor allem in multinukleären und großen, möglicherweise in der Folge apoptotischen Zellen gehäuft vorkam. Eine deutliche Expression von FOXM1 würde somit auch funktionell im Zusammenhang mit mitotischer Instabilität (z.B. via Überexpression von Mitose-Kinasen wie Survivin und Aurora) stehen [317], was der bisherigen Datenlage entspricht.

FOXM1 konnte immunhistochemisch auch mit der Expression von Survivin assoziiert werden, das selbst einen starken prognostischen Marker in GEP-NEN darstellt und bereits als FOXM1 Zielprotein bekannt ist [121, 131]. Dies war möglich, da sich die Kollektive aus einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe [121] und der vorliegenden Arbeit bei 49 Patienten überschnitten und eine erneute Auswertung aller Daten durchgeführt wurde. Zwischenzeitlich sind zudem parallele Färbungen mit Aurora B ausgewertet wurden, die für dieses FOXM1 Zielprotein eine signifikante Assoziation sowohl mit Progressionsparametern wie Grading, Tumorgröße und Funktionalität des Tumors, als auch mit STAT3, FOXM1 und Survivin Expression aufzeigten (unveröffentlicht) und somit das Bild des eng verbundenen Netzwerks dieser Proteine abrunden. Im späteren *Knockdown* von *FOXM1* konnte zwar kein Rückgang von Survivin gezeigt werden, jedoch der Aurora Kinase A. Grund dafür war vermutlich das nicht vollständige Ausschalten aller FOXM1 Isoformen in diesem Experiment. Durch Siomycin A Behandlung der Zelllinien wurde die Expression von Survivin, Aurora A und B, aber auch von STAT3 hingegen deutlich reduziert. Dass dieser Effekt auch in der p53 defizienten QGP-1 Zelllinie auftrat, spricht zumindest dafür, dass die Reduktion der Expression in diesem Falle nicht p53-abhängig ist, obwohl Survivin ebenfalls direkt durch p53 reguliert werden kann [318].

Da FOXM1 hoch signifikant mit Proliferation korreliert und hoch proliferative Tumoren häufiger metastasieren, konnte FOXM1 in einer univariaten Analyse in den gastrointestinalen Tumoren ebenfalls mit dem M0/M1 Status assoziiert werden. Dieser Zusammenhang hielt einer robusteren
multivariaten Testung jedoch nicht stand, da FOXM1 nicht losgelöst vom Proliferationsstatus betrachtet werden kann und weitere starke Variablen, wie die Kernlokalisation von Survivin, mit einbezogen waren. Daher ergibt sich bei eindimensionaler Betrachtung ein Zusammenhang, nach dem Proliferation mit Metastasierung einher geht sowie die FOXM1 Expression mit steigender Proliferationsrate zunimmt und folglich eine hohe FOXM1 Expression ebenfalls mit Metastasierung assoziiert sein müsste. Der tatsächliche Einfluss von FOXM1 auf die Metastasierung, wenngleich er in der Literatur häufig zu finden ist, konnte jedoch bei unserem Tumorkollektiv in einer multivariaten Analyse als gering eingeschätzt werden.

Als zentrale Aussage der immunhistochemischen Ergebnisse steht FOXM1 in deutlichem Zusammenhang mit dem Übergang vom G1 auf das G2 Tumorstadium in gastrointestinalen NEN. Dieser Zusammenhang ist insofern interessant, als dass die pathologische Unterscheidung zwischen diesen Tumorgraden bei GEP-NEN bisher lediglich mittels eines Ki67 Gehaltes über bzw. unter 2% sowie der Anzahl der Mitosen im Gewebeschnitt diagnostiziert wird. FOXM1, das überdies die Expression von *MKI67* (Ki67) reguliert [295], könnte somit nicht nur als ein verfeinernder Marker diagnostisch relevant, sondern auch als Zielmolekül für eine molekulare Therapie interessant sein. Bei den aggressiveren pankreatischen NEN findet sich sogar in den G1 Tumoren eine deutliche Anzahl FOXM1 hoch exprimierender Tumoren.

Durch die Assoziation mit dem Tumor Grading sowie dem *in vitro* Nachweis, dass FOXM1 in GEP-NEN Zelllinien abhängig vom PI3K-Weg reguliert werden kann, ergibt sich ein Rückschluss auf mögliche klinische Zusammenhänge: Verlust oder Mutationen von PTEN oder TSC1/2 sowie Überexpression von MDM2 als bekannte Charakteristika in GEP-NEN [65, 108] könnten somit zur vermehrten Expression von FOXM1 und zu erhöhter Proliferation führen.

Offen blieb die Frage inwieweit die FOXM1 Expression nicht nur ein Maß für die Deregulation von GEP-NEN darstellt, sondern aktiv an der onkogenen Signaltransduktion mitwirkt und damit therapeutisch relevant sein könnte. Der starke anti-proliferative Effekt des *FOXM1 Knockdown* in der QGP-1 Zelllinie auch ohne Zugabe von Cisplatin lässt zumindest den Rückschluss zu, dass sich FOXM1 als theraputisches Ziel eignen könnte.

FOXM1 ist in den letzten Jahren als Transkriptionsfaktor, aber auch als Regulator der DNA Schaden-Antwort (*DNA damage response*) zunehmend in den Fokus der präklinischen Forschung gerückt. Grund dafür mag seine prognostische Präsenz in einer Vielzahl von Krebsarten sein [132, 177]. Vor allem aber befindet sich die Krebsmedizin an einem Scheideweg. Einerseits gewinnen zielgerichtete Ansätze immer mehr an therapeutischer Bedeutung, andererseits sind diese selten nachhaltig kurativ, und es treten eine Vielzahl von Resistenzen auf [319]. Kombinatorische Strategien können an überhöhter Toxizität scheitern. Deshalb liegt das Forschungsinteressse auch auf der Erprobung sinnvoller symptomkontrollierender Medikamente und somit der Palliation sowie auf Behandlungen, die eine Progression verlangsamen.

Das Interesse an der Inhibition von FOXM1 liegt, neben seiner Prädominanz in malignen Gewebe, u.a. auch darin begründet, dass FOXM1 die Resistenz gegenüber genotoxischen Therapien vermittelt und dessen Inhibition beispielsweise bei GEP-NEN überhaupt erst für Chemo- oder Strahlentherapie/PRRT sensibilisieren könnte.

Auch p53 trägt zur Regulation von DNA Reparaturmechanismen bei, beispielsweise durch die Inhibition der O⁶-MGMT [127]. Deshalb wurden in dieser Arbeit in die Ableitung therapeutischer Ansätze eingearbeitet, dass alle drei Mediatoren der Achse (sowohl MDM2, p53 als auch FOXM1) als Zielmoleküle sowohl für Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapie in Frage kommen. Interessant wären weitere Untersuchungen mit p53 stabilisierenden Substanzen für Patienten mit pankreatischen Wildtyp p53 NEN. Hier zeigte sich bereits dass die Expression von O⁶-MGMT als interferierendes Reparaturprotein die Therapie mit Temozolomide beeinflusst [129].

4.3 STAT3 und FOXM1 stehen in einem regulatorischen Zusammenhang

Auch STAT3 wurde eingangs auf einen Zusammenhang mit FOXM1 analysiert und dieser bestätigt. Ein Zusammenhang beider Proteine war zu Beginn dieser Arbeit keineswegs nahe liegend, da neben der Arbeit von Mencalha und Kollegen vom Oktober 2012 [236] keine weiteren Veröffentlichungen zu Abhängigkeiten von FOXM1 und STAT3 bekannt waren.

FOXM1 fungiert als Regulator von Survivin und Aurora Kinasen [131], allerdings ebenso wie sein direkter Inhibitor p53. Aurora A reguliert wiederum STAT3 [320] und trägt damit möglicherweise zu einem autoregulatorischen Loop von FOXM1 bei. Sowohl STAT3 als auch Survivin konnten in den Gewebebiopsien in einer multivariaten Analyse mit dem Metastasierungsstatus korreliert werden. Zudem konnte in nachfolgenden Untersuchungen eine deutliche Korrelation der STAT3 Expression mit der von FOXM1 auch alternativmethodisch gezeigt werden. So konnte die Ko-Expression von STAT3 und FOXM1 sowohl mittels Immunfluoreszenz in den Zelllinien als auch mittels Immunhistochemie an einem weiteren, unabhängigen Kollektiv bestätigt werden.

In der Zwischenzeit sind weitere Arbeiten zum Zusammenhang von FOXM1 und STAT3 erschienen, die jedoch weitestgehend STAT3 als transkriptionell abhängig von FOXM1 beschreiben [321, 322], was die These einer regulatorischen Schleife unterstützt. Zudem existieren bisher unveröffentlichte preliminäre Daten aus einer Kooperation, nach denen der *Knockdown* von *STAT3* die FOXM1 Expression reduziert und der *FOXM1 Knockdown* die STAT3 Expression negativ beeinflusst. Letzteres

steht allerdings im Widerspruch zu den FOXM1 RNAi Daten in dieser Arbeit und muss weiter evaluiert werden. Eine naheliegende Begründung findet sich jedoch in dem nicht alle Isoform umfassende *Knockdown* von FOXM1 in den Versuchen im Abschnitt 3.3.1.2.4.

Weiterhin unveröffentlicht sind Daten, nach denen der *Knockdown* von *FOXM1* wiederum die STAT3 Promotor-abhängige Luciferaseaktivität reduziert, während Interleukin-6 als STAT3 Aktivator diese stimuliert. Zudem konnte Interleukin-6 die FOXM1 Expression aktivieren. Demnach ergäbe sich für FOXM1 eine weitere funktionelle Rolle als Proliferationsregulator, der extrazelluläre Immunsystemgenerierte Signale in GEP-NEN Zellen weitervermittelt. Interessant ist auch die verstärkte Expression des pro-apoptotischen STAT3 Gegenspielers STAT1 nach *Knockdown* von *FOXM1*. Welche klinische Bedeutung die Wechselwirkung von FOXM1 und STAT3 darüber hinaus hat, wird in diesem separaten Projekt weiter untersucht werden. Dass der FOXM1 Promoter eine STAT3 Bindesequenz enthält, die auch mit STAT3 interagiert, wurde bereits wissenschaftlich nachgewiesen [236]. Obwohl der humane STAT3 Promoter wiederum keine 5'-A(C/T)AAA(C/T)AA-3' FOXM1 Konsensus-Bindesequenz [323] enthält, ist zumindest ein indirekter Zusammenhang denkbar. Zur Prüfung, ob FOXM1 Isoformen an andere Sequenzen des STAT3 Promoters binden können, müssten EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assays*) oder ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) Versuche durchgeführt werden, die nun auch in der Arbeitsgruppe etabliert werden sollen.

Klinisch gesehen ist der Bedarf, prädiktive Biomarker für STAT3 inhibitorische Therapien zu finden, nach ersten Phase I Studien weiterhin sehr hoch [324]. Außerdem sind immunmodulatorische Therapien derzeit von großem Interesse. STAT3 als ein zentraler Mediator der Zytokinkommunikation könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen.

4.4 Proteasominhibitoren wirken antiproliferativ auf GEP-NEN Zellen, inhibieren die FOXM1 Expression und sensibilisieren gegenüber Cisplatin

Da es zu Beginn des Projekts keinen direkten FOXM1 Inhibitor gab, wurde zunächst die Proteasominhibition als der am häufigsten verfolgte Ansatz der indirekten FOXM1 Inhibition untersucht. Proteasominhibitoren haben den Vorteil, dass sie auf Tumorzellen spezifisch stärker wirken. Ein möglicher Grund dafür könnte in der höheren FOXM1 Expression bei Tumorzellen liegen, aber auch die zentrale Rolle des Proteasoms im erhöhten Proteinstoffwechsel, in der Kontrolle ungefalteter Proteine bei einem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) und in der DNA Reparatur [246] könnte die Spezifität von Proteasominhibitoren erklären [258, 325]. Gleichzeitig werden durch Proteasominhibition die Effekte deregulierter E3 Ubiquitin Ligasen, wie MDM2 oder SKP2, das sich im Kontext der FOXM1 Inhibition in unserer Arbeitsgruppe wiederholt als differentiell exprimiert zeigte (z.T. unveröffentlicht), nivelliert. Als wichtiger Bestandteil dieser Analysen sollte dabei nicht nur geklärt werden, wie die Substanzen zellbiologisch wirken, sondern auch, welche der beobachteten Effekte tatsächlich FOXM1-abhängig sind, also nach gentechnischem Ausschalten von FOXM1 ebenfalls auftreten.

Alle drei Proteasominhibitoren, Siomycin A, Bortezomib und Thiostrepton, zeigten Wirksamkeit im Sinne eines deutlichen antiproliferativen Effekts. Die Potenz der einzelnen Substanzen unterschied sich jedoch stark voreinander.

Bortezomib wirkte bereits bei drei Zelllinien im niedrigen nanomolaren Bereich, während die Thiazolverbindungen erst im niedrigen Mikromolarbereich Wirksamkeit zeigten. Mit Blick auf die molekulare Masse, die bei Bortezomib nur etwa ein Viertel der beiden anderen Substanzen beträgt, liegen pharmakokinetische Ursachen nahe. Letztendlich lässt jedoch die *in vitro* Potenz keine verlässlichen Aussagen über die tatsächlichen klinischen ADMET Eigenschaften (Absorption, Verteilung, Metabolisierung, Elemination und Toxizität) zu [326]. Für Bortezomib spricht jedoch, dass die Substanz selbst bereits klinische Studien durchlaufen hat und somit Fragen zur allgemeinen Pharmakokinetik schon erforscht sind [327].

Siomycin A wirkte mit einer IC50 von knapp unter 1 µM in drei von vier Zelllinien. Während die Kombination von Siomycin mit Cisplatin zu additiven bis synergistischen Effekten in allen Zelllinien führte, zeigten sich für Temozolomide interessanterweise gegensätzliche Effekte in pankreatischen und gastrointestinalen NEN. Die Ursache dafür ist unbekannt. Die Ergebnisse verdeutlichen jedoch den unterschiedlichen molekularen Hintergrund beider Subgruppen und dass eine Trennung dieser bei präklinischen und klinischen Studien notwendig ist.

Bei BON, KRJ-I und LCC-18 konnte zudem eine deutliche Induktion von Apoptose gezeigt werden. KRJ-I Zellen wiesen zudem eine wesentlich frühere Induktion von Apoptose auf und zeigten bereits nach 72 Stunden zusätzlich einen deutlichen Anstieg von Laktatdehydrogenase im Medium, so dass hier davon ausgegangen werden muss, dass die Substanz auch stark zytotoxisch auf die Zelllinie wirkte. Lediglich QGP-1 Zellen induzierten keine Apoptosen. Dieses Ergebnis fand sich auch bei anderen Behandlungen, beispielsweise mit Bortezomib, aber auch bei verschiedenen PI3K Inhibitoren, in denen in QGP-1 Zellen stattdessen Zellzyklus Arrest auftrat [266]. Gerade dieser Unterschied zwischen früher Induktion von Apoptose in KRJ-I und Apoptose-Insuffizienz bei QGP-1 könnte ursächlich mit dem p53 Status zusammenhängen. Zur Untersuchung der Rolle von p53 in der Wirkungsweise von Proteasominhibitoren sind weitere Versuche notwendig. Ein *Knockdown* von *TP53* in KRJ-I sowie vektorbasierte Reexpression von intaktem p53 in QGP-1 könnte den Behandlungseffekt maßgeblich beeinflussen. Da bei der Analyse der Signaltransduktion nach Proteasominhibition aber versucht werden sollte, möglichst p53-unabhängige Mechanismen, die aber FOXM1-vermittelt auftraten, durch Vergleich mit dem *FOXM1 Knockdown* zu identifizieren, wurde für die Expressionsanalysen die *TP53*-mutierte QGP-1 Zelllinie verwendet. Fünf Gründe sprechen dafür, dass die analysierten QGP-Zellen kein funktionelles p53 produzieren:

- QGP-1 Zellen enthalten nur eine stark verkürzte Version von *TP53* (ohne Tetramerisierungsdomäne und mit stark verkürzter DNA Bindedomäne, vgl. Abschnitt 3.1.2.4).
- Das p53 Protein konnte in QGP-1 mit den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern im Western Blot nicht nachgewiesen werden.
- Klassische p53 *Targets* wie MDM2, p21, Bax, Noxa und PUMA zeigten sich in der Expressionsanalyse von mit Siomycin A behandelten QGP-1 nicht in ihrer Expression verändert, und es konnte mit keiner Substanz Apoptose induziert werden.
- QGP-1 Zellen zeigten keine Antwort auf Nutlin-3a. Ein Anstieg von MDM2, p21 oder BAX konnte auch durch Nutlin-3a nicht induziert werden.
- Frühere Publikationen beschreiben die Abwesenheit von p53 mRNA und fehlende Immunoreaktivität in der Immunhistochemie in QGP-1 Zellen [91, 328].

Der inhibitorische Effekt von Proteasominhibition auf Tumorzellen verläuft teilweise auch über FOXM1, zumindest legt dies die vorhandene Literatur nahe [252, 329]. Jedoch sind die Funktionen des Proteasoms zu komplex, um diesen Weg als zentralen Wirkungsmechanismus zu sehen. Gerade bei funktionellen neuroendokrinen Tumorzellen muss davon ausgegangen werden, dass durch die Aktivierung einer UPR (unfolded protein response) endoplasmatischer Stress induziert wird, der ebenfalls zur Induktion von Apoptose führen kann. Die Klärung der Frage, ob es einzelne Mechanismen gibt, die sich mit dem Expressionsmuster nach Knockdown von FOXM1 überschneiden, sollte Hinweise darauf geben, welche Mechanismen der Proteasominhibiton mit FOXM1 in Verbindung stehen. Insgesamt bestand das größte Problem beim Vergleich der Genomexpression nach FOXM1 Knockdown mit der nach Siomycin A Behandlung darin, dass der gewünschte Effekt der FOXM1 siRNA nicht vollständig eintrat. Zwar konnte die Expression der mRNA auf weniger als 40 % reduziert werden, womit FOXM1 das am stärksten negativ differentiell exprimierte Gen dieser Behandlungsgruppe wurde, doch waren die überlappenden Effekte von siRNA und Siomycin A behandelten Proben sehr gering. In Verbindung mit der statistischen Unsicherheit, die sich aus der geringen Stichprobenzahl ergab, konnte die Differenzierung von FOXM1-abhängigen und -unabhängigen Prozessen der Siomycin A-Antwort nicht vorgenommen werden.

Mögliche Begründungen dafür könnten sein, dass die reine Inhibition von FOXM1 ohne zusätzliche Trigger keinen bedeutenden Einfluss auf die QGP-1 Zellen hatte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass FOXM1 selbst keine bedeutende treibende Rolle in der Tumorbiologie von GEP-NEN zukommt und seine Expression Tumorgeschehen zwar sichtbar macht, aber nicht steuert. Diese Erklärung ist jedoch unwahrscheinlich, da die starke Proliferationinhibition nach *FOXM1 Knockdown* in QGP-1 Zellen in Abschnitt 3.2.2, bei der eine andere Transfektionsmethode und andere siRNA verwendet wurde, sich auch in der Genexpression hätte niederschlagen müssen. Zudem wurden mit der alternativen siRNA auch im Kapitel 3.3.1.3.5 deutliche Effekte erzielt.

Als zweite Begründung könnte der *Knockdown* in seiner Effizienz nicht ausgereicht haben. Im Western Blot zeigte sich nur eine FOXM1 Bande nach siRNA verändert, obwohl die Sequenz alle Isoformen hätte abdecken müssen. Zudem konnte mittels isoformspezifischer *Real Time* PCR nachgewiesen werden, dass gerade das Transkript der FOXM1B Isoform, der das größte transformierende Potential zugeschrieben wird [274], nur unzureichend reduziert wurde. Am stärksten zeigte sich FOXM1A betroffen, die A-Isoform gilt jedoch bisher als nicht relevant für die maligne Transformation. Im Gegenteil, FOXM1A wird als dominant negativer Regulator für die B- und C-Isoformen diskutiert [330], und eine verstärkte Reduktion könnte somit genau gegensätzliche Effekte triggern.

Hinzu kam das statistische Problem, dass aufgrund begrenzter Ressourcen nur je zwei biologische Replikate analysiert worden sind. Die dadurch gewonnenen Daten waren dementsprechend nicht robust genug, um eine Bonferroni oder FDR Korrektur für multiples Testen durchzuführen. Statistisch gesehen sind bei rund 24.000 Codesets und Alpha = 0,05 etwa 1.250 Falschpositive zu erwarten. Diese müssten zufällig verteilt sein. Aus diesem Grunde wurden in der Auswertung weniger einzelne Gene als vielmehr Gensets betrachtet, die ähnliche Funktionen haben. Vor diesem Kontext sind jedoch die Daten sehr vorsichtig zu interpretieren. Dies gilt v.a. für die 26 Gene, die nach beiden Behandlungen differentiell exprimiert waren, da sich hier kaum Muster zeigten. Immerhin spricht die Tatsache, dass mehrere Codesets eines Genes vergleichbare Ergebnisse lieferten, dafür, dass nicht alle Daten vollständig von der Hand zu weisen sind. Interessant ist zudem das Ergebnis, dass sich unter den wenigen Transkripten, die nach Siomycin A und FOXM1 Knockdown analog reguliert wurden, gleich mehrere uncodierende Transkripte mikrotubulärer tRNA befanden. Denkbar wäre somit zum einen ein Zusammenhang zwischen Mitochondrien-Proliferation und Zellteilung, allerdings ist die Mitose nach Siomycin A Behandlung deutlich reduziert. Denkbar wäre zum anderen aber auch eine Assoziation der mitochondrialen Proteinsynthese mit verstärkter Aktivität der Atmungskette und damit verbunden mit einem verstärkten Glukose-Stoffwechsel, der phänotypisch bereits in therapieinduzierter Seneszenz beschrieben wurde [331]. Jedoch konnte bei keinem Gen der Atmungskette selbst ein deutlicher

Anstieg der Expression gezeigt werden. Welche Rolle demnach die verstärkte Expression von mitochondrialen tRNA Genen nach *FOXM1 Knockdown* und Proteasominhibiton spielt, kann bisher nicht abschließend abgeleitet werden. Vermutlich handelt es sich um einen kompensatorischen Mechanismus.

Diese vergleichenden Untersuchungen von Siomycin mit RNA Interferenz gegen *FOXM1* blieben daher ohne belastbares Ergebnis, da Etablierung der isoformspezifischen PCR sehr viel Zeit in Anspruch nahm und zum Zeitpunkt der Mikroarrayanalysen noch nicht abgeschlossen war. Warum die für diese Studien verwendete siRNA vor allem *FOXM1A* inhibierte, mag zum einem mit dem Anteil der Isoformen am Gesamt-FOXM1 Pool zusammenhängen, könnte aber auch von den Sekundärstukturen der einzelnen mRNA Moleküle beeinflusst worden sein.

Im Anschluss erfolgte die Behandlung von ebenfalls *TP53* mutierten, aber p53 exprimierenden BON Zellen mit Bortezomib. Hier wurde zudem aufgrund der deutlichen Reduktion von Transkripten der DNA Reparaturmechanismen auch die Genexpression nach Kombinationstherapie mit Cisplatin analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulationsmuster von Bortezomib trotz zusätzlicher Induktion von DNA Schädigungsstress stabil blieben: die negative Regulation der Proliferation und v.a. der DNA Reparatur waren auch nach Kombination mit Cisplatin deutlich nachzuweisen. Bortezomib konnte demnach die Expression von durch Cisplatin induzierten Genen unterdrücken. Die Kombination löste zudem in BON Zellen verstärkt Apoptose aus, wie im Western Blot und mittels Durchflusszytometrie bestätigt werden konnte. Als Mechanismen für die verstärkende Wirkung von Bortezomib mit Cisplatin werden sowohl die Inhibition der DNA Reparaturmechanismen als auch die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert [332, 333]. Beide stehen auch in engem Zusammenhang mit FOXM1 [132, 334, 335]. Derzeit wird die Kombination von DNA-Schäden nach Proteasominhibtion als medikamentöse Sensibilisierungsmethode für die – bei GEP-NEN etablierte – PRRT im Anschluss auch in ein Xenograft-Tiermodell übertragen zu können.

Beim Vergleich von Bortezomib mit *FOXM1 Knockdown* zeigten sich Überlappungen bei betroffenen Genen der Zellzyklusregulation. Einen Einfluss der siRNA auf die DNA-Reparaturmechanismen konnte nicht gezeigt werden. Somit ist anzunehmen, dass FOXM1 zwar in Bezug auf die Zellzyklusregulation in die Wirkungsmechanismen von Bortezomib involviert ist, jedoch eher als Effektor fungiert als als Trigger.

Zusammenfassend konnte Proteasominhibition als *in vitro* weitestgehend wirksame therapeutische Option dargestellt werden. Leider konnte nicht zweifelsfrei dargelegt werden, dass der beobachtete

Effekt auch maßgeblich über FOXM1 vermittelt wurde, weshalb die argumentative Grundvoraussetzung zur präklinischen Analyse von Substanzen, die die MDM2-FOXM1-p53 Achse beeinflussen, nicht als gegeben angesehen werden konnte. Da Proteasominhibiton zu komplexe Mechanismen beeinflusst, wäre eine umfangreiche Arbeit mit gentechnisch stabil veränderten Zellen zur Klärung allein dieser Fragestellung (die aufgrund vorheriger Publikationen zunächst als erfüllte Grundvoraussetzung angenommen wurde) notwendig gewesen. So hätte beispielsweise geprüft werden können, ob FOXM1 *Knockout* Zellen oder FOXM1 exogen überexprimierende Zellen anders auf Proteasominhibiton ansprechen als Kontrollen. Wenn FOXM1 essentiell an der Vermittlung der Therapieantwort beteiligt wäre, müsste diese Frage zu bejahen sein. Allerdings waren die gentechnischen Möglichkeiten zur Klärung dieser Fragestellung sehr eingeschränkt, weil das Labor der Arbeitsgruppe bisher keine S1 oder S2 Gentechnikzulassung hat.

Die Genexpression nach Siomycin A Behandlung wurde mit der Genexpression nach Bortezomib und Nutlin Behandlung verglichen. Es fanden sich nach der Behandlung mit Siomycin A zahlreiche Gengruppen, die Übereinstimmungen mit den Regulationsmustern nach Bortezomib und Nutlin-3a Behandlung zeigten, beispielsweise in Bezug auf Zellzyklusregulatoren und DNA Reparaturgene. Zum anderen wurden in den QGP-1 durch Siomycin A keines der typischen p53 Zielproteine (*MDM2*, *CDKN1A*, *BBC3*, *GADD45A/B*, *SFN*, *BAX*, *PMAIP1*) differentiell exprimiert. Es gibt somit zumindest Überschneidungen mit dem Muster einer p53 Aktivierung durch Nutlin, obwohl p53 in QGP-1 Zellen funktionell gar nicht aktiv ist. Ein Grund dafür könnte die Reduktion der FOXM1 Expression nach Proteasominhibitor- und Nutlinbehandlung sein, da nahezu alle Übereinstimmungen FOXM1 Zielgene betrafen.

4.5 Inhibitition der MDM2-p53 Wechselwirkung wirkt antiproliferativ in p53 wt Zellen und sensibiliert gegenüber Cisplatin

Da Proteasominhibition ingesamt jedoch unzählige weitere Parameter einschließt, wurde der alternative Ansatz einer Hemmung der MDM2-p53 Protein-Protein Wechselwirkung mittels Nutlinen weiterverfolgt. Da GEP-NEN Tumoren MDM2 überexprimieren und gleichzeitig weitestgehend Wildtyp p53 vorweisen, lag eine starke Rationale für die Analyse einer p53-stabilisierenden Therapie vor. Erwartungsgemäß zeigte keine der mutierten Zelllinien ein Ansprechen auf Nutlin, während KRJ-I Zellen konzentrations-, zeit- und substanzabhängig auf das Racemat Nutlin-3 und das höher potente Nutlin-3a Enantiomer reagierten.

Die insgesamt verhältnismäßig hohen IC50 Werte, die für Nutline gemessen wurden, deckten sich mit den allgemein verwendeten effektiven Konzentrationen aus anderen Veröffentlichungen. Zudem ist

Nutlin nicht lange stabil. Pharmakodynamische Untersuchungen dazu haben ergeben, dass eine höhere Dosis Nutlin generell bessere Erfolge erzielt als mehrere niedrige Dosen über einen längeren Inkubationszeitraum und dass die Akkumulation von p53 im Nukleus erst einen Schwellenwert überschreiten muss, um das zelluläre Schicksal zu beeinflussen [292]. Deshalb wurde in dieser Arbeit letztendlich mit verhältnismäßig hohen einmaligen Dosen gearbeitet. Vermutlich sind die hohen effektiven Konzentrationen in GEP-NEN zusätzlich dem Fakt geschuldet, dass die reine Stabilisierung von p53 in einem zellulären Kontext, in dem bisher nahezu keine starken onkogenen Treibermechanismen bekannt sind, allein keine starke pro-apoptotische Antwort erwarten lässt. Deshalb ist bei der Analyse der Nutlin-Antwort von Beginn an die Kombination mit einem DNAschädigenden Trigger mitgeführt worden, in diesem Falle wieder Cisplatin, da die Substanz selbst keine allzu starken Effekte in Monotherapie zeigt. Durch die Zugabe von Cisplatin konnte demzufolge eine Reduktion der relativen IC50 von Nutlin-3a nach 72 h um das 7-fache auf unter 200 nM erreicht werden. Entsprechend konnte auch eine deutlich erhöhte Induktion von Apoptose gezeigt werden. Obwohl nach Nutlin Monotherapie eine mäßige Apoptoseinduktion zu erkennen war, ließ der starke Rückgang der Mitosen darauf schließen, dass vor allem die Proliferation und der Zellzyklus der Zellen beeinträchtigt waren. Dass jedoch – entgegen den Erwartungen – auch in der Expressionsanalyse verhältnismäßig wenig Apoptose-Gene differentiell exprimiert waren, mag zudem mit dem späten Zeitpunkt der Zelllyse und mit dem Fakt in Verbindung stehen, dass Apoptose ein Prozess ist, der nicht überwiegend durch de novo Synthese von mRNA und Proteinen, sondern eben auch stark durch Proteinprozessierung, -modifikation und -transport gekennzeichnet ist.

Es konnte in den Expressionsanalysen und im Western Blot eine klare p53 Antwort als Kontrolle des Wirkungsmechanismus (*Proof of principle*) nachgewiesen werden, da typische p53 Zielgene/-proteine wie beispielsweise *CDKN1A*/p21, *MDM2*, *BAX*, *FAS*, *GADD45* positiv reguliert waren. Gleichzeitig konnte für eine deutliche Anzahl an positiven Zellzyklusregulatoren und DNA Reparaturgenen eine Abnahme der mRNA gezeigt werden. FOXM1 wird in diesem Zusammenhang u.a. wechselseitig von ATM und p53 reguliert, wobei p53 FOXM1 negativ beeinflusst [114, 132]. Nach Nutlin-3a Behandlung zeigten sich die Gene einer Vielzahl von DNA Reparaturwegen, einschließlich der Checkpunkte (*CHEK1*), der Basen-Exzisions-Reparatur (*FEN1*), der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (*RFC*, DNA pol ε), der *Mismatch*-Reparatur (*MSH* Gene), der Homologen-Rekombination (*BRCA* Gene, *RAD* Gene, *BRIP1*, *SKP2*) oder der *DNA interstrand cross-link* Reparatur/Fanconi Anämie Weg (*FANC* Proteine, *SKP1*) negativ reguliert. Damit bestätigte sich teilweise das Expressionsmuster, das nach Proteasominhibition der p53-defizienten QGP-1 Zelllinie auftrat (Rückgang der Expression der Checkpoint Kinasen, RAD Proteine, BRCA Proteine, BRIP1, MCM Proteine, DNA Polymerasen). Dieses lässt darauf schließen, dass

die beobachteten Effekte *downstream* von p53 koordiniert werden, z.B. durch Regulation via FOXM1. Viele Mediatoren der DNA Reparatur werden jedoch auch über das Ubiquitin-Proteasom-System kontrolliert [246] und die vergleichende Analyse von FOXM1 *Knockdown* mit Proteasominhibition zeigte keinen deutlichen Einfluss der RNAi auf Reparaturproteine. Zudem beschränken sich die Gene, die nach Proteasominhibition und Nutlin-3a Behandlung (Tabelle 3-4) betroffen sind und mit der Regulation nach Knockdown von FOXM1 (Abschnitt 3.3.1.3.5) übereinstimmen auf 10 Gene (*CCNA2, CCNB1, DNMT1, DUSP5, HDAC2, HIST1H3B, HIST1H3G, RAD21, SKP2, WHSC1*), die weitestgehend mit Zellzyklusregulation und Transkription in Verbindung stehen. Daher scheint die Schnittstelle zwischen den Behandlungen p53 zu sein und FOXM1 nur in die beiden letztgenannten Prozesse involviert zu sein.

Der Rückgang von FOXM1 nach Nutlin-3a Behandlung von Wildtyp p53 Zellen trotz Zunahme der MDM2 Expression zeigt die primäre regulatorische Abhängigkeit der FOXM1 Expression von p53. Zudem zeigte Nutlin eine Wirkung auf die Serin-35 Phosphorylierung von FOXM1 und somit mutmaßlich auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors. Dieser Aminosäurerest liegt in der N-terminalen Autorepressor-Domäne von FOXM1 und kann beispielsweise von Cyclin A/CDK-Komplexen kontrolliert werden [336]. Dessen Expression sank übereinstimmend nach Nutlin Behandlung stark ab.

Da aber in einem p53-defizienten Kontext die Inhibition von MDM2 (hier in Form von siRNA) ebenfalls die FOXM1 Expression reduzieren kann, könnte (im Hinblick auf die therapeutische Praktikabilität und den Umfang der Anwendbarkeit) die Verwendung von nicht-kompetitiven MDM2 Inhibitoren perspektivisch einen deutlichen Vorteil auch für G3 Patienten mit p53 Mutation haben. Dieser Ansatz sollte weiter verfolgt werden.

In einem mechanistischen Unterschied bei der Induktion von Seneszenz oder Quieszenz könnte begründet sein, dass nach Siomycin A – im Gegensatz Nutlin-3a – zusätzlich zur Hypophosphorylierung von Rb auch der PI3K-Weg aktiviert zu sein scheint (Hyperphosphorylierung von p70S6K, aber keine verstärkte Aktivierung von ERK1/2). Beide zellulären Vorgänge können alternativ, abhängig von der Aktivierung von AKT (und somit *bona fide* bei guter bzw. schlechter Nährstoffversorgung), durch Rb-vermittelte FOXM1 Inaktivierung und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert werden [337]. Gerade für den therapeutischen Ansatz ist eine möglichst weitreichende Elimination der Tumorzellen und Kontrolle eines Seneszenz-assoziierten Phänotyps jedoch essentiell, um Resistenzen vorzubeugen [325, 338]. Deshalb ist die bloße Induktion von Zellzyklus-Arrest, vor allem wenn er reversibel induziert wird, in Hinsicht auf eine mögliche Anwendbarkeit als nicht ausreichend zu

bewerten. Leider konnte eine Differenzierung zwischen Quieszenz und Seneszenz in dieser Arbeit nicht erfolgreich vorgenommen werden, da die durchgeführten β-Galactosidase Färbungen stets bereits bei den DMSO Kontrollen sehr starke Farbreaktionen zeigten (Daten nicht gezeigt). In der weiteren präklinischen Analyse der Substanzen, vor allem in *in vivo* Studien, wird also vor allem das Potential zur Verringerung der Tumormasse kritisch zu prüfen sein.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit der Evaluation einer deregulierten MDM2-p53-FOXM1 Achse als therapeutisches Ziel in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN).

Der Tumorsuppressor p53 ist in gut differenzierten GEP-NEN nur selten mutiert. Er ist jedoch durch aberrante Expression der p53 regulierenden Ubiquitin-Ligase MDM2 häufig funktionell eingeschränkt. Dadurch können transkriptionell reprimierte p53 Zielgene, die als Protoonkogene wirken, wie beispielweise Survivin oder FOXM1 verstärkt exprimiert werden.

Diese Arbeit widmete sich zunächst der klinischen Analyse primärer Tumorproben sowie funktioneller Abhängigkeiten in GEP-NEN Zelllinien hinsichtlich der Rolle von MDM2 und FOXM1 als Malignitätsmarker in GEP-NEN und leitete daraus therapeutische Ansätze ab. Diese wurden anschließend präklinisch in der Zellkultur bewertet.

Die Relevanz der FOXM1 Expression als Malignitätsmarker in GEP-NEN konnte in zwei unabhängigen Kollektiven sowohl mittels Western Blot als auch durch Immunhistochemie nachgewiesen werden. Hier wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem Anstieg der Expression von FOXM1 und der Abgrenzung von G1 Tumorstadien hin zu G2 und G3 Tumoren gezeigt, wobei letztere FOXM1 deutlich stärker exprimierten. Ebenso konnte eine verstärkte Expression von FOXM1 und MDM2 in Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren gezeigt werden.

In Ergänzung zur bereits bekannten regulatorischen Abhängigkeit von FOXM1 durch MDM2 via p53, konnte durch RNA Interferenz in p53 defizienten QGP-1 Zellen gezeigt werden, dass MDM2 FOXM1 auch unabhängig von p53 regulieren kann. Zudem wurde mittels pharmakologischer Modulation mit dem PTEN Inhibitor bpV(HOpic) und dem AKT Inhibitor Triciribin nachgewiesen, dass auch der PI3 Kinase-Weg - als bisher zentrales therapeutisches Ziel für molekulare Therapien in GEP-NEN - einen Einfluss auf die FOXM1 Expression haben kann. Da die Expression von FOXM1 durch Modulation des PI3 Kinase-Weges beeinflusst werden kann, ist es möglich, dass die Trias aus MDM2 Überexpression, Hyperaktivierung des PI3 Kinase-Weges und hoher FOXM1 Expression ein bedeutendes molekulares Muster für die Entstehung von GEP-NEN darstellt. Um diese Markerkombination weiter zu evaluieren, beispielsweise im Hinblick auf die Vorhersagekraft von Metastasierungsereignissen, bedarf es jedoch weiterer intensiver Studien an primärem Tumormaterial.

Anschließend wurden drei Proteasominhibitoren, Siomycin A, Bortezomib und Thiostrepton, sowie, als Antagonisten der MDM2-p53 Wechselwirkung, Nutlin-3 und Nutlin-3a auf ihre Wirksamkeit in GEP-NEN Zelllinien mittels WST-1 Proliferationsassay, Durchflusszytometrie, Western Blot und Expressionsanalysen charakterisiert.

Die beste Wirksamkeit im Sinne einer antiproliferativen Wirkung und Induktion von Apoptose wiesen Siomycin A und Bortezomib auf. Dieses konnte mittels Proliferationsassay und Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Es zeigte sich zudem in den Expressionsanalysen und im Western Blot eine deutliche Reduktion der Transkription von Genen, die die Proliferation und die DNA Reparatur beeinflussen, sowie von FOXM1 und seiner Zielgene.

Für Bortezomib zeigten die Genexpressions- und Western Blot Analysen, dass die Inhibition der DNA Reparatur in BON Zellen auch bei Induktion von genotoxischem Stress mittels Cisplatin stabil blieb und somit zu verstärktem DNA-Schaden induziertem Stress, sowie zu verstärkter Apoptoseinduktion führte. Da auch die Proliferationsstudien quantitativ synergistische Effekte in dieser Zelllinie zeigten, kann von einem sensibilisierenden Effekt gegenüber Cisplatin ausgegangen werden.

Für die Kombination von Proteasominhibition mit Chemotherapie ergab sich ein verstärkender Effekt bei gentechnischer sowie pharmakologischer Reduktion der FOXM1 Expression, hier allerdings nur bei den p53 mutierten Zelllinien. Die p53 Wildtyp (wt) Zelllinie sprach bereits sehr gut auf alle Monotherapien an, zeigte jedoch keine verstärkenden Effekte bei zusätzlicher Induktion von zellulärem Stress durch Cisplatin. Ein Grund dafür könnte sein, dass FOXM1 hier weitestgehend schwach exprimiert und zytoplasmatisch lokalisiert war und entsprechend grundsätzlich weniger therapeutische Angrifffläche bestand. Bei Verfügbarkeit einer weiteren *TP53* wt Zelllinie oder nach *Knockdown* von p53 in KRJ-I muss geklärt werden, ob dieser Effekt zelllinienspezifisch nur bei KRJ-I auftritt, oder ein generelles Charakteristikum von p53 wt Zelllinien in diesem Kontext darstellt. Zudem sollte die Rolle von p53 in der Chemotherapieantwort unter Proteasominhibition in GEP-NEN näher untersucht werden, da diese vor allem für die Kombinationstherapie von p53 Wildtyp NET-G3 versus p53 mutierten NEC-G3 relevant sein könnte.

Die Kausalität zwischen den Wirkmechanismen der Proteasominhibition mit der Inhibition von FOXM1 wurde in der Literatur vielfach als maßgeblich beschrieben. Obwohl Proteasominhibition FOXM1 und seine Zielgene inhibiert, werfen die Studien in dieser Arbeit die Frage auf, ob die induzierten Mechanismen wirklich maßgeblich FOXM1-abhängig sind, oder die Expression von FOXM1 nicht vielmehr als Folge einer Proliferationsinhibition auftritt. Im Vergleich von Bortezomb mit *FOXM1 Knockdown* Zellen ergaben sich lediglich Übereinstimmungen in der Expression Zellzyklus-assoziierter Gene. Die veränderte Regulation einer Vielzahl von FOXM1 Zielproteinen reicht an dieser Stelle jedoch nicht aus und könnte letztlich eine Folge verminderter Proliferation sein. Zum erwünschten

molekularbiologischen Erkenntnisgewinn im Sinne der initialen Thesen konnte dieser Teil der Arbeit nicht beitragen. Er liefert jedoch eine starke Rationale zur weitergehenden präklinischen Erforschung von Bortezomib, vor allem als *Radiosensitizer*.

Daher wurde ein alternativer Ansatz gewählt, in dem eine Stabilisierung von p53 gegenüber MDM2 erreicht werden sollte. Auch die Verwendung von Nutlinen zeigte (entsprechend der Wirkungsweise von Nutlin) bei den p53 wt KRJ-I Zellen einen antiproliferativen Effekt. Dieser war funktionell durch die Induktion von p53 Zielgenen, Inhibition von FOXM1 Expression und Aktivität sowie durch Reduktion von DNA Reparaturmechanismen und synergistische Kombinationseffekte mit Cisplatin gekennzeichnet.

Auf Basis der vorliegenden *in vitro* Ergebnise sollte somit die Proteasominhibiton als chemotherapiesensibilisierend in p53- mutierten GEP-NEN weiter präklinisch erforscht werden. Hier kämen vor allem höher proliferative Tumore infrage, bei denen platinbasierte Chemotherapie tatsächlich auch bereits mit mässigem Erfolg angewendet wird. Interessant wäre überdies die weitere Evaluierug dieses therapeutischen Ansatzes in Kombination mit Radiotherapie oder PRRT. Für niedrig proliferative p53 Wildtyp Tumore sollte hingegen die Proteasominhibtion in Monotherapie, bzw. die Inhibition der MDM2-p53 Interaktion weiter präklinisch erforscht werden. Eine Stratifikation von Patientensubgruppen, beispielsweise nach p53 Genotyp und FOXM1 Expression, sollte in möglichen frühen klinischen Studien unbedingt vorgenommen werden

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich FOXM1 als Progressionsmarker in GEP-NEN eignet. Zudem konnte aus anwendungsorientierter Sicht die Wirksamkeit von Proteasominhibitoren in Hinsicht auf eine mögliche GEP-NEN Therapie bestätigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass MDM2-inhibitorische Ansätze in GEP-NEN effektiv sind, wenn die notwendigen molekularen Voraussetzungen vorliegen. Die Ergebnisse zu beiden therapeutischen Ansätzen können nun die Grundlage für weiterführende translationale Studien sein.

Summary

Therapeutic options are often limited in patients diagnosed with gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NEN) thus the role of deregulated proteins of the p53 network as therapeutic targets was addressed in this work. The major objective was therefore to identify and assess novel targeted treatment strategies for GEP-NEN *in vitro*.

Unless tumor suppressor p53 is rarely mutated in GEP-NEN, the aberrant expression of its upstream regulator MDM2 results in a functional loss of p53 and a dysregulation of transcriptionally repressed protooncogenic p53 target genes. The p53 regulator MDM2, an E3 ubiquitin ligase, and the p53 transcriptional target FOXM1 were analyzed in primary GEP-NEN material in order to describe potential roles as malignancy markers and further to derive and assess novel therapeutic approaches *in vitro*.

We demonstrated through immunohistochemistry and western blots analysis that the expression of FOXM1 may serve as a new progression marker, as FOXM1 expression was associated with GEP-NEN disease grading. Here, FOXM1 expression was found significantly elevated in G2 and G3 graded tumors. We further demonstrated a higher expression of FOXM1 and MDM2 in metastatic tissue related to primary tumors.

We also demonstrated that the loss of transcriptional repression of FOXM1 due to MDM2 ubiquitinmediated proteasomal degradation of p53 may not be the only regulatory interaction of FOXM1 and MDM2. The results of RNA interference of MDM2 in p53 deficient QGP-1 cells suggests that FOXM1 may be also regulated by MDM2 in a p53-independent manner. Furthmore, modulation of the PI3 kinase pathway by inhibition through triciribin and activation through the PTEN inhibitor bpV(HOpic) proved a regulatory dependency of FOXM1 expression from a frequent hyperactivated PI3K signaling in GEP-NEN.

Subsequently, three proteasome inhibitors, siomycin A, bortezomib and thiostreptone, as well as antagonists of the MDM2-p53 interaction, namely nutlin-3 and nutlin-3a, were preclinically assessed *in vitro* by proliferation assay, flow cytometry, western blot and expression analysis.

We could show that the proteasome inhibitors siomycin A and bortezomib induced anti-proliferative as well as pro-apoptotic effects in all GEP-NEN cell lines, as demonstrated by proliferation studies and induction of cell cycle arrest, increased apoptosis, and altered expression of cell cycle and DNA repair related genes. Both substances further decreased the expression of FOXM1 itself and of FOXM1 target genes. Gene expression and western blot analyses of BON cells treated with bortezomib combined with genotoxic stress induction by cisplatin induced enhanced DNA damage stress and pro-apoptotic effects. Including the results of proliferation assays after combined treatment, synergistic genotoxic effects of bortezomib and cisplatin were concluded for three GEP-NEN cell lines with *TP53* mutations. The p53 wild type cell line showed a very strong response to all monotherapeutic treatments with no enhanced effect by additional induction of cellular stress by the use of cisplatin. This effect might be dependent on the overall low expression of FOXM1 in this cell line and should be verified by

knockdown of p53 or when another p53 wild type GEP-NEN cell line is available. The functional role of p53 in the response to chemotherapy combined with proteasome inhibition might also be interesting in the context of treating wild type G3-NET versus mutated G3-NEC tumors.

This study rises concerns about the operative role of FOXM1 in the response to proteasome inhibitors. The gene expression pattern after bortezomib treatment or *FOXM1 knockdown* was only comparable for cell cycle associated genes. The inhibition of FOXM1 and its target genes might thus not contribute to the induced mechanisms, but might be a result of reduced proliferation. Nevertheless, it provides interesting preclinical data for further assessing bortezomib in GEP-NEN, especially as radiosensitizer.

In order to explore a more target-related approach, we introduced a treatment alternative through restabilization of p53. This alternative approach, the treatment of the p53 wild type GEP-NEN cell line KRJ-I with the MDM2 antagonist nutlin, resulted in a reduced proliferation, induction of p53 target genes, inhibition of FOXM1 expression, and synergistic anti-proliferative effects in combination with cisplatin. The decreased expression of DNA-damage related genes could also be demonstrated after nutlin treatment. Finally, more than 90% of the genes affected by both proteasome inhibition and MDM2 antagonism, were transcriptional targets of FOXM1.

Based on these *in vitro* results, the chemo- and radiosensitizing effect of proteasome inhibitors should be further evaluated for the treatment of p53 mutated GEP-NEN. Especially patients with higher proliferative tumors might benefit, because chemotherapy and PRRT are already established treatment options. For slowly proliferating p53 wt tumors, proteasome inhibition as monotherapy and inhibition of MDM2 should be further assessed. In both cases, the determination of a patients genotype is essential and a *TP53* genotype stratification should be included in early clinical studies as well.

In conclusion, FOXM1 might serve as novel grading marker in GEP-NEN. Despite the inability to demonstrate a clear direct association of proteasome inhibition with FOXM1 activity, the therapeutic potential of proteasome inhibition for GEP-NEN is presented herein. Further, MDM2 inhibitory approaches are possible when the status of p53 is considered in molecular pre-screening. The results of this work provide the rationale for further translational studies on bortezomib and nutlin for the treatment of GEP-NEN disease.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Langhans, T, *Ueber einen Druesenpolyp im Ileum.* Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 1867. 38: p. 559-560.
- 2. Lubarsch, O, Ueber den primaren Krebs des Ileum nebst Bewerkungen ueber das gleichzeitige Vorkommen von Krebs und Tuberculose. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med, 1888. 111: p. 280-317.
- 3. Oberndorfer, S, *Karzinoide: Tumoren des Duenndarms.* Frank Z Pathol, 1907. 1: p. 426-429.
- 4. Modlin, IM, Oberg, K, Chung, DC, Jensen, RT, de Herder, WW, Thakker, RV, et al., *Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.* Lancet Oncol, 2008. 9(1): p. 61-72.
- 5. Klöppel, G, *Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms.* Endocr Relat Cancer, 2011. 18 Suppl 1: p. S1-16.
- 6. Oberg, K, Knigge, U, Kwekkeboom, D, and Perren, A, *Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol, 2012. 23 Suppl 7: p. vii124-30.
- 7. van der Zwan, JM, Trama, A, Otter, R, Larranaga, N, Tavilla, A, Marcos-Gragera, R, et al., *Rare neuroendocrine tumours: results of the surveillance of rare cancers in Europe project.* Eur J Cancer, 2013. 49(11): p. 2565-78.
- 8. Schimmack, S, Svejda, B, Lawrence, B, Kidd, M, and Modlin, IM, *The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Langenbecks Arch Surg, 2011. 396(3): p. 273-98.
- 9. Anlauf, M, Garbrecht, N, Bauersfeld, J, Schmitt, A, Henopp, T, Komminoth, P, et al., *Hereditary neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. Virchows Arch, 2007. 451 Suppl 1: p. S29-38.
- 10. Halperin, DM, Kulke, MH, and Yao, JC, A Tale of Two Tumors: Treating Pancreatic and Extrapancreatic Neuroendocrine Tumors. Annu Rev Med, 2014.
- 11. Rindi G., AR, Bosman FT., Capella C., Klimstra D.S., Klöppel G., Komminoth P., Solcia E., 2010 Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system., in WHO Classification of Tumours of the Digestive System, F.T. Bosman, Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D., Editor. 2010, IARC Press: Lyon. p. 13–14.
- 12. Velayoudom-Cephise, FL, Duvillard, P, Foucan, L, Hadoux, J, Chougnet, CN, Leboulleux, S, et al., *Are G3* ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? Endocr Relat Cancer, 2013. 20(5): p. 649-57.
- 13. Sorbye, H, Welin, S, Langer, SW, Vestermark, LW, Holt, N, Osterlund, P, et al., *Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study.* Ann Oncol, 2013. 24(1): p. 152-60.
- 14. Basturk, O, Yang, Z, Tang, LH, Hruban, RH, Adsay, V, McCall, CM, et al., *The High-grade (WHO G3) Pancreatic Neuroendocrine Tumor Category Is Morphologically and Biologically Heterogenous and Includes Both Well Differentiated and Poorly Differentiated Neoplasms.* Am J Surg Pathol, 2015. 39(5): p. 683-90.
- 15. Hijioka, S, Hosoda, W, Mizuno, N, Hara, K, Imaoka, H, Bhatia, V, et al., *Does the WHO 2010 classification of pancreatic neuroendocrine neoplasms accurately characterize pancreatic neuroendocrine carcinomas*? J Gastroenterol, 2015. 50(5): p. 564-72.
- 16. Pizzi, S, Azzoni, C, Bassi, D, Bottarelli, L, Milione, M, and Bordi, C, *Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract.* Cancer, 2003. 98(6): p. 1273-82.
- 17. Lubensky, IA and Zhuang, Z, *Molecular genetic events in gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumors.* Endocr Pathol, 2007. 18(3): p. 156-62.

- 18. Yachida, S, Vakiani, E, White, CM, Zhong, Y, Saunders, T, Morgan, R, et al., *Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors*. Am J Surg Pathol, 2012. 36(2): p. 173-84.
- 19. Briest, F and Grabowski, P, *The p53 network as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms.* Cancer Treat Rev, 2015.
- 20. Cheng, H and Leblond, CP, Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. Am J Anat, 1974. 141(4): p. 537-61.
- 21. Wiedenmann, B, John, M, Ahnert-Hilger, G, and Riecken, EO, *Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. J Mol Med (Berl), 1998. 76(9): p. 637-47.
- 22. Makowski, L, Caspar, DL, Phillips, WC, Baker, TS, and Goodenough, DA, *Gap junction structures. VI. Variation and conservation in connexon conformation and packing.* Biophys J, 1984. 45(1): p. 208-18.
- 23. Kwon, SE and Chapman, ER, Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. Neuron, 2011. 70(5): p. 847-54.
- 24. Höcker, M, John, M, Anagnostopoulos, J, Buhr, HJ, Solimena, M, Gasnier, B, et al., *Molecular dissection of regulated secretory pathways in human gastric enterochromaffin-like cells: an immunohistochemical analysis.* Histochem Cell Biol, 1999. 112(3): p. 205-14.
- 25. Weihe, E, Schafer, MK, Erickson, JD, and Eiden, LE, *Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat.* J Mol Neurosci, 1994. 5(3): p. 149-64.
- 26. Wiedenmann, B and Huttner, WB, Synaptophysin and chromogranins/secretogranins--widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1989. 58(2): p. 95-121.
- 27. D'Amico M, A, Ghinassi, B, Izzicupo, P, Manzoli, L, and Di Baldassarre, A, *Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides*. Endocr Connect, 2014. 3(2): p. R45-54.
- 28. Belloni, D, Scabini, S, Foglieni, C, Veschini, L, Giazzon, A, Colombo, B, et al., *The vasostatin-I fragment of chromogranin A inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration*. FASEB J, 2007. 21(12): p. 3052-62.
- 29. Theurl, M, Schgoer, W, Albrecht, K, Jeschke, J, Egger, M, Beer, AG, et al., *The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism.* Circ Res, 2010. 107(11): p. 1326-35.
- 30. Oberg, K, *Diagnostic work-up of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Clinics (Sao Paulo), 2012. 67 Suppl 1: p. 109-12.
- 31. Chou, WC, Chen, JS, Hung, YS, Hsu, JT, Chen, TC, Sun, CF, et al., *Plasma chromogranin A levels predict survival and tumor response in patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Anticancer Res, 2014. 34(10): p. 5661-9.
- 32. Wiedenmann, B and Pape, UF, From basic to clinical research in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease -- the clinician-scientist perspective. Neuroendocrinology, 2004. 80 Suppl 1: p. 94-8.
- 33. Chaudhry, A, Papanicolaou, V, Oberg, K, Heldin, CH, and Funa, K, *Expression of platelet-derived growth* factor and its receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. Cancer Res, 1992. 52(4): p. 1006-12.
- 34. Chaudhry, A, Funa, K, and Oberg, K, *Expression of growth factor peptides and their receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system.* Acta Oncol, 1993. 32(2): p. 107-14.
- 35. Chaudhry, A, Oberg, K, Gobl, A, Heldin, CH, and Funa, K, *Expression of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 in neuroendocrine tumors of the digestive system*. Anticancer Res, 1994. 14(5B): p. 2085-91.

- 36. Nilsson, O, Wangberg, B, McRae, A, Dahlstrom, A, and Ahlman, H, *Growth factors and carcinoid tumours*. Acta Oncol, 1993. 32(2): p. 115-24.
- 37. Nilsson, O, Wangberg, B, Kolby, L, Schultz, GS, and Ahlman, H, *Expression of transforming growth factor alpha and its receptor in human neuroendocrine tumours.* Int J Cancer, 1995. 60(5): p. 645-51.
- 38. Wulbrand, U, Wied, M, Zofel, P, Goke, B, Arnold, R, and Fehmann, H, *Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.* Eur J Clin Invest, 1998. 28(12): p. 1038-49.
- 39. Wulbrand, U, Remmert, G, Zofel, P, Wied, M, Arnold, R, and Fehmann, HC, *mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours.* Eur J Clin Invest, 2000. 30(8): p. 729-39.
- 40. von Wichert, G, Jehle, PM, Hoeflich, A, Koschnick, S, Dralle, H, Wolf, E, et al., *Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells.* Cancer Res, 2000. 60(16): p. 4573-81.
- 41. Peghini, PL, Iwamoto, M, Raffeld, M, Chen, YJ, Goebel, SU, Serrano, J, et al., *Overexpression of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors in a proportion of gastrinomas correlates with aggressive growth and lower curability*. Clin Cancer Res, 2002. 8(7): p. 2273-85.
- 42. Gilbert, JA, Adhikari, LJ, Lloyd, RV, Rubin, J, Haluska, P, Carboni, JM, et al., *Molecular markers for novel therapies in neuroendocrine (carcinoid) tumors*. Endocr Relat Cancer, 2010. 17(3): p. 623-36.
- 43. Gilbert, JA, Adhikari, LJ, Lloyd, RV, Halfdanarson, TR, Muders, MH, and Ames, MM, *Molecular markers for novel therapeutic strategies in pancreatic endocrine tumors.* Pancreas, 2013. 42(3): p. 411-21.
- 44. Azzoni, C, Bottarelli, L, Cecchini, S, Lagrasta, C, Pizzi, S, D'Adda, T, et al., *Involvement of HER-2/neu and metastasis-related proteins in the development of ileal neuroendocrine tumors*. Virchows Arch, 2011. 458(5): p. 525-36.
- 45. Akintola-Ogunremi, O, Pfeifer, JD, Tan, BR, Yan, Y, Zhu, X, Hart, J, et al., *Analysis of protein expression and gene mutation of c-kit in colorectal neuroendocrine carcinomas.* Am J Surg Pathol, 2003. 27(12): p. 1551-8.
- 46. Jiao, Y, Shi, C, Edil, BH, de Wilde, RF, Klimstra, DS, Maitra, A, et al., *DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors.* Science, 2011. 331(6021): p. 1199-203.
- 47. Corbo, V, Beghelli, S, Bersani, S, Antonello, D, Talamini, G, Brunelli, M, et al., *Pancreatic endocrine tumours: mutational and immunohistochemical survey of protein kinases reveals alterations in targetable kinases in cancer cell lines and rare primaries*. Ann Oncol, 2012. 23(1): p. 127-34.
- 48. Knosel, T, Chen, Y, Altendorf-Hofmann, A, Danielczok, C, Freesmeyer, M, Settmacher, U, et al., *High KIT and PDGFRA are associated with shorter patients survival in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, but mutations are a rare event.* J Cancer Res Clin Oncol, 2012. 138(3): p. 397-403.
- 49. Shah, T, Hochhauser, D, Frow, R, Quaglia, A, Dhillon, AP, and Caplin, ME, *Epidermal growth factor receptor expression and activation in neuroendocrine tumours.* J Neuroendocrinol, 2006. 18(5): p. 355-60.
- 50. Kasajima, A, Pavel, M, Darb-Esfahani, S, Noske, A, Stenzinger, A, Sasano, H, et al., *mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*. Endocr Relat Cancer, 2011. 18(1): p. 181-92.
- 51. Chan, J and Kulke, M, *Targeting the mTOR signaling pathway in neuroendocrine tumors.* Curr Treat Options Oncol, 2014. 15(3): p. 365-79.
- 52. Steck, PA, Pershouse, MA, Jasser, SA, Yung, WK, Lin, H, Ligon, AH, et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers.* Nat Genet, 1997. 15(4): p. 356-62.
- 53. Chung, DC, Brown, SB, Graeme-Cook, F, Tillotson, LG, Warshaw, AL, Jensen, RT, et al., *Localization of putative tumor suppressor loci by genome-wide allelotyping in human pancreatic endocrine tumors*. Cancer Res, 1998. 58(16): p. 3706-11.

- 54. Speel, EJ, Richter, J, Moch, H, Egenter, C, Saremaslani, P, Rutimann, K, et al., *Genetic differences in endocrine pancreatic tumor subtypes detected by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol, 1999. 155(6): p. 1787-94.
- 55. Perren, A, Komminoth, P, Saremaslani, P, Matter, C, Feurer, S, Lees, JA, et al., *Mutation and expression* analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. Am J Pathol, 2000. 157(4): p. 1097-103.
- 56. Roldo, C, Missiaglia, E, Hagan, JP, Falconi, M, Capelli, P, Bersani, S, et al., *MicroRNA expression* abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. J Clin Oncol, 2006. 24(29): p. 4677-84.
- 57. Meng, F, Henson, R, Wehbe-Janek, H, Ghoshal, K, Jacob, ST, and Patel, T, *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology, 2007. 133(2): p. 647-58.
- 58. Trindade, AJ, Medvetz, DA, Neuman, NA, Myachina, F, Yu, J, Priolo, C, et al., *MicroRNA-21 is induced by rapamycin in a model of tuberous sclerosis (TSC) and lymphangioleiomyomatosis (LAM).* PLoS One, 2013. 8(3): p. e60014.
- 59. Lee, HW, Ha, SY, and Roh, MS, Altered Expression of PTEN and Its Major Regulator MicroRNA-21 in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. Korean J Pathol, 2014. 48(1): p. 17-23.
- 60. Xu, LF, Wu, ZP, Chen, Y, Zhu, QS, Hamidi, S, and Navab, R, *MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular* proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China. PLoS One, 2014. 9(8): p. e103698.
- 61. Go, H, Jang, JY, Kim, PJ, Kim, YG, Nam, SJ, Paik, JH, et al., *MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma.* Oncotarget, 2015.
- 62. Mayo, LD and Donner, DB, A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of *Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11598-603.
- 63. Mayo, LD, Dixon, JE, Durden, DL, Tonks, NK, and Donner, DB, *PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy.* J Biol Chem, 2002. 277(7): p. 5484-9.
- 64. Gottlieb, TM, Leal, JF, Seger, R, Taya, Y, and Oren, M, *Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis.* Oncogene, 2002. 21(8): p. 1299-303.
- 65. Missiaglia, E, Dalai, I, Barbi, S, Beghelli, S, Falconi, M, della Peruta, M, et al., *Pancreatic endocrine tumors:* expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. J Clin Oncol, 2010. 28(2): p. 245-55.
- 66. Perren, A, Schmid, S, Locher, T, Saremaslani, P, Bonvin, C, Heitz, PU, et al., *BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors.* Endocr Relat Cancer, 2004. 11(4): p. 855-60.
- 67. Tannapfel, A, Vomschloss, S, Karhoff, D, Markwarth, A, Hengge, UR, Wittekind, C, et al., *BRAF gene mutations are rare events in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Am J Clin Pathol, 2005. 123(2): p. 256-60.
- 68. Sippel, RS and Chen, H, Activation of the ras/raf-1 signal transduction pathway in carcinoid tumor cells results in morphologic transdifferentiation. Surgery, 2002. 132(6): p. 1035-9; discussion 1039.
- 69. Sippel, RS, Carpenter, JE, Kunnimalaiyaan, M, Lagerholm, S, and Chen, H, *Raf-1 activation suppresses neuroendocrine marker and hormone levels in human gastrointestinal carcinoid cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. 285(2): p. G245-54.
- Van Gompel, JJ, Kunnimalaiyaan, M, Holen, K, and Chen, H, ZM336372, a Raf-1 activator, suppresses growth and neuroendocrine hormone levels in carcinoid tumor cells. Mol Cancer Ther, 2005. 4(6): p. 910-7.
- 71. Ning, L, Chen, H, and Kunnimalaiyaan, M, Focal adhesion kinase, a downstream mediator of Raf-1 signaling, suppresses cellular adhesion, migration, and neuroendocrine markers in BON carcinoid cells. Mol Cancer Res, 2010. 8(5): p. 775-82.

- 72. Agarwal, ML, Ramana, CV, Hamilton, M, Taylor, WR, DePrimo, SE, Bean, LJ, et al., *Regulation of p53 expression by the RAS-MAP kinase pathway.* Oncogene, 2001. 20(20): p. 2527-36.
- 73. Bulavin, DV, Saito, S, Hollander, MC, Sakaguchi, K, Anderson, CW, Appella, E, et al., *Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation*. EMBO J, 1999. 18(23): p. 6845-54.
- 74. She, QB, Chen, N, and Dong, Z, *ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation.* J Biol Chem, 2000. 275(27): p. 20444-9.
- 75. Chamberlain, CE, Scheel, DW, McGlynn, K, Kim, H, Miyatsuka, T, Wang, J, et al., *Menin determines K-RAS proliferative outputs in endocrine cells*. J Clin Invest, 2014. 124(9): p. 4093-101.
- 76. Liu, L, Broaddus, RR, Yao, JC, Xie, S, White, JA, Wu, TT, et al., *Epigenetic alterations in neuroendocrine tumors: methylation of RAS-association domain family 1, isoform A and p16 genes are associated with metastasis.* Mod Pathol, 2005. 18(12): p. 1632-40.
- 77. Zhang, HY, Rumilla, KM, Jin, L, Nakamura, N, Stilling, GA, Ruebel, KH, et al., Association of DNA methylation and epigenetic inactivation of RASSF1A and beta-catenin with metastasis in small bowel carcinoid tumors. Endocrine, 2006. 30(3): p. 299-306.
- 78. Capurso, G, Festa, S, Valente, R, Piciucchi, M, Panzuto, F, Jensen, RT, et al., *Molecular pathology and genetics of pancreatic endocrine tumours*. J Mol Endocrinol, 2012. 49(1): p. R37-50.
- 79. Karhoff, D, Sauer, S, Schrader, J, Arnold, R, Fendrich, V, Bartsch, DK, et al., *Rap1/B-Raf signaling is activated in neuroendocrine tumors of the digestive tract and Raf kinase inhibition constitutes a putative therapeutic target.* Neuroendocrinology, 2007. 85(1): p. 45-53.
- 80. Carracedo, A, Ma, L, Teruya-Feldstein, J, Rojo, F, Salmena, L, Alimonti, A, et al., *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer.* J Clin Invest, 2008. 118(9): p. 3065-74.
- 81. Zitzmann, K, Ruden, J, Brand, S, Goke, B, Lichtl, J, Spottl, G, et al., *Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease.* Cancer Lett, 2010. 295(1): p. 100-9.
- 82. Svejda, B, Kidd, M, Kazberouk, A, Lawrence, B, Pfragner, R, and Modlin, IM, *Limitations in small intestinal neuroendocrine tumor therapy by mTor kinase inhibition reflect growth factor-mediated PI3K feedback loop activation via ERK1/2 and AKT*. Cancer, 2011. 117(18): p. 4141-54.
- 83. Harrington, LS, Findlay, GM, Gray, A, Tolkacheva, T, Wigfield, S, Rebholz, H, et al., *The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins*. J Cell Biol, 2004. 166(2): p. 213-23.
- 84. Shah, OJ and Hunter, T, Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. Mol Cell Biol, 2006. 26(17): p. 6425-34.
- 85. Pitt, SC, Chen, H, and Kunnimalaiyaan, M, Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling suppresses tumor cell proliferation and neuroendocrine marker expression in GI carcinoid tumors. Ann Surg Oncol, 2009. 16(10): p. 2936-42.
- 86. Pitt, SC, Davis, R, Kunnimalaiyaan, M, and Chen, H, *AKT and PTEN expression in human gastrointestinal carcinoid tumors*. Am J Transl Res, 2009. 1(3): p. 291-9.
- 87. Villaume, K, Blanc, M, Gouysse, G, Walter, T, Couderc, C, Nejjari, M, et al., *VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway.* Neuroendocrinology, 2010. 91(3): p. 268-78.
- 88. Li, J, Song, J, Cassidy, MG, Rychahou, P, Starr, ME, Liu, J, et al., *PI3K p110alpha/Akt signaling negatively regulates secretion of the intestinal peptide neurotensin through interference of granule transport.* Mol Endocrinol, 2012. 26(8): p. 1380-93.
- 89. Lane, DP, *Cancer. p53, guardian of the genome.* Nature, 1992. 358(6381): p. 15-6.

- 90. Janicke, RU, Sohn, D, and Schulze-Osthoff, K, *The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53.* Cell Death Differ, 2008. 15(6): p. 959-76.
- 91. Bartz, C, Ziske, C, Wiedenmann, B, and Moelling, K, *p53 tumour suppressor gene expression in pancreatic neuroendocrine tumour cells*. Gut, 1996. 38(3): p. 403-9.
- 92. Rindi, G, Candusso, ME, and Solcia, E, *Molecular aspects of the endocrine tumours of the pancreas and the gastrointestinal tract.* Ital J Gastroenterol Hepatol, 1999. 31 Suppl 2: p. S135-8.
- 93. Grabowski, P, Schrader, J, Wagner, J, Hörsch, D, Arnold, R, Arnold, CN, et al., *Loss of nuclear p27* expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Clin Cancer Res, 2008. 14(22): p. 7378-84.
- 94. Weisbrod, AB, Zhang, L, Jain, M, Barak, S, Quezado, MM, and Kebebew, E, *Altered PTEN, ATRX, CHGA, CHGB, and TP53 Expression Are Associated with Aggressive VHL-Associated Pancreatic Neuroendocrine Tumors.* Horm Cancer, 2013. 4(3): p. 165-75.
- 95. Lang, D, Miknyoczki, SJ, Huang, L, and Ruggeri, BA, *Stable reintroduction of wild-type P53 (MTmp53ts)* causes the induction of apoptosis and neuroendocrine-like differentiation in human ductal pancreatic carcinoma cells. Oncogene, 1998. 16(12): p. 1593-602.
- 96. Tang, J, Qu, LK, Zhang, J, Wang, W, Michaelson, JS, Degenhardt, YY, et al., *Critical role for Daxx in regulating Mdm2*. Nat Cell Biol, 2006. 8(8): p. 855-62.
- 97. Tang, J, Qu, L, Pang, M, and Yang, X, *Daxx is reciprocally regulated by Mdm2 and Hausp.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. 393(3): p. 542-5.
- 98. Meulmeester, E, Pereg, Y, Shiloh, Y, and Jochemsen, AG, *ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation.* Cell Cycle, 2005. 4(9): p. 1166-70.
- 99. Khoronenkova, SV and Dianov, GL, *Regulation of USP7/HAUSP in response to DNA damage: yet another role for ATM.* Cell Cycle, 2012. 11(13): p. 2409-10.
- 100. Khoronenkova, SV, Dianova, II, Ternette, N, Kessler, BM, Parsons, JL, and Dianov, GL, *ATM-dependent downregulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage*. Mol Cell, 2012. 45(6): p. 801-13.
- 101. Brazina, J, Svadlenka, J, Macurek, L, Andera, L, Hodny, Z, Bartek, J, et al., *DNA damage-induced regulatory interplay between DAXX, p53, ATM kinase and Wip1 phosphatase.* Cell Cycle, 2015. 14(3): p. 375-87.
- 102. Shreeram, S, Demidov, ON, Hee, WK, Yamaguchi, H, Onishi, N, Kek, C, et al., *Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways.* Mol Cell, 2006. 23(5): p. 757-64.
- 103. Lubomierski, N, Kersting, M, Bert, T, Muench, K, Wulbrand, U, Schuermann, M, et al., *Tumor suppressor* genes in the 9p21 gene cluster are selective targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. Cancer Res, 2001. 61(15): p. 5905-10.
- 104. Chan, AO, Kim, SG, Bedeir, A, Issa, JP, Hamilton, SR, and Rashid, A, *CpG island methylation in carcinoid and pancreatic endocrine tumors.* Oncogene, 2003. 22(6): p. 924-34.
- 105. Simon, B and Lubomierski, N, *Implication of the INK4a/ARF locus in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumorigenesis.* Ann N Y Acad Sci, 2004. 1014: p. 284-99.
- 106. Lee, J, Sung, CO, Lee, EJ, Do, IG, Kim, HC, Yoon, SH, et al., *Metastasis of neuroendocrine tumors are characterized by increased cell proliferation and reduced expression of the ATM gene*. PLoS One, 2012. 7(4): p. e34456.
- 107. Shin, JU, Lee, CH, Lee, KT, Lee, JK, Lee, KH, Kim, KM, et al., *Prognostic significance of ATM and cyclin B1 in pancreatic neuroendocrine tumor.* Tumour Biol, 2012. 33(5): p. 1645-51.
- 108. Hu, W, Feng, Z, Modica, I, Klimstra, DS, Song, L, Allen, PJ, et al., Gene Amplifications in Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors Inactivate the p53 Pathway. Genes Cancer, 2010. 1(4): p. 360-368.

- 109. Song, MS, Song, SJ, Kim, SY, Oh, HJ, and Lim, DS, *The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex.* EMBO J, 2008. 27(13): p. 1863-74.
- 110. Ogawara, Y, Kishishita, S, Obata, T, Isazawa, Y, Suzuki, T, Tanaka, K, et al., *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. J Biol Chem, 2002. 277(24): p. 21843-50.
- 111. Feng, J, Tamaskovic, R, Yang, Z, Brazil, DP, Merlo, A, Hess, D, et al., *Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation*. J Biol Chem, 2004. 279(34): p. 35510-7.
- 112. Zitzmann, K, Vlotides, G, Brand, S, Lahm, H, Spottl, G, Goke, B, et al., *Perifosine-mediated Akt inhibition in neuroendocrine tumor cells: role of specific Akt isoforms*. Endocr Relat Cancer, 2012. 19(3): p. 423-34.
- 113. Lu, X, Ma, O, Nguyen, TA, Jones, SN, Oren, M, and Donehower, LA, *The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop.* Cancer Cell, 2007. 12(4): p. 342-54.
- 114. Millour, J, de Olano, N, Horimoto, Y, Monteiro, LJ, Langer, JK, Aligue, R, et al., *ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance*. Mol Cancer Ther, 2011. 10(6): p. 1046-58.
- 115. Zhang, H, He, J, Li, J, Tian, D, Gu, L, and Zhou, M, *Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX.* FASEB J, 2013. 27(1): p. 232-42.
- 116. de Moraes, E, Dar, NA, de Moura Gallo, CV, and Hainaut, P, *Cross-talks between cyclooxygenase-2 and tumor suppressor protein p53: Balancing life and death during inflammatory stress and carcinogenesis.* Int J Cancer, 2007. 121(5): p. 929-37.
- 117. Wu, CC, Yang, TY, Yu, CT, Phan, L, Ivan, C, Sood, AK, et al., *p53 negatively regulates Aurora A via both transcriptional and posttranslational regulation*. Cell Cycle, 2012. 11(18): p. 3433-42.
- 118. Wang, DG, Johnston, CF, and Buchanan, KD, Oncogene expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: implications for pathogenesis. Cancer, 1997. 80(4): p. 668-75.
- 119. Canavese, G, Azzoni, C, Pizzi, S, Corleto, VD, Pasquali, C, Davoli, C, et al., *p27: a potential main inhibitor of cell proliferation in digestive endocrine tumors but not a marker of benign behavior*. Hum Pathol, 2001. 32(10): p. 1094-101.
- 120. Detjen, KM, Welzel, M, Wiedenmann, B, and Rosewicz, S, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit growth of human neuroendocrine tumor cells via G1 cell-cycle arrest.* Int J Cancer, 2003. 107(5): p. 844-53.
- 121. Grabowski, P, Griss, S, Arnold, CN, Hörsch, D, Goke, R, Arnold, R, et al., *Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease*. Neuroendocrinology, 2005. 81(1): p. 1-9.
- 122. Mizuno, S, Kato, K, Hashimoto, A, Sugitani, M, Sheikh, A, Komuro, S, et al., *Expression of cyclo-oxygenase-2 in gastrointestinal carcinoid tumors.* J Gastroenterol Hepatol, 2006. 21(8): p. 1313-9.
- 123. Bergmann, F, Breinig, M, Hopfner, M, Rieker, RJ, Fischer, L, Kohler, C, et al., *Expression pattern and functional relevance of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2: novel chemotherapeutic targets in pancreatic endocrine tumors?* Am J Gastroenterol, 2009. 104(1): p. 171-81.
- 124. Georgieva, I, Koychev, D, Wang, Y, Holstein, J, Hopfenmuller, W, Zeitz, M, et al., *ZM447439, a novel* promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines. Neuroendocrinology, 2010. 91(2): p. 121-30.
- 125. Fraedrich, K, Schrader, J, Ittrich, H, Keller, G, Gontarewicz, A, Matzat, V, et al., *Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model.* Clin Cancer Res, 2012. 18(17): p. 4621-32.
- 126. Abdel-Rahman, O, Vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway and neuroendocrine neoplasms (NENs): prognostic and therapeutic considerations. Tumour Biol, 2014. 35(11): p. 10615-25.

- 127. Bocangel, D, Sengupta, S, Mitra, S, and Bhakat, KK, *p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor.* Anticancer Res, 2009. 29(10): p. 3741-50.
- 128. Kulke, MH, Hornick, JL, Frauenhoffer, C, Hooshmand, S, Ryan, DP, Enzinger, PC, et al., *O6-methylguanine DNA methyltransferase deficiency and response to temozolomide-based therapy in patients with neuroendocrine tumors.* Clin Cancer Res, 2009. 15(1): p. 338-45.
- 129. Schmitt, AM, Pavel, M, Rudolph, T, Dawson, H, Blank, A, Komminoth, P, et al., *Prognostic and Predictive Roles of MGMT Protein Expression and Promoter Methylation in Sporadic Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms*. Neuroendocrinology, 2014.
- 130. Bobustuc, GC, Patel, A, Thompson, M, Srivenugopal, KS, Frick, J, Weese, J, et al., *MGMT inhibition* suppresses survivin expression in pancreatic cancer. Pancreas, 2015. 44(4): p. 626-35.
- 131. Wang, IC, Chen, YJ, Hughes, D, Petrovic, V, Major, ML, Park, HJ, et al., *Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase.* Mol Cell Biol, 2005. 25(24): p. 10875-94.
- 132. Zona, S, Bella, L, Burton, MJ, Nestal de Moraes, G, and Lam, EW, *FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance.* Biochim Biophys Acta, 2014. 1839(11): p. 1316-22.
- 133. Terris, B, Meddeb, M, Marchio, A, Danglot, G, Flejou, JF, Belghiti, J, et al., *Comparative genomic hybridization analysis of sporadic neuroendocrine tumors of the digestive system.* Genes Chromosomes Cancer, 1998. 22(1): p. 50-6.
- 134. Kytola, S, Hoog, A, Nord, B, Cedermark, B, Frisk, T, Larsson, C, et al., *Comparative genomic hybridization identifies loss of 18q22-qter as an early and specific event in tumorigenesis of midgut carcinoids*. Am J Pathol, 2001. 158(5): p. 1803-8.
- 135. Tonnies, H, Toliat, MR, Ramel, C, Pape, UF, Neitzel, H, Berger, W, et al., *Analysis of sporadic neuroendocrine tumours of the enteropancreatic system by comparative genomic hybridisation.* Gut, 2001. 48(4): p. 536-41.
- 136. Hashemi, J, Fotouhi, O, Sulaiman, L, Kjellman, M, Hoog, A, Zedenius, J, et al., *Copy number alterations in small intestinal neuroendocrine tumors determined by array comparative genomic hybridization*. BMC Cancer, 2013. 13: p. 505.
- 137. Gebauer, N, Schmidt-Werthern, C, Bernard, V, Feller, AC, Keck, T, Begum, N, et al., *Genomic landscape of pancreatic neuroendocrine tumors*. World J Gastroenterol, 2014. 20(46): p. 17498-506.
- 138. Alanen, KA, Falkmer, UG, Klemi, PJ, Joensuu, H, and Falkmer, S, *Flow and image cytometric study of pancreatic neuroendocrine tumours: frequent DNA aneuploidy and an association with the clinical outcome.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1992. 421(2): p. 121-5.
- 139. Kidd, M, Modlin, IM, Bodei, L, and Drozdov, I, *Decoding the Molecular and Mutational Ambiguities Of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasm Pathobiology*. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2015. 1(2): p. 131-153.
- 140. La Rosa, S, Uccella, S, Erba, S, Capella, C, and Sessa, F, *Immunohistochemical detection of fibroblast growth factor receptors in normal endocrine cells and related tumors of the digestive system*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001. 9(4): p. 319-28.
- 141. Subhi, AL, Tang, B, Balsara, BR, Altomare, DA, Testa, JR, Cooper, HS, et al., *Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2004. 10(21): p. 7290-6.
- 142. Nakakura, EK, Sriuranpong, VR, Kunnimalaiyaan, M, Hsiao, EC, Schuebel, KE, Borges, MW, et al., *Regulation of neuroendocrine differentiation in gastrointestinal carcinoid tumor cells by notch signaling.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. 90(7): p. 4350-6.
- 143. Cingarlini, S, Bonomi, M, Corbo, V, Scarpa, A, and Tortora, G, *Profiling mTOR pathway in neuroendocrine tumors*. Target Oncol, 2012. 7(3): p. 183-8.

- 144. Gortz, B, Roth, J, Krahenmann, A, de Krijger, RR, Muletta-Feurer, S, Rutimann, K, et al., *Mutations and allelic deletions of the MEN1 gene are associated with a subset of sporadic endocrine pancreatic and neuroendocrine tumors and not restricted to foregut neoplasms*. Am J Pathol, 1999. 154(2): p. 429-36.
- 145. Stalberg, P, Granberg, D, Carling, T, Wilander, E, Eriksson, B, Gobl, A, et al., *In situ RNA-RNA hybridisation of phospholipase C beta 3 shows lack of expression in neuroendocrine tumours.* Anticancer Res, 2003. 23(3B): p. 2227-32.
- 146. Kawahara, M, Kammori, M, Kanauchi, H, Noguchi, C, Kuramoto, S, Kaminishi, M, et al., *Immunohistochemical prognostic indicators of gastrointestinal carcinoid tumours*. Eur J Surg Oncol, 2002. 28(2): p. 140-6.
- 147. Yao, JC, *Neuroendocrine tumors. Molecular targeted therapy for carcinoid and islet-cell carcinoma.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. 21(1): p. 163-72.
- 148. Edfeldt, K, Ahmad, T, Akerstrom, G, Janson, ET, Hellman, P, Stalberg, P, et al., *TCEB3C a putative tumor suppressor gene of small intestinal neuroendocrine tumors*. Endocr Relat Cancer, 2014. 21(2): p. 275-84.
- 149. Rahman, MM, Qian, ZR, Wang, EL, Yoshimoto, K, Nakasono, M, Sultana, R, et al., *DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b overexpression and clinical significance in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Hum Pathol, 2010. 41(8): p. 1069-78.
- 150. Schimmack, S, Taylor, A, Lawrence, B, Schmitz-Winnenthal, H, Fischer, L, Buchler, MW, et al., *Stathmin in pancreatic neuroendocrine neoplasms: a marker of proliferation and PI3K signaling*. Tumour Biol, 2015. 36(1): p. 399-408.
- 151. Di Florio, A, Capurso, G, Milione, M, Panzuto, F, Geremia, R, Delle Fave, G, et al., *Src family kinase activity regulates adhesion, spreading and migration of pancreatic endocrine tumour cells*. Endocr Relat Cancer, 2007. 14(1): p. 111-24.
- 152. Heaphy, CM, de Wilde, RF, Jiao, Y, Klein, AP, Edil, BH, Shi, C, et al., *Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations.* Science, 2011. 333(6041): p. 425.
- 153. Marinoni, I, Kurrer, AS, Vassella, E, Dettmer, M, Rudolph, T, Banz, V, et al., *Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors.* Gastroenterology, 2014. 146(2): p. 453-60 e5.
- 154. Kim, HS, Lee, HS, Nam, KH, Choi, J, and Kim, WH, *Telomere length abnormalities and telomerase RNA component expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.* Anticancer Res, 2015. 35(6): p. 3501-10.
- 155. Lovejoy, CA, Li, W, Reisenweber, S, Thongthip, S, Bruno, J, de Lange, T, et al., *Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway.* PLoS Genet, 2012. 8(7): p. e1002772.
- 156. Conte, D, Huh, M, Goodall, E, Delorme, M, Parks, RJ, and Picketts, DJ, *Loss of Atrx sensitizes cells to DNA damaging agents through p53-mediated death pathways.* PLoS One, 2012. 7(12): p. e52167.
- 157. House, MG, Herman, JG, Guo, MZ, Hooker, CM, Schulick, RD, Lillemoe, KD, et al., *Aberrant hypermethylation of tumor suppressor genes in pancreatic endocrine neoplasms*. Ann Surg, 2003. 238(3): p. 423-31; discussion 431-2.
- 158. Bartsch, DK, Kersting, M, Wild, A, Ramaswamy, A, Gerdes, B, Schuermann, M, et al., *Low frequency of p16(INK4a) alterations in insulinomas*. Digestion, 2000. 62(2-3): p. 171-7.
- 159. Choi, IS, Estecio, MR, Nagano, Y, Kim do, H, White, JA, Yao, JC, et al., *Hypomethylation of LINE-1 and Alu in well-differentiated neuroendocrine tumors (pancreatic endocrine tumors and carcinoid tumors).* Mod Pathol, 2007. 20(7): p. 802-10.
- 160. Fotouhi, O, Adel Fahmideh, M, Kjellman, M, Sulaiman, L, Hoog, A, Zedenius, J, et al., *Global hypomethylation and promoter methylation in small intestinal neuroendocrine tumors: an in vivo and in vitro study.* Epigenetics, 2014. 9(7): p. 987-97.
- 161. Schulz, WA, Steinhoff, C, and Florl, AR, *Methylation of endogenous human retroelements in health and disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. 310: p. 211-50.

- 162. Anthony, LB, Strosberg, JR, Klimstra, DS, Maples, WJ, O'Dorisio, TM, Warner, RR, et al., *The NANETS* consensus guidelines for the diagnosis and management of gastrointestinal neuroendocrine tumors (nets): well-differentiated nets of the distal colon and rectum. Pancreas, 2010. 39(6): p. 767-74.
- 163. Kulke, MH, Anthony, LB, Bushnell, DL, de Herder, WW, Goldsmith, SJ, Klimstra, DS, et al., *NANETS* treatment guidelines: well-differentiated neuroendocrine tumors of the stomach and pancreas. Pancreas, 2010. 39(6): p. 735-52.
- 164. Pavel, M, Baudin, E, Couvelard, A, Krenning, E, Oberg, K, Steinmuller, T, et al., *ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary.* Neuroendocrinology, 2012. 95(2): p. 157-76.
- 165. Kunz, PL, Reidy-Lagunes, D, Anthony, LB, Bertino, EM, Brendtro, K, Chan, JA, et al., *Consensus guidelines for the management and treatment of neuroendocrine tumors*. Pancreas, 2013. 42(4): p. 557-77.
- 166. Strosberg, JR, Coppola, D, Klimstra, DS, Phan, AT, Kulke, MH, Wiseman, GA, et al., *The NANETS consensus guidelines for the diagnosis and management of poorly differentiated (high-grade) extrapulmonary neuroendocrine carcinomas.* Pancreas, 2010. 39(6): p. 799-800.
- 167. Yao, JC, Phan, AT, Jehl, V, Shah, G, and Meric-Bernstam, F, *Everolimus in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: the clinical experience.* Cancer Res, 2013. 73(5): p. 1449-53.
- 168. Hofland, LJ and Lamberts, SW, *The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance.* Endocr Rev, 2003. 24(1): p. 28-47.
- 169. O'Toole, D, Couvelard, A, Rebours, V, Zappa, M, Hentic, O, Hammel, P, et al., *Molecular markers* associated with response to chemotherapy in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. Endocr Relat Cancer, 2010. 17(4): p. 847-56.
- 170. Teh, MT, Initiation of Human Tumourigenesis: Upregulation of FOXM1 Transcription Factor, in Stem Cells and Cancer Stem Cells, Therapeutic Applications in Disease and Injury: Volume 3, M.A. Hayat, Editor. 2011, Springer Netherlands. p. 149-154.
- 171. Hanahan, D and Weinberg, RA, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
- 172. Halasi, M and Gartel, AL, *FOX(M1) news--it is cancer*. Mol Cancer Ther, 2013. 12(3): p. 245-54.
- 173.
 Laoukili, J, Alvarez, F, M., and Medema, RH. FOXM1 (forkhead box M1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
 2008
 02/2008;
 12(6):[Available
 from: http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/FOXM1ID40631ch12p13.html.
- 174. Wierstra, I, The transcription factor FOXM1 (Forkhead box M1): proliferation-specific expression, transcription factor function, target genes, mouse models, and normal biological roles. Adv Cancer Res, 2013. 118: p. 97-398.
- 175. Hacker, U, Grossniklaus, U, Gehring, WJ, and Jackle, H, *Developmentally regulated Drosophila gene family encoding the fork head domain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(18): p. 8754-8.
- 176. Ye, H, Kelly, TF, Samadani, U, Lim, L, Rubio, S, Overdier, DG, et al., *Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues.* Mol Cell Biol, 1997. 17(3): p. 1626-41.
- 177. Wierstra, I, FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis: overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy. Adv Cancer Res, 2013. 119: p. 191-419.
- 178. Nestal de Moraes, G, Bella, L, Zona, S, Burton, MJ, and Lam, EW, *Insights into a Critical Role of the FOXO3a-FOXM1 Axis in DNA Damage Response and Genotoxic Drug Resistance*. Curr Drug Targets, 2014.
- 179. Zhang, Y, Zhang, N, Dai, B, Liu, M, Sawaya, R, Xie, K, et al., *FoxM1B transcriptionally regulates vascular* endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. Cancer Res, 2008. 68(21): p. 8733-42.

- 180. Park, HJ, Gusarova, G, Wang, Z, Carr, JR, Li, J, Kim, KH, et al., *Deregulation of FoxM1b leads to tumour metastasis*. EMBO Mol Med, 2011. 3(1): p. 21-34.
- 181. Lam, EW, Brosens, JJ, Gomes, AR, and Koo, CY, *Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony*. Nat Rev Cancer, 2013. 13(7): p. 482-95.
- Lundqvist, M, Mark, J, Funa, K, Heldin, NE, Morstyn, G, Wedell, B, et al., *Characterisation of a cell line* (*LCC-18*) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. Eur J Cancer, 1991. 27(12): p. 1663-8.
- 183. Grozinsky-Glasberg, S, Shimon, I, and Rubinfeld, H, *The role of cell lines in the study of neuroendocrine tumors*. Neuroendocrinology, 2012. 96(3): p. 173-87.
- 184. Iguchi, H, Hayashi, I, and Kono, A, *A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): release experiment and immunohistochemical study.* Cancer Res, 1990. 50(12): p. 3691-3.
- 185. Krieg, A, Mersch, S, Boeck, I, Dizdar, L, Weihe, E, Hilal, Z, et al., New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. PLoS One, 2014. 9(2): p. e88713.
- 186. Babu, V, Paul, N, and Yu, R, *Animal models and cell lines of pancreatic neuroendocrine tumors*. Pancreas, 2013. 42(6): p. 912-23.
- 187. Nilsson, O, Wangberg, B, Johansson, L, Modlin, IM, and Ahlman, H, *Praomys (Mastomys) natalensis: a model for gastric carcinoid formation.* Yale J Biol Med, 1992. 65(6): p. 741-51; discussion 827-9.
- 188. Fossmark, R, Qvigstad, G, and Waldum, HL, *Gastric cancer: animal studies on the risk of hypoacidity and hypergastrinemia.* World J Gastroenterol, 2008. 14(11): p. 1646-51.
- 189. Wang, DG, Johnston, CF, Anderson, N, Sloan, JM, and Buchanan, KD, Overexpression of the tumour suppressor gene p53 is not implicated in neuroendocrine tumour carcinogenesis. J Pathol, 1995. 175(4): p. 397-401.
- 190. Ha, SY, Lee, CH, Chang, HK, Chang, S, Kwon, KY, Lee, EH, et al., *Differential expression of forkhead box M1 and its downstream cyclin-dependent kinase inhibitors* p27(kip1) and p21(waf1/cip1) in the diagnosis of pulmonary neuroendocrine tumours. Histopathology, 2012. 60(5): p. 731-9.
- 191. Carrano, AC, Eytan, E, Hershko, A, and Pagano, M, *SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27.* Nat Cell Biol, 1999. 1(4): p. 193-9.
- 192. Totary-Jain, H, Sanoudou, D, Dautriche, CN, Schneller, H, Zambrana, L, and Marks, AR, *Rapamycin* resistance is linked to defective regulation of *Skp2*. Cancer Res, 2012. 72(7): p. 1836-43.
- 193. Evers, BM, Townsend, CM, Jr., Upp, JR, Allen, E, Hurlbut, SC, Kim, SW, et al., *Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth.* Gastroenterology, 1991. 101(2): p. 303-11.
- 194. Kaku, M, Nishiyama, T, Yagawa, K, and Abe, M, *Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma*. Gan, 1980. 71(5): p. 596-601.
- 195. Pfragner, R, Wirnsberger, G, Niederle, B, Behmel, A, Rinner, I, Mandl, A, et al., *Establishment of a continuous cell line from a human carcinoid of the small intestine (KRJ-I).* Int J Oncol, 1996. 8(3): p. 513-20.
- 196. Ponten, J and Saksela, E, Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. Int J Cancer, 1967. 2(5): p. 434-47.
- 197. Briest, F, Berg, E, Grass, I, Freitag, H, Kaemmerer, D, Lewens, F, et al., *FOXM1: A novel drug target in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Oncotarget, 2015. 6(10): p. 8185-99.
- 198. *The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project.* Science, 2004. 306(5696): p. 636-40.
- 199. A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). PLoS Biol, 2011. 9(4): p. e1001046.

- 200. Sbisà, E, Catalano, D, Grillo, G, Licciulli, F, Turi, A, Liuni, S, et al., *p53FamTaG: a database resource of human p53, p63 and p73 direct target genes combining in silico prediction and microarray data.* BMC Bioinformatics, 2007. 8(Suppl 1): p. S20.
- 201. Mi, H, Lazareva-Ulitsky, B, Loo, R, Kejariwal, A, Vandergriff, J, Rabkin, S, et al., *The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways.* Nucleic Acids Res, 2005. 33(Database issue): p. D284-8.
- 202. Thomas, PD, Campbell, MJ, Kejariwal, A, Mi, H, Karlak, B, Daverman, R, et al., *PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function*. Genome Res, 2003. 13(9): p. 2129-41.
- 203. Bradford, MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
- 204. Renart, J, Reiser, J, and Stark, GR, *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(7): p. 3116-20.
- 205. Towbin, H, Staehelin, T, and Gordon, J, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
- 206. Kulkarni, MM, *Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system*. Curr Protoc Mol Biol, 2011. Chapter 25: p. Unit25B 10.
- 207. Fortina, P and Surrey, S, Digital mRNA profiling. Nat Biotechnol, 2008. 26(3): p. 293-4.
- 208. Iglewicz, B and Hoaglin, D, *How to Detect and Handle Outliers* in *Asqc Basic References in Quality Control*. 1993, Amer Society for Quality Control.
- 209. Sebaugh, JL, *Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation*. Pharm Stat, 2011. 10(2): p. 128-34.
- 210. Chou, TC, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev, 2006. 58(3): p. 621-81.
- 211. <u>http://www.combosyn.com/</u>. [cited 2015 02/01/2015].
- 212. Irizarry, RA, Bolstad, BM, Collin, F, Cope, LM, Hobbs, B, and Speed, TP, *Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(4): p. e15.
- 213. Irizarry, RA, Hobbs, B, Collin, F, Beazer-Barclay, YD, Antonellis, KJ, Scherf, U, et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.* Biostatistics, 2003. 4(2): p. 249-64.
- 214. Bolstad, BM, Irizarry, RA, Astrand, M, and Speed, TP, *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.* Bioinformatics, 2003. 19(2): p. 185-93.
- 215. Fisher, R, Statistical Methods for Research Workers. 1925, Edinburgh: Oliver & Boyd.
- 216. Benjamini, Y and Hochberg, Y, *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.* Journal of the Royal Statistical Society, Series B, 1995. 57(1): p. 289-300
- 217. Eisenhart, C, *The assumptions underlying the analysis of variance*. Biometrics, 1947. 3(1): p. 1-21.
- 218. Tamhane, A and Dunlop, D, *Statistics and Data Analysis from Elementary to Intermediate.* 2000: Prentice Hall.
- 219. Vogelstein, B, Papadopoulos, N, Velculescu, VE, Zhou, S, Diaz, LA, Jr., and Kinzler, KW, *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. 339(6127): p. 1546-58.
- 220. Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, Poppe, B, Van Roy, N, De Paepe, A, et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.* Genome Biol, 2002. 3(7): p. RESEARCH0034.
- 221. Tomfohr, J, Lu, J, and Kepler, TB, *Pathway level analysis of gene expression using singular value decomposition.* BMC Bioinformatics, 2005. 6: p. 225.

- 222. Subramanian, A, Tamayo, P, Mootha, VK, Mukherjee, S, Ebert, BL, Gillette, MA, et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(43): p. 15545-50.
- 223. Luo, W and Brouwer, C, *Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization*. Bioinformatics, 2013. 29(14): p. 1830-1.
- 224. Danaher, P, Rhodes, M, Irving, L, Bailey, C, Dennis, L, and Beechem, J *Using the PanCancer Pathways Analysis Module for Analysis of nCounter*[®] *PanCancer Pathways Data*. 2015. NanoString Technologies.
- 225. Burgering, BM and Medema, RH, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty.* J Leukoc Biol, 2003. 73(6): p. 689-701.
- 226. Leslie, NR, Batty, IH, Maccario, H, Davidson, L, and Downes, CP, *Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability.* Oncogene, 2008. 27(41): p. 5464-76.
- 227. Höpfner, M, Sutter, AP, Gerst, B, Zeitz, M, and Scherübl, H, A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (*ZD1839*). Br J Cancer, 2003. 89(9): p. 1766-75.
- 228. Moiseeva, O, Bourdeau, V, Vernier, M, Dabauvalle, MC, and Ferbeyre, G, *Retinoblastoma-independent regulation of cell proliferation and senescence by the p53-p21 axis in lamin A /C-depleted cells.* Aging Cell, 2011. 10(5): p. 789-97.
- 229. Wilson, MS, Brosens, JJ, Schwenen, HD, and Lam, EW, FOXO and FOXM1 in cancer: the FOXO-FOXM1 axis shapes the outcome of cancer chemotherapy. Curr Drug Targets, 2011. 12(9): p. 1256-66.
- 230. Ho, CY and Lammerding, J, Lamins at a glance. J Cell Sci, 2012. 125(Pt 9): p. 2087-93.
- 231. Calhoun, S and Daggett, V, Structural effects of the L145Q, V157F, and R282W cancer-associated mutations in the p53 DNA-binding core domain. Biochemistry, 2011. 50(23): p. 5345-53.
- 232. Briest, F, Grass, I, Möbs, M, Christen, F, Mende, S, Kaemmerer, D, et al., *Targeting the MDM2-p53-FOXM1 axis is highly effective in p53 wild type GEP-NEN*. in Revision in Endocrine Related Cancer
- 233. Lopez, JR, Claessen, SM, Macville, MV, Albrechts, JC, Skogseid, B, and Speel, EJ, *Spectral karyotypic and comparative genomic analysis of the endocrine pancreatic tumor cell line BON-1*. Neuroendocrinology, 2010. 91(2): p. 131-41.
- 234. Vandamme, T, Peeters, M, Dogan, F, Pauwels, P, Van Assche, E, Beyens, M, et al., *Whole exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1.* J Mol Endocrinol, 2015.
- 235. canSAR QGP-1 Mutations Cell Line Synopsis. [cited 2015 23/04]; Available from: https://cansar.icr.ac.uk/cansar/cell-lines/QGP-1/mutations/.
- 236. Mencalha, AL, Binato, R, Ferreira, GM, Du Rocher, B, and Abdelhay, E, *Forkhead box M1 (FoxM1) gene is a new STAT3 transcriptional factor target and is essential for proliferation, survival and DNA repair of K562 cell line.* PLoS One, 2012. 7(10): p. e48160.
- 237. Bartz, SR, Zhang, Z, Burchard, J, Imakura, M, Martin, M, Palmieri, A, et al., *Small interfering RNA screens reveal enhanced cisplatin cytotoxicity in tumor cells having both BRCA network and TP53 disruptions.* Mol Cell Biol, 2006. 26(24): p. 9377-86.
- 238. Wu, J, Zhang, X, Zhang, L, Wu, CY, Rezaeian, AH, Chan, CH, et al., *Skp2 E3 ligase integrates ATM activation and homologous recombination repair by ubiquitinating NBS1*. Mol Cell, 2012. 46(3): p. 351-61.
- 239. Barsotti, AM and Prives, C, *Pro-proliferative FoxM1 is a target of p53-mediated repression*. Oncogene, 2009. 28(48): p. 4295-305.
- 240. Pandit, B, Halasi, M, and Gartel, AL, *p53 negatively regulates expression of FoxM1*. Cell Cycle, 2009. 8(20): p. 3425-7.
- 241. Schmid, AC, Byrne, RD, Vilar, R, and Woscholski, R, *Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors*. FEBS Lett, 2004. 566(1-3): p. 35-8.

- 242. Couderc, C, Poncet, G, Villaume, K, Blanc, M, Gadot, N, Walter, T, et al., *Targeting the PI3K/mTOR* pathway in murine endocrine cell lines: in vitro and in vivo effects on tumor cell growth. Am J Pathol, 2011. 178(1): p. 336-44.
- 243. Gartel, AL, A new target for proteasome inhibitors: FoxM1. Expert Opin Investig Drugs, 2010. 19(2): p. 235-42.
- 244. Radhakrishnan, SK, Bhat, UG, Hughes, DE, Wang, IC, Costa, RH, and Gartel, AL, *Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1*. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9731-5.
- 245. Halasi, M and Gartel, AL, A novel mode of FoxM1 regulation: positive auto-regulatory loop. Cell Cycle, 2009. 8(12): p. 1966-7.
- 246. Falaschetti, C, Mirkin, E, Raha, S, Paunesku, T, and Woloschak, G, *The Ubiquitin-Proteasome System and DNA Repair*, in *DNA Repair On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*, F. Storici, Editor. 2011, InTech: Rijeka, Croatia. p. 255-286.
- 247. Jacquemont, C and Taniguchi, T, *Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation.* Cancer Res, 2007. 67(15): p. 7395-405.
- 248. Takeshita, T, Wu, W, Koike, A, Fukuda, M, and Ohta, T, *Perturbation of DNA repair pathways by proteasome inhibitors corresponds to enhanced chemosensitivity of cells to DNA damage-inducing agents.* Cancer Chemother Pharmacol, 2009. 64(5): p. 1039-46.
- 249. Karpov, DS, Spasskaya, DS, Tutyaeva, VV, Mironov, AS, and Karpov, VL, *Proteasome inhibition enhances* resistance to DNA damage via upregulation of Rpn4-dependent DNA repair genes. FEBS Lett, 2013. 587(18): p. 3108-14.
- 250. Chen, S, Blank, JL, Peters, T, Liu, XJ, Rappoli, DM, Pickard, MD, et al., *Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib.* Cancer Res, 2010. 70(11): p. 4318-26.
- 251. Gormally, MV, Dexheimer, TS, Marsico, G, Sanders, DA, Lowe, C, Matak-Vinkovic, D, et al., *Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition.* Nat Commun, 2014. 5: p. 5165.
- 252. Bhat, UG, Halasi, M, and Gartel, AL, *FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors*. PLoS One, 2009. 4(8): p. e6593.
- 253. Gartel, AL, *Targeting FOXM1 auto-regulation in cancer*. Cancer Biol Ther, 2015. 16(2): p. 185-6.
- 254. Myatt, SS and Lam, EW, Targeting FOXM1. Nat Rev Cancer, 2008. 8(3): p. 242.
- Ling, X, Calinski, D, Chanan-Khan, AA, Zhou, M, and Li, F, Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types. J Exp Clin Cancer Res, 2010. 29: p. 8.
- 256. Pandit, B and Gartel, AL, *Proteasome inhibitors induce p53-independent apoptosis in human cancer cells.* Am J Pathol, 2011. 178(1): p. 355-60.
- 257. Williams, SA and McConkey, DJ, *The proteasome inhibitor bortezomib stabilizes a novel active form of p53 in human LNCaP-Pro5 prostate cancer cells.* Cancer Res, 2003. 63(21): p. 7338-44.
- 258. Crawford, LJ, Walker, B, and Irvine, AE, *Proteasome inhibitors in cancer therapy*. J Cell Commun Signal, 2011. 5(2): p. 101-10.
- 259. Carlucci, A, Lignitto, L, and Feliciello, A, *Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome.* Trends Cell Biol, 2008. 18(12): p. 604-13.
- 260. Calabrese, EJ, *Biphasic dose responses in biology, toxicology and medicine: accounting for their generalizability and quantitative features.* Environ Pollut, 2013. 182: p. 452-60.
- 261. Calabrese, EJ, Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. Crit Rev Toxicol, 2005. 35(6): p. 463-582.

- 262. Berridge, MV, Herst, PM, and Tan, AS, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu Rev, 2005. 11: p. 127-52.
- 263. Jang, W, Choi, S, Kim, SH, Yoon, E, Lim, HG, and Kim, YJ, *A comparative study on mechanical and biochemical properties of bovine pericardium after single or double crosslinking treatment*. Korean Circ J, 2012. 42(3): p. 154-63.
- 264. Bhat, UG, Halasi, M, and Gartel, AL, *Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells.* PLoS One, 2009. 4(5): p. e5592.
- 265. Kim, SH, Joshi, K, Ezhilarasan, R, Myers, TR, Siu, J, Gu, C, et al., *EZH2 protects glioma stem cells from* radiation-induced cell death in a MELK/FOXM1-dependent manner. Stem Cell Reports, 2015. 4(2): p. 226-38.
- 266. Freitag, H, Christen, F, Lewens, F, Grass, I, Briest F, Iwaszkiewicz, S, et al., *Inhibition of mTORs catalytic site by PKI-587 is a promising therapeutic option for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease*. submitted to Neuroendocrinology
- 267. Gartel, AL, *Thiazole Antibiotics Siomycin a and Thiostrepton Inhibit the Transcriptional Activity of FOXM1*. Front Oncol, 2013. 3: p. 150.
- 268. Hoffman, WH, Biade, S, Zilfou, JT, Chen, J, and Murphy, M, *Transcriptional repression of the anti*apoptotic survivin gene by wild type p53. J Biol Chem, 2002. 277(5): p. 3247-57.
- 269. Mi, H, Muruganujan, A, Casagrande, JT, and Thomas, PD, *Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system.* Nat Protoc, 2013. 8(8): p. 1551-66.
- 270. Mi, H, Muruganujan, A, and Thomas, PD, *PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees.* Nucleic Acids Res, 2013. 41(Database issue): p. D377-86.
- 271. Mi, H and Thomas, P, PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. Methods Mol Biol, 2009. 563: p. 123-40.
- 272. Zhang, J, Gao, Z, Yin, J, Quon, MJ, and Ye, J, *S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2.* J Biol Chem, 2008. 283(51): p. 35375-82.
- 273. Nair, JS, Ho, AL, Tse, AN, Coward, J, Cheema, H, Ambrosini, G, et al., *Aurora B kinase regulates the postmitotic endoreduplication checkpoint via phosphorylation of the retinoblastoma protein at serine 780*. Mol Biol Cell, 2009. 20(8): p. 2218-28.
- 274. Lam, AK, Ngan, AW, Leung, MH, Kwok, DC, Liu, VW, Chan, DW, et al., *FOXM1b, which is present at elevated levels in cancer cells, has a greater transforming potential than FOXM1c.* Front Oncol, 2013. 3: p. 11.
- 275. Li, J, Wood, WH, 3rd, Becker, KG, Weeraratna, AT, and Morin, PJ, *Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells.* Oncogene, 2007. 26(20): p. 2860-72.
- 276. Barakat, BM, Wang, QE, Han, C, Milum, K, Yin, DT, Zhao, Q, et al., *Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis.* Int J Cancer, 2010. 127(4): p. 977-88.
- 277. Stoyanova, T, Roy, N, Kopanja, D, Bagchi, S, and Raychaudhuri, P, *DDB2 decides cell fate following DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(26): p. 10690-5.
- 278. Degli-Esposti, MA, Dougall, WC, Smolak, PJ, Waugh, JY, Smith, CA, and Goodwin, RG, *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain.* Immunity, 1997. 7(6): p. 813-20.
- 279. Avalle, L, Pensa, S, Regis, G, Novelli, F, and Poli, V, *STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance.* JAKSTAT, 2012. 1(2): p. 65-72.

- 280. Khoo, KH, Verma, CS, and Lane, DP, *Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy.* Nat Rev Drug Discov, 2014. 13(3): p. 217-36.
- 281. Cheok, CF, Dey, A, and Lane, DP, Cyclin-dependent kinase inhibitors sensitize tumor cells to nutlininduced apoptosis: a potent drug combination. Mol Cancer Res, 2007. 5(11): p. 1133-45.
- 282. Deben, C, Wouters, A, Op de Beeck, K, van Den Bossche, J, Jacobs, J, Zwaenepoel, K, et al., *The MDM2inhibitor Nutlin-3 synergizes with cisplatin to induce p53 dependent tumor cell apoptosis in non-small cell lung cancer.* Oncotarget, 2015.
- 283. Endo, S, Yamato, K, Hirai, S, Moriwaki, T, Fukuda, K, Suzuki, H, et al., *Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells.* Cancer Sci, 2011. 102(3): p. 605-13.
- 284. Jin, L, Tabe, Y, Kojima, K, Zhou, Y, Pittaluga, S, Konopleva, M, et al., *MDM2 antagonist Nutlin-3 enhances bortezomib-mediated mitochondrial apoptosis in TP53-mutated mantle cell lymphoma.* Cancer Lett, 2010. 299(2): p. 161-70.
- 285. Saha, MN, Jiang, H, Jayakar, J, Reece, D, Branch, DR, and Chang, H, *MDM2 antagonist nutlin plus proteasome inhibitor velcade combination displays a synergistic anti-myeloma activity.* Cancer Biol Ther, 2010. 9(11): p. 936-44.
- 286. Secchiero, P, Bosco, R, Celeghini, C, and Zauli, G, *Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3.* Curr Pharm Des, 2011. 17(6): p. 569-77.
- 287. Secchiero, P, Zerbinati, C, di Iasio, MG, Melloni, E, Tiribelli, M, Grill, V, et al., *Synergistic cytotoxic activity* of recombinant TRAIL plus the non-genotoxic activator of the p53 pathway nutlin-3 in acute myeloid leukemia cells. Curr Drug Metab, 2007. 8(4): p. 395-403.
- 288. Vatsyayan, R, Singhal, J, Nagaprashantha, LD, Awasthi, S, and Singhal, SS, *Nutlin-3 enhances sorafenib efficacy in renal cell carcinoma*. Mol Carcinog, 2013. 52(1): p. 39-48.
- 289. ElSawy, KM, Verma, CS, Lane, DP, and Caves, LS, *On the origin of the stereoselective affinity of Nutlin-3 geometrical isomers for the MDM2 protein.* Cell Cycle, 2013. 12(24): p. 3727-35.
- 290. Kussie, PH, Gorina, S, Marechal, V, Elenbaas, B, Moreau, J, Levine, AJ, et al., *Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain.* Science, 1996. 274(5289): p. 948-53.
- 291. Anil, B, Riedinger, C, Endicott, JA, and Noble, ME, *The structure of an MDM2-Nutlin-3a complex solved by the use of a validated MDM2 surface-entropy reduction mutant.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013. 69(Pt 8): p. 1358-66.
- 292. Puszynski, K, Gandolfi, A, and d'Onofrio, A, *The pharmacodynamics of the p53-Mdm2 targeting drug Nutlin: the role of gene-switching noise.* PLoS Comput Biol, 2014. 10(12): p. e1003991.
- 293. Kim, K, Biade, S, and Matsumoto, Y, *Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair.* J Biol Chem, 1998. 273(15): p. 8842-8.
- 294. Shivji, MK, Podust, VN, Hubscher, U, and Wood, RD, *Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA*. Biochemistry, 1995. 34(15): p. 5011-7.
- 295. Aytes, A, Mitrofanova, A, Lefebvre, C, Alvarez, MJ, Castillo-Martin, M, Zheng, T, et al., *Cross-species* regulatory network analysis identifies a synergistic interaction between FOXM1 and CENPF that drives prostate cancer malignancy. Cancer Cell, 2014. 25(5): p. 638-51.
- 296. Grant, GD, Brooks, L, 3rd, Zhang, X, Mahoney, JM, Martyanov, V, Wood, TA, et al., *Identification of cell cycle-regulated genes periodically expressed in U2OS cells and their regulation by FOXM1 and E2F transcription factors.* Mol Biol Cell, 2013. 24(23): p. 3634-50.
- 297. Moldovan, GL and D'Andrea, AD, *How the fanconi anemia pathway guards the genome.* Annu Rev Genet, 2009. 43: p. 223-49.
- 298. Kim, JT, Li, J, Jang, ER, Gulhati, P, Rychahou, PG, Napier, DL, et al., *Deregulation of Wnt/beta-catenin signaling through genetic or epigenetic alterations in human neuroendocrine tumors.* Carcinogenesis, 2013. 34(5): p. 953-61.

- 299. Zhao, Y, Aguilar, A, Bernard, D, and Wang, S, *Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment.* J Med Chem, 2015. 58(3): p. 1038-52.
- 300. Mir, R, Tortosa, A, Martinez-Soler, F, Vidal, A, Condom, E, Perez-Perarnau, A, et al., *Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in TP53 wild-type ovarian cancer cells.* Int J Cancer, 2013. 132(7): p. 1525-36.
- 301. Roh, JL, Kang, SK, Minn, I, Califano, JA, Sidransky, D, and Koch, WM, *p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2011. 47(1): p. 8-15.
- 302. Barbieri, E, Mehta, P, Chen, Z, Zhang, L, Slack, A, Berg, S, et al., *MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death*. Mol Cancer Ther, 2006. 5(9): p. 2358-65.
- 303. Boersma, V, Moatti, N, Segura-Bayona, S, Peuscher, MH, van der Torre, J, Wevers, BA, et al., *MAD2L2* controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. Nature, 2015. 521(7553): p. 537-40.
- 304. Burrage, J, Termanis, A, Geissner, A, Myant, K, Gordon, K, and Stancheva, I, *The SNF2 family ATPase LSH promotes phosphorylation of H2AX and efficient repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells.* J Cell Sci, 2012. 125(Pt 22): p. 5524-34.
- 305. Ha, K, Lee, GE, Palii, SS, Brown, KD, Takeda, Y, Liu, K, et al., *Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery*. Hum Mol Genet, 2011. 20(1): p. 126-40.
- 306. Miller, KM, Tjeertes, JV, Coates, J, Legube, G, Polo, SE, Britton, S, et al., *Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining*. Nat Struct Mol Biol, 2010. 17(9): p. 1144-51.
- 307. Muller-Tidow, C, Ji, P, Diederichs, S, Potratz, J, Baumer, N, Kohler, G, et al., *The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2004. 24(20): p. 8917-28.
- 308. Schar, P, Fasi, M, and Jessberger, R, *SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways.* Nucleic Acids Res, 2004. 32(13): p. 3921-9.
- 309. Sone, K, Piao, L, Nakakido, M, Ueda, K, Jenuwein, T, Nakamura, Y, et al., *Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for gamma-H2AX production and DNA repair.* Nat Commun, 2014. 5: p. 5691.
- 310. Pei, H, Zhang, L, Luo, K, Qin, Y, Chesi, M, Fei, F, et al., *MMSET regulates histone H4K20 methylation and* 53BP1 accumulation at DNA damage sites. Nature, 2011. 470(7332): p. 124-8.
- 311. Hajdu, I, Ciccia, A, Lewis, SM, and Elledge, SJ, *Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in the cellular response to DNA damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(32): p. 13130-4.
- 312. Lawrence, B, Gustafsson, BI, Chan, A, Svejda, B, Kidd, M, and Modlin, IM, *The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011. 40(1): p. 1-18, vii.
- 313. Poulikakos, PI, Zhang, C, Bollag, G, Shokat, KM, and Rosen, N, *RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF.* Nature, 2010. 464(7287): p. 427-30.
- 314. Boora, GK, Kanwar, R, Kulkarni, AA, Pleticha, J, Ames, M, Schroth, G, et al., *Exome-level comparison of primary well-differentiated neuroendocrine tumors and their cell lines.* Cancer Genet, 2015. 208(7-8): p. 374-81.
- 315. Singh, S, Ramamoorthy, M, Vaughan, C, Yeudall, WA, Deb, S, and Palit Deb, S, *Human oncoprotein MDM2 activates the Akt signaling pathway through an interaction with the repressor element-1 silencing transcription factor conferring a survival advantage to cancer cells.* Cell Death Differ, 2013. 20(4): p. 558-66.

- 316. Lewens, F, Briest, F, Arsenic, R, Sänger, J, Kunze, A, Möbs, M, et al., *The pro-proliferative protein FOXM1* serves as clinical marker and potential target in bronchopulmonary neuroendocrine tumors. Submitted to Oncotarget
- 317. Meraldi, P, Honda, R, and Nigg, EA, Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. EMBO J, 2002. 21(4): p. 483-92.
- 318. Mirza, A, McGuirk, M, Hockenberry, TN, Wu, Q, Ashar, H, Black, S, et al., *Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway.* Oncogene, 2002. 21(17): p. 2613-22.
- 319. Groenendijk, FH and Bernards, R, *Drug resistance to targeted therapies: deja vu all over again.* Mol Oncol, 2014. 8(6): p. 1067-83.
- 320. Santo, L, Hideshima, T, Cirstea, D, Bandi, M, Nelson, EA, Gorgun, G, et al., *Antimyeloma activity of a multitargeted kinase inhibitor, AT9283, via potent Aurora kinase and STAT3 inhibition either alone or in combination with lenalidomide.* Clin Cancer Res, 2011. 17(10): p. 3259-71.
- 321. Gong, AH, Wei, P, Zhang, S, Yao, J, Yuan, Y, Zhou, AD, et al., *FoxM1 Drives a Feed-Forward STAT3-Activation Signaling Loop That Promotes the Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells.* Cancer Res, 2015. 75(11): p. 2337-48.
- 322. Jiang, Y, Liao, Y, He, H, Xin, Q, Tu, Z, Kong, S, et al., *FoxM1 Directs STAT3 Expression Essential for Human Endometrial Stromal Decidualization.* Sci Rep, 2015. 5: p. 13735.
- 323. Wierstra, I and Alves, J, *Despite its strong transactivation domain, transcription factor FOXM1c is kept almost inactive by two different inhibitory domains.* Biol Chem, 2006. 387(7): p. 963-76.
- 324. Oh, DY, Lee, SH, Han, SW, Kim, MJ, Kim, TM, Kim, TY, et al., *Phase I study of OPB-31121, an Oral STAT3* Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors. Cancer Res Treat, 2015.
- 325. Dorr, JR, Yu, Y, Milanovic, M, Beuster, G, Zasada, C, Dabritz, JH, et al., *Synthetic lethal metabolic targeting* of cellular senescence in cancer therapy. Nature, 2013. 501(7467): p. 421-5.
- 326. Gleeson, MP, Hersey, A, Montanari, D, and Overington, J, *Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters.* Nat Rev Drug Discov, 2011. 10(3): p. 197-208.
- 327. Bross, PF, Kane, R, Farrell, AT, Abraham, S, Benson, K, Brower, ME, et al., *Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2004. 10(12 Pt 1): p. 3954-64.
- 328. Arany, I, Rady, P, Evers, BM, Tyring, SK, and Townsend, CM, Jr., *Analysis of multiple molecular changes in human endocrine tumours.* Surg Oncol, 1994. 3(3): p. 153-9.
- 329. Gartel, AL, Suppression of the Oncogenic Transcription Factor FOXM1 by Proteasome Inhibitors. Scientifica (Cairo), 2014. 2014.
- 330. Koo, CY, Muir, KW, and Lam, EW, *FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1819(1): p. 28-37.
- 331. Perez-Mancera, PA, Young, AR, and Narita, M, *Inside and out: the activities of senescence in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. 14(8): p. 547-58.
- 332. Shaheen, M, Allen, C, Nickoloff, JA, and Hromas, R, *Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair.* Blood, 2011. 117(23): p. 6074-82.
- 333. Sourbier, C, Valera-Romero, V, Giubellino, A, Yang, Y, Sudarshan, S, Neckers, L, et al., *Increasing reactive oxygen species as a therapeutic approach to treat hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma*. Cell Cycle, 2010. 9(20): p. 4183-9.
- 334. Halasi, M, Pandit, B, Wang, M, Nogueira, V, Hay, N, and Gartel, AL, *Combination of oxidative stress and FOXM1 inhibitors induces apoptosis in cancer cells and inhibits xenograft tumor growth*. Am J Pathol, 2013. 183(1): p. 257-65.
- 335. Park, HJ, Carr, JR, Wang, Z, Nogueira, V, Hay, N, Tyner, AL, et al., *FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis.* EMBO J, 2009. 28(19): p. 2908-18.
- 336. Laoukili, J, Alvarez, M, Meijer, LA, Stahl, M, Mohammed, S, Kleij, L, et al., *Activation of FoxM1 during G2* requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. Mol Cell Biol, 2008. 28(9): p. 3076-87.
- 337. Imai, Y, Takahashi, A, Hanyu, A, Hori, S, Sato, S, Naka, K, et al., *Crosstalk between the Rb pathway and AKT signaling forms a quiescence-senescence switch*. Cell Rep, 2014. 7(1): p. 194-207.
- 338. Coppe, JP, Patil, CK, Rodier, F, Sun, Y, Munoz, DP, Goldstein, J, et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. 6(12): p. 2853-68.

7. Anhang

7.1 Anhang 1

Briest F, Grabowski P. The p53 network as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. Cancer Treat Rev. 2015 May;41(5):423-30. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.03.006</u>



Abbildung A-1: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse des Zellzyklus von 1µM Siomycin A versus DMSO (vgl. Abschnitt 3.3.1.2.3)

7.3 Anhang 3



Abbildung A-2: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Messung der frühen Apoptoseinduktion nach 1 μM Siomycin A versus DMSO nach 20h (vgl. Abschnitt 3.3.1.2.3)

7.4 Anhang 4

				Fold-Change	
	Transkript		p-Wert	(Siomycin	vs.
Gensymbol	ID	RefSeq	(Siomycin vs. DMSO)	DMSO)	
ABLIM3	8109093	NM_014945	0,0341494	4,28364	
ACAT2	8123137	NM_005891	0,0274822	-1,66158	
ACBD7	7932214	NM_001039844	0,0325257	-3,10689	
ACTL6A	8084067	NM_004301	0,00118133	-1,76949	
ADCY2	8104394	NM_020546	0,00645103	-1,7871	
AGMO	8138337	NM_001004320	0,0349034	-2,20295	
ΑΚΑΡ5	7975066	ENST00000320636	0,0419495	-1,51639	
ALDH2	7958784	NM_000690	0,0459858	2,85335	
ALG1L	8090291	NM_001015050	0,00165302	-1,7894	
ALYREF	8019772	NM_005782	0,00234163	-1,73739	
ALYREF	8019273	NM_005782	0,000869665	-1,63842	
ANKRD32	8106931	NM_032290	0,0201169	-1,90529	
ANKRD42	7942858	NM_182603	0,00487442	1,79359	
ANLN	8132318	NM_001284301	0,00443441	-2,39809	
ANTXR1	8042439	NM_018153	0,0203958	-1,6411	
ARHGAP11A	7982358	NM_001286479	0,00439755	-2,28264	
ARHGAP11B	7982287	NM_001039841	0,0371219	-2,34755	
ARHGAP5-AS1	7978538	NR_027263	0,040599	1,86111	
ARL6IP6	8045768	NM_152522	0,0338696	-2,51264	
ASAH1	8149534	NM_001127505	0,0093997	1,64933	
ASB4	8134376	NM_145872	0,00477031	1,6529	
ASF1B	8034772	NM_018154	0,00716662	-2,49909	
ASPH	8150988	NM_001164751	0,0143371	1,74239	
ASPM	7923086	NM_001206846	0,0134588	-2,95607	
ASRGL1	7940643	NM_001083926	0,014796	-1,61958	
ATAD2	8152668	NM_014109	0,0101856	-2,0997	
ATAD5	8006187	NM_024857	0,022834	-2,38706	
ATG9B	8143803	NM_173681	0,000360681	1,77259	
ATP2B4	7908940	NM_001001396	0,0328756	1,51401	

ATP6V1C2	8040249	NM_001039362	0,00871701	-1,54654
AUNIP	7913852	NM_001287490	0,00909148	-2,02607
AURKA	8067167	NM_003600	0,019801	-2,35218
AURKB	8012403	NM_001256834	0,0326093	-2,45536
BBS12	8097252	NM_001178007	0,0422997	1,52842
BCLAF1	8129773	NM_001077440	0,00496794	-1,55423
BDH2P1	8121212	ENST0000602288	0,0219512	-2,30286
BEND6	8120362	NM_152731	0,00649071	1,59488
BIRC5	8010260	NM_001012271	0,00190049	-2,1909
BLM	7986068	NM_000057	0,0117265	-2,70207
BORA	7969374	NM_001286746	0,00629687	-1,88476
BRCA1	8015769	NM_007294	0,0163094	-2,45079
BRCA2	7968484	NM_000059	0,0122761	-2,39766
BRIP1	8017262	NM_032043	0,0126701	-2,71703
BSCL2	7948798	NM_001122955	0,0222955	1,89019
BTG3	8069565	NM_001130914	0,0336117	-1,5399
BUB1	8054580	NM_001278616	0,0149538	-2,48635
BUB1B	7982663	NM_001211	0,00598787	-2,1918
C12orf29	7957467	NM_001009894	0,0349003	-1,66463
C12orf75	7958253	NM_001145199	0,0224223	-1,54415
C16orf93	8000932	XM_006721102	0,0354115	1,63019
C17orf53	8007569	NM_001171251	0,00935185	-1,82709
C18orf54	8021286	NM_001288980	0,034384	-2,64651
C19orf48	8038624	NM_001290149	0,00813395	-1,5538
C1orf112	7907183	ENST00000286031	0,0047378	-2,56944
C15	7953603	NM_001734	0,0195456	6,58612
C2orf43	8050608	NM_001282719	0,0127454	-1,7492
C4orf46	7991777	NM_001008393	0,0348415	-1,7283
C5orf34	8111960	NM_198566	0,00449611	-2,07557
CALB2	7997139	NM_001740	0,00550611	9,25625
CASC5	7982757	NM_144508	0,0174574	-2,6782
CAT	7939298	NM_001752	0,00332092	1,56602
CAV2	8135587	NM_001206747	0,0392288	2,98492

CBX1P1	8173206	ENST00000440184	0,0103797	-1,6376
CCDC101	7994362	NM_138414	0,0220211	-1,53004
CCDC113	7996198	NM_001142302	0,0116917	1,75241
CCDC138	8044278	NM_144978	0,0162058	-1,81238
CCDC15	7944913	NM_025004	0,00929648	-2,562
CCDC18	7903049	NM_206886	0,00760066	-1,62839
CCDC181	7922152	NM_021179	0,0117745	-1,68609
CCDC77	7952914	NM_001130146	0,0192955	-1,98231
CCNA2	8102643	NM_001237	0,00806548	-2,74518
CCNB1	8105828	NM_031966	0,00529994	-2,47139
CCNB2	7983969	NM_004701	0,0101818	-3,0506
CCNF	7992594	NM_001761	0,0133563	-2,17018
CDC14A	7903334	NM_003672	0,00909639	-1,64804
CDC20	7900699	NM_001255	0,0049906	-2,87069
CDC20P1	8156194	ENST00000488829	0,0367663	-1,65006
CDC25A	8086880	NM_001789	0,00290025	-2,20507
CDC25C	8114425	NM_001287582	0,0242696	-2,23329
CDC45	8071212	NM_001178010	0,0133406	-2,57822
CDC6	8007071	NM_001254	0,00476232	-2,68446
CDC7	7902913	NM_001134419	0,0335146	-2,24429
CDCA2	8145418	NM_152562	0,0191095	-2,33583
CDCA3	7960702	NM_031299	0,0101847	-2,16899
CDCA5	7949364	NM_080668	0,025369	-2,45521
CDCA7	8046488	NM_031942	0,0405599	-1,84033
CDCA8	7900167	NM_001256875	0,00619124	-2,46595
CDK1	7927710	NM_001786	0,0209652	-2,71741
CDK14	8134098	NM_001287135	0,0238829	-1,61661
CDK2	7956076	NM_001290230	0,0484461	-1,86635
CDK2AP1	7967412	NM_001270433	0,00683997	-1,78365
CDT1	7997839	NM_030928	0,0028989	-1,86459
CEACAM1	8037205	NM_001024912	0,0238772	1,93685
CEACAM6	8029098	NM_002483	0,0102084	3,6767
CEACAM7	8037053	NM_001291485	0,0121133	1,68624

CEMIP	7985317	NM_001293298	0,0247117	2,06739
CENPA	8040712	NM_001042426	0,0139383	-2,23242
CENPE	8102076	NM_001286734	0,00637247	-2,76671
CENPF	7909708	NM_016343	0,008005	-2,82694
CENPH	8105842	NM_022909	0,0131398	-2,19857
CENPI	8168794	NM_006733	0,00911552	-2,38625
CENPL	7922391	NM_001127181	0,00426072	-2,25057
CENPN	7997381	NM_001100624	0,000449044	-2,00751
CENPO	8040578	NM_001199803	0,00519086	-2,0231
CENPQ	8120165	NM_018132	0,0232211	-1,97973
CENPU	8103932	NM_024629	0,0135967	-2,70236
CENPV	8013015	NM_181716	0,0404153	-2,56683
CENPW	8121911	NM_001012507	0,00273386	-2,3642
CEP128	7980496	NM_152446	0,0496698	-2,17631
CEP135	8095187	NM_025009	0,0139303	-1,99903
CEP55	7929334	NM_001127182	0,0217691	-2,34101
CEP78	8156026	NM_001098802	0,0492432	-2,14541
CER1	8160163	NM_005454	0,0246362	-2,32235
CFHR1	7908488	NM_002113	0,0323475	-1,56763
CHAF1A	8024843	NM_005483	0,0345772	-1,6654
CHEK1	7945014	NM_001114122	0,0152533	-2,14404
CHEK2	8075164	NM_001005735	0,00572646	-1,51896
CHN1	8056890	NM_001025201	0,0203008	-1,76207
CHRDL1	8174513	NM_001143981	0,0174519	-1,54521
CHRNA5	7985213	NM_000745	0,0167661	-2,08014
CHURC1-FNTB	7975121	NM_001202558	0,00787148	-1,56499
CIT	7966878	NM_001206999	0,0235579	-1,91024
СКАР2	7969243	NM_001098525	0,00320482	-2,04115
CKAP2L	8054702	NM_152515	0,00989324	-2,33023
СКВ	7981427	NM_001823	0,046468	-1,81143
CKS1B	8112327	NM_001826	0,0184242	-2,45727
CKS1B	7926896	NM_001826	0,0182073	-2,44074
CKS2	8156290	NM_001827	0,038367	-1,73373

CLN6	7989975	NM_017882	0,00429767	-1,72856
CLSPN	7914878	NM_001190481	0,00395845	-2,99421
CLSPN	7914851	NM_001190481	0,00641497	-2,85747
CNIH2	7941587	NM_182553	0,00492548	-1,54675
CSE1L	8063283	NM_001256135	0,011445	-1,80762
CSTF2T	7933659	NM_015235	0,0481406	-1,53789
CTSD	7945666	NM_001909	0,0228506	2,13219
CYB561A3	7948565	NM_001161452	0,00523334	-1,51512
CYP1A1	7990391	NM_000499	0,0391933	2,26213
CYP4F3	8026456	NM_000896	0,0261873	2,01905
DBF4	8133976	NM_006716	0,0107849	-1,70436
DBR1	8090960	NM_016216	0,015956	-1,63293
DCAF8L2	8166585	ENST00000580017	0,0232493	1,90587
DCK	8095574	NM_000788	0,0486318	-1,61292
DCP2	8107356	NM_001242377	0,0179899	-1,67361
DDC	8139640	NM_000790	0,0262802	-2,07338
DDIAS	7942832	NM_145018	0,00486732	-2,85637
DDIT4	7928308	NM_019058	0,00924894	2,38527
DDX39A	8034806	XM_006722606	0,00305475	-1,52562
DEPDC1	7916898	NM_001114120	0,00449635	-2,95014
DEPDC1B	8112260	NM_001145208	0,00707796	-2,01355
DHDDS	7899173	NM_001243564	0,0481473	1,97173
DHFR	8043036	NM_000791	0,00714352	-2,63071
DHFR	8112902	NM_000791	0,018123	-2,32894
DHFR	8022640	NM_000791	0,0218355	-2,31671
DIAPH3	7971866	NM_001042517	0,0215828	-2,50288
DLGAP5	7979307	NM_001146015	0,00613849	-3,69928
DNA2	7934026	NM_001080449	0,0113653	-2,33268
DNAJB2	8048523	NM_006736	0,0437796	1,70536
DNAJC9	8064976	NM_015190	0,000689531	-1,63563
DNMT1	8033912	NM_001130823	0,0154078	-1,6653
DPYSL2	8145470	NM_001197293	0,0168064	-1,80955
DPYSL5	8040725	NM_001253723	0,0436605	-2,20691

DSCC1	8152582	NM_024094	0,0202543	-2,72157
DSN1	8066074	NM_001145315	0,0119062	-1,72468
DTL	7909568	NM_001286229	0,0063254	-2,02151
DTYMK	8060286	ENST00000445261	0,0177195	-1,58843
DTYMK	8077262	ENST00000445261	0,0177195	-1,58843
DUSP18	8075423	NM_152511	0,0189249	1,52378
DUSP5	7930413	NM_004419	0,0159832	2,40499
DUT	7983594	NM_001025248	0,0177944	-2,02396
E2F2	7913644	NM_004091	0,0114749	-1,75413
E2F8	7947110	NM_001256371	0,0125958	-2,71194
ECM1	7905220	NM_001202858	0,0281668	4,73122
ECT2	8083941	NM_001258316	0,0116613	-2,29859
EEPD1	8132305	NM_030636	0,00755589	1,52042
ELAVL1	8033479	NM_001419	0,0336227	-1,52849
ELL2	8113220	NM_012081	0,0153607	1,73442
ELL2P1	7921344	ENST00000413990	0,00464373	1,93886
ELOVL2	8123920	NM_017770	0,00854493	-1,95321
EME1	8008310	NM_001166131	0,00316426	-2,02021
EMP2	7999387	NM_001424	0,0324535	-1,54981
ENC1	8112615	NM_001256574	0,0296242	-2,68242
ENPP5	8126750	NM_001290072	0,0369921	2,25092
ERCC6L	8173506	NM_017669	0,0106752	-2,60377
ERH	7979864	NM_004450	0,0254124	-1,57109
ERI2	8000013	NM_001142725	0,00816879	-1,65103
ERRFI1	7912157	NM_018948	0,0239115	1,7242
ERVK13-1	7998835	NR_040023	0,0143651	1,60138
ESCO2	8145570	NM_001017420	0,0233479	-2,72304
ESPL1	7955736	NM_012291	0,000911839	-2,59797
ETV1	8138289	NM_001163147	0,016111	-1,70804
EXO1	7910997	NM_003686	0,0276495	-2,53392
EXOC6B	8052956	NM_015189	0,0268614	1,52114
EXOSC5	8037023	NM_020158	0,045091	-1,53895
EXOSC8	7968658	NM_181503	0,0358028	-1,50705

EXOSC9	8097128	NM_005033	0,005954	-1,61607
EXPH5	7951545	NM_015065	0,0456077	-1,78892
EZH2	8143663	NM_001203247	0,0259789	-1,6613
F2RL1	8106403	NM_005242	0,00617526	2,12609
FAH	7985268	NM_000137	0,00955316	1,51576
FAM102A	8164343	NM_001035254	0,0219823	2,22934
FAM111A	7940153	NM_001142519	0,00827861	-1,87329
FAM111B	7940147	NM_001142703	0,00718706	-2,66467
FAM174A	8107119	NM_198507	0,00428337	1,61275
FAM214B	8160981	ENST00000322813	0,0221546	1,88451
FAM64A	8004167	NM_001195228	0,0114929	-2,42986
FAM71A	7924163	AK097437	0,0146739	1,60044
FAM72B	7904452	NM_001100910	0,00624474	-2,42694
FAM72B	7919591	NM_001100910	0,0111992	-2,41453
FAM72B	7909146	NM_001100910	0,00585964	-2,40827
FAM72B	8039928	NM_001100910	0,00633502	-2,38563
FAM83D	8062571	NM_030919	0,00183619	-1,80914
FAM86B3P	8144498	NR_024361	0,00517874	1,63531
FAM86DP	8088895	NR_024241	0,0392765	1,50397
FANCB	8171381	NM_001018113	0,026179	-2,14961
FANCD2	8077731	NM_001018115	0,0215239	-2,4308
FANCI	7985829	NM_001113378	0,0191872	-2,46525
FANCM	7974166	NM_020937	0,017934	-1,58804
FBL	8036777	NM_001436	0,00974288	-1,72796
FBXO32	8152703	NM_058229	0,0481549	1,76446
FBXO45	8084947	NM_001105573	0,00742037	-1,53643
FBXO5	8130374	NM_001142522	0,00149615	-2,6844
FEN1	7940561	NM_004111	0,0085011	-2,53905
FHL3	7915147	NM_001243878	0,0443131	1,79195
FIGNL1	8139632	NM_001287495	0,00605002	-1,87098
FLJ25758	8025124	NR_024372	0,0152369	1,69808
FLJ42627	7992682	AK124618	0,0324012	1,63563
FLJ42627	7998820	AK124618	0,0238331	1,65354

FOXM1	7960340	NM_001243088	0,00744564	-2,70906
FOXRED1	7945071	NM_017547	0,021205	-1,7495
FRRS1	7917954	NM_001013660	0,00897476	-1,82439
FSD1	8024816	NM_024333	0,00893222	-1,71769
FZD4	7950885	NM_012193	0,018858	-1,74889
GABARAPL1	7953943	NM_031412	0,0048148	2,45092
GBA	7920697	NM_000157	0,0462363	1,64695
GBAP1	7920687	NR_002188	0,0101154	1,68462
GEM	8151816	NM_005261	0,0439396	3,29567
GEMIN4	8010946	NM_015721	0,00127512	-1,81281
GEN1	8040440	NM_001130009	0,00921668	-2,27825
GINS1	8061471	NM_021067	0,00766034	-2,74506
GINS2	8003204	NM_016095	0,0279211	-2,63407
GINS3	7996211	NM_001126129	0,0127097	-1,62589
GINS4	8146130	NM_032336	0,0355717	-1,73971
GK	8166632	NM_000167	0,0373049	1,64714
GMNN	8117225	NM_001251989	0,0132576	-1,8523
GNS	7964701	NM_002076	0,00621344	1,58359
GOLGA6A	7990283	NM_001038640	0,0129058	1,53587
GOLGA7B	7929711	NM_001010917	0,0216356	1,5719
GPAM	7936322	NM_001244949	0,00408149	-2,08447
GPATCH3	7913990	NM_022078	0,0335335	1,52072
GPM6B	8171359	NM_001001995	0,0122574	-1,88662
GPR125	8022338	ENST00000506133	0,0153292	-1,64665
GPR125	8099612	NM_145290	0,023241	-1,59337
GPR155	8056837	NM_001033045	0,0140118	2,00099
GPSM2	7903565	NM_013296	0,0475769	-1,59377
GPX3	8109333	NM_002084	0,0133685	3,76946
GRAMD3	8107673	NM_001146319	0,045515	-1,88753
GRHL2	8147697	NM_024915	0,00996715	-1,59631
GRN	8007620	NM_002087	0,00691924	1,51253
GSG2	8003844	NM_031965	0,0268852	-2,45312
GSTK1	8136849	NM_001143679	0,0236501	1,51017

GTSE1	8073858	NM_016426	0,0175477	-2,07123
H1FX	8090555	NM_006026	0,00168291	-1,53702
H2AFY2	7928107	NM_018649	0,0310721	-1,9757
H2AFZ	8101945	NM_002106	0,0332855	-1,58275
HAUS1	8021101	NM_138443	0,0226409	-1,74746
HBZ	7991750	NM_005332	0,0228686	-1,58806
HELLS	7929438	NM_001289067	0,0119571	-2,90184
HERC4	7933947	NM_001278185	0,00551695	1,73169
HERPUD1	7995895	NM_001010989	0,0391286	1,71116
HIRIP3	8000748	NM_003609	0,0069519	-1,63995
HIST1H1B	8124527	NM_005322	0,0021648	-3,84783
HIST1H1C	8124397	NM_005319	0,0124979	-2,29201
HIST1H1E	8117377	NM_005321	0,0131013	-2,03938
HIST1H2AB	8124391	NM_003513	0,00585681	-4,23248
HIST1H2AE	8117408	NM_021052	0,038236	-2,23141
HIST1H2AG	8117535	NM_021064	0,000846926	-1,70063
HIST1H2AH	8117543	NM_080596	0,00118689	-3,03971
HIST1H2AI	8117580	NM_003509	0,0054557	-2,30398
HIST1H2AI	8117583	NM_003509	0,003054	-2,19195
HIST1H2AJ	8124518	NM_021066	0,0109125	-2,03357
HIST1H2AK	8124524	NM_003510	0,00505441	-1,78129
HIST1H2AL	8117608	NM_003511	0,00454757	-2,44275
HIST1H2APS4	8124446	ENST00000362070	0,0217457	-1,73206
HIST1H2BC	8124406	NM_003526	0,00350127	-2,00498
HIST1H2BF	8117395	NM_003522	0,00674946	-2,96464
HIST1H2BH	8117426	NM_003524	0,00579731	-2,52897
HIST1H2BI	8117429	NM_003525	0,0372363	-2,5
HIST1H2BL	8124510	NM_003519	0,00706564	-1,62551
HIST1H2BM	8117594	NM_003521	0,00747261	-5,25896
HIST1H2BN	8117600	NM_003520	0,0229132	-1,7312
HIST1H3A	8117330	NM_003529	0,000429459	-2,86178
HIST1H3B	8124388	NM_003537	0,00118273	-2,50608
HIST1H3D	8124416	NM_003530	0,00343379	-2,5316

HIST1H3F	8124437	NM_021018	0,00382707	-2,55573
HIST1H3G	8124440	NM_003534	0,00353344	-2,12176
HIST1H3I	8124531	NM_003533	0,010154	-2,23494
HIST1H3J	8124537	NM_003535	0,00598494	-3,16738
HIST1H4A	8117334	NM_003538	0,00217511	-2,08749
HIST1H4B	8124385	NM_003544	0,00589341	-2,2641
HIST1H4C	8117368	NM_003542	0,0107243	-1,73823
HIST1H4D	8124413	NM_003539	0,000841319	-2,50197
HIST1H4K	8124521	NM_003541	0,0481486	-2,04412
HIST1H4K	8117598	NM_003541	0,0466973	-1,98302
HIST1H4L	8124534	NM_003546	0,000789954	-2,25595
HIST2H2AA4	7905079	NM_001040874	0,0124027	-1,70595
HIST2H2AA4	7919619	NM_001040874	0,0124027	-1,70595
HIST2H2AB	7919642	NM_175065	0,00732287	-3,38976
HIST2H2AC	7905088	NM_003517	0,00870087	-1,66275
HIST2H2BA	7904465	NR_027337	0,00978563	-1,87902
HIST2H3A	7919612	NM_001005464	0,00491105	-2,24649
HIST2H3A	7905085	NM_001005464	0,00582404	-2,16623
HIST2H3A	7919614	NM_001005464	0,00582404	-2,16623
HIST2H3A	7919589	NM_001005464	0,00372952	-2,1101
HIST2H3DP1	7904463	ENST00000401004	0,00632629	-1,70512
HJURP	8059838	NM_001282962	0,0188234	-2,49868
HMGB1	8078248	NM_002128	0,0123438	-1,91371
HMGB1P1	8067206	ENST00000522557	0,0100576	-1,64963
HMGB1P10	8072122	ENST00000395823	0,0106242	-1,63945
HMGB1P4	8056728	ENST00000455362	0,0144612	-1,81286
HMGB2	8103728	NM_001130688	0,00639367	-3,05286
HMGN2	8000409	ENST0000361427	0,0155293	-2,34801
HMGN2	7982204	NM_005517	0,014748	-2,33321
HMGN2P17	7897424	ENST00000425872	0,0288077	-1,50216
HMMR	8109712	NM_001142556	0,0060804	-2,85076
HNRNPD	8101324	NM_001003810	0,00905942	-1,51818
HNRNPU-AS1	7925561	NR_026778	0,0310268	1,57855

НОХВ7	8016468	NM_004502	0,00874864	-1,54192
HSPA2	7975076	NM_021979	1,36E-05	-1,86685
IER3	8124848	NM_003897	0,0447937	2,113
IER3	8179704	NM_003897	0,0447937	2,113
IER3	8178435	NM_003897	0,0359653	2,25319
IGSF9	7921492	NM_001135050	0,0174776	-1,59954
IL17RB	8080562	XM_006713253	0,0220723	-1,53364
IMMP1L	7947332	NM_144981	0,0198974	-1,74338
IMPDH2	8087254	NM_000884	0,0340388	-1,54882
IQCG	8093258	NM_001134435	0,0421786	1,57286
IQGAP3	7921033	NM_178229	0,0376623	-1,90979
ITGA6	8046380	NM_000210	0,0374937	1,90785
ITGB3BP	7916727	NM_001206739	0,0199503	-2,30675
JPX	8168412	ENST00000414209	0,000106146	1,77864
KAL1	8171248	NM_000216	0,01631	-1,63029
KCNA2	7918449	NM_001204269	0,0365126	2,65422
KCNJ2	8009502	NM_000891	0,0464984	-2,15764
KCNN3	7920552	NM_001204087	0,0157995	1,80873
KIAA0101	7989647	NM_001029989	0,0168181	-2,82784
KIAA0513	7997662	NM_001286565	0,0173811	1,74942
KIAA1524	8089372	NM_020890	0,0140059	-2,8466
KIF11	7929258	NM_004523	0,00770975	-3,15328
KIF14	7923189	NM_014875	0,0255032	-2,77919
KIF15	8079237	NM_020242	0,0200558	-2,93884
KIF18A	7947248	NM_031217	0,00390189	-2,3117
KIF18B	8016147	NM_001264573	0,00589849	-1,78601
KIF18B	8016139	NM_001264573	0,0173968	-1,75288
KIF20A	8108301	NM_005733	0,00391484	-3,52801
KIF20B	7929078	NM_001284259	0,00745673	-2,33502
KIF22	8003583	NM_001256269	0,0118603	-1,9738
KIF22	7994620	NM_001256269	0,0122335	-1,95694
KIF23	7984540	NM_001281301	0,00254877	-2,69423
KIF24	8160771	NM_194313	0,00384194	-1,74063

KIF2C	7901010	NM_006845	0,00396447	-2,80083
KIF4A	8168146	NM_012310	0,00963329	-2,72984
KIF4B	8109484	NM_001099293	0,00931092	-2,09256
KIFC1	8179564	NM_002263	0,0120022	-2,26216
KIFC1	8118669	NM_002263	0,00760209	-2,17093
KITLG	7965322	NM_000899	0,040951	-1,65976
KIZ	8061305	NM_001163022	0,0156116	1,59701
KLF6	7931810	NM_001160124	0,0260094	1,805
KLHL13	8174654	NM_001168299	0,0365133	-2,18502
KLRC4-KLRK1	7961173	NM_001199805	0,0461455	3,57486
KNSTRN	7982712	NM_001142761	0,00731488	-2,27344
KNTC1	7959408	NM_014708	0,017587	-1,98103
L3HYPDH	7979437	NM_144581	0,0135873	1,59307
LAMC2	7908072	NM_005562	0,0302925	4,58483
LARP6	7990080	NM_001286679	0,0257489	1,60262
LGALS3	7974461	NM_001177388	0,0135699	1,57094
LGR5	7957140	NM_001277226	0,0112769	-2,32238
LHFPL2	8112803	NM_005779	0,00945974	1,74558
LHFPL5	8118995	NM_182548	0,00848552	2,00254
LIG1	8037991	NM_000234	0,00947728	-1,72371
LIN28B	8121251	NM_001004317	0,0302713	-1,77178
LIN9	7924712	NM_001270409	0,0113638	-2,02204
LINC00888	8084215	ENST00000482098	0,0176005	1,59472
LINC00917	8003230	ENST0000600892	0,0243875	-1,94232
LMNB1	8107706	NM_001198557	0,0119249	-2,5442
LOC100049716	7952950	ENST00000318291	0,0142011	2,13955
LOC102724229	8141765	XM_006716222	0,0484841	1,55687
LOC642533	7997904	AK126695	0,0308918	1,63512
LOC652276	7992678	NR_015441	0,0415278	1,55322
LOC728323	8097064	NR_024437	0,0197154	1,5227
LOC728323	7924549	NR_024437	0,0209458	1,56151
LOC728323	8049963	NR_024437	0,0209458	1,56151
LONRF3	8169603	NM_001031855	0,0451997	1,53981

LRP1B	8055496	NM_018557	0,0363746	1,58403
LRRCC1	8147079	NM_033402	0,0481292	-1,8571
LSM3	8078008	NM_014463	0,00738991	-1,57983
LSM3P3	8053386	ENST00000436601	0,00245082	-1,98284
LSM5	8138912	NM_001130710	0,0214048	-1,73008
LSMEM1	8135532	NM_001134468	0,0080391	1,60716
LYST	7925257	NM_000081	0,0158219	1,8564
LYZ	7957023	NM_000239	0,0035849	1,5404
MAD2L1	8102560	NM_002358	0,0212308	-2,43953
MAD2L2	7912481	NM_001127325	0,038566	-1,54027
MAGI2	8140504	NM_012301	0,00956986	-1,82477
MALAT1	7941272	NR_002819	0,00241685	2,26685
MALAT1	7949410	AF001542	0,00550175	4,22342
MAN2A2	7986132	NM_006122	0,0185915	1,51541
MAN2B1	8034420	ENST00000466794	0,0192592	1,73341
MANBA	8102006	NM_005908	0,0256553	1,98759
MAPRE3	8040742	NM_012326	0,0259313	1,86293
MARC1	7909877	NM_022746	0,0350714	-1,58651
MASTL	7926821	NM_001172303	0,00891514	-2,14561
MBNL3	8175177	NM_001170701	0,0235094	-1,67548
МСМ10	7926259	NM_018518	0,00795491	-2,65389
МСМ2	8082350	NM_004526	0,00329092	-2,44443
МСМ3	8127031	NM_001270472	0,0104007	-1,86497
МСМ4	8146357	NM_005914	0,004432	-2,12438
МСМ5	8072687	NM_006739	0,00221513	-2,40839
МСМ6	8055426	NM_005915	0,0219396	-2,10263
МСМ7	8141395	NM_001278595	0,020042	-2,61554
МСМ8	8060813	NM_001281520	0,0321478	-1,72528
МСМВР	7936706	NM_001256378	0,0245794	-1,50608
МЕСОМ	8091972	NM_001105077	0,0324031	-1,76828
MELK	8155214	NM_001256685	0,0294328	-2,67435
MFAP2	7912887	NM_001135247	0,0402333	-1,73893
MGME1	8061129	NM_052865	0,00763277	-2,03541

MID2	8169249	NM_012216	0,0211439	2,17246
MIR127	7976804	NR_029696	0,0354646	-1,95353
MIR15A	7971653	ENST0000235290	0,00526111	-2,15524
MIR21	8008885	NR_029493	0,0476236	2,4872
MIS18BP1	7978776	NM_018353	0,0234629	-1,79754
MKI67	7937020	NM_001145966	0,0196601	-2,56154
MLPH	8049487	NM_001042467	0,00073489	2,46284
MMAA	8097670	NM_172250	0,0418039	1,58052
MMS22L	8128329	NM_198468	0,0045701	-2,36595
MRE11A	7951046	NM_005590	0,0219357	-1,71001
МТВР	8148124	NM_022045	0,0405635	-1,84289
MTFR2	8129763	NM_001099286	0,00990743	-2,0519
MTHFD1	7975045	NM_005956	0,0157549	-1,53225
MTR	7910752	NM_000254	0,0451508	-1,61195
МТ-ТС	8165700	ENST00000387405	0,0339544	1,71022
MT-TD	7896750	ENST00000387419	0,0232278	1,54655
ΜΤ-ΤΚ	8043375	ENST00000387421	0,0302551	1,66395
ΜΤ-ΤΚ	7896752	ENST00000387421	0,0192735	1,75663
МТ-ТК	8165667	ENST00000387421	0,0192735	1,75663
MT-TS1	7911343	ENST00000387416	0,0253516	1,85086
MT-TS1	8165703	ENST00000387416	0,0253516	1,85086
MT-TS2	8165682	ENST00000387449	0,00229227	1,57961
MT-TW	7896748	ENST00000387382	0,0356647	1,61734
ΜΤ-ΤΥ	7911341	ENST00000387409	0,0471894	1,66628
МҮВ	8122202	NM_001161657	0,0146432	-2,03196
MYBL1	8151101	NM_001080416	0,00590697	-1,69194
MYBL2	8062766	NM_001278610	0,00719562	-2,88987
MYCNOS	8050423	NR_026766	0,0133428	1,51656
МҮО5В	8023267	NM_001080467	0,0154999	2,02231
МҮО5С	7988876	NM_018728	0,00789206	-1,56387
NASP	7901123	NM_002482	0,0228325	-1,64792
NBEAL1	8047596	NM_001114132	0,00866755	1,56376
NCAPD2	7953351	NM_014865	0,00497805	-2,18665

NCAPD3	7952830	NM_015261	0,01623	-2,11669
NCAPG	8094278	NM_022346	0,00319078	-3,04678
NCAPG2	8144153	NM_001281932	0,0400585	-2,69841
NCAPH	8043602	NM_001281710	0,00246331	-2,91988
NCOA5	8066668	NM_020967	0,00174346	-1,5507
NDC1	7916316	NM_001168551	0,00563063	-2,02738
NDC80	8019857	NM_006101	0,00570628	-2,68841
NDST4	8102450	NM_022569	0,000596317	-1,93532
NEIL3	8098423	NM_018248	0,0403776	-2,55992
NEK2	7924096	NM_001204182	0,0474053	-1,97687
NFASC	7909027	NM_001005388	0,0170868	1,60631
NFE2L3	8131944	ENST0000606261	0,0331663	-1,64592
NFIB	8160138	NM_001190737	0,010495	-1,66875
NLRC5	7995926	NM_032206	0,010336	1,7634
NLRP1	8011884	NM_001033053	0,0305084	1,61094
NMNAT2	7922756	NM_015039	0,00790722	1,5095
NOTCH2NL	7904702	NM_203458	0,014585	1,85625
NPIPB5	8000636	NM_001135865	0,0187358	1,62487
NPIPB6	7994559	XM_005255742	0,0327491	1,60993
NPM1P8	8166659	ENST00000458237	0,0459701	-1,51188
NRCAM	8142270	ENST00000379022	0,00186431	2,15687
NRIP3	7946446	NM_020645	0,0248788	1,61764
NRM	8178399	NM_001270707	0,010371	-1,93305
NRM	8179683	NM_001270707	0,010371	-1,93305
NRM	8124806	NM_001270707	0,011965	-1,79866
NT5DC2	8087935	NM_001134231	0,0389621	-1,94364
NUCKS1	7909142	AF130080	0,0038861	-1,66671
NUDT15	7968999	NM_018283	0,00201789	-1,62868
NUDT7	7997332	NM_001105663	0,0159674	1,67035
NUF2	7906930	NM_031423	0,0112601	-3,25881
NUMBL	8036936	ENST00000598759	0,00714088	1,74141
NUP107	7956949	NM_020401	0,00961962	-1,83005
NUP35	8046804	NM_001287584	0,00744426	-1,78147

NUP85	8009761	NM_024844	0,0255879	-1,69926
NUSAP1	7982889	NM_001243142	0,0140668	-2,65135
OBFC1	7936134	NM_024928	0,0278049	1,86444
OCLM	7908347	NM_022375	0,0499842	1,6774
OIP5	7987636	NM_007280	0,00424366	-2,0387
OR2A9P	8136983	NR_002157	0,0426314	1,81624
OR6C72P	7955987	ENST00000451403	0,0218719	-1,52656
ORC1	7916167	NM_001190818	0,0124036	-1,87224
ORC6	7995354	NM_014321	0,00826281	-2,35953
PAICS	8095221	NM_001079524	0,000622674	-1,58884
PARPBP	7958031	NM_017915	0,0133328	-2,41697
РВК	8149955	NM_001278945	0,0287204	-2,96834
PCNA	8064844	NM_002592	0,00643647	-2,23408
PCNXL2	7925089	NM_014801	0,0106177	1,57525
PDGFA	8137670	NM_002607	0,0445239	2,10989
PDLIM3	8104022	ENST00000284770	0,00644968	1,97979
PDSS1	7926807	NM_014317	0,00811493	-1,73595
PGM2L1	7950391	NM_173582	0,0287793	1,6703
PI4K2B	8094378	NM_018323	0,0139107	-1,51998
PIGW	8006634	NM_178517	0,00228849	-2,1193
PIR	8171435	NM_001018109	0,0180991	-1,51199
РКІВ	8121768	NM_001270393	0,027052	1,56573
ΡΚΜΥΤ1	7998886	NM_001258450	0,0104193	-1,59839
PLA2G3	8075468	NM_015715	0,00616983	-2,07179
PLA2G4C	8037970	NM_001159322	0,0102759	1,79594
PLBD2	7958989	NM_001159727	0,0467235	1,73946
PLCD3	8016168	NM_133373	0,0306422	1,6278
PLEKHM3	8058512	NM_001080475	0,0451513	2,08309
PLK1	7994109	NM_005030	0,00752035	-3,01367
PLK3	7901054	NM_004073	0,0433423	1,60804
PLK4	8097356	NM_001190799	0,00809461	-2,7656
DOC1A				
FUCIA	8087839	NM_001161580	0,0195573	-1,89593

POLA2	7941214	NM_002689	0,00733296	-1,95885
POLD1	8030641	NM_001256849	0,00524221	-1,6837
POLD2	8139299	NM_001127218	0,0103218	-1,53791
POLE	7967736	NM_006231	0,0308838	-1,80403
POLE2	7978846	NM_001197330	0,0189819	-3,29346
POLE3	8163525	NM_001278255	0,000754058	-1,87086
POLQ	8089875	NM_199420	0,012159	-1,84312
PPIH	7900576	NM_006347	0,0116658	-1,82093
PRC1	7991406	NM_001267580	0,024641	-2,37891
PRIM1	7964271	NM_000946	0,00701773	-2,08342
PRIM2	8120411	NM_000947	0,00103627	-2,16613
PRIMPOL	8098556	NM_152683	0,0210921	-1,63591
PRR11	8008784	NM_018304	0,0151096	-2,56964
PRUNE2	8161865	NM_015225	0,0467724	1,51694
PSAP	7934196	NM_001042465	0,0207868	1,68488
PSIP1	8160238	NM_001128217	0,0318475	-1,58197
PSMC3IP	8015642	NM_001256014	0,0322411	-2,07774
PTGS2	7922976	ENST00000490885	0,00616891	-3,38651
PTPRH	8039389	NM_002842	0,0205487	1,9287
PTTG1	8109639	NM_001282382	0,0341604	-2,72825
RAB17	8059955	NM_022449	0,027726	1,95067
RAB33A	8169898	NM_004794	0,00568148	-1,58777
RAB3GAP1	8045398	NM_001172435	0,0178348	1,60605
RACGAP1	7963157	NM_001126103	0,0085418	-2,00221
RACGAP1P	7962487	NR_026583	0,027424	-1,87336
RAD1	8111457	NM_002853	0,0288546	-1,63396
RAD18	8085145	NM_020165	0,0243936	-1,79826
RAD51AP1	7953218	NM_001130862	0,0259305	-3,18556
RAD51C	8008754	NM_002876	0,018567	-1,66575
RAD54B	8151824	ENST00000463267	0,0135084	-1,79261
RAD54L	7901192	NM_001142548	0,0421231	-1,82484
RAI14	8104788	NM_001145520	0,0468708	-1,53194
RANBP1	8071332	NM_001278639	0,00338712	-1,90246

RAP2A	7969693	NM_021033	0,0466832	1,65689
RASSF2	8064790	NM_014737	0,0152845	-1,71602
RASSF9	7965226	NM_005447	0,00320591	-1,73698
RBL1	8066136	NM_002895	0,0262668	-1,81217
RBMX	8175420	NM_002139	0,0092896	-1,61126
RBX1	8073334	NM_014248	0,0038982	-1,50167
RCC1	7899462	NM_001048194	0,00378333	-1,58036
RCC2	7912956	NM_001136204	0,0163984	-1,74508
RDH12	7975284	NM_152443	0,0417238	2,25618
RELL2	8108822	NM_173828	0,0405751	1,71075
REPS2	8166243	NM_001080975	0,00688899	1,72196
RFC2	8140151	NM_001278791	0,0124733	-1,97432
RFC3	7968563	NM_002915	0,0106149	-2,25725
RFC4	8092640	NM_002916	0,0341363	-1,92862
RFC5	7959052	NM_001130112	0,0150158	-1,90057
RFTN2	8058063	NM_144629	0,0330359	1,50919
RFWD3	8002762	NM_018124	0,0082558	-1,66733
RHOU	7910387	NM_021205	0,0342549	-1,58887
RIBC2	8073766	NM_015653	0,0356231	-1,55735
RICTOR	8111698	NM_001285439	0,0270453	1,59059
RMI1	8156126	NM_024945	0,0127214	-1,66942
RN7SL166P	7970426	ENST00000489872	0,0460722	1,52834
RN7SL473P	7919747	ENST00000580341	0,0165281	1,55341
RN7SL600P	7919749	ENST00000581811	0,00690885	1,70848
RN7SL751P	8088952	ENST00000473281	0,031497	2,27836
RN7SL834P	8048976	ENST00000461450	0,00408821	1,70454
RNA5SP283	8155596	ENST0000365604	0,0431936	1,55155
RNA5SP52	7917468	ENST0000362448	0,0389592	1,58196
RNASEH2A	8026051	NM_006397	0,00322058	-2,08193
RNASEH2B	7969179	NM_001142279	0,0200855	-1,54055
RNF217	8121825	NM_001286398	0,0314691	1,5837
RNPC3	7903404	NM_017619	0,0230405	1,66964
RNU5D-1	7915592	NR_002755	0,0296669	-2,19725

RNU6-118P	7948879	ENST00000516552	0,0472622	1,51804
RNU6-199P	8132830	ENST0000362954	0,00741185	-3,79843
RNU6-656P	8146328	ENST00000516785	0,0255498	1,58125
RNU6-759P	8065990	ENST00000516740	0,0298003	1,5636
RORA	7989365	NM_134261	0,0173425	1,59777
RPL39L	8092654	NM_052969	0,0300845	-1,72756
RPPH1	7977507	NR_002312	0,0190333	1,74289
RRM1	7937915	NM_001033	0,00412589	-1,57338
RRM2	8040223	NM_001034	0,0234556	-2,48978
RTL1	7981322	NM_001134888	0,0496573	-3,28091
RTN4	8052204	NM_007008	0,0236087	1,53405
RTTN	8023766	NM_173630	0,0447148	-1,50749
S100A11	7920128	NM_005620	0,0447868	2,58319
SAMD13	7902617	NM_001010971	0,00203916	-2,09171
SASS6	7917976	NM_194292	0,0017235	-2,18866
SAT2	8012247	NM_133491	0,0237602	1,53147
SCAND2P	7985587	NR_003654	0,0169479	1,58678
SCARNA17	8021183	NR_003003	0,0153311	2,05764
SCARNA7	8091778	NR_003001	0,00856292	1,83233
SCARNA9	7943158	NR_002569	0,0360723	1,67306
SCML2	8171561	NM_006089	0,0349504	-1,72174
SCN9A	8056491	NM_002977	0,0429973	1,65958
SCPEP1	8008646	NM_021626	0,041052	1,76772
SECISBP2L	7988581	NM_001193489	0,0277293	1,51761
SEMA6D	7983527	NM_001198999	0,0380755	2,47294
SEPHS1	7932109	NM_001195604	0,00941337	-1,68907
SETMAR	8077370	NM_001243723	0,0398593	-1,6857
SGOL1	8085754	NM_001012409	0,00513364	-2,76133
SGOL2	8047288	NM_001160033	0,0200447	-2,14535
SH2D3A	8033319	NM_005490	0,0113083	1,50087
SHC4	7988563	NM_203349	0,0345034	3,00687
SHCBP1	8001133	NM_024745	0,014066	-3,17142
SHISA4	7908758	NM_198149	0,00492806	1,62002

SHMT1	8013243	NM_001281786	0,0426457	-2,01237
SIVA1	7977288	NM_006427	0,00776691	-1,51202
SKA1	8021187	NM_001039535	0,0087001	-2,94496
SKA2	8017133	NM_001100595	0,0182194	-2,14971
SKA2	8157691	NM_001100595	0,00310885	-1,77135
SKA3	7970513	NM_001166017	0,00927191	-2,9021
SKP2	8104912	NM_001243120	0,00980498	-2,07013
SLC10A5	8151559	NM_001010893	0,0494203	1,66274
SLC12A5	8063129	NM_001134771	0,0101712	1,54704
SLC16A14	8059642	NM_152527	0,0448708	1,92988
SLC22A18	7937852	XM_006725127	0,0193014	1,80078
SLC22A18AS	7945774	NM_007105	0,029877	1,57638
SLC25A10	8010673	NM_001270888	0,0403298	-1,58179
SLC25A19	8018352	NM_001126121	0,0161494	-1,78854
SLC35D3	8122256	NM_001008783	0,0237464	-1,60042
SLC44A2	8025672	ENST00000586078	0,0169213	-1,81247
SLC48A1	7955055	NM_017842	0,0305069	1,96819
SLC4A11	8064613	NM_001174089	0,0170085	1,99574
SLK	7930276	NM_014720	0,0433134	1,79034
SMC2	8156982	NM_001042550	0,0234413	-2,1396
SMC4	8083709	NM_001002800	0,00345929	-2,20228
SMG1	8000156	NM_015092	0,000635858	1,5086
SMG1	8000687	NM_015092	0,00849936	1,71037
SMOX	8060745	NM_001270691	0,0151324	1,71126
SNORA23	7938329	NR_002962	0,0435804	-1,55617
SNORA29	8130580	NR_002965	0,025507	1,59844
SNORD114-3	7976816	NR_003195	0,0272972	1,69609
SNORD38A	7901050	NR_001456	0,00123105	1,76171
SNORD45C	7902396	NR_003042	0,0412503	2,03468
SNORD50B	8127989	NR_003044	0,0154569	-1,60188
SNORD95	8116532	NR_002591	0,00072721	1,56567
SNRNP40	7914334	AF090988	0,013137	-1,56136
SNRPG	8026339	NM_003096	0,0395076	-1,72424

SNRPGP10	7909102	ENST00000432323	0,0282793	-1,53742
SNX29P1	7993825	NR_045011	0,01153	1,52448
SNX29P1	7994576	NR_045011	0,0185182	1,57419
SP100	8048940	NM_001206702	0,0233482	1,82711
SPAG5	8013671	NM_006461	0,00981074	-2,76054
SPC24	8034122	NM_182513	0,00250731	-2,2422
SPC25	8056572	NM_020675	0,00517918	-3,07734
SPDL1	8109830	NM_017785	0,0177503	-2,65118
SPNS2	8003875	NM_001124758	0,0127769	2,48234
SPP1	8096301	NM_000582	0,0496976	2,42572
SRBD1	8051963	NM_018079	0,0343724	-1,53919
SRRT	8134992	NM_001128852	0,0054204	-1,62722
SRSF2	8018803	NM_003016	0,00242349	-1,54761
SRSF3	8119080	NR_036610	0,00373087	-1,56945
SSRP1	7948192	NM_003146	0,0234055	-1,60687
STAG1	8090898	NM_005862	0,0319201	-1,85391
STIL	7915926	NM_001048166	0,00692943	-2,12703
STX4	7995017	NM_001272095	0,0479828	1,5463
SUV39H1	8167347	NM_001282166	0,0224831	-1,69581
SUV39H2	7926319	NM_001193424	0,0160834	-1,57043
SVIL	7932796	NM_003174	0,00331638	1,83203
SYT2	7923442	NM_001136504	0,0420802	2,28332
ТАССЗ	8093500	NM_006342	0,0101929	-2,19635
ТАҒ9В	8173732	NM_015975	0,00455307	-1,73837
ТАҒ9В	8176263	NM_015975	0,00455307	-1,73837
TANC2	8009075	ENST00000389520	0,0196578	1,707
TCF19	8118086	NM_007109	0,0222459	-1,90712
TCF19	8177947	NM_007109	0,0222459	-1,90712
TCF19	8179228	NM_001077511	0,0242285	-1,8634
TCN2	8072360	NM_000355	0,0450315	2,56135
TCP11L2	7958262	NM_152772	0,0296731	3,77434
TCTN1	7958692	NM_001082537	0,0241601	-1,62092
TFDP1	7970317	NM_007111	0,0111444	-1,63578

THOC1	8021924	NM_005131	0,0186423	-1,58726
ТНОС6	7992795	NM_001142350	0,00162001	-1,54757
TICRR	7985873	NM_152259	0,00347656	-2,74216
TIMELESS	7964145	NM_003920	0,0166392	-2,34917
ТК1	8018849	NM_003258	0,0355741	-2,48699
TM4SF19	8093104	NM_001204897	0,0194032	1,51325
TMEM141	8159379	NM_032928	0,0366056	1,61489
TMEM194A	7964347	NM_001130963	0,0212604	-2,14866
TMEM194B	8057732	NM_001142645	0,0276502	-1,50791
TMEM237	8058258	NM_001044385	0,0364997	-2,03733
TMEM45A	8081288	XM_005247569	0,0213207	-1,68107
TMEM97	8005839	NM_014573	0,020576	-1,69226
TMEM98	8006415	NM_001033504	0,0216619	-1,58021
ТМРО	7957737	NM_001032283	0,00587378	-2,37799
TMSB15A	8174189	NM_021992	0,0128656	-4,22493
TMSB15B	8169073	NM_194324	0,0253926	-1,98487
TNFAIP8L1	8024885	NM_001167942	0,0111578	-1,54535
TNFRSF21	8126839	NM_014452	0,0111885	1,52892
TNPO1	8106122	NM_002270	0,021091	1,76827
ТОММ20	7925174	NM_014765	0,0255664	-1,79445
ΤΟΡ2Α	8014974	NM_001067	0,0146617	-2,82462
TOPBP1	8090772	NM_007027	0,00705235	-1,73051
TPP1	7946228	NM_000391	0,00909642	1,98562
ТРХ2	8061579	NM_012112	0,00934486	-2,36228
TRA2A	8138581	NM_001282757	0,0430329	-1,50958
TRAIP	8087513	NM_005879	0,000846478	-1,98928
TRIM59	8091757	NM_173084	0,0111003	-1,77014
TRIP13	8104234	NM_004237	0,0212149	-3,13596
TROAP	7955195	NM_005480	0,0125195	-1,66198
TSPAN6	8173941	NM_001278740	0,0262792	-1,74248
TSPAN7	8166784	NM_004615	0,00478326	2,455
TSPAN9	7953166	NM_001168320	0,0488466	2,06168
TSPY14P	8176737	ENST00000303979	0,0232831	-1,61605

ттк	8120838	NM_001166691	0,00566762	-3,12561
TUBD1	8017150	NM_001193609	0,00605018	-1,5598
TYMS	8019842	NM_001071	0,0424813	-2,81487
UBE2C	8063043	NM_001281741	0,0158469	-2,02152
UBE2Q2P1	7991120	NR_003661	0,00282795	2,10221
UBE2S	8012958	NM_014501	0,0115523	-1,87152
UBE2S	8039491	NM_014501	0,00882269	-1,79395
UBE2T	7923426	NM_014176	0,0229405	-1,74121
UBL3	7970831	NM_007106	0,0417312	1,79793
UBR7	7976336	NM_175748	0,00600543	-1,59473
UHRF1	8024900	NM_001048201	0,00393914	-1,62454
UPF3B	8174717	NM_023010	0,00285389	-1,73747
USP18	8071155	NM_017414	0,0486957	-1,7052
USP32P1	8005225	NR_003190	0,0207396	1,5796
USP53	8097098	NM_019050	0,0186457	1,55637
VAT1	8015759	NM_006373	0,0384309	1,56906
VAV3	7918157	NM_001079874	0,0275634	-1,86874
VRK1	7976621	NM_003384	0,010877	-2,704
VSIG1	8169263	NM_001170553	0,0433202	1,80619
VTRNA1-3	8108631	NR_026705	0,0399502	2,06389
VWDE	8138277	NM_001135924	0,0234225	1,52158
VWDE	8138258	NM_001135924	0,0427612	1,6459
WASF2	7914094	NM_001201404	0,0101113	1,61099
WDHD1	7979281	NM_001008396	0,0274122	-2,38592
WDR34	8164440	NM_052844	0,000420172	-1,73739
WDR54	8042843	ENST00000409791	0,0370897	-1,63473
WDR76	7983306	NM_001167941	0,0139384	-1,74902
WEE1	7938348	NM_001143976	0,0168758	-1,52957
WNK1	7952986	NM_001184985	0,0246419	1,93945
XRCC2	8144036	NM_005431	0,0246324	-2,36094
YEATS4	7957032	NM_006530	0,0249434	-1,54531
YPEL5	8041197	NM_001127399	0,0362769	1,58174
ZFC3H1	7964937	NM_144982	0,0164489	1,52277

ZFP36	8028652	NM_003407	0,0338915	2,1095
ZGRF1	8102389	NM_018392	0,0109474	-1,94618
ZNF100	8035808	NM_173531	0,00889946	-2,034
ZNF107	8133049	NM_001013746	0,015512	-2,09422
ZNF138	8133057	NM_001160183	0,0143337	-1,5181
ZNF367	8162601	AY554164	0,0103244	-1,57179
ZNF519	8022420	NM_145287	0,0165989	-1,82346
ZNF521	8022612	NM_015461	0,0173681	-1,59013
ZNF670	7925672	NM_001204220	0,0281596	-1,71062
ZNF678	7910190	NM_178549	0,0390805	-1,75488
ZNF681	8035855	NM_138286	0,0444306	-1,81576
ZNF724P	8035838	NR_045525	0,0146783	-1,97592
ZNF737	8035793	NM_001159293	0,000112974	-1,75078
ZNF841	8038949	NM_001136499	0,048099	1,57287
ZNF93	8027247	NM_031218	0,0112904	-2,14734
ZRANB3	8055377	NM_001286568	0,0472003	-1,55512
ZWILCH	7984330	NM_001287821	0,0106944	-2,22793
ZWINT	7933707	NM_001005413	0,00387889	-2,07163
N/A	8083592		0,0383846	-2,17416
N/A	8144151		0,00482795	-1,9341
N/A	8171879		0,0132328	-1,92031
N/A	7947890		0,0141254	-1,81148
N/A	8132960		0,0443463	-1,71433
N/A	7911136		0,0311934	-1,5825
N/A	7951341		0,0300088	1,50715
N/A	8122198		0,00168278	1,51125
N/A	8110666		0,00883534	1,53263
N/A	8044737		0,0374763	1,53382
N/A	8114213		0,0166687	1,53521
N/A	7925444		0,00456698	1,55737
N/A	7962557		0,00269045	1,58395
N/A	7916018		0,031839	1,68774
N/A	8121130		0,00525141	1,87363

N/A	7939296	 0,00901629	2,18224
N/A	7949954	 0,00530614	2,78996
N/A	7898405	 0,0232442	3,577
N/A	7912806	 0,0232442	3,577

Tabelle A-1: Vollständige Auflistung der differentiell exprimierten Gene nach Siomycin A Behandlung

792 Codesets zeigten eine <-1,5/>1,5-fach veränderte Expression (p<0,05). Codesets ohne Namen (N/A) stellen Pseudogene dar und werden zur Vollständigkeit aufgelistet. Dopplungen von Gennamen stehen für verschiedene Codesets, die dasselbe Gen abdecken. Blau markiert sind alle durch ENCODE identifizierten FOXM1 Zielgene (FOXM1 ENCODE Transcription Factor Targets Gene Set; Messung der Transkriptionsfaktor DNA-Binding mittels ChIP-seq; Zugang über http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome Datenbank)[195, 196].

7.5 Anhang 5

			p-Wert			Fold-Char	ige	
	Transkript		(FOXM1	siRNA	vs.	(FOXM1	siRNA	vs.
Gensymbol	ID	RefSeq	Kontr.)			Kontr)		
ACSL3	8048733	NM_004457	0,0199765	;		-1,65721		
ACVR1C	8055992	NM_001111031	0,0046665	7		1,67402		
AFF2	8170364	NM_001169122	0,0408838	;		1,5173		
ANKRD20A5P	8053741	ENST00000590226	0,0252932			1,96639		
ANKRD36BP1	7922121	NR_026844	0,017085			-1,65888		
AOC2	8007414	NM_001158	0,019629			1,5132		
APCDD1	8020141	NM_153000	0,0130057	,		2,48912		
ARPP19	8110618	NM_006628	0,0177753	}		-1,5349		
ARSJ	8102440	NM_024590	0,0052778	9		-1,79367		
ASPH	8150988	NM_001164751	0,0331265	,		-1,50045		
ASS1P11	8138487	ENST00000441309	0,0487709			-1,60077		
ATP5G1	8008132	NM_001002027	0,0089037	'3		-1,67538		
BCL2L1	8065569	NM_001191	0,0314034	ļ		1,60641		
BEST3	7964852	NM_001282613	0,001957			1,86482		
BIRC3	7943413	NM_001165	0,0431081			-1,64973		
BTBD3	8060988	NM_001282550	0,0252206	;		1,8626		
C14orf119	7973371	NM_017924	0,0035068	3		-1,50991		
C1orf194	7918294	NM_001122961	0,0404251			1,76565		
C5orf22	8104680	NM_018356	0,0088832	.8		-1,84207		
CA10	8016808	NM_001082533	0,0143171			-1,61414		
CACNA1A	8034643	NM_000068	0,0040006	3		2,03764		
CALU	8135955	NM_001130674	0,0129566	;		-1,68327		
CAMK1D	7926223	NM_020397	0,0323485	,		1,57251		
CAP2	8117054	NM_006366	0,0128695	,		-1,71208		
CBFA2T2	8061919	NM_001032999	0,0223055	•		1,72521		
CCDC30	7900555	NM_001080850	0,0220193	}		1,63489		
CCNA2	8102643	NM_001237	0,0475902	2		-1,68233		
CCNB1	8105828	NM_031966	0,0389183	}		-1,54658		
ССР110	7993664	NM_001199022	0,0101712			1,51625		

CCSER2	7928800	NM_001284240	0,00109486	1,72029
CDADC1	7969096	NM_001193478	0,0119158	1,58628
CDC14A	7903334	NM_003672	0,0111382	-1,59166
CDH6	8104663	NM_004932	0,00294776	-1,65105
CDKAL1	8117140	NM_017774	0,010585	-1,55738
CDKN3	7974404	NM_001130851	0,00945316	-1,80755
CDRT4	8012918	NM_001204477	0,0114935	1,53526
CEP19	8093145	NM_032898	0,00661585	1,57254
CHAC1	7982868	NM_001142776	0,0323195	-2,54627
CLNK	8099368	NM_052964	0,000922994	1,66284
CNOT8	8109462	NM_004779	0,0144532	-1,5813
CPSF6	7957008	NM_007007	0,031296	1,55335
CRYZ	7917037	NM_001130042	0,0428515	-1,92602
CXorf57	8169158	NM_018015	0,00173054	-1,7561
CXXC4	8102135	NM_025212	0,00383385	2,18929
CYB5R2	7946292	NM_016229	0,00377263	-1,69703
CYLD	7995552	NM_001042355	0,00451164	1,71905
DAZAP2	7955464	NM_001136264	0,00538707	-1,58102
DAZAP2P1	8058333	ENST00000475212	0,0136013	-1,55042
DCLK2	8097753	NM_001040260	0,010208	1,87373
DCTN6	8145660	NM_006571	0,0344938	-1,74816
DDAH1	7917347	NM_001134445	0,0112566	-2,19419
DDC	8139640	NM_000790	0,0454615	1,80141
DDX26B	8170027	NM_182540	0,0398546	1,57334
DHRS3	7912537	AY358093	0,00389807	-1,84224
DLL1	8130939	NM_005618	0,0299752	1,6692
DLL4	7982854	NM_019074	0,0224734	1,89673
DNAJB9	8135480	NM_012328	0,00979615	-1,53154
DPY30	8051387	NM_032574	0,000342719	-1,86178
DUSP26	8150197	NM_024025	0,0120073	1,70688
E2F5	8147101	NM_001083588	0,0284322	-1,55266
EDEM1	8077458	NM_014674	0,0185045	-1,68396
EGR1	8108370	NM_001964	0,0363326	-1,91399

EIF3J	7983350	NM_001284335	0,026384	-1,76624
ERI2	8000013	NM_001142725	0,00801589	-1,65658
ERO1L	7979179	NM_014584	0,0239863	-1,51349
ESYT1	7956166	NM_001184796	0,0231361	-1,72485
ETS2	8068593	NM_001256295	0,0213852	1,72788
ETV4	8015806	NM_001261439	0,00277017	-1,50991
EXPH5	7951545	NM_015065	0,0367073	-1,88543
FAM122A	8155696	NM_138333	0,0210963	1,51071
FAM13B	8114326	NM_001101800	0,011135	1,60995
FAM3C	8142540	NM_001040020	0,0039649	-2,29402
FAM3C	8166442	NM_001040020	0,00431922	-2,27908
FAM46C	7904361	NM_017709	0,0023052	-1,82472
FAM60A	7962146	NM_001135811	0,0463117	-1,50734
FAM72B	7909146	NM_001100910	0,0229945	-1,71114
FAM72B	7904452	NM_001100910	0,0251032	-1,70924
FAM72B	7919591	NM_001100910	0,0429073	-1,70249
FAM72B	8039928	NM_001100910	0,0273661	-1,66743
FAM91A1	8148208	NM_144963	0,000639689	-1,96053
FANCF	7947138	NM_022725	0,00984176	1,56619
FGF19	7950023	NM_005117	0,0077559	-1,52156
FNIP2	8098103	NM_020840	0,00759726	-1,89716
FOXM1	7960340	NM_001243088	0,00466572	-3,23298
GABRA3	8175696	NM_000808	0,0150823	1,96402
GALNT7	8098328	NM_017423	0,00784953	-1,60685
GCNT3	7984001	NM_004751	0,00531496	-1,63407
GLRA3	8103778	NM_001042543	0,00743524	2,46028
GNAQ	8161906	NM_002072	0,0272556	-1,5734
GNG12	7916843	NM_018841	0,00573064	-1,94463
GRB10	8139656	NM_001001549	0,0214018	-3,14605
HACL1	8085608	NM_001284413	0,0440193	-1,55764
HAUS4	7977841	NM_001166269	0,0346697	-1,5291
HFE	8117343	NM_000410	0,0187881	-1,68875
HIST1H1B	8124527	NM_005322	0,044511	-1,57173

HIST1H2AK	8124524	NM_003510	0,0107745	-1,55614
HS3ST3A1	8012883	NM_006042	0,000108459	-1,59789
HS6ST1	7898677	NM_004807	0,0221579	1,50255
HSP90AA6P	8103722	ENST00000325407	0,00802002	-1,84399
IL20RA	8129837	NM_001278722	0,0403749	-1,73394
ITGAV	8046861	NM_001144999	0,0338225	-1,58936
JPX	8168412	ENST00000414209	0,000147234	1,67556
KAL1	8171248	NM_000216	0,003777	2,27067
KATNAL1	7970844	NM_001014380	0,0130539	-1,92524
KCNJ6	8070279	NM_002240	0,00332425	1,63961
KIAA1919	8121525	NM_153369	0,0306413	1,52766
KIF2C	7901010	NM_006845	0,0473046	-1,51444
KLHL12	7923489	NM_021633	0,00617088	-1,63927
LAD1	7923347	NM_005558	0,0268221	-1,58237
LGR5	7957140	NM_001277226	0,0279121	-1,82787
LINC00965	8144410	NR_027000	0,0397491	1,50993
LINC01123	8044346	NR_046110	0,00500659	1,602
LINC01123	8054517	NR_046110	0,0439569	1,70239
LOC100134091	8061497	ENST00000278882	0,00272112	1,64135
LOC100996517	7904695	XR_431259	0,0192137	-1,56321
LOC101928673	7922351	ENST0000367716	0,00743136	1,55329
LOC389834	8104139	NR_027420	0,0417833	1,65956
LOC642131	7986639	XM_006709982	0,0396785	-1,62275
LOC642980	8170400	AK131413	0,0235545	1,83677
LOC642980	8175638	AK131413	0,0166537	1,85079
LRRFIP1	8049532	NM_001137550	0,0481982	-1,78826
LYRM7	8107859	NM_001293735	0,00569048	-1,5842
MAD2L1	8102560	NM_002358	0,0445176	-1,95412
МАРК8	7927389	NM_001278547	0,0397234	-1,52918
MARCH4	8058849	NM_020814	0,0280328	1,57979
MBNL3	8175177	NM_001170701	0,00622698	-2,30159
MFAP3	8109403	NM_001135037	0,0061199	-1,82489
MFGE8	7991234	NM_001114614	0,038487	-1,79857

MTHFD2P7	8084064	ENST00000483867	0,034186	-1,70853
MT-TD	7896750	ENST00000387419	0,0124807	1,72951
MT-TD	8165663	ENST00000387419	0,0184673	2,2373
МТ-ТК	8043375	ENST00000387421	0,0309066	1,65704
МТ-ТК	7896752	ENST00000387421	0,0245158	1,67354
ΜΤ-ΤΚ	8165667	ENST00000387421	0,0245158	1,67354
MT-TW	7896748	ENST00000387382	0,0146462	1,95798
MYO1D	8014115	NM_015194	0,0111197	1,54029
MYRFL	7957092	ENST0000299350	0,0276332	1,7505
NCEH1	8092177	NM_001146276	0,0282431	-1,66122
NECAP1	7953715	NM_015509	0,0143276	-1,78637
NOL4	8022856	NM_001198546	0,0100874	1,5934
NPAS2	8043909	NM_002518	0,0394204	-1,54993
NPTN	7990253	NM_001161363	0,00134461	-1,50991
NR0B2	7914000	NM_021969	0,0146316	2,13584
NRAS	7918813	NM_002524	0,000197525	-1,59778
NRM	8178399	NM_001270707	0,0197482	-1,6846
NRM	8179683	NM_001270707	0,0197482	-1,6846
NRM	8124806	NM_001270707	0,0275149	-1,53973
NUP62CL	8174351	NM_017681	0,0495633	-1,86586
PALLD	8098263	NM_001166108	0,015134	-1,62194
PCDHB13	8108737	NM_018933	0,0170559	1,5972
PCDHB14	8108744	NM_018934	0,0353217	1,65881
PCGF5	7929132	NM_001256549	0,0365373	1,58658
РСК2	7973530	NM_001018073	0,0133551	-1,83132
PCP4	8068651	NM_006198	0,00157812	3,31411
PDE5A	8102532	NM_001083	0,0430085	1,56939
PDE8A	7985662	NM_002605	0,0370227	-1,57545
PDLIM3	8104022	ENST0000284770	0,0168244	-1,62371
PEX5L	8092277	NM_001256750	0,0328936	1,66179
PGM2	8094556	NM_018290	0,023531	-1,59187
PGM2L1	7950391	NM_173582	0,0492054	-1,51455
PHLDA1	7965040	NM_007350	0,0241687	-2,64465

РІ4К2В	8094378	NM_018323	0,0103151	-1,59401
PIGM	7921526	NM_145167	0,0147559	1,507
РІКЗСВ	8091009	NM_006219	0,0445898	-1,6697
PLCL1	8047248	NM_006226	0,00310204	1,62546
PLD1	8092134	NM_001130081	0,0121228	-1,86063
PLEKHA1	7931081	NM_001001974	0,0014267	-2,22357
PLEKHA3	8046680	NM_019091	0,0454477	-1,52809
PLXNA2	7923991	NM_025179	0,00931224	1,57211
PPIP5K2	8107164	NM_001276277	0,0145349	-1,59095
PRKXP1	7991562	NR_073405	0,00723521	2,62107
PROX1	7909681	NM_001270616	0,0292623	1,56703
PSAT1	8156043	NM_021154	0,00379349	-2,13195
PTDSS1	8147447	NM_001290225	0,00796951	-1,59295
PTGS2	7922976	ENST00000490885	0,0284737	-2,01369
RAB9B	8174271	NM_016370	0,0387831	1,58104
RAD23A	8026122	NM_001270362	0,00216117	-1,59491
RASSF2	8064790	NM_014737	0,0138124	-1,75112
RASSF3	7956819	NM_178169	0,000167432	-2,33078
RASSF9	7965226	NM_005447	0,00488033	-1,61207
REV3L	8128894	NM_001286431	0,0159647	1,60927
RFESD	8106978	NM_001131065	0,0038177	-1,73725
RHOQP2	8045289	ENST00000449922	0,0173723	-1,97584
RIN2	8061247	NM_001242581	0,0367067	1,716
RN7SKP65	7964596	ENST00000410278	0,0243431	-1,67336
RN7SL218P	8095703	ENST00000464637	0,00992694	1,5183
RNF130	8116372	NM_001280801	0,005103	-1,75982
RNU6-838P	8100227	ENST00000363399	0,0206927	1,65922
RNVU1-4	7905054	NR_104073	0,0452499	-1,63691
RNVU1-4	7919160	NR_104073	0,0462714	-1,63121
RNVU1-4	7919166	NR_104073	0,0462714	-1,63121
ROR1	7901969	NM_001083592	0,027234	-1,58063
RYR2	7910792	NM_001035	0,0284009	1,59999
S100A16	7920291	ENST00000368703	0,0461737	-1,80688
SAMD9	8140967	NM_001193307	0,0222707	1,92217
----------	---------	-----------------	------------	----------
SAT1	8166469	NM_002970	0,0372474	-1,84128
SCN3A	8056376	NM_001081676	0,0168384	1,81297
SCNN1A	7960529	NM_001038	0,0147562	1,52758
SEH1L	8020254	NM_031216	0,00922726	-1,51309
SEPT10	8054467	NM_144710	0,0404027	-1,65868
SERINC5	8112865	NM_001174071	0,00158489	-1,97869
SFT2D2	7907135	NM_199344	0,0342872	-1,58978
SFXN2	7930148	NM_178858	0,0374588	-1,66096
SGCE	8141035	NM_001099400	0,0432848	2,3944
SKA2	8017133	NM_001100595	0,035309	-1,81401
SKA2	8157691	NM_001100595	0,00704882	-1,53772
SLC1A4	8042310	NM_001193493	0,0144846	-1,69677
SLC25A17	8076260	NM_001282726	0,0135497	-1,55831
SLC43A1	7948249	NM_001198810	0,0497898	-1,5428
SLC44A2	8025672	ENST00000586078	0,0292784	-1,62293
SLC7A5	8003298	NM_003486	0,0407705	-1,94276
SLC9A6	8170097	NM_001042537	0,0108628	-1,85967
SLITRK3	8091863	NM_014926	0,003975	1,52396
SMURF2	8017651	NM_022739	0,00544556	-1,64976
SNCAIP	8107594	NM_001242935	0,00680364	2,4342
SNHG17	8066247	NR_027241	0,0143043	1,70969
SRP19	8107353	NM_001204199	0,0179136	1,6611
ST8SIA4	8113358	NM_005668	0,0106457	2,00812
STK17B	8057887	NM_004226	0,0442323	-2,25804
STRADB	8047443	NM_001206864	0,00527625	1,50071
SWAP70	7938370	NM_015055	0,00321682	-1,63793
SYPL1	8142110	NM_006754	0,00864414	-2,20823
SYT4	8022986	NM_020783	0,00528998	1,68535
TACR1	8053266	NM_001058	0,0119722	2,07864
TANC1	8045889	NM_001145909	0,00979172	-1,55719
TC2N	7980891	NM_001128595	0,0300799	-2,04419
TDG	7958147	NM_003211	0,0133107	-1,78837

TLCD1	8013771	NM_001160407	0,0428493	-1,5459
TMED5	7917741	NM_001167830	0,0217369	-1,6061
TMEM230	8064833	NM_001009924	0,0013861	-1,71297
TMEM252	8161610	NM_153237	0,0444939	-1,60553
TMEM54	7914592	NM_033504	0,0120125	-1,64829
TOMM34	8066461	NM_006809	0,000115726	-2,13681
TRAPPC6B	7978739	NM_177452	0,0347598	1,53973
TRIM38	8117321	NM_006355	0,0387651	-1,55993
TSPYL1	8129097	NM_003309	0,0430785	1,74701
TSPYL4	8129089	NM_021648	0,00921277	1,9121
ТТСЗОА	8056999	NM_152275	0,0170512	1,78225
UBA6	8100615	NM_018227	0,000504562	-1,68739
UBE4A	7944195	NM_001204077	0,018806	-1,59399
UPF1	8027074	NM_002911	0,00524375	1,61706
USP46	8100328	NM_001134223	0,0064637	-1,58171
USP53	8097098	NM_019050	0,0143451	-1,62734
VAMP3	7897370	NM_004781	0,00450605	-1,78293
VAMP4	7922309	NM_001185127	0,0275857	-1,53289
VAV3	7918157	NM_001079874	0,0278147	1,8647
WDR41	8112746	NM_018268	0,00118018	-1,55091
WNK1	7952986	NM_001184985	0,0185936	2,08726
YARS	7914563	NM_003680	0,0340378	-1,53282
ZBTB20	8089701	NM_001164342	0,00237922	1,55283
ZBTB8OSP2	8059687	ENST00000423890	0,0404956	-1,50942
ZDHHC2	8144758	NM_016353	0,0261308	-1,53693
ZMAT4	8150419	NM_001135731	0,0264613	2,42021
ZNF354A	8116247	NM_005649	0,0118747	1,53035
ZNF81	8167201	NM_007137	0,00336078	1,54498
ZNF852	8086494	NM_001287349	0,0387161	1,59612
N/A	7979696		0,029328	-1,93352
N/A	7980477		0,020116	-1,65193
N/A	7925436		0,0375972	1,53853
N/A	8114213		0,0142139	1,57511

N/A	8036363	 0,0285127	1,60576
N/A	8025301	 0,0439843	1,63049
N/A	7917739	 0,00505938	1,7973
N/A	8045334	 0,0121646	1,84787
N/A	8101061	 0,0309286	1,94618
N/A	8099922	 0,0425805	1,96659

Tabelle A-2: Vollständige Auflistung der differentiell exprimierten Gene nach RNAi vermitteltem *Knockdown* von *FOXM1*

266 Codesets zeigten eine <-1,5/>1,5-fach veränderte Expression (p<0,05). Codesets ohne Namen (N/A) stellen Pseudogene dar und werden zur Vollständigkeit aufgelistet. Dopplungen von Gennamen stehen für verschiedene Codesets, die dasselbe Gen abdecken.

7.6 Anhang 6

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test (release 201504				
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2015-08-06				
Analyzed List:	Client Text Box Input (Homo sapiens)				
Reference List:	Homo sapiens (all genes in database)				
Bonferroni correction:	true				
Reference list	Client Text	Box Input			
Mapped IDs:	20814	642			
Unmapped IDs:	0	92			

				Client		
				Text		Client
	Homo	Client		Вох	Client Text	Text Box
	sapiens -	Text Box	Client Text	Input	Box Input	Input
GO biological process	REFLIST	Input	Box Input	(over/	(fold	(P-
complete	(20814)	(642)	(expected)	under)	Enrichment)	value)
lagging strand	6	5	0,19	+	> 5	1,19E-02
elongation						
protein localization to	10	8	0,31	+	> 5	1,15E-05
kinetochore						
DNA strand	35	27	1,08	+	> 5	1,20E-24
elongation involved in						
DNA replication						
mitotic spindle	8	6	0,25	+	> 5	1,93E-03
elongation						
protein localization to	12	9	0,37	+	> 5	1,90E-06
chromosome,						
centromeric region						
DNA strand	37	27	1,14	+	> 5	5,06E-24
elongation						
mitotic spindle	7	5	0,22	+	> 5	2,51E-02
midzone assembly						
telomere	23	16	0,71	+	> 5	6,61E-13
maintenance via semi-						
conservative						
replication						
nuclear DNA	27	18	0,83	+	> 5	1,65E-14
replication						
spindle elongation	9	6	0,28	+	> 5	3,82E-03
mitotic chromosome	12	8	0,37	+	> 5	4,70E-05
condensation						

cell cycle DNA	28	18	0,86	+	> 5	3,08E-14
replication						
regulation of	11	7	0,34	+	> 5	5,77E-04
attachment of spindle						
microtubules to						
kinetochore						
DNA replication	30	19	0,93	+	> 5	4,77E-15
initiation						
activation of	8	5	0,25	+	> 5	4,76E-02
anaphase-promoting						
complex activity						
telomere	27	16	0,83	+	> 5	7,68E-12
maintenance via						
recombination						
kinetochore	12	7	0,37	+	> 5	1,03E-03
organization						
chromatin remodeling	31	17	0,96	+	> 5	3,42E-12
at centromere						
mitotic recombination	33	18	1,02	+	> 5	5,15E-13
protein localization to	11	6	0,34	+	> 5	1,21E-02
chromatin						
centromere complex	35	19	1,08	+	> 5	7,74E-14
assembly						
DNA-dependent DNA	19	10	0,59	+	> 5	5,65E-06
replication						
maintenance of						
fidelity						
nucleotide-excision	19	10	0,59	+	> 5	5,65E-06
repair, DNA gap filling						
CENP-A containing	29	15	0,89	+	> 5	4,18E-10
nucleosome assembly						
CENP-A containing	29	15	0,89	+	> 5	4,18E-10
chromatin						
organization						
replication fork	16	8	0,49	+	> 5	4,22E-04
processing						
mitotic prometaphase	99	49	3,05	+	> 5	6,98E-38
telomere	37	18	1,14	+	> 5	3,60E-12
maintenance via						
telomere lengthening						
DNA-dependent DNA	99	48	3,05	+	> 5	1,21E-36
replication						
microtubule	27	13	0,83	+	> 5	4,81E-08
cytoskeleton						

organization involved						
in mitosis						
mitotic spindle	23	11	0,71	+	> 5	2,16E-06
assembly						
attachment of spindle	13	6	0,4	+	> 5	3,12E-02
microtubules to						
kinetochore						
protein localization to	33	15	1,02	+	> 5	2,59E-09
chromosome						
DNA replication-	39	17	1,2	+	> 5	1,35E-10
independent						
nucleosome assembly						
DNA replication-	39	17	1,2	+	> 5	1,35E-10
independent						
nucleosome						
organization						
mitotic G2 DNA	14	6	0,43	+	> 5	4,75E-02
damage checkpoint						
DNA replication	14	6	0,43	+	> 5	4,75E-02
checkpoint						
regulation of	26	11	0,8	+	> 5	7,67E-06
transcription involved						
in G1/S transition of						
mitotic cell cycle						
mitotic G2/M	19	8	0,59	+	> 5	1,54E-03
transition checkpoint						
mitotic sister	73	30	2,25	+	> 5	6,93E-20
chromatid segregation						
histone exchange	39	16	1,2	+	> 5	1,96E-09
sister chromatid	81	33	2,5	+	> 5	5,15E-22
segregation						
chromosome	28	11	0,86	+	> 5	1,64E-05
condensation						
mitotic spindle	48	18	1,48	+	> 5	2,86E-10
organization						
negative regulation of	22	8	0,68	+	> 5	4,58E-03
G2/M transition of						
mitotic cell cycle						
regulation of	69	25	2,13	+	> 5	6,94E-15
chromosome						
segregation						
error-prone	20	7	0,62	+	> 5	2,98E-02
translesion synthesis						

negative regulation of	23	8	0,71	+	> 5	6,37E-03
cell cycle G2/M phase						
transition						
DNA replication	211	73	6,51	+	> 5	1,96E-47
mitotic cell cycle	295	102	9,1	+	> 5	5,35E-68
phase						
mitotic cytokinesis	29	10	0,89	+	> 5	2,95E-04
cell cycle phase	297	102	9,16	+	> 5	1,01E-67
mitotic S phase	118	40	3,64	+	> 5	2,72E-24
biological phase	301	102	9,28	+	> 5	3,57E-67
S phase	120	40	3,7	+	> 5	5,03E-24
metaphase plate	39	13	1,2	+	> 5	4,09E-06
congression						
spindle checkpoint	39	13	1,2	+	> 5	4,09E-06
telomere	64	21	1,97	+	> 5	2,82E-11
maintenance						
mitotic interphase	132	43	4,07	+	> 5	1,23E-25
G2 DNA damage	34	11	1,05	+	> 5	1,18E-04
checkpoint						
mitotic metaphase	31	10	0,96	+	> 5	5,44E-04
plate congression						
interphase	134	43	4,13	+	> 5	2,21E-25
nuclear chromosome	135	43	4,16	+	> 5	2,96E-25
segregation						
telomere organization	66	21	2,04	+	> 5	5,08E-11
centrosome cycle	35	11	1,08	+	> 5	1,57E-04
chromosome	204	64	6,29	+	> 5	1,17E-38
segregation						
mitotic nuclear	335	105	10,33	+	> 5	4,92E-66
division						
establishment of	50	15	1,54	+	> 5	8,18E-07
chromosome						
localization						
chromosome	50	15	1,54	+	> 5	8,18E-07
localization						
regulation of mitotic	47	14	1,45	+	> 5	3,74E-06
sister chromatid						
separation						
nucleosome assembly	108	32	3,33	+	> 5	3,30E-17
spindle assembly	54	16	1,67	+	> 5	2,35E-07
regulation of DNA-	34	10	1,05	+	> 5	1,26E-03
dependent DNA						
replication						

spindle assembly	34	10	1,05	+	> 5	1,26E-03
checkpoint						
spindle organization	96	28	2,96	+	> 5	1,44E-14
regulation of mitotic	48	14	1,48	+	> 5	4,88E-06
sister chromatid						
segregation						
regulation of sister	48	14	1,48	+	> 5	4,88E-06
chromatid segregation						
cytoskeleton-	38	11	1,17	+	> 5	3,58E-04
dependent cytokinesis						
regulation of mitotic	45	13	1,39	+	> 5	2,23E-05
metaphase/anaphase						
transition						
DNA packaging	157	45	4,84	+	> 5	1,09E-24
DNA geometric	63	18	1,94	+	> 5	2,50E-08
change						
DNA damage	35	10	1,08	+	> 5	1,64E-03
response, detection of						
DNA damage						
translesion synthesis	49	14	1,51	+	> 5	6,33E-06
ATP-dependent	60	17	1,85	+	> 5	1,13E-07
chromatin remodeling						
regulation of	46	13	1,42	+	> 5	2,88E-05
metaphase/anaphase						
transition of cell cycle						
anaphase	160	45	4,94	+	> 5	2,35E-24
mitotic anaphase	160	45	4,94	+	> 5	2,35E-24
DNA biosynthetic	82	23	2,53	+	> 5	3,62E-11
process						
chromatin assembly	122	34	3,76	+	> 5	1,25E-17
positive regulation of	36	10	1,11	+	> 5	2,11E-03
cytokinesis						
mitotic M phase	221	61	6,82	+	> 5	1,28E-33
negative regulation of	40	11	1,23	+	> 5	5,95E-04
chromosome						
segregation						
protein-DNA complex	135	37	4,16	+	> 5	3,57E-19
assembly						
DNA conformation	219	60	6,75	+	> 5	7,67E-33
change						
M phase	223	61	6,88	+	> 5	2,10E-33
mitotic spindle	33	9	1,02	+	> 5	9,66E-03
assembly checkpoint						

nuclear division	445	120	13,73	+	> 5	3,57E-69
base-excision repair	52	14	1,6	+	> 5	1,34E-05
regulation of G2/M	52	14	1,6	+	> 5	1,34E-05
transition of mitotic						
cell cycle						
sister chromatid	30	8	0,93	+	> 5	4,42E-02
cohesion						
negative regulation of	38	10	1,17	+	> 5	3,44E-03
mitotic sister						
chromatid separation						
negative regulation of	38	10	1,17	+	> 5	3,44E-03
mitotic sister						
chromatid segregation						
negative regulation of	38	10	1,17	+	> 5	3,44E-03
sister chromatid						
segregation						
regulation of cell cycle	54	14	1,67	+	> 5	2,15E-05
G2/M phase transition						
postreplication repair	58	15	1,79	+	> 5	6,05E-06
DNA duplex	58	15	1,79	+	> 5	6,05E-06
unwinding						
regulation of mitotic	132	34	4,07	+	> 5	1,37E-16
nuclear division						
mitotic spindle	35	9	1,08	+	> 5	1,55E-02
checkpoint						
negative regulation of	35	9	1,08	+	> 5	1,55E-02
mitotic						
metaphase/anaphase						
transition						
organelle fission	472	121	14,56	+	> 5	2,11E-67
chromatin assembly	142	36	4,38	+	> 5	1,69E-17
or disassembly						
negative regulation of	36	9	1,11	+	> 5	1,95E-02
metaphase/anaphase						
transition of cell cycle						
negative regulation of	49	12	1,51	+	> 5	5,31E-04
mitotic nuclear						
division						
mitotic cell cycle	791	193	24,4	+	> 5	1,93E-
						109
negative regulation of	74	18	2,28	+	> 5	3,31E-07

double-strand break	74	18	2,28	+	> 5	3,31E-07
repair via homologous						
recombination						
regulation of	37	9	1,14	+	> 5	2,43E-02
centrosome cycle						
recombinational	75	18	2,31	+	> 5	4,10E-07
repair						
centrosome	67	16	2,07	+	> 5	5,13E-06
organization						
nucleosome	134	32	4,13	+	> 5	1,57E-14
organization						
cell cycle G1/S phase	172	41	5,31	+	> 5	2,52E-19
transition						
G1/S transition of	172	41	5,31	+	> 5	2,52E-19
mitotic cell cycle						
meiotic chromosome	63	15	1,94	+	> 5	1,82E-05
segregation						
cell division	466	109	14,37	+	> 5	3,08E-56
negative regulation of	60	14	1,85	+	> 5	7,93E-05
nuclear division						
cell cycle checkpoint	270	63	8,33	+	> 5	9,84E-31
positive regulation of	56	13	1,73	+	> 5	2,81E-04
mitotic cell cycle						
phase transition						
mitotic cell cycle	720	167	22,21	+	> 5	1,13E-89
process						
protein-DNA complex	162	37	5	+	> 5	1,41E-16
subunit organization						
regulation of	62	14	1,91	+	> 5	1,19E-04
cytokinesis						
regulation of nuclear	157	35	4,84	+	> 5	3,22E-15
division						
positive regulation of	59	13	1,82	+	> 5	5,09E-04
cell cycle phase						
transition						
prophase	64	14	1,97	+	> 5	1,75E-04
mitotic prophase	64	14	1,97	+	> 5	1,75E-04
double-strand break	134	29	4,13	+	> 5	7,58E-12
repair						
cell cycle phase	311	67	9,59	+	> 5	7,39E-31
transition						
mitotic cell cycle	307	66	9,47	+	> 5	2,70E-30
phase transition						

microtubule	76	16	2,34	+	> 5	2,99E-05
organizing center						
organization						
meiotic nuclear	134	28	4,13	+	> 5	5,55E-11
division						
chromosome	48	10	1,48	+	> 5	2,70E-02
organization involved						
in meiosis						
meiotic cell cycle	140	29	4,32	+	> 5	2,27E-11
process						
DNA recombination	204	42	6,29	+	> 5	1,57E-17
cell cycle G2/M phase	142	29	4,38	+	> 5	3,24E-11
transition						
G2/M transition of	142	29	4,38	+	> 5	3,24E-11
mitotic cell cycle						
transcription-coupled	49	10	1,51	+	> 5	3,23E-02
nucleotide-excision						
repair						
regulation of DNA	55	11	1,7	+	> 5	1,31E-02
recombination						
cytokinesis	96	19	2,96	+	> 5	2,90E-06
meiosis I	81	16	2,5	+	> 5	7,21E-05
regulation of	117	23	3,61	+	> 5	4,75E-08
microtubule						
cytoskeleton						
organization						
anaphase-promoting	83	16	2,56	+	> 5	1,01E-04
complex-dependent						
proteasomal						
ubiquitin-dependent						
protein catabolic						
process						
regulation of cell	261	50	8,05	+	> 5	4,70E-20
division						
cell cycle process	1068	201	32,94	+	> 5	2,74E-94
meiotic cell cycle	173	32	5,34	+	> 5	1,83E-11
positive regulation of	116	21	3,58	+	> 5	1,71E-06
mitotic cell cycle						
regulation of DNA	119	21	3,67	+	> 5	2,68E-06
replication						
chromatin remodeling	148	26	4,57	+	> 5	2,37E-08
cell cycle	1322	229	40,78	+	> 5	1,58E-
						102
DNA repair	434	73	13,39	+	> 5	3,23E-27

DNA metabolic	722	121	22,27	+	> 5	7,75E-48
process						
regulation of	144	24	4,44	+	> 5	4,66E-07
microtubule-based						
process						
positive regulation of	128	21	3,95	+	> 5	9,59E-06
cell division						
negative regulation of	92	15	2,84	+	> 5	2,36E-03
chromosome						
organization						
mitotic cell cycle	167	27	5,15	+	> 5	5,85E-08
checkpoint						
regulation of mitotic	251	40	7,74	+	> 5	8,09E-13
cell cycle phase						
transition						
microtubule	343	54	10,58	+	> 5	4,95E-18
cytoskeleton						
organization						
regulation of cell cycle	269	42	8,3	+	> 5	2,76E-13
phase transition						
DNA integrity	155	24	4,78	+	> 5	1,99E-06
checkpoint						
chromosome	867	132	26,74	+	4,94	3,92E-48
organization						
regulation of cell cycle	521	79	16,07	+	4,92	8,47E-27
process						
negative regulation of	236	35	7,28	+	4,81	5,33E-10
cell cycle process						
negative regulation of	88	13	2,71	+	4,79	4,11E-02
DNA metabolic						
process						
regulation of cyclin-	89	13	2,75	+	4,74	4,63E-02
dependent protein						
serine/threonine						
kinase activity						
negative regulation of	225	32	6,94	+	4,61	1,87E-08
mitotic cell cycle						
regulation of mitotic	466	65	14,37	+	4,52	1,52E-19
cell cycle						
positive regulation of	244	34	7,53	+	4,52	6,66E-09
cell cycle process						
negative regulation of	158	22	4,87	+	4,51	7,27E-05
mitotic cell cycle						

negative regulation of	169	23	5,21	+	4,41	5,10E-05
cell cycle phase						
transition						
cellular response to	691	91	21,31	+	4,27	5,99E-27
DNA damage stimulus						
regulation of	139	18	4,29	+	4,2	4,47E-03
proteasomal						
ubiquitin-dependent						
protein catabolic						
process						
positive regulation of	303	38	9,35	+	4,07	6,85E-09
cell cycle						
regulation of DNA	281	35	8,67	+	4,04	6,64E-08
metabolic process						
microtubule-based	509	63	15,7	+	4,01	2,85E-16
process						
regulation of	212	26	6,54	+	3,98	4,38E-05
chromosome						
organization						
DNA damage	145	17	4,47	+	3,8	3,37E-02
checkpoint						
regulation of cell cycle	946	108	29,18	+	3,7	1,50E-27
negative regulation of	282	30	8,7	+	3,45	7,26E-05
organelle organization						
nucleic acid	218	23	6,72	+	3,42	4,43E-03
phosphodiester bond						
nydrolysis	694	64	40.45		2.40	4.055.44
chromatin	621	61	19,15	+	3,18	4,25E-11
organization	205	20	0.47		2.40	2 245 02
anatomical structure	265	26	8,17	+	3,18	3,21E-03
	1070	102	60.76		2 10	1 025 44
organelle organization	1970	195	00,70	Ŧ	5,10	1,03E-44
	460	11	1/ 10		2 1	7 015 07
	400	44	14,19	т	5,1	7,012-07
establishment of	20/	27	9.07		2.08	6 72E-02
organelle localization	234	27	9,07	т	2,98	0,721-03
small GTPase	778	69	24	+	2.88	8 44F-11
mediated signal	//0	05	27	·	2,00	0,446 11
transduction						
organelle organization	2912	257	89.82	+	2.86	3.02E-55
chromatin	513	45	15.82	+	2.84	6.25E-06
modification			, ~_		_, . .	-, 00
organelle localization small GTPase mediated signal transduction organelle organization chromatin modification	2912 513	69 257 45	24 89,82 15,82	+ + + +	2,33 2,88 2,86 2,84	8,44E-11 3,02E-55 6,25E-06

collular	608	52	10 75	т	2 63	2 20E-07
macromolecular	008	55	18,75	т	2,65	2,301-07
complex assembly						
organelle localization	368	32	11.35	+	2.82	2.17F-03
cell proliferation	661	57	20.39	+	2,82	6.00F-08
protein complex	948	80	29,24	+	2,74	7,56F-12
assembly	510				_), :	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
protein complex	948	80	29.24	+	2.74	7.56E-12
biogenesis			- /		,	,
cytoskeleton	848	71	26,16	+	2,71	5,30E-10
organization						
organelle assembly	435	35	13,42	+	2,61	3,61E-03
protein complex	1406	107	43,37	+	2,47	7,11E-14
subunit organization						
macromolecular	1177	88	36,3	+	2,42	2,39E-10
complex assembly						
cellular response to	1718	124	52,99	+	2,34	6,45E-15
stress						
negative regulation of	547	39	16,87	+	2,31	1,50E-02
cellular component						
organization						
regulation of	1097	77	33,84	+	2,28	2,31E-07
organelle organization						
macromolecular	2074	139	63,97	+	2,17	1,65E-14
complex subunit						
organization	764				2.4.6	2 775 02
cellular	764	51	23,57	+	2,16	2,77E-03
macromolecule						
	025	60	20 01		2.09	0.245.04
macromoloculo	935	57	28,84	+	2,08	9,34E-04
catabolic process	655	57	21,15	т	2,00	2,002-03
cellular component	1810	11/	55.83		2 04	2 36F-09
assembly	1010	114	55,65	·	2,04	2,302-03
cellular component	5066	315	156.26	+	2.02	7.15E-38
organization		010			_,	,, ====
cellular component	5188	319	160.02	+	1.99	1.36E-37
organization or			,-		,	,
biogenesis						
cellular component	1978	120	61,01	+	1,97	5,95E-09
biogenesis			-			
intracellular signal	1816	102	56,01	+	1,82	2,74E-05
transduction						

organic substance	1509	80	46,54	+	1,72	1,57E-02
catabolic process						
nucleic acid metabolic	3874	204	119,49	+	1,71	7,58E-12
process						
nucleobase-containing	4372	223	134,85	+	1,65	5,45E-12
compound metabolic						
process						
cellular aromatic	4575	229	141,11	+	1,62	1,46E-11
compound metabolic						
process						
regulation of cellular	2160	108	66,62	+	1,62	3,32E-03
component						
organization						
heterocycle metabolic	4573	228	141,05	+	1,62	2,75E-11
process						
organic cyclic	4818	230	148,61	+	1,55	2,33E-09
compound metabolic						
process						
response to stress	3648	174	112,52	+	1,55	8,80E-06
cellular nitrogen	5112	242	157,68	+	1,53	8,69E-10
compound metabolic						
process						
nitrogen compound	5475	251	168,87	+	1,49	8,33E-09
metabolic process						
single-organism	4494	198	138,62	+	1,43	2,37E-04
metabolic process						
cellular response to	6227	265	192,07	+	1,38	5,06E-06
stimulus						
cellular	6753	278	208,29	+	1,33	4,56E-05
macromolecule						
metabolic process						
response to stimulus	7621	310	235,07	+	1,32	7,76E-06
single-organism	11415	458	352,09	+	1,3	5,50E-14
cellular process						
cellular metabolic	8573	341	264,43	+	1,29	5,83E-06
process						
macromolecule	7438	294	229,42	+	1,28	8,01E-04
metabolic process						
single-organism	12755	498	393,42	+	1,27	7,80E-15
process						
primary metabolic	8697	339	268,26	+	1,26	9,51E-05
process						
metabolic process	9928	386	306,23	+	1,26	1,38E-06

organic substance	9008	350	277,85	+	1,26	5,39E-05
metabolic process						
cellular process	14147	542	436,36	+	1,24	1,05E-17
biological_process	16542	590	510,23	+	1,16	4,06E-14
system process	1773	26	54,69	-	0,48	4,79E-02
Unclassified	4272	58	131,77	-	0,44	0,00E+0
						0
G-protein coupled	1197	11	36,92	-	0,3	2,52E-03
receptor signaling						
pathway						
sensory perception	945	8	29,15	-	0,27	2,07E-02
detection of chemical	496	1	15,3	-	< 0.2	2,44E-02
stimulus						
detection of stimulus	514	1	15,85	-	< 0.2	1,43E-02
involved in sensory						
perception						

Tabelle A-3: Rohdaten des PANTHER Überrepräsentations-Tests nach Siomycin A Behandlung

Analysetyp: PANTHER Overrepresentation Test (release 20150430); Annotation Data Set: GO Biological process complete, alpha=0,05 mit Bonferroni Korrektur [266].

7.7 Anhang 7



Abbildung A-3: Weitere Dosis-Wirkungs-Kurven zur Demonstration der Zeitanhängigkeit der Bortezomib-Antwort

A-D) Histogramme des Effektes bei verschiedenen Konzentrationen einer dekadischen Verdünnungsreihe nach 24 und 50 Stunden in vitro. Balken kennzeichnen Median und Interquartilenabstand. Legende: *p<0,05 (Zellzahl50h<Zellzahl24h); zweifache ANOVA mit Sidak's Korrektur. E-H) Normalisierte Dosis-Wirkungskurven (Median) zur Bestimmung der relativen IC50 bei 24 und 50h.



Abbildung A-4: Weitere Dosis-Wirkungs-Kurven zur Demonstration der Chemosensibilität nach Bortezomib-Behandlung

BON (A), QGP-1 (B), LCC-18 (C) und KRJ-I (D) Zellen wurden über 24 und 50h mit Bortezomib, Cisplatin oder einer 1:10 Kombination beider Substanzen, in jeweils dekadisch (von 1nM Bortezomib+10nM Cisplatin) steigender Konzentration inkubiert. Wachstumskurven nach 50h der in vitro Inkubation in Abhängigkeit von der Konzentration (dekadische Verdünnungsreihe; höchste Konzentrationen: Bortezomib 10µM, Cisplatin 100µM; Median und Interquartilenabstand). Punkte kennzeichnen Median und Interquartilenabstand.

7.8 Anhang 8



Abbildung A-5: Repräsentative Rohdaten zur Messung der Apoptoseinduktion nach Bortezomib-Behandlung und Kombination

A) BON, B) KRJ-I und C) QGP-1 Zellen wurden 20h mit mit 10µM Cisplatin, 50nM Borteomib und Kombination inkubiert. Die Messung der Apoptoseinduktion erfolgte per JC-1-Assay.

7.9 Anhang 9

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
ABL1	-0,1557	-0,2562	-0,0553	1,89E-02	6,26E-01	RAS, CC
ALK	-1,1623	-1,9890	-0,3356	2,83E-02	7,88E-01	
ALKBH2	0,3965	0,1160	0,6770	2,77E-02	7,86E-01	DNARepair
ALKBH3	-0,1642	-0,2905	-0,0379	3,82E-02	9,37E-01	DNARepair
ARID1A	-0,4049	-0,6050	-0,2048	5,42E-03	3,13E-01	ChromMod
ARNT2	-0,4080	-0,5429	-0,2732	5,82E-04	7,35E-02	TXmisReg
ATRX	-0,3186	-0,4877	-0,1495	7,73E-03	3,61E-01	
BID	0,4140	0,1932	0,6348	7,91E-03	3,65E-01	Арор
BMP4	0,3652	0,2423	0,4880	6,46E-04	7,60E-02	HH, TGFB
BMP7	-0,4353	-0,6170	-0,2536	2,22E-03	1,75E-01	TGFB
BMP8A	0,6066	0,3084	0,9048	5,28E-03	3,10E-01	TGFB
BMPR1B	-0,3590	-0,4757	-0,2423	5,27E-04	7,26E-02	TGFB
BNIP3	0,1887	0,0750	0,3025	1,40E-02	5,20E-01	ChromMod
BRCA1	0,4938	0,2614	0,7262	4,22E-03	2,72E-01	DNARepair, PI3K
BRCA2	0,2619	0,0776	0,4462	2,71E-02	7,77E-01	DNARepair
BRIP1	0,2572	0,0721	0,4423	2,96E-02	7,96E-01	DNARepair
C19orf40	0,4330	0,1356	0,7304	2,46E-02	7,35E-01	DNARepair
CACNA1C	-0,9017	-1,4513	-0,3521	1,47E-02	5,29E-01	МАРК
CACNA1H	-0,6506	-0,8638	-0,4373	5,53E-04	7,26E-02	МАРК
CACNA2D1	-0,5224	-0,6725	-0,3722	2,49E-04	4,72E-02	МАРК
CACNA2D2	-0,5838	-0,8792	-0,2883	6,11E-03	3,35E-01	МАРК
CACNB2	-0,4375	-0,7676	-0,1073	3,56E-02	8,99E-01	МАРК
CARD11	-1,4065	-1,8095	-1,0035	2,44E-04	4,72E-02	
CASP7	0,1719	0,0488	0,2950	2,91E-02	7,93E-01	Арор
CASP9	0,4542	0,0855	0,8229	4,65E-02	1,00E+00	РІЗК, Арор
CBL	-0,4682	-0,8480	-0,0883	4,64E-02	1,00E+00	STAT
CCNA2	0,2112	0,0670	0,3554	2,40E-02	7,35E-01	CC
CCNB1	-0,2276	-0,3697	-0,0855	1,64E-02	5,70E-01	CC
CCNE1	0,5971	0,3730	0,8213	1,22E-03	1,16E-01	РІЗК, СС

CCNE2	0,7290	0,5643	0,8937	5,42E-05	1,95E-02	РІЗК, СС
CDC25A	0,6863	0,4798	0,8928	3,30E-04	5,79E-02	CC
CDC25B	0,1945	0,0839	0,3052	1,07E-02	4,42E-01	МАРК, СС
CDC25C	-0,5170	-0,7974	-0,2366	8,58E-03	3,77E-01	CC
CDC6	0,4345	0,2735	0,5954	1,13E-03	1,11E-01	CC
CDC7	0,1784	0,0371	0,3196	4,26E-02	1,00E+00	CC
CDH1	-0,2515	-0,3834	-0,1195	7,32E-03	3,55E-01	
CDKN1A	1,2748	1,0970	1,4527	2,19E-06	2,49E-03	TXmisReg, PI3K,
						сс
CEBPA	0,8934	0,2456	1,5413	3,05E-02	8,13E-01	TXmisReg
CHEK1	0,2561	0,1214	0,3907	7,38E-03	3,55E-01	CC
COL27A1	-0,9882	-1,2013	-0,7751	4,00E-05	1,95E-02	РІЗК
CREB3L4	-0,3792	-0,6751	-0,0833	4,03E-02	9,62E-01	РІЗК
CUL1	0,1332	0,0254	0,2410	4,59E-02	1,00E+00	Wnt, TGFB, CC
CXXC4	-0,8076	-1,3992	-0,2160	3,17E-02	8,35E-01	Wnt
DDB2	0,2720	0,2053	0,3387	9,18E-05	2,61E-02	DNARepair
DDIT3	-0,3751	-0,5862	-0,1639	1,02E-02	4,32E-01	TXmisReg, MAPK
DKK1	-0,4734	-0,7443	-0,2025	1,11E-02	4,49E-01	Wnt
DKK4	0,6348	0,2654	1,0042	1,19E-02	4,69E-01	Wnt
DLL1	-0,3344	-0,5661	-0,1028	2,54E-02	7,46E-01	Notch
DLL3	-0,3865	-0,5692	-0,2039	4,31E-03	2,72E-01	Notch
DLL4	-0,4829	-0,7430	-0,2228	8,30E-03	3,77E-01	Notch
DUSP5	-0,4323	-0,6160	-0,2485	2,45E-03	1,82E-01	МАРК
DUSP6	-0,4258	-0,6763	-0,1753	1,26E-02	4,82E-01	TXmisReg, MAPK
EFNA5	-0,5419	-0,7946	-0,2892	4,02E-03	2,69E-01	PI3K, RAS
EGFR	-0,2313	-0,4166	-0,0459	4,44E-02	1,00E+00	MAPK, PI3K, RAS
EPOR	-0,5802	-0,8952	-0,2653	8,62E-03	3,77E-01	STAT, PI3K
ETV1	-0,4662	-0,6115	-0,3208	4,10E-04	6,60E-02	TXmisReg
EZH2	0,2823	0,0812	0,4833	2,84E-02	7,88E-01	
FANCA	0,2219	0,0789	0,3649	1,88E-02	6,26E-01	DNARepair
FANCB	0,2866	0,0681	0,5050	3,70E-02	9,20E-01	DNARepair
FANCF	-0,3887	-0,6550	-0,1223	2,43E-02	7,35E-01	DNARepair
FAS	0,8078	0,2996	1,3161	1,69E-02	5,78E-01	МАРК, Арор

FEN1	0,4841	0,2756	0,6926	2,63E-03	1,91E-01	DNARepair
FGF11	-0,4957	-0,6860	-0,3055	1,39E-03	1,25E-01	MAPK, PI3K, RAS
FGF12	-0,4392	-0,6094	-0,2690	1,47E-03	1,28E-01	MAPK, PI3K, RAS
FGF14	-0,7653	-0,8350	-0,6955	1,19E-07	4,05E-04	MAPK, PI3K, RAS
FGFR1	-0,2498	-0,4015	-0,0980	1,45E-02	5,27E-01	MAPK, PI3K, RAS
FGFR3	0,5514	0,3679	0,7350	6,07E-04	7,39E-02	MAPK, PI3K, RAS
FLNC	-0,8631	-1,5720	-0,1542	4,84E-02	1,00E+00	МАРК
FUBP1	-0,3625	-0,5684	-0,1567	1,07E-02	4,42E-01	
FUT8	-0,5141	-0,9000	-0,1282	3,49E-02	8,88E-01	TXmisReg
GADD45G	-0,8854	-1,0810	-0,6898	4,68E-05	1,95E-02	МАРК, СС
GNAQ	-0,2308	-0,3508	-0,1107	7,02E-03	3,52E-01	
GNG12	-0,5537	-0,7125	-0,3949	2,45E-04	4,72E-02	MAPK, PI3K, RAS
GSK3B	-0,2320	-0,3239	-0,1401	1,66E-03	1,35E-01	Wnt, HH, PI3K, CC
HDAC10	-0,6103	-0,9132	-0,3074	5,54E-03	3,15E-01	ChromMod
HDAC4	-0,7292	-1,1514	-0,3070	1,17E-02	4,65E-01	ChromMod
HDAC6	-0,3654	-0,6195	-0,1114	2,58E-02	7,46E-01	ChromMod
HELLS	0,2754	0,0629	0,4879	3,87E-02	9,37E-01	ChromMod
HGF	-0,5717	-0,9692	-0,1743	2,58E-02	7,46E-01	PI3K, RAS
HIST1H3G	-0,4718	-0,7970	-0,1465	2,49E-02	7,40E-01	TXmisReg
HIST1H3H	-0,9513	-1,2992	-0,6034	1,05E-03	1,06E-01	TXmisReg
HMGA2	-0,4619	-0,7449	-0,1789	1,51E-02	5,31E-01	TXmisReg
HNF1A	-0,8291	-1,4885	-0,1696	4,32E-02	1,00E+00	
HSP90B1	-0,4192	-0,5282	-0,3101	1,34E-04	3,51E-02	РІЗК
HSPA2	-0,2078	-0,3682	-0,0474	3,87E-02	9,37E-01	МАРК
ID2	-0,3185	-0,5249	-0,1121	1,93E-02	6,31E-01	TXmisReg, TGFB
IGF1R	-0,4040	-0,6126	-0,1954	6,75E-03	3,45E-01	TXmisReg, PI3K,
						RAS
INHBB	-0,3738	-0,5988	-0,1488	1,39E-02	5,20E-01	TGFB
JAG1	-0,2598	-0,3915	-0,1280	6,18E-03	3,35E-01	Notch
KDM5C	-0,2776	-0,4454	-0,1097	1,42E-02	5,22E-01	
КМТ2С	-0,2337	-0,4080	-0,0594	3,40E-02	8,79E-01	
LAMA5	-0,5816	-0,9717	-0,1915	2,23E-02	7,04E-01	РІЗК
LAMC2	-0,2888	-0,4843	-0,0933	2,32E-02	7,18E-01	РІЗК

LAT	-1,0356	-1,5789	-0,4924	7,30E-03	3,55E-01	RAS
LEPR	-0,8405	-1,1676	-0,5134	1,50E-03	1,28E-01	STAT
LFNG	-0,8445	-1,0766	-0,6124	1,88E-04	4,59E-02	Notch
LIFR	-0,6193	-0,9782	-0,2604	1,17E-02	4,65E-01	STAT
LTBP1	-0,5514	-0,8218	-0,2810	5,21E-03	3,10E-01	TGFB
MAD2L2	0,3689	0,2913	0,4464	3,40E-05	1,95E-02	DNARepair, CC
MAP2K6	-0,4078	-0,5531	-0,2626	9,04E-04	9,64E-02	МАРК
МАРК8	-0,2056	-0,2678	-0,1435	3,39E-04	5,79E-02	Wnt, MAPK, RAS
MAPT	-1,0542	-1,4114	-0,6969	6,75E-04	7,67E-02	МАРК
MDC1	-0,3587	-0,6216	-0,0958	3,18E-02	8,35E-01	DNARepair
ΜΕΤ	0,1854	0,0828	0,2880	9,44E-03	4,08E-01	TXmisReg, PI3K,
						RAS
MLLT3	-0,2374	-0,3279	-0,1469	1,34E-03	1,23E-01	TXmisReg
MLLT4	-0,4147	-0,6688	-0,1607	1,51E-02	5,31E-01	RAS
MSH2	0,2387	0,1319	0,3455	3,23E-03	2,20E-01	
МҮВ	0,2744	0,0799	0,4688	2,79E-02	7,86E-01	РІЗК
NASP	0,3552	0,1246	0,5859	1,94E-02	6,31E-01	ChromMod
NFKBIA	0,3243	0,1885	0,4602	2,26E-03	1,75E-01	Арор
NKD1	-0,5607	-0,7819	-0,3394	1,62E-03	1,35E-01	Wnt
NOTCH1	1,0325	0,3372	1,7277	2,26E-02	7,09E-01	Notch
NOTCH2	-0,5027	-0,8327	-0,1728	2,03E-02	6,54E-01	Notch
NRAS	-0,2296	-0,3678	-0,0915	1,39E-02	5,20E-01	MAPK, PI3K, RAS
NSD1	-0,3992	-0,7025	-0,0959	3,65E-02	9,15E-01	ChromMod
NUMBL	0,4564	0,2150	0,6978	7,59E-03	3,60E-01	Notch
PBX1	-0,6909	-0,9148	-0,4669	5,18E-04	7,26E-02	TXmisReg
PDGFD	-0,4389	-0,5964	-0,2813	9,46E-04	9,78E-02	PI3K, RAS
PIK3R1	-0,2889	-0,4750	-0,1028	1,88E-02	6,26E-01	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PLA2G4C	-0,3983	-0,7170	-0,0796	4,41E-02	1,00E+00	MAPK, RAS
PLCB1	-1,3180	-1,4962	-1,1399	1,77E-06	2,49E-03	Wnt
PLCG2	-0,6667	-0,9626	-0,3708	3,09E-03	2,15E-01	RAS
POLD4	-0,3172	-0,4546	-0,1797	2,72E-03	1,94E-01	DNARepair
POLE2	0,4328	0,1126	0,7529	3,30E-02	8,59E-01	DNARepair

POLR2D	0,2532	0,1106	0,3957	1,03E-02	4,32E-01	DNARepair
PRKAR1B	-0,2775	-0,4082	-0,1468	4,24E-03	2,72E-01	Арор
PRKCG	-0,6555	-0,9898	-0,3212	6,35E-03	3,38E-01	Wnt, MAPK, RAS
RAD21	-0,1477	-0,2213	-0,0740	5,68E-03	3,18E-01	CC
RAD51	0,4556	0,3065	0,6048	5,50E-04	7,26E-02	DNARepair
RASGRF2	-0,4793	-0,8553	-0,1034	4,11E-02	9,73E-01	MAPK, RAS
RFC3	0,4220	0,3281	0,5160	4,91E-05	1,95E-02	DNARepair
RFC4	0,0951	0,0172	0,1730	4,80E-02	1,00E+00	DNARepair
SHC2	-0,4916	-0,8278	-0,1554	2,41E-02	7,35E-01	RAS
SKP2	-0,2696	-0,3311	-0,2082	5,71E-05	1,95E-02	СС
SMC3	0,1585	0,0449	0,2720	2,91E-02	7,93E-01	CC
SOS2	-0,4143	-0,5617	-0,2670	8,96E-04	9,64E-02	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS
SPOP	-0,7133	-1,2651	-0,1614	3,90E-02	9,38E-01	
SPRY1	-0,3783	-0,5642	-0,1923	5,28E-03	3,10E-01	STAT
SPRY2	-0,6930	-0,9862	-0,3998	2,39E-03	1,81E-01	STAT
SPRY4	-0,8303	-0,9832	-0,6774	1,42E-05	1,21E-02	STAT
SUV39H2	0,3127	0,0784	0,5471	3,46E-02	8,88E-01	ChromMod
TGFB3	-0,6653	-0,8196	-0,5110	6,41E-05	1,99E-02	TGFB, MAPK, CC
TIAM1	-0,5262	-0,8355	-0,2169	1,25E-02	4,82E-01	RAS
TLX1	0,3876	0,1095	0,6658	2,93E-02	7,93E-01	TXmisReg
TNFSF10	-0,4301	-0,6624	-0,1977	8,42E-03	3,77E-01	Арор
TNR	-1,2474	-1,6056	-0,8892	2,47E-04	4,72E-02	РІЗК
TSC1	-0,3084	-0,5014	-0,1154	1,66E-02	5,71E-01	РІЗК
UBE2T	0,3179	0,0740	0,5618	3,78E-02	9,35E-01	DNARepair
WHSC1	-0,1499	-0,2231	-0,0766	5,12E-03	3,10E-01	TXmisReg
WHSC1L1	-0,0795	-0,1319	-0,0270	2,09E-02	6,65E-01	ChromMod
WNT3	0,7061	0,3416	1,0707	6,75E-03	3,45E-01	Wnt, HH
WNT3 WNT7A	0,7061 -0,8165	0,3416 -1,4859	1,0707 -0,1472	6,75E-03 4,81E-02	3,45E-01 1,00E+00	Wnt, HH Wnt, HH
WNT3 WNT7A XRCC4	0,7061 -0,8165 -0,7366	0,3416 -1,4859 -0,9677	1,0707 -0,1472 -0,5055	6,75E-03 4,81E-02 4,26E-04	3,45E-01 1,00E+00 6,60E-02	Wnt, HH Wnt, HH DNARepair

Tabelle A-4: Alle differenziell exprimierten Gene mit p<0,05 nach 24h Inkubation von BON Zellen mit 10µM Cisplatin und assoziierte Signalwege

Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog; Fett gedruckte Gene markieren eine differenzielle Expression mit einer FDR<0.05.

7.10 Anhang 10

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
ABL1	0,3366	0,2243	0,4489	6,15E-04	1,42E-02	RAS, CC
AKT1	-0,6591	-0,8659	-0,4524	4,24E-04	1,07E-02	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
ΑΚΤ2	-0,6014	-0,8642	-0,3386	2,85E-03	4,61E-02	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
ALKBH3	0,5896	0,4484	0,7308	7,88E-05	2,93E-03	DNARepair
AMER1	-0,7898	-1,0707	-0,5089	8,97E-04	1,84E-02	
ARID1A	-0,5421	-0,7658	-0,3183	2,09E-03	3,52E-02	ChromMod
ARNT2	-0,8587	-1,0095	-0,7080	1,03E-05	5,96E-04	TXmisReg
ATR	-0,8217	-1,1364	-0,5070	1,37E-03	2,54E-02	СС
B2M	-0,9285	-1,0701	-0,7870	3,99E-06	2,83E-04	
BAIAP3	-1,3912	-1,5774	-1,2051	1,65E-06	1,64E-04	TXmisReg
BAX	-0,6289	-0,7962	-0,4616	1,53E-04	4,76E-03	Арор
BCL2	-1,2656	-1,6325	-0,8987	2,62E-04	7,52E-03	РІЗК, Арор
BCOR	-1,3179	-1,5292	-1,1065	5,62E-06	3,49E-04	
BID	0,6998	0,4530	0,9467	8,54E-04	1,78E-02	Арор
BMP6	1,4292	0,8547	2,0036	1,80E-03	3,09E-02	TGFB
BMP7	-1,5367	-1,7399	-1,3335	1,52E-06	1,64E-04	TGFB
BMPR1B	-0,4257	-0,5562	-0,2952	3,69E-04	9,69E-03	TGFB
BNIP3	0,7793	0,6521	0,9065	6,32E-06	3,73E-04	ChromMod
BRCA2	-0,5108	-0,7168	-0,3047	1,84E-03	3,13E-02	DNARepair
BRIP1	-0,6544	-0,8613	-0,4474	4,47E-04	1,10E-02	DNARepair
CACNA2D1	-1,1894	-1,3573	-1,0215	2,37E-06	2,08E-04	МАРК
CACNB2	-1,0934	-1,4625	-0,7242	6,60E-04	1,49E-02	МАРК
CAPN2	1,1210	1,0385	1,2035	2,70E-08	1,74E-05	Арор
CASP3	-0,6546	-0,8157	-0,4935	9,38E-05	3,30E-03	МАРК, Арор
CASP7	0,6847	0,5471	0,8224	2,53E-05	1,16E-03	Арор
CASP8	0,5109	0,3014	0,7204	2,01E-03	3,42E-02	Арор
CCNA2	-1,2025	-1,3637	-1,0413	1,67E-06	1,64E-04	CC

CCNB1	-0,4559	-0,6148	-0,2971	7,95E-04	1,72E-02	CC
CCND1	-1,8714	-2,1630	-1,5799	4,63E-06	3,10E-04	Wnt, STAT, PI3K,
						CC
CCNE1	-2,1695	-2,4202	-1,9189	6,05E-07	9,50E-05	РІЗК, СС
CCNE2	-1,6783	-1,8624	-1,4941	4,25E-07	8,06E-05	РІЗК, СС
CDC14A	-0,8511	-1,0427	-0,6595	5,30E-05	2,10E-03	CC
CDC25A	-0,8937	-1,1246	-0,6628	1,28E-04	4,11E-03	CC
CDC25B	-0,8173	-0,9410	-0,6936	3,81E-06	2,82E-04	МАРК, СС
CDC6	-0,5857	-0,7656	-0,4058	3,74E-04	9,75E-03	CC
CDC7	-1,2969	-1,4549	-1,1390	8,70E-07	1,23E-04	CC
CDH1	-0,4427	-0,5903	-0,2951	6,12E-04	1,42E-02	
CDK4	-0,8264	-0,9800	-0,6728	1,51E-05	7,67E-04	РІЗК, СС
CDK6	-0,5940	-0,8092	-0,3787	1,00E-03	2,00E-02	РІЗК, СС
CDKN1A	1,2400	1,0411	1,4388	5,62E-06	3,49E-04	TXmisReg, PI3K,
						СС
CDKN2D	-0,7955	-1,0911	-0,4998	1,16E-03	2,23E-02	CC
CEBPA	2,2668	1,5425	2,9911	4,75E-04	1,17E-02	TXmisReg
CHEK2	-0,7792	-0,9532	-0,6052	5,02E-05	2,01E-03	CC
СНИК	-0,4777	-0,6444	-0,3110	8,03E-04	1,72E-02	МАРК, РІЗК,
						RAS, Apop
CREB3L1	-0,8368	-1,0037	-0,6700	2,39E-05	1,12E-03	РІЗК
CUL1	0,2741	0,1535	0,3946	2,95E-03	4,72E-02	Wnt, TGFB, CC
CXXC4	-1,5557	-2,2171	-0,8943	2,46E-03	4,03E-02	Wnt
CYLD	0,7492	0,5581	0,9403	1,18E-04	3,98E-03	
DDB2	-0,7378	-0,8124	-0,6632	2,42E-07	6,35E-05	DNARepair
DDIT3	1,5447	1,3087	1,7808	4,07E-06	2,83E-04	TXmisReg,
						МАРК
DLL1	-2,1333	-2,3923	-1,8743	8,51E-07	1,23E-04	Notch
DLL3	-1,7651	-1,9693	-1,5608	6,12E-07	9,50E-05	Notch
DLL4	-1,8699	-2,1607	-1,5791	4,57E-06	3,10E-04	Notch
DNMT1	-0,4372	-0,5895	-0,2849	7,94E-04	1,72E-02	
DNMT3A	-0,4498	-0,6234	-0,2763	1,43E-03	2,62E-02	
DUSP4	-0,8571	-1,0377	-0,6764	3,44E-05	1,45E-03	МАРК

DUSP5	0,6059	0,4005	0,8114	6,77E-04	1,51E-02	МАРК
DUSP6	-2,1433	-2,4234	-1,8632	1,41E-06	1,60E-04	TXmisReg,
						МАРК
E2F1	-1,4315	-1,5713	-1,2916	1,91E-07	5,93E-05	CC
E2F5	-1,7917	-1,9837	-1,5998	3,61E-07	7,71E-05	TGFB, CC
EFNA5	-0,7824	-1,0649	-0,4998	9,79E-04	1,98E-02	PI3K, RAS
ENDOG	-1,8438	-2,1961	-1,4914	1,81E-05	8,95E-04	Арор
EPOR	-1,0915	-1,4436	-0,7393	5,03E-04	1,21E-02	STAT, PI3K
ERCC2	-0,5733	-0,8260	-0,3205	2,99E-03	4,74E-02	DNARepair
ETS2	-1,6853	-1,8216	-1,5490	5,19E-08	1,97E-05	RAS
ETV1	-1,7784	-1,9410	-1,6159	1,21E-07	4,12E-05	TXmisReg
ETV4	-0,7773	-1,0095	-0,5452	3,15E-04	8,46E-03	TXmisReg
FANCA	-0,8619	-1,0218	-0,7021	1,48E-05	7,67E-04	DNARepair
FANCC	-0,6863	-0,8866	-0,4860	2,73E-04	7,71E-03	DNARepair
FANCL	-0,8263	-1,1568	-0,4957	1,75E-03	3,05E-02	DNARepair
FBXW7	-0,6781	-0,9783	-0,3779	3,05E-03	4,80E-02	
FEN1	-1,0517	-1,2848	-0,8186	4,78E-05	1,94E-03	DNARepair
FGF11	-0,5135	-0,7263	-0,3008	2,13E-03	3,56E-02	MAPK, PI3K, RAS
FGF14	-1,5055	-1,5835	-1,4275	2,34E-09	2,67E-06	MAPK, PI3K, RAS
FGF9	0,9364	0,6966	1,1762	1,21E-04	4,00E-03	MAPK, PI3K, RAS
FGFR3	-0,8419	-1,0471	-0,6367	8,82E-05	3,13E-03	MAPK, PI3K, RAS
FLNA	1,2589	1,1022	1,4157	1,01E-06	1,23E-04	МАРК
FLNC	1,7934	1,0008	2,5860	3,03E-03	4,78E-02	МАРК
FN1	0,4402	0,2757	0,6046	1,19E-03	2,27E-02	РІЗК
FOSL1	2,4229	2,1215	2,7242	1,00E-06	1,23E-04	Wnt
FZD10	-0,9869	-1,2775	-0,6962	2,89E-04	8,02E-03	Wnt
FZD3	-0,6598	-0,9402	-0,3795	2,44E-03	4,03E-02	Wnt
GADD45B	0,9785	0,6142	1,3429	1,17E-03	2,24E-02	МАРК, СС
GATA2	-1,2123	-1,7156	-0,7090	2,15E-03	3,59E-02	
GNG12	-1,1866	-1,3642	-1,0091	3,52E-06	2,73E-04	MAPK, PI3K, RAS
GNG4	-1,1454	-1,4793	-0,8114	2,72E-04	7,71E-03	PI3K, RAS
GRB2	0,6103	0,4898	0,7309	2,25E-05	1,10E-03	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS

H2AFX	-0,8751	-1,1496	-0,6006	4,25E-04	1,07E-02	DNARepair
НЗҒЗА	-1,3733	-1,6261	-1,1206	1,41E-05	7,44E-04	TXmisReg
НЗҒЗС	-0,9595	-1,1560	-0,7631	2,85E-05	1,30E-03	TXmisReg
HDAC1	-0,7388	-0,8912	-0,5863	3,00E-05	1,33E-03	Notch,
						ChromMod,
						TXmisReg, CC
HDAC2	-0,5119	-0,7021	-0,3216	1,16E-03	2,23E-02	Notch,
						ChromMod,
						TXmisReg, CC
HELLS	-0,8021	-1,0397	-0,5645	3,00E-04	8,18E-03	ChromMod
HES1	-2,3624	-2,6929	-2,0319	2,23E-06	2,01E-04	Notch
HHEX	0,7536	0,5615	0,9457	1,17E-04	3,98E-03	TXmisReg
HIST1H3B	-1,2289	-1,6789	-0,7788	1,06E-03	2,10E-02	TXmisReg
HIST1H3G	-1,6737	-2,0373	-1,3101	4,20E-05	1,73E-03	TXmisReg
HIST1H3H	-0,9114	-1,3004	-0,5224	2,51E-03	4,09E-02	TXmisReg
HMGA2	-3,0097	-3,3262	-2,6933	3,17E-07	7,71E-05	TXmisReg
HOXA10	-0,8548	-1,1332	-0,5764	5,32E-04	1,27E-02	TXmisReg
HRAS	-0,7561	-1,0229	-0,4893	8,55E-04	1,78E-02	MAPK, PI3K, RAS
HSP90B1	0,6654	0,5434	0,7873	1,37E-05	7,43E-04	РІЗК
HSPA1A	6,2823	5,5134	7,0513	8,99E-07	1,23E-04	МАРК
HSPA2	-0,4965	-0,6758	-0,3171	9,81E-04	1,98E-02	МАРК
HSPB1	2,5675	1,9314	3,2036	9,78E-05	3,41E-03	МАРК
ID1	-3,6501	-4,0387	-3,2614	3,46E-07	7,71E-05	TGFB
ID2	-3,0798	-3,3106	-2,8491	3,05E-08	1,74E-05	TXmisReg, TGFB
ID4	-1,6233	-1,8406	-1,4061	1,65E-06	1,64E-04	TGFB
IDH2	-1,7407	-1,9404	-1,5409	5,79E-07	9,50E-05	
IGFBP3	0,6462	0,3946	0,8979	1,51E-03	2,72E-02	TXmisReg
IKBKG	0,7964	0,5923	1,0005	1,21E-04	4,00E-03	МАРК, РІЗК,
						RAS, Apop
IL12A	1,1282	0,6822	1,5742	1,64E-03	2,90E-02	STAT
IL12RB2	-0,6300	-0,8500	-0,4099	8,07E-04	1,72E-02	STAT
IL1R2	-0,8068	-1,1608	-0,4529	2,91E-03	4,68E-02	TXmisReg,
						МАРК

IL20RB	1,2389	0,6929	1,7850	2,98E-03	4,74E-02	STAT
IL6R	0,7019	0,4670	0,9368	6,26E-04	1,42E-02	STAT, PI3K
INHBB	-1,7327	-1,9843	-1,4811	2,87E-06	2,34E-04	TGFB
IRS1	-0,8036	-1,0853	-0,5220	8,22E-04	1,74E-02	РІЗК
ITGA3	-0,5896	-0,7512	-0,4280	1,85E-04	5,63E-03	РІЗК
ITGB8	-2,0583	-2,4307	-1,6858	1,26E-05	7,05E-04	РІЗК
JAG2	-1,0978	-1,3808	-0,8148	1,26E-04	4,09E-03	Notch
KITLG	-0,6441	-0,8968	-0,3913	1,57E-03	2,81E-02	PI3K, RAS
КМТ2С	0,5618	0,3669	0,7567	7,74E-04	1,70E-02	
KRAS	0,3098	0,2481	0,3714	2,36E-05	1,12E-03	MAPK, PI3K, RAS
LAMB3	1,1657	1,0156	1,3158	1,27E-06	1,50E-04	РІЗК
LFNG	-3,2693	-3,5288	-3,0098	4,55E-08	1,97E-05	Notch
LIF	-1,3323	-1,6544	-1,0102	8,37E-05	3,05E-03	STAT
LIG4	-0,8566	-1,1094	-0,6037	2,93E-04	8,07E-03	DNARepair
MAD2L2	-0,3714	-0,4581	-0,2846	6,71E-05	2,59E-03	DNARepair, CC
MAP2K1	0,5927	0,5132	0,6721	1,68E-06	1,64E-04	MAPK, PI3K, RAS
MAP2K2	0,6737	0,4485	0,8988	6,21E-04	1,42E-02	MAPK, PI3K, RAS
MAP2K6	-0,9997	-1,1621	-0,8373	6,13E-06	3,73E-04	МАРК
MAP3K14	1,1246	0,7391	1,5101	7,22E-04	1,60E-02	МАРК, Арор
МАРЗК5	-1,0524	-1,3704	-0,7344	3,38E-04	9,02E-03	МАРК
МАРКЗ	-0,6705	-0,8603	-0,4807	2,26E-04	6,71E-03	TGFB, MAPK,
						PI3K, RAS
ΜΑΡΚ8	-0,4408	-0,5103	-0,3713	5,01E-06	3,29E-04	Wnt, MAPK, RAS
MAPT	0,9231	0,5237	1,3225	2,70E-03	4,39E-02	МАРК
MCM4	-0,6520	-0,8921	-0,4120	1,10E-03	2,14E-02	CC
МСМ5	-0,7211	-0,9718	-0,4704	7,85E-04	1,72E-02	CC
МСМ7	-0,5832	-0,8082	-0,3581	1,43E-03	2,62E-02	CC
МЕСОМ	-1,3960	-1,7220	-1,0699	6,71E-05	2,59E-03	МАРК
MET	1,0025	0,8878	1,1171	5,66E-07	9,50E-05	TXmisReg, PI3K,
						RAS
MLF1	-0,5015	-0,6301	-0,3729	1,22E-04	4,00E-03	TXmisReg
MLLT3	-0,6653	-0,7665	-0,5641	3,94E-06	2,83E-04	TXmisReg
MSH2	-0,3092	-0,4285	-0,1898	1,44E-03	2,62E-02	

МҮВ	-2,7014	-2,9188	-2,4840	5,01E-08	1,97E-05	РІЗК
МҮС	-0,9651	-1,1465	-0,7838	1,62E-05	8,12E-04	Wnt, TXmisReg,
						TGFB, MAPK,
						STAT, PI3K, CC
NFKB1	-1,2252	-1,5769	-0,8735	2,47E-04	7,20E-03	TXmisReg,
						МАРК, РІЗК,
						RAS, Apop
NFKBIA	-0,4176	-0,5695	-0,2658	1,02E-03	2,02E-02	Арор
NKD1	-0,6500	-0,8973	-0,4026	1,32E-03	2,48E-02	Wnt
NOTCH1	2,3585	1,5812	3,1358	5,72E-04	1,35E-02	Notch
NOTCH3	1,3095	0,9004	1,7187	4,15E-04	1,06E-02	Notch
NPM2	-1,0013	-1,4249	-0,5777	2,39E-03	3,96E-02	ChromMod
NTHL1	-0,7357	-1,0301	-0,4412	1,76E-03	3,05E-02	DNARepair
NUMBL	1,4653	1,1954	1,7351	1,42E-05	7,44E-04	Notch
PBRM1	-0,5134	-0,7137	-0,3131	1,52E-03	2,74E-02	
PBX1	-0,8061	-1,0565	-0,5558	4,00E-04	1,03E-02	TXmisReg
РВХЗ	-0,7303	-0,9050	-0,5556	7,82E-05	2,93E-03	TXmisReg
PDGFD	-0,7036	-0,8798	-0,5275	1,05E-04	3,60E-03	PI3K, RAS
PGF	2,1554	1,7744	2,5365	1,08E-05	6,14E-04	PI3K, RAS
РІКЗСВ	-0,6277	-0,8776	-0,3779	1,70E-03	2,99E-02	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PIK3R1	-0,6156	-0,8236	-0,4075	6,65E-04	1,49E-02	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PIK3R3	-0,4713	-0,6442	-0,2984	1,07E-03	2,10E-02	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PLA2G4C	1,1272	0,7709	1,4836	4,45E-04	1,10E-02	MAPK, RAS
POLD4	-0,5233	-0,6770	-0,3696	2,84E-04	7,95E-03	DNARepair
POLE2	-0,8989	-1,2568	-0,5409	1,71E-03	2,99E-02	DNARepair
POLR2D	-0,7733	-0,9327	-0,6140	2,97E-05	1,33E-03	DNARepair
POLR2H	-1,0265	-1,2751	-0,7778	8,48E-05	3,05E-03	DNARepair
PPP2CB	0,6087	0,4438	0,7736	1,72E-04	5,28E-03	TGFB, PI3K
PPP2R2C	1,7855	1,4991	2,0719	5,63E-06	3,49E-04	РІЗК

РРРЗСВ	-0,8778	-1,2076	-0,5480	1,23E-03	2,33E-02	Wnt, MAPK,
						Арор
PRKACA	-0,8361	-0,9573	-0,7149	2,84E-06	2,34E-04	Wnt, HH, MAPK,
						RAS, Apop
PRKAR1B	-0,6250	-0,7711	-0,4788	6,76E-05	2,59E-03	Арор
PRKAR2A	-0,5185	-0,6814	-0,3557	4,28E-04	1,07E-02	Арор
PRKCG	-0,9894	-1,3631	-0,6156	1,27E-03	2,39E-02	Wnt, MAPK, RAS
PTCH1	-1,5642	-1,9771	-1,1513	1,46E-04	4,58E-03	НН
PTTG2	-0,8886	-1,2041	-0,5730	8,88E-04	1,84E-02	CC
RAD21	-0,5044	-0,5867	-0,4220	6,34E-06	3,73E-04	CC
RBX1	-0,4333	-0,5762	-0,2904	5,75E-04	1,35E-02	Wnt, TGFB, CC
RET	-2,3199	-2,6334	-2,0064	1,77E-06	1,67E-04	
RFC3	-0,3268	-0,4318	-0,2218	4,91E-04	1,20E-02	DNARepair
RFC4	-0,7051	-0,7921	-0,6180	9,57E-07	1,23E-04	DNARepair
RPS27A	-0,3945	-0,5260	-0,2630	6,11E-04	1,42E-02	DNARepair
RXRG	-0,8353	-1,1354	-0,5351	9,52E-04	1,95E-02	TXmisReg
SETBP1	-0,6859	-0,9268	-0,4450	8,32E-04	1,75E-02	
SFN	0,7006	0,4280	0,9733	1,50E-03	2,72E-02	CC
SHC1	0,6532	0,5177	0,7887	3,10E-05	1,34E-03	RAS
SHC3	-0,9839	-1,2595	-0,7082	2,12E-04	6,36E-03	RAS
SHC4	1,8139	1,0644	2,5633	2,10E-03	3,53E-02	RAS
SKP1	0,3852	0,2758	0,4947	2,31E-04	6,80E-03	Wnt, TGFB, CC
SKP2	-1,7866	-1,8553	-1,7180	2,92E-10	9,96E-07	CC
SMARCA4	-0,5060	-0,6525	-0,3595	2,60E-04	7,52E-03	
SMC1A	-0,6373	-0,8812	-0,3935	1,37E-03	2,54E-02	CC
SMC3	-0,5299	-0,6568	-0,4029	7,91E-05	2,93E-03	CC
SOS1	0,2741	0,1924	0,3558	3,12E-04	8,44E-03	МАРК, STAT,
						PI3K, RAS
SOX9	-1,1863	-1,4995	-0,8731	1,46E-04	4,58E-03	
SPP1	3,6997	3,5318	3,8676	9,32E-10	1,59E-06	РІЗК
SPRY1	-1,9010	-2,1089	-1,6931	4,16E-07	8,06E-05	STAT
SPRY2	-2,2614	-2,5893	-1,9336	2,84E-06	2,34E-04	STAT
SPRY4	-1,7156	-1,8865	-1,5446	2,19E-07	6,23E-05	STAT

STMN1	-0,8861	-1,0082	-0,7640	2,01E-06	1,86E-04	МАРК
SUV39H2	-0,9394	-1,2014	-0,6774	2,06E-04	6,23E-03	ChromMod
<i>SYK</i>	-0,9234	-1,0631	-0,7838	3,78E-06	2,82E-04	РІЗК
TBL1XR1	-0,8011	-0,9949	-0,6073	8,41E-05	3,05E-03	Wnt
TFDP1	-1,1946	-1,3691	-1,0202	2,98E-06	2,37E-04	TGFB, CC
TGFB3	-2,9226	-3,0951	-2,7501	5,81E-09	4,96E-06	ТGFB, МАРК, СС
TGFBR2	-1,2031	-1,4429	-0,9633	2,39E-05	1,12E-03	TXmisReg, TGFB,
						МАРК
THEM4	-1,0476	-1,3652	-0,7299	3,46E-04	9,15E-03	РІЗК
TIAM1	-0,8622	-1,2080	-0,5164	1,78E-03	3,07E-02	RAS
TSPAN7	-0,5830	-0,8127	-0,3533	1,61E-03	2,86E-02	TXmisReg
UBB	0,9993	0,7894	1,2092	3,37E-05	1,44E-03	DNARepair
WEE1	-0,9888	-1,1700	-0,8076	1,37E-05	7,43E-04	СС
WHSC1	-0,3151	-0,3970	-0,2332	1,33E-04	4,23E-03	TXmisReg
WNT4	-1,9228	-2,3387	-1,5069	4,08E-05	1,70E-03	Wnt, HH
ХРА	-0,6332	-0,8370	-0,4293	4,97E-04	1,20E-02	DNARepair
ZBTB16	-1,2574	-1,5180	-0,9967	3,09E-05	1,34E-03	TXmisReg
ZIC2	-1,6596	-2,2613	-1,0579	1,00E-03	2,00E-02	НН

Tabelle A-5: Alle differenziell exprimierten Gene mit FDR<0,05 nach 24h Inkubation von BON Zellen mit 25nM Bortezomib und assoziierte Signalwege

Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog.

7.11 Anhang 11

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
AKT1	-0,9807	-1,1656	-0,7958	1,66E-05	5,04E-04	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
AKT2	-1,0736	-1,3087	-0,8385	4,42E-05	1,10E-03	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
ALKBH2	0,6423	0,3618	0,9229	2,84E-03	3,68E-02	DNARepair
ALKBH3	0,3576	0,2313	0,4839	8,60E-04	1,29E-02	DNARepair
AMER1	-0,8477	-1,0989	-0,5964	3,01E-04	5,24E-03	
ARID1A	-1,0200	-1,2201	-0,8199	2,15E-05	6,22E-04	ChromMod
ARID1B	-1,3941	-1,6962	-1,0920	4,13E-05	1,04E-03	
ARID2	-0,5133	-0,7274	-0,2991	2,22E-03	3,00E-02	
ARNT2	-1,7084	-1,8432	-1,5735	4,38E-08	1,07E-05	TXmisReg
ATR	-0,9776	-1,2591	-0,6961	2,51E-04	4,64E-03	СС
ATRX	-0,6803	-0,8495	-0,5112	1,00E-04	2,06E-03	
B2M	-0,9631	-1,0896	-0,8365	1,46E-06	7,80E-05	
BAIAP3	-1,3572	-1,5237	-1,1907	9,14E-07	6,24E-05	TXmisReg
BAX	-0,7434	-0,8931	-0,5938	2,55E-05	7,01E-04	Арор
BCL2	-1,3639	-1,6921	-1,0357	8,12E-05	1,73E-03	РІЗК, Арор
BCL2L1	-0,7880	-1,1406	-0,4354	3,23E-03	4,09E-02	TXmisReg, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
BCOR	-1,2635	-1,4526	-1,0745	3,52E-06	1,56E-04	
BID	0,8028	0,5820	1,0236	1,89E-04	3,59E-03	Арор
BMP7	-2,0759	-2,2576	-1,8942	8,97E-08	1,61E-05	TGFB
BMPR1B	-0,9132	-1,0299	-0,7965	1,21E-06	6,95E-05	TGFB
BNIP3	0,9796	0,8659	1,0934	6,28E-07	4,87E-05	ChromMod
BRCA2	-1,0197	-1,2040	-0,8354	1,25E-05	4,03E-04	DNARepair
CACNA1C	-1,7950	-2,3446	-1,2454	3,67E-04	6,26E-03	МАРК
CACNA1D	-1,3292	-1,7231	-0,9353	3,00E-04	5,24E-03	МАРК
CACNA1H	-1,5805	-1,7937	-1,3672	1,75E-06	8,77E-05	МАРК
CACNA2D1	-2,0198	-2,1699	-1,8696	2,89E-08	8,97E-06	МАРК

CACNA2D2	-1,3458	-1,6413	-1,0504	4,49E-05	1,10E-03	МАРК
CACNB2	-1,0392	-1,3693	-0,7090	4,59E-04	7,53E-03	МАРК
CAPN2	0,7980	0,7242	0,8718	1,31E-07	2,13E-05	Арор
CASP3	-0,3290	-0,4731	-0,1849	2,88E-03	3,73E-02	МАРК, Арор
CASP7	0,7982	0,6751	0,9213	4,32E-06	1,80E-04	Арор
CASP8	0,6028	0,4154	0,7902	4,02E-04	6,78E-03	Арор
CBLC	-1,2965	-1,6672	-0,9259	2,41E-04	4,46E-03	STAT
CCNA2	-1,1654	-1,3096	-1,0212	9,68E-07	6,35E-05	CC
CCNB1	-0,8035	-0,9456	-0,6614	1,08E-05	3,65E-04	CC
CCND1	-2,5093	-2,7701	-2,2485	2,93E-07	3,29E-05	Wnt, STAT, PI3K,
						СС
CCNE1	-1,5851	-1,8093	-1,3609	2,41E-06	1,14E-04	РІЗК, СС
CDC14A	-0,8155	-0,9869	-0,6441	3,38E-05	9,02E-04	СС
CDC25B	-1,1744	-1,2851	-1,0638	1,49E-07	2,31E-05	МАРК, СС
CDC25C	-0,8165	-1,0970	-0,5361	7,30E-04	1,13E-02	CC
CDC7	-1,2397	-1,3810	-1,0984	5,52E-07	4,57E-05	CC
CDH1	-0,7341	-0,8661	-0,6021	1,21E-05	4,00E-04	
CDK4	-0,7709	-0,9083	-0,6335	1,14E-05	3,81E-04	РІЗК, СС
CDK6	-1,2526	-1,4451	-1,0600	4,23E-06	1,80E-04	РІЗК, СС
CDKN1A	1,6324	1,4545	1,8102	4,05E-07	3,95E-05	TXmisReg, PI3K,
						СС
CDKN2D	-0,8283	-1,0928	-0,5639	4,72E-04	7,71E-03	CC
СЕВРА	3,5734	2,9255	4,2212	1,28E-05	4,07E-04	TXmisReg
СНЕК2	-0,6977	-0,8533	-0,5421	4,98E-05	1,21E-03	CC
COL27A1	-1,5967	-1,8098	-1,3836	1,62E-06	8,40E-05	РІЗК
CREB3L1	-1,1121	-1,2613	-0,9629	1,68E-06	8,57E-05	РІЗК
CREBBP	-0,9996	-1,4521	-0,5472	3,44E-03	4,31E-02	Notch, Wnt,
						ChromMod,
						TGFB, STAT, CC
CXXC4	-1,8885	-2,4801	-1,2969	4,21E-04	7,01E-03	Wnt
CYLD	0,9466	0,7757	1,1175	1,24E-05	4,03E-04	
DDB2	-0,4997	-0,5664	-0,4330	1,63E-06	8,40E-05	DNARepair

DDIT3	1,6567	1,4455	1,8679	1,19E-06	6,95E-05	TXmisReg,
						МАРК
DKK1	-0,5927	-0,8636	-0,3217	3,62E-03	4,51E-02	Wnt
DLL1	-2,1847	-2,4164	-1,9530	3,36E-07	3,59E-05	Notch
DLL3	-2,1013	-2,2840	-1,9187	8,54E-08	1,61E-05	Notch
DLL4	-2,0373	-2,2974	-1,7772	1,20E-06	6,95E-05	Notch
DNMT1	-0,6796	-0,8158	-0,5433	2,48E-05	6,94E-04	
DNMT3A	-0,6120	-0,7672	-0,4568	1,14E-04	2,28E-03	
DUSP4	-1,5784	-1,7400	-1,4169	2,64E-07	3,21E-05	МАРК
DUSP6	-2,3266	-2,5771	-2,0761	3,74E-07	3,75E-05	TXmisReg,
						МАРК
E2F1	-1,0131	-1,1381	-0,8880	9,54E-07	6,35E-05	CC
E2F5	-2,0717	-2,2434	-1,9000	6,15E-08	1,31E-05	TGFB, CC
EFNA3	0,9523	0,6642	1,2403	3,40E-04	5,87E-03	PI3K, RAS
EFNA5	-1,9691	-2,2218	-1,7164	1,24E-06	6,95E-05	PI3K, RAS
EGFR	-1,2340	-1,4194	-1,0487	3,62E-06	1,57E-04	MAPK, PI3K, RAS
EIF4EBP1	-0,6686	-0,8509	-0,4864	1,79E-04	3,40E-03	РІЗК
ENDOG	-1,8226	-2,1377	-1,5075	9,31E-06	3,24E-04	Арор
EPOR	-1,3214	-1,6364	-1,0064	7,65E-05	1,69E-03	STAT, PI3K
ERCC2	-0,9443	-1,1704	-0,7182	7,87E-05	1,69E-03	DNARepair
ETS2	-1,6030	-1,7249	-1,4810	3,39E-08	9,64E-06	RAS
ETV1	-2,2399	-2,3852	-2,0945	1,12E-08	6,40E-06	TXmisReg
ETV4	-1,0200	-1,2276	-0,8123	2,74E-05	7,49E-04	TXmisReg
FANCA	-0,5632	-0,7062	-0,4202	1,14E-04	2,28E-03	DNARepair
FANCC	-1,0363	-1,2155	-0,8572	9,29E-06	3,24E-04	DNARepair
FANCF	-0,6172	-0,8835	-0,3509	2,66E-03	3,51E-02	DNARepair
FAS	1,1879	0,6797	1,6961	2,54E-03	3,37E-02	МАРК, Арор
FASLG	-1,3073	-1,7741	-0,8406	9,16E-04	1,37E-02	МАРК, РІЗК,
						RAS, Apop
FBXW7	-0,9567	-1,2252	-0,6882	2,15E-04	4,03E-03	
FEN1	-0,5254	-0,7339	-0,3170	1,68E-03	2,33E-02	DNARepair
FGF11	-0,4964	-0,6867	-0,3061	1,38E-03	1,95E-02	MAPK, PI3K, RAS
FGF12	-0,9910	-1,1612	-0,8208	8,90E-06	3,20E-04	MAPK, PI3K, RAS
FGF14	-2,3022	-2,3720	-2,2325	5,54E-11	9,46E-08	MAPK, PI3K, RAS
---	---	--	---	--	--	---
FGF9	1,0798	0,8654	1,2943	2,33E-05	6,58E-04	MAPK, PI3K, RAS
FGFR3	-0,4816	-0,6651	-0,2980	1,34E-03	1,90E-02	MAPK, PI3K, RAS
FGFR4	-1,4136	-1,8260	-1,0011	2,73E-04	4,98E-03	MAPK, PI3K, RAS
FLNA	0,9391	0,7989	1,0794	3,48E-06	1,56E-04	МАРК
FOSL1	2,3621	2,0926	2,6317	5,57E-07	4,57E-05	Wnt
FST	0,6942	0,4412	0,9473	1,03E-03	1,51E-02	TGFB
FUT8	-1,7046	-2,0905	-1,3187	5,49E-05	1,31E-03	TXmisReg
FZD10	-0,8359	-1,0958	-0,5759	4,03E-04	6,78E-03	Wnt
GADD45A	0,4630	0,3713	0,5548	2,30E-05	6,53E-04	МАРК, СС
GADD45B	1,1070	0,7811	1,4329	2,88E-04	5,15E-03	МАРК, СС
GATA2	-1,0626	-1,5128	-0,6124	2,41E-03	3,21E-02	
GNAQ	-0,7168	-0,8369	-0,5967	7,54E-06	2,92E-04	
GNAS	-0,5071	-0,7262	-0,2879	2,68E-03	3,52E-02	
GNG12	-1,6518	-1,8106	-1,4930	1,71E-07	2,43E-05	MAPK, PI3K, RAS
GNG4	-1,7010	-1,9997	-1,4023	1,03E-05	3,52E-04	PI3K, RAS
GPC4	-1,1511	-1,4094	-0,8928	5,18E-05	1,24E-03	Wnt
GRB2	0,4380	0,3302	0,5459	9,39E-05	1,95E-03	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS
GSK3B	-0 4568	-0.5487	-0.3640	2 54F-05	7 01F-04	Wht. HH. PI3K
	0,4500	0,0107	-0,3049	2,312 05	,,012 01	
	0,4000	0,0 107	-0,3049	2,512 05	,,012 01	CC
H2AFX	-0,5660	-0,8115	-0,3204	2,74E-03	3,58E-02	CC DNARepair
H2AFX H3F3A	-0,5660	-0,8115 -1,6598	-0,3204 -1,2077	2,74E-03 5,02E-06	3,58E-02 2,04E-04	CC DNARepair TXmisReg
H2AFX H3F3A H3F3C	-0,5660 -1,4337 -0,8531	-0,8115 -1,6598 -1,0289	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch,
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod,
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod, TXmisReg, CC
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1 HDAC10	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497 -1,2320	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860 -1,5349	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133 -0,9291	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06 9,32E-05	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05 1,95E-03	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod, TXmisReg, CC ChromMod
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1 HDAC10 HDAC11	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497 -1,2320 -0,7660	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860 -1,5349 -1,0401	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133 -0,9133 -0,9291 -0,4918	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06 9,32E-05 9,29E-04	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05 1,95E-03 1,38E-02	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod, TXmisReg, CC ChromMod ChromMod
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1 HDAC10 HDAC11 HDAC2	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497 -1,2320 -0,7660 -0,5455	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860 -1,1860 -1,5349 -1,0401 -0,7157	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133 -0,9133 -0,9291 -0,4918 -0,3753	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06 9,32E-05 9,29E-04 4,11E-04	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05 1,95E-03 1,38E-02 6,88E-03	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod, TXmisReg, CC ChromMod ChromMod Notch,
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1 HDAC10 HDAC11 HDAC2	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497 -1,2320 -0,7660 -0,5455	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860 -1,1860 -1,5349 -1,0401 -0,7157	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133 -0,9133 -0,9291 -0,4918 -0,3753	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06 9,32E-05 9,29E-04 4,11E-04	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05 1,95E-03 1,38E-02 6,88E-03	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod, TXmisReg, CC ChromMod ChromMod Notch, ChromMod
H2AFX H3F3A H3F3C HDAC1 HDAC10 HDAC11 HDAC2	-0,5660 -1,4337 -0,8531 -1,0497 -1,2320 -0,7660 -0,5455	-0,8115 -1,6598 -1,0289 -1,1860 -1,1860 -1,5349 -1,0401 -0,7157	-0,3049 -0,3204 -1,2077 -0,6774 -0,9133 -0,9133 -0,9291 -0,4918 -0,3753	2,74E-03 5,02E-06 2,96E-05 1,35E-06 9,32E-05 9,29E-04 4,11E-04	3,58E-02 2,04E-04 7,96E-04 7,43E-05 1,95E-03 1,38E-02 6,88E-03	CC DNARepair TXmisReg TXmisReg Notch, ChromMod, TXmisReg, CC ChromMod ChromMod Notch, ChromMod, TXmisReg, CC

HELLS	-0,5088	-0,7213	-0,2963	2,23E-03	3,01E-02	ChromMod
HES1	-2,0736	-2,3692	-1,7780	2,54E-06	1,19E-04	Notch
HHEX	1,0681	0,8962	1,2399	5,75E-06	2,28E-04	TXmisReg
HIST1H3B	-0,9909	-1,3935	-0,5883	1,91E-03	2,62E-02	TXmisReg
HIST1H3G	-1,2507	-1,5759	-0,9255	1,33E-04	2,59E-03	TXmisReg
HIST1H3H	-0,8722	-1,2202	-0,5243	1,73E-03	2,39E-02	TXmisReg
HMGA2	-3,6508	-3,9338	-3,3678	3,87E-08	1,01E-05	TXmisReg
HNF1A	-2,0197	-2,6791	-1,3602	5,41E-04	8,70E-03	
HOXA10	-1,1626	-1,4116	-0,9136	3,83E-05	9,74E-04	TXmisReg
HRAS	-1,1301	-1,3687	-0,8914	3 <i>,</i> 49E-05	9,22E-04	MAPK, PI3K, RAS
HSP90B1	0,4408	0,3317	0,5499	9,71E-05	2,01E-03	РІЗК
HSPA1A	5,6833	4,9955	6,3710	8,32E-07	5,91E-05	МАРК
HSPB1	2,0536	1,4847	2,6225	1,98E-04	3,73E-03	МАРК
ID1	-3,5044	-3,8520	-3,1568	2,13E-07	2,79E-05	TGFB
ID2	-2,8198	-3,0262	-2,6134	2,60E-08	8,86E-06	TXmisReg, TGFB
ID4	-1,6000	-1,7943	-1,4057	8,53E-07	5,94E-05	TGFB
IDH1	0,5947	0,4006	0,7887	5,39E-04	8,70E-03	
IDH2	-2,0894	-2,2681	-1,9108	7,63E-08	1,53E-05	
IGF1R	-0,9114	-1,1200	-0,7028	5 <i>,</i> 89E-05	1,36E-03	TXmisReg, PI3K,
						RAS
IGFBP3	0,6874	0,4623	0,9125	5,50E-04	8,81E-03	TXmisReg
IKBKG	0,8559	0,6733	1,0384	3,72E-05	9,64E-04	МАРК, РІЗК,
						RAS, Apop
IL12A	1,8824	1,4835	2,2813	3,57E-05	9,37E-04	STAT
IL12RB2	-0,8688	-1,0656	-0,6719	5,52E-05	1,31E-03	STAT
IL1R2	-0,7917	-1,1083	-0,4752	1,75E-03	2,42E-02	TXmisReg,
						МАРК
IL1RAP	-1,2490	-1,6894	-0,8086	8,52E-04	1,29E-02	Арор
IL20RA	-0,8809	-1,2802	-0,4817	3,46E-03	4,33E-02	STAT
IL6R	0,5510	0,3410	0,7611	1,34E-03	1,90E-02	STAT, PI3K
IL8	1,3773	1,1717	1,5829	3,47E-06	1,56E-04	TXmisReg
INHBB	-2,1667	-2,3917	-1,9417	2,91E-07	3,29E-05	TGFB
IRS1	-1,3503	-1,6022	-1,0984	1,54E-05	4,74E-04	РІЗК

ITGA3	-0,8730	-1,0175	-0,7285	6,95E-06	2,73E-04	РІЗК
ITGB8	-1,4632	-1,7963	-1,1300	5,69E-05	1,34E-03	РІЗК
JAG2	-1,5027	-1,7558	-1,2496	7,81E-06	2,96E-04	Notch
JUN	0,9243	0,6197	1,2288	5,71E-04	9,10E-03	Wnt, MAPK
КАТ2В	-1,5564	-1,9804	-1,1324	1,78E-04	3,40E-03	Notch
KRAS	0,2385	0,1833	0,2936	6,28E-05	1,43E-03	MAPK, PI3K, RAS
LAMA5	-1,0550	-1,4451	-0,6649	1,12E-03	1,63E-02	РІЗК
LAMB3	1,3296	1,1954	1,4639	2,40E-07	3,03E-05	РІЗК
LEPR	-0,7308	-1,0580	-0,4037	3,24E-03	4,09E-02	STAT
LFNG	-3,4769	-3,7090	-3,2448	1,37E-08	6,67E-06	Notch
LIF	-1,5129	-1,8010	-1,2248	1,77E-05	5,25E-04	STAT
LIFR	0,8740	0,5151	1,2329	2,03E-03	2,77E-02	STAT
LIG4	-0,8951	-1,1213	-0,6690	1,11E-04	2,24E-03	DNARepair
LTBP1	-1,7490	-2,0194	-1,4786	4,39E-06	1,81E-04	TGFB
MAML2	-1,6772	-2,4193	-0,9351	3,05E-03	3,88E-02	Notch
MAP2K1	0,5542	0,4831	0,6253	1,24E-06	6,95E-05	MAPK, PI3K, RAS
MAP2K6	-1,3280	-1,4733	-1,1828	4,16E-07	3,95E-05	МАРК
MAP3K14	1,1213	0,7765	1,4661	3,77E-04	6,39E-03	МАРК, Арор
МАРЗК5	-1,5052	-1,7896	-1,2207	1,68E-05	5,07E-04	МАРК
МАРК12	-0,8680	-1,2328	-0,5033	2,30E-03	3,08E-02	МАРК
МАРКЗ	-0,7089	-0,8787	-0,5392	7,87E-05	1,69E-03	TGFB, MAPK,
						PI3K, RAS
МАРК8	-0,3540	-0,4161	-0,2918	1,03E-05	3,52E-04	Wnt, MAPK, RAS
MAPK8IP1	-0,8032	-1,1566	-0,4498	2,96E-03	3,79E-02	МАРК
МСМ7	-0,6709	-0,8722	-0,4696	3,24E-04	5,62E-03	CC
MDC1	-0,6025	-0,8654	-0,3396	2,83E-03	3,68E-02	DNARepair
МЕСОМ	-1,8921	-2,1837	-1,6005	4,30E-06	1,80E-04	МАРК
MEN1	0,2450	0,1370	0,3531	2,99E-03	3,82E-02	TXmisReg
MET	1,0374	0,9349	1,1400	2,08E-07	2,79E-05	TXmisReg, PI3K,
						RAS
MFNG	-1,4404	-2,1135	-0,7672	4,07E-03	4,99E-02	Notch
MLLT3	-1,2893	-1,3798	-1,1988	1,94E-08	7,37E-06	TXmisReg
MSH2	-0,3622	-0,4689	-0,2554	2,91E-04	5,16E-03	

MTOR	-0,8275	-1,1189	-0,5362	8,45E-04	1,29E-02	РІЗК
МҮВ	-2,8357	-3,0301	-2,6412	1,65E-08	7,03E-06	РІЗК
МҮС	-1,0094	-1,1716	-0,8472	5,70E-06	2,28E-04	Wnt, TXmisReg,
						TGFB, MAPK,
						STAT, PI3K, CC
MYD88	-0,9418	-1,2594	-0,6241	6,57E-04	1,03E-02	Арор
NCOR1	-0,6424	-0,8089	-0,4760	1,30E-04	2,55E-03	TXmisReg
NF1	-0,6167	-0,7958	-0,4377	2,64E-04	4,85E-03	MAPK, RAS
NFKB1	-1,3163	-1,6308	-1,0017	7,77E-05	1,69E-03	TXmisReg,
						МАРК, РІЗК,
						RAS, Apop
NFKBIA	-0,3354	-0,4712	-0,1996	1,88E-03	2,58E-02	Арор
NKD1	-1,1863	-1,4075	-0,9650	1,54E-05	4,74E-04	Wnt
NOTCH1	2,3801	1,6849	3,0754	2,75E-04	4,99E-03	Notch
NOTCH3	1,0312	0,6653	1,3972	8,85E-04	1,32E-02	Notch
NPM2	-1,2374	-1,6162	-0,8585	3,67E-04	6,26E-03	ChromMod
NSD1	-0,9467	-1,2500	-0,6434	4,83E-04	7,84E-03	ChromMod
NTHL1	-1,0870	-1,3504	-0,8236	8,49E-05	1,80E-03	DNARepair
NUMBL	1,4168	1,1754	1,6582	8,44E-06	3,06E-04	Notch
PAX5	-1,5857	-1,9540	-1,2174	6,48E-05	1,46E-03	TXmisReg
PBRM1	-0,9680	-1,1472	-0,7889	1,46E-05	4,58E-04	
PBX1	-1,9491	-2,1730	-1,7251	5,83E-07	4,63E-05	TXmisReg
PBX3	-1,3129	-1,4692	-1,1567	7,42E-07	5,39E-05	TXmisReg
PDGFD	-1,4726	-1,6302	-1,3151	3,57E-07	3,70E-05	PI3K, RAS
PGF	2,8718	2,5310	3,2126	7,28E-07	5,39E-05	PI3K, RAS
PHF6	-0,4473	-0,5745	-0,3201	2,33E-04	4,35E-03	
РІКЗСВ	-1,2989	-1,5224	-1,0755	9,00E-06	3,20E-04	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PIK3R1	-0,9450	-1,1311	-0,7589	2,21E-05	6,33E-04	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PIK3R2	-1,2498	-1,7456	-0,7541	1,67E-03	2,33E-02	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PLA2G4C	0,7713	0,4526	1,0900	2,10E-03	2,86E-02	MAPK, RAS

PLCB1	-1,5653	-1,7435	-1,3872	5,46E-07	4,57E-05	Wnt
PLD1	-0,6821	-0,9400	-0,4241	1,28E-03	1,83E-02	RAS
POLB	0,6620	0,4044	0,9195	1,50E-03	2,12E-02	DNARepair
POLD1	-1,5369	-1,9425	-1,1312	1,46E-04	2,83E-03	DNARepair
POLD4	-0,7534	-0,8908	-0,6159	1,33E-05	4,21E-04	DNARepair
POLE2	-0,6949	-1,0151	-0,3748	3,77E-03	4,66E-02	DNARepair
POLR2D	-0,6428	-0,7854	-0,5003	4,80E-05	1,17E-03	DNARepair
POLR2H	-1,0426	-1,2650	-0,8202	3,73E-05	9,64E-04	DNARepair
PPARGC1A	-0,5283	-0,7555	-0,3010	2,62E-03	3,46E-02	ChromMod
РРР2СВ	0,5768	0,4294	0,7243	1,19E-04	2,36E-03	TGFB, PI3K
PPP2R1A	-0,6376	-0,8703	-0,4050	1,04E-03	1,52E-02	TGFB, PI3K
PPP2R2C	1,0169	0,7608	1,2731	1,09E-04	2,21E-03	РІЗК
РРРЗСА	-1,0774	-1,2606	-0,8941	8,34E-06	3,06E-04	Wnt, MAPK,
						Арор
РРРЗСВ	-1,2543	-1,5493	-0,9593	7,02E-05	1,58E-03	Wnt, MAPK,
						Арор
PPP3R1	-0,3243	-0,4733	-0,1753	3,71E-03	4,61E-02	Wnt, MAPK,
						Арор
PRKACA	-0,9486	-1,0570	-0,8402	5,61E-07	4,57E-05	Wnt, HH, MAPK,
						RAS, Apop
PRKAR1B	-1,6063	-1,7371	-1,4756	5,41E-08	1,23E-05	Арор
PRKAR2A	-0,7558	-0,9015	-0,6101	1,92E-05	5,63E-04	Арор
PRKCA	-2,0576	-2,6609	-1,4543	2,81E-04	5,05E-03	Wnt, MAPK,
						PI3K, RAS
PRKCG	-1,1403	-1,4746	-0,8060	2,81E-04	5,05E-03	Wnt, MAPK, RAS
PRKDC	-0,8910	-1,1298	-0,6522	1,61E-04	3,10E-03	DNARepair, CC
РТСН1	-2,0426	-2,4119	-1,6733	1,25E-05	4,03E-04	HH
PTPN11	-0,2938	-0,3806	-0,2071	2,93E-04	5,16E-03	STAT, RAS
PTTG2	-1,3210	-1,6033	-1,0388	3,77E-05	9,66E-04	CC
RAD21	-0,5331	-0,6068	-0,4595	2,05E-06	1,00E-04	СС
RAD50	-0,9363	-1,1604	-0,7123	7,84E-05	1,69E-03	DNARepair
RASGRF2	-1,1361	-1,5120	-0,7601	5,86E-04	9,26E-03	MAPK, RAS
RBX1	-0,5826	-0,7104	-0,4547	4,48E-05	1,10E-03	Wnt, TGFB, CC

RET	-2,6902	-2,9706	-2,4099	2,99E-07	3,29E-05	
RFC4	-0,6918	-0,7697	-0,6139	5,08E-07	4,57E-05	DNARepair
RPS27A	-0,3558	-0,4734	-0,2382	5,82E-04	9,23E-03	DNARepair
RRAS2	0,5257	0,2885	0,7630	3,38E-03	4,26E-02	MAPK, RAS
RXRG	-0,9097	-1,1782	-0,6412	2,93E-04	5,16E-03	TXmisReg
SETBP1	-0,8834	-1,0988	-0,6679	8,85E-05	1,86E-03	
SFN	1,0323	0,7884	1,2761	7,22E-05	1,61E-03	CC
SHC1	0,5619	0,4408	0,6831	4,00E-05	1,01E-03	RAS
SHC2	-1,4755	-1,8117	-1,1393	5,72E-05	1,34E-03	RAS
SHC3	-1,6395	-1,8861	-1,3930	3,65E-06	1,57E-04	RAS
SHC4	1,7751	1,1048	2,4455	1,27E-03	1,82E-02	RAS
SKP1	0,5025	0,4046	0,6004	2,05E-05	5,99E-04	Wnt, TGFB, CC
SKP2	-2,1795	-2,2410	-2,1181	3,34E-11	9,46E-08	CC
SMAD2	-0,5609	-0,7725	-0,3492	1,26E-03	1,82E-02	TGFB, CC
SMAD3	-0,6981	-0,8310	-0,5653	1,76E-05	5,25E-04	Wnt, TGFB, CC
SMARCA4	-0,9498	-1,0808	-0,8188	2,03E-06	1,00E-04	
SMARCB1	-1,1409	-1,5543	-0,7274	9,99E-04	1,48E-02	
SMC1A	-1,0598	-1,2779	-0,8416	2,95E-05	7,96E-04	CC
SMC3	-0,4930	-0,6066	-0,3794	6,14E-05	1,41E-03	CC
SOCS1	0,9353	0,5641	1,3064	1,68E-03	2,33E-02	STAT
SOS2	-0,4277	-0,5751	-0,2803	7,45E-04	1,14E-02	MAPK, STAT,
						PI3K, RAS
SOX9	-1,1732	-1,4533	-0,8931	7,73E-05	1,69E-03	
SPP1	4,0253	3,8751	4,1755	2,37E-10	2,70E-07	РІЗК
SPRY1	-3,1193	-3,3052	-2,9333	6,24E-09	4,25E-06	STAT
SPRY2	-2,5659	-2,8591	-2,2726	5,62E-07	4,57E-05	STAT
SPRY4	-1,6887	-1,8416	-1,5358	1,13E-07	1,93E-05	STAT
STAT3	-0,4100	-0,5904	-0,2297	2,95E-03	3,79E-02	STAT
STMN1	-0,8760	-0,9852	-0,7668	1,02E-06	6,51E-05	МАРК
SUV39H2	-0,6834	-0,9177	-0,4491	7,23E-04	1,13E-02	ChromMod
SYK	-1,0600	-1,1849	-0,9351	6,93E-07	5,26E-05	РІЗК
TBL1XR1	-1,3606	-1,5339	-1,1872	1,18E-06	6,95E-05	Wnt
TCF3	-0,7300	-0,9163	-0,5436	1,19E-04	2,35E-03	TXmisReg

TFDP1	-1,2495	-1,4055	-1,0935	1,03E-06	6,51E-05	TGFB, CC
TGFB3	-3,3835	-3,5377	-3,2292	9,63E-10	8,21E-07	ТGFB, МАРК, СС
TGFBR2	-1,6402	-1,8547	-1,4257	1,41E-06	7,65E-05	TXmisReg, TGFB,
						МАРК
THEM4	-0,9034	-1,1875	-0,6193	4,32E-04	7,15E-03	РІЗК
TIAM1	-2,1979	-2,5072	-1,8886	2,33E-06	1,12E-04	RAS
TNFRSF10A	0,9001	0,6167	1,1834	4,34E-04	7,16E-03	Арор
TNFRSF10D	1,1259	0,7283	1,5236	8,60E-04	1,29E-02	Арор
TNFSF10	-0,5023	-0,7346	-0,2699	3,85E-03	4,75E-02	Арор
TNR	-2,8335	-3,1917	-2,4753	1,12E-06	6,95E-05	РІЗК
TSPAN7	-0,8158	-1,0212	-0,6103	1,09E-04	2,21E-03	TXmisReg
UBB	1,1061	0,9183	1,2938	8,23E-06	3,05E-04	DNARepair
VHL	-0,6559	-0,8830	-0,4288	7,66E-04	1,17E-02	
WEE1	-0,9629	-1,1249	-0,8008	7,77E-06	2,96E-04	CC
WHSC1	-0,5012	-0,5745	-0,4280	3,00E-06	1,38E-04	TXmisReg
WNT3	1,0606	0,6961	1,4252	7,34E-04	1,13E-02	Wnt, HH
WNT4	-2,1991	-2,5711	-1,8271	8,04E-06	3,01E-04	Wnt, HH
ХРА	-0,5015	-0,6839	-0,3192	1,02E-03	1,50E-02	DNARepair
XRCC4	-0,6974	-0,9286	-0,4663	5,91E-04	9,29E-03	DNARepair
ZBTB16	-2,4255	-2,6587	-2,1924	1,71E-07	2,43E-05	TXmisReg
ZIC2	-1,2859	-1,8241	-0,7477	2,25E-03	3,03E-02	НН

Tabelle A-6: Alle differenziell exprimierten Gene mit FDR<0,05 nach 24h Inkubation von BON Zellen mit 25nM Bortezomib kombiniert mit 10µM Cisplatin und assoziierte Signalwege

Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog.

7.12 Anhang 12

Familiy name	PANTHER GO-Slim Biological Process	Family ID	Mapped IDs
Aryl Hydrocarbon	transcription from RNA polymerase II	PTHR23042:	HUMAN HGNC=1
Receptor Nuclear	promoter; regulation of transcription from	SF6	6876 UniProtKB=
Translocator 2	RNA polymerase II promoter		Q9HBZ2
At-Rich Interactive		PTHR12656:	HUMAN HGNC=1
Domain-Containing		SF11	8040 UniProtKB=
Protein 1b	··· · · · · · · · · · · · · · · · · ·	DTUD44200	Q8NFD5
Breast Cancer Type 2	nitrogen compound metabolic	PTHR11289:	HUMAN HGNC=1
Susceptibility Protein	process;biosynthetic process;transcription,	SFU	
	of pucleobase-containing compound		51367
	metabolic process		
Camp-Dependent	cell communication	PTHR11635:	HUMAN HGNC=9
Protein Kinase Type I-		SF126	390 UniProtKB=P
Beta Regulatory Subunit		00	31321
Creb-Binding Protein	transcription from RNA polymerase II	PTHR13808:	HUMAN HGNC=2
-	promoter; regulation of transcription from	SF5	348 UniProtKB=Q
	RNA polymerase II promoter		92793
Cyclic Amp-Responsive	transcription from RNA polymerase II	PTHR22952:	HUMAN HGNC=1
Element-Binding Protein	promoter;cellular process;neurological	SF105	8854 UniProtKB=
3-Like Protein 4	system process;ectoderm		Q8TEY5
	development;nervous system		
	development; response to stress; regulation		
	of transcription from RNA polymerase II		
	promoter		
Dna Repair Protein		PTHR18867:	HUMAN HGNC=9
Radsu		5F12	
Dna Panair Protein Yrcc/		DTHP28550.	
		SF1	2831 UniProtKB=
		011	013426
Dna-Dependent Protein	phosphate-containing compound metabolic	PTHR11139:	HUMAN HGNC=9
Kinase Catalytic Subunit	process;nitrogen compound metabolic	SF68	413 UniProtKB=P
-	process;DNA metabolic process;cellular		78527
	process; response to stress		
Dual Specificity Protein	single-multicellular organism	PTHR10159:	HUMAN HGNC=3
Phosphatase 4	process; endoderm development; an atomical	SF111	070 UniProtKB=Q
	structure morphogenesis;embryo		13115
	development		
Ephrin-A5	cellular component movement;cell	PTHR11304:	HUMAN HGNC=3
	communication;cell-cell adhesion;single-	SF33	225 UniProtKB=P
	multicellular organism process;cellular		52803
	component morphogenesis;cell		
	development/locometion/recrossed		
	development, ocomotion; response to		

	external stimulus;regulation of biological				
	process; cytoskeleton organization				
Epidermal Growth	apoptotic process;cell proliferation;cell-cell	PTHR24416:	HUMAN HGNC=3		
Factor Receptor	adhesion;apoptotic process;nervous system	SF91	236 UniProtKB=P		
	development		00533		
Fibroblast Growth	cell cycle;cell-cell signaling;mesoderm	PTHR11486:	HUMAN HGNC=3		
Factor 12	development; angiogenesis; nervous system	SF17	668 UniProtKB=P		
	development		61328		
Fibroblast Growth	cell cycle;cell-cell signaling;mesoderm	PTHR11486:	HUMAN HGNC=3		
Factor 14	development;angiogenesis;nervous system	SF18	671 UniProtKB=Q		
	development		92915		
Glycogen Synthase	glycogen metabolic process;protein	PTHR24057:	HUMAN HGNC=4		
Kinase-3 Beta	phosphorylation;mitosis;cell	SF8	617 UniProtKB=P		
	communication;segment		49841		
	specification;segment				
	specification; ectoderm				
	development;mesoderm				
	development;embryo development;nervous				
	system development				
Guanine Nucleotide-	metabolic process;cell	PTHR10218:	HUMAN HGNC=4		
Binding Protein G(Q)	communication; response to	SF184	390 UniProtKB=P		
Subunit Alpha	stimulus;regulation of biological		50148		
	process; regulation of catalytic activity				
Histone Deacetylase 4	apoptotic process;transcription from RNA	PTHR10625:	HUMAN HGNC=1		
	polymerase II promoter;cell cycle;apoptotic	SF100	4063 UniProtKB=		
	process; regulation of transcription from RNA		P56524		
	polymerase II promoter; negative regulation				
	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization				
Insulin-Like Growth	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization	PTHR24416:	HUMAN HGNC=5		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization	PTHR24416: SF106	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization	PTHR24416: SF106	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II	PTHR24416: SF106 PTHR13703:	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 Nuclear Receptor	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992:	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 Nuclear Receptor Corepressor 1	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=O		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 Nuclear Receptor Corepressor 1	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=O 75376		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 Nuclear Receptor Corepressor 1 Nucleophosmin	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter regulation of transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747:	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=O 75376 HUMAN HGNC=7		
Insulin-LikeGrowthFactor 1 ReceptorMothersAgainstDecapentaplegicHomolog 3NuclearReceptorCorepressor 1Nucleophosmin	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 SF5 PTHR22747: SF2	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 Nuclear Receptor Corepressor 1 Nucleophosmin	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748		
Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3 Nuclear Receptor Corepressor 1 Nucleophosmin	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2 PTHR10336:	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=O 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748 HUMAN HGNC=1		
Insulin-LikeGrowthFactor 1 ReceptorMothersAgainstDecapentaplegicHomolog 3NuclearReceptorCorepressor 1Nucleophosmin1-Phosphatidyl-Inositol4,5-Bisphosphate	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2 PTHR10336: SF12	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748 HUMAN HGNC=1 5917 UniProtKB=		
Insulin-LikeGrowthFactor 1 ReceptorMothersAgainstDecapentaplegicHomolog 3NuclearReceptorCorepressor 1Nucleophosmin1-Phosphatidyl-Inositol4,5-BisphosphatePhosphodiesterase	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organizationtranscription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promotertranscription from RNA polymerase II promotertranscription from RNA polymerase II promotertranscription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoterrRNA metabolic processphospholipidmetabolic process;phospholipid metabolic process;cell communication;regulation of catalytic	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2 PTHR10336: SF12	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748 HUMAN HGNC=1 5917 UniProtKB= Q9NQ66		
Insulin-LikeGrowthFactor 1 ReceptorMothersAgainstDecapentaplegicHomolog 3NuclearReceptorCorepressor 1Nucleophosmin1-Phosphatidyl-Inositol4,5-BisphosphatePhosphodiesteraseBeta-1	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process phospholipid metabolic process;cell communication;regulation of catalytic activity	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2 PTHR10336: SF12	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748 HUMAN HGNC=1 5917 UniProtKB= Q9NQ66		
Insulin-LikeGrowthFactor 1 ReceptorMothersAgainstDecapentaplegicHomolog 3NuclearReceptorCorepressor 1Nucleophosmin1-Phosphatidyl-Inositol4,5-BisphosphatePhosphodiesteraseBeta-1Phosphatidyl-Inositol	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter rRNA polymerase II promoter rRNA metabolic process phospholipid metabolic process;cell communication;regulation of catalytic activity phospholipid metabolic process;biosynthetic	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2 PTHR10336: SF12 PTHR10048:	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748 HUMAN HGNC=1 5917 UniProtKB= Q9NQ66 HUMAN HGNC=8		
Insulin-LikeGrowthFactor 1 ReceptorMothersAgainstDecapentaplegicHomolog 3NuclearReceptorCorepressor 1Nucleophosmin1-Phosphatidyl-Inositol4,5-BisphosphatePhosphodiesteraseBeta-1Phosphatidyl-Inositol4,5-Bisphosphate3-	polymerase II promoter;negative regulation of apoptotic process;chromatin organization transcription from RNA polymerase II promoter;cell-cell signaling;regulation of transcription from RNA polymerase II promoter transcription from RNA polymerase II promoter regulation of transcription from RNA polymerase II promoter rRNA metabolic process phospholipid metabolic process;cell communication;regulation of catalytic activity phospholipid metabolic process;biosynthetic process;phospholipid metabolic process;biosynthetic process;phospholipid metabolic process;biosynthetic	PTHR24416: SF106 PTHR13703: SF25 PTHR13992: SF5 PTHR22747: SF2 PTHR10336: SF12 PTHR10048: SF33	HUMAN HGNC=5 465 UniProtKB=P 08069 HUMAN HGNC=6 769 UniProtKB=P 84022 HUMAN HGNC=7 672 UniProtKB=0 75376 HUMAN HGNC=7 910 UniProtKB=P 06748 HUMAN HGNC=1 5917 UniProtKB= Q9NQ66 HUMAN HGNC=8 976 UniProtKB=P		

Kinase Catalytic Subunit			
Beta Isoform			
Phospholipase D1	cell communication	PTHR18896: SF57	HUMAN HGNC=9 067 UniProtKB=Q 13393
Platelet-Derived Growth Factor D	phosphate-containing compound metabolicprocess;proteinphosphorylation;cellularcomponentmovement;cellcommunication;cellproliferation;single-multicellularorganismprocess;locomotion;responsetostress;localization;regulationof phosphatemetabolicprocess;regulationactivityprocess;localization;	PTHR11633: SF4	HUMAN HGNC=3 0620 UniProtKB= Q9GZP0
Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1	transcription from RNA polymerase II promoter;mesoderm development	PTHR11850: SF89	HUMAN HGNC=8 632 UniProtKB=P 40424
Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 3	transcription from RNA polymerase II promoter;mesoderm development;hemopoiesis	PTHR11850: SF97	HUMAN HGNC=8 634 UniProtKB=P 40426
Protein Af-9	transcription from RNA polymerase II promoter	PTHR23195: SF25	HUMAN HGNC=7 136 UniProtKB=P 42568
Protein Kinase C Alpha Type	protein phosphorylation;cell cycle;cell communication	PTHR24356: SF193	HUMAN HGNC=9 393 UniProtKB=P 17252
Protein Polybromo-1		PTHR16062: SF15	HUMAN HGNC=3 0064 UniProtKB= Q86U86
Protein Sprouty Homolog 1	cell communication;mesoderm development	PTHR12365: SF10	HUMAN HGNC=1 1269 UniProtKB= O43609
Serine/Threonine- Protein Phosphatase 2b Catalytic Subunit Alpha Isoform	glycogen metabolic process;transcription from RNA polymerase II promoter;mRNA processing;protein phosphorylation;mitosis;cell communication;response to stress;regulation of carbohydrate metabolic process;regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	PTHR11668: SF118	HUMAN HGNC=9 314 UniProtKB=Q 08209
Shc-Transforming Protein 2	cell communication;response to stimulus;regulation of biological process	PTHR10337: SF5	HUMAN HGNC=2 9869 UniProtKB= P98077
Tenascin-R	cell communication;cell-matrix adhesion;cell-cell adhesion	PTHR19143: SF254	HUMAN HGNC=1 1953 UniProtKB= Q92752

T-Lymphoma Invasion	B cell mediated immunity;metabolic	PTHR22826:	HUMAN HGNC=1
And Metastasis-Inducing	process;cell communication;neurological	SF88	1805 UniProtKB=
Protein 1	system process;cellular defense		Q13009
	response; regulation of catalytic activity		
Transcription Factor E2-	female gamete generation;transcription	PTHR11793:	HUMAN HGNC=1
Alpha	from RNA polymerase II promoter; ectoderm	SF7	1633 UniProtKB=
	development;sex determination;nervous		P15923
	system development;regulation of		
	transcription from RNA polymerase II		
	promoter		
Transcriptional	DNA repair; transcription from RNA	PTHR10799:	HUMAN HGNC=8
Regulator Atrx	polymerase II promoter;cellular	SF584	86 UniProtKB=P4
		6100	
	polymerase II promoter;chromatin		
	organization		
Voltage-Dependent		PTHR10166:	HUMAN HGNC=1
Calcium Channel Subunit		SF6	399 UniProtKB=P
Alpha-2/Delta-1			54289
Voltage-Dependent		PTHR10166:	HUMAN HGNC=1
Calcium Channel Subunit		SF7	400 UniProtKB=Q
Alpha-2/Delta-2			9NY47
Voltage-Dependent L-	cellular process; cation transport; regulation	PTHR10037:	HUMAN HGNC=1
Type Calcium Channel	of biological process	SF188	390 UniProtKB=Q
Subunit Alpha-1c			13936
Voltage-Dependent T-	cellular process;cation	PTHR10037:	HUMAN HGNC=1
Type Calcium Channel	transport; exocytosis; regulation of biological	SF192	395 UniProtKB=O
Subunit Alpha-1h	process		95180

Tabelle A-7: Funktionelle Zuordnung der Gene, die sich in der Agglomerativen Clusteranalyse von Bortezomib versus Kombinationsbehandlung als gegenläufig reguliert gezeigt haben

7.13 Anhang 13

		Oberes	Unteres			
	Log2 fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
AKT1	-0,1870	-0,2257	-0,1483	3,06E-05	2,75E-03	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS, Apop
ARID2	-0,4605	-0,6113	-0,3097	5,51E-04	2,17E-02	
ASXL1	-0,3863	-0,5145	-0,2581	5,95E-04	2,29E-02	
ATR	0,5032	0,3349	0,6715	6,24E-04	2,32E-02	CC
AXIN1	-0,2037	-0,2761	-0,1313	8,93E-04	2,89E-02	Wnt
B2M	1,0525	0,9082	1,1967	1,94E-06	4,84E-04	
BCL2	-0,6372	-0,7748	-0,4997	4,02E-05	3,42E-03	РІЗК, Арор
BMP4	0,5543	0,4288	0,6798	5,49E-05	4,28E-03	HH, TGFB
BMPR1B	0,3593	0,2907	0,4279	1,80E-05	2,01E-03	TGFB
CACNA1D	-0,6287	-0,8218	-0,4357	3,73E-04	1,61E-02	МАРК
CACNA2D1	0,3568	0,2325	0,4811	7,94E-04	2,62E-02	МАРК
CASP7	0,7744	0,6268	0,9220	1,78E-05	2,01E-03	Арор
CASP8	0,5016	0,3878	0,6154	5,56E-05	4,28E-03	Арор
CCNA2	-0,5611	-0,6707	-0,4515	2,09E-05	2,12E-03	CC
CCNB1	-0,7504	-0,8912	-0,6096	1,60E-05	1,99E-03	CC
CCND1	0,3372	0,2691	0,4053	2,61E-05	2,56E-03	Wnt, STAT, PI3K,
						СС
CCND3	-0,1519	-0,1993	-0,1046	4,07E-04	1,71E-02	Wnt, STAT, PI3K,
						СС
CCNE1	-0,8845	-0,9924	-0,7765	8,83E-07	2,60E-04	РІЗК, СС
CCNE2	-0,1980	-0,2730	-0,1231	1,28E-03	3,70E-02	РІЗК, СС
CDC25C	-0,5600	-0,7595	-0,3605	9,05E-04	2,90E-02	CC
CDH1	-0,4856	-0,6326	-0,3387	3,41E-04	1,54E-02	
CDK6	-0,3873	-0,4845	-0,2900	1,07E-04	6,53E-03	РІЗК, СС
CDKN1A	-0,5330	-0,7341	-0,3319	1,26E-03	3,67E-02	TXmisReg, PI3K, CC
CDKN2C	-0,2735	-0,3818	-0,1651	1,66E-03	4,50E-02	TXmisReg, CC
CREB3L1	0,4262	0,3610	0,4915	4,12E-06	7,40E-04	РІЗК
CXXC4	-1,2706	-1,6266	-0,9145	2,13E-04	1,07E-02	Wnt

DDIT4	0,5235	0,3381	0,7088	8,74E-04	2,85E-02	РІЗК
DKK1	0,9978	0,7670	1,2286	6,30E-05	4,53E-03	Wnt
DKK4	1,4017	0,8628	1,9407	1,40E-03	3,91E-02	Wnt
DLL1	-0,4583	-0,6042	-0,3124	4,65E-04	1,88E-02	Notch
DNMT1	0,1614	0,1076	0,2151	6,09E-04	2,32E-02	
DNMT3A	-0,2628	-0,3593	-0,1664	1,07E-03	3,22E-02	
DUSP4	0,6031	0,5377	0,6684	3,91E-07	1,58E-04	МАРК
DUSP5	0,9524	0,8758	1,0289	4,97E-08	5,35E-05	МАРК
EPHA2	1,0411	0,9433	1,1389	1,46E-07	9,44E-05	PI3K, RAS
ERBB2	0,9267	0,5891	1,2644	1,03E-03	3,11E-02	
ETS2	-0,3286	-0,4055	-0,2517	6,79E-05	4,74E-03	RAS
FGF12	-0,5017	-0,6490	-0,3545	2,83E-04	1,32E-02	MAPK, PI3K, RAS
FGFR1	0,3585	0,2628	0,4542	1,57E-04	8,69E-03	MAPK, PI3K, RAS
FLNA	0,4967	0,4138	0,5796	7,35E-06	1,08E-03	МАРК
FOSL1	0,8222	0,6541	0,9903	2,82E-05	2,68E-03	Wnt
GADD45B	0,6718	0,4473	0,8963	6,21E-04	2,32E-02	МАРК, СС
GADD45G	-0,8258	-1,0759	-0,5756	3,44E-04	1,54E-02	МАРК, СС
GNA11	0,2854	0,2141	0,3567	1,03E-04	6,53E-03	
GNAS	-0,2327	-0,3162	-0,1492	9,46E-04	2,97E-02	
GNG4	-0,2752	-0,3552	-0,1952	2,67E-04	1,27E-02	PI3K, RAS
H3F3A	-0,3834	-0,5307	-0,2361	1,40E-03	3,91E-02	TXmisReg
НЗҒЗС	0,2007	0,1576	0,2437	3,87E-05	3,39E-03	TXmisReg
HDAC2	-0,3492	-0,4742	-0,2242	9,31E-04	2,95E-02	Notch, ChromMod,
						TXmisReg, CC
HIST1H3B	-0,8900	-1,0473	-0,7328	1,07E-05	1,45E-03	TXmisReg
HIST1H3G	-0,6325	-0,8322	-0,4328	4,42E-04	1,81E-02	TXmisReg
HOXA10	0,7626	0,5902	0,9351	5,44E-05	4,28E-03	TXmisReg
HSPA1A	0,4677	0,3256	0,6099	3,51E-04	1,55E-02	МАРК
HSPB1	0,3995	0,2651	0,5339	6,46E-04	2,34E-02	МАРК
ID2	-0,4263	-0,5814	-0,2712	1,02E-03	3,11E-02	TXmisReg, TGFB
IL6R	0,3747	0,2548	0,4946	4,80E-04	1,91E-02	STAT, PI3K
IL8	1,3519	1,1337	1,5700	5,86E-06	9,10E-04	TXmisReg
IRS1	0,7333	0,4522	1,0144	1,38E-03	3,91E-02	РІЗК

ITGA2	0,8082	0,6187	0,9977	6,88E-05	4,74E-03	РІЗК
ITGA3	0,5313	0,3877	0,6748	1,69E-04	8,96E-03	РІЗК
ITGA6	0,5878	0,4761	0,6994	1,74E-05	2,01E-03	РІЗК
ITGB8	0,6457	0,4060	0,8854	1,15E-03	3,40E-02	РІЗК
JAG1	0,4517	0,3417	0,5616	8,76E-05	5,78E-03	Notch
JAK1	0,4505	0,3478	0,5533	5,74E-05	4,32E-03	STAT, PI3K
JAK2	0,6858	0,4488	0,9229	7,58E-04	2,55E-02	STAT, PI3K
KITLG	0,2411	0,1594	0,3227	6,72E-04	2,36E-02	PI3K, RAS
KLF4	0,7538	0,5523	0,9554	1,59E-04	8,69E-03	
LAMA3	1,5313	1,3045	1,7581	3,29E-06	6,64E-04	РІЗК
LAMC2	1,0066	0,8837	1,1294	8,83E-07	2,60E-04	РІЗК
LIF	1,5118	1,2166	1,8069	2,08E-05	2,12E-03	STAT
LTBP1	0,8023	0,5500	1,0547	4,32E-04	1,79E-02	TGFB
MAP2K6	1,0272	0,9229	1,1316	2,50E-07	1,29E-04	МАРК
МАРЗК5	0,4087	0,2614	0,5560	9,68E-04	3,00E-02	МАРК
MET	0,5314	0,3844	0,6784	1,96E-04	1,01E-02	TXmisReg, PI3K,
						RAS
MLLT3	0,8907	0,7468	1,0346	5,91E-06	9,10E-04	TXmisReg
МҮС	0,5850	0,5157	0,6544	7,21E-07	2,59E-04	Wnt, TXmisReg,
						TGFB, MAPK, STAT,
						РІЗК, СС
MYD88	0,8471	0,7721	0,9221	9,67E-08	7,82E-05	Арор
NBN	0,5734	0,4203	0,7265	1,57E-04	8,69E-03	DNARepair
NFKBIA	0,7915	0,5254	1,0577	6,44E-04	2,34E-02	Арор
NFKBIZ	0,6622	0,4377	0,8867	6,76E-04	2,36E-02	TXmisReg
NR4A3	0,8684	0,5222	1,2145	1,72E-03	4,59E-02	TXmisReg
PLA1A	1,4512	0,9736	1,9288	5,67E-04	2,21E-02	RAS
PLAU	1,8791	1,6161	2,1422	2,24E-06	5,16E-04	TXmisReg
PLD1	0,6417	0,4231	0,8603	6,96E-04	2,39E-02	RAS
PML	1,6182	1,5126	1,7239	1,17E-08	1,90E-05	TXmisReg
POLD4	0,4420	0,3255	0,5584	1,45E-04	8,51E-03	DNARepair
POLD4 POLR2D	0,4420 -0,3441	0,3255 -0,4291	0,5584 -0,2591	1,45E-04 9,60E-05	8,51E-03 6,21E-03	DNARepair DNARepair

PTEN	0,1796	0,1237	0,2355	4,05E-04	1,71E-02	РІЗК
PTPN11	-0,4218	-0,5278	-0,3158	1,07E-04	6,53E-03	STAT, RAS
PTTG2	-0,4419	-0,5672	-0,3165	2,30E-04	1,14E-02	CC
RAD21	-0,3560	-0,4512	-0,2608	1,58E-04	8,69E-03	CC
RASGRP1	0,6785	0,5173	0,8397	7,47E-05	5,03E-03	MAPK, RAS
RET	-0,8115	-1,1219	-0,5010	1,37E-03	3,91E-02	
RPS27A	-0,2825	-0,3809	-0,1841	7,92E-04	2,62E-02	DNARepair
RXRG	1,2438	1,0043	1,4834	1,91E-05	2,05E-03	TXmisReg
SGK2	-0,3772	-0,5250	-0,2295	1,56E-03	4,27E-02	РІЗК
SHC1	0,2436	0,1689	0,3182	3,68E-04	1,61E-02	RAS
SHC3	-1,0308	-1,4028	-0,6589	9,75E-04	3,00E-02	RAS
SHC4	2,0702	1,7589	2,3816	3,65E-06	6,94E-04	RAS
SKP2	0,3097	0,2264	0,3930	1,65E-04	8,87E-03	CC
SOCS1	1,2631	1,0375	1,4887	1,16E-05	1,49E-03	STAT
SOCS3	0,6208	0,4117	0,8299	6,50E-04	2,34E-02	STAT
SOS1	-0,4488	-0,6010	-0,2966	6,78E-04	2,36E-02	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS
SPP1	2,1080	1,7756	2,4404	5,02E-06	8,54E-04	РІЗК
STAT1	4,2428	4,0937	4,3918	1,56E-10	5,04E-07	STAT
<i>SYK</i>	-0,1772	-0,2284	-0,1259	2,59E-04	1,25E-02	РІЗК
TBL1XR1	-0,2651	-0,3642	-0,1660	1,19E-03	3,51E-02	Wnt
TGFB1	0,4950	0,3931	0,5969	2,95E-05	2,73E-03	TGFB, MAPK, CC
TGFBR2	0,7392	0,6379	0,8405	1,94E-06	4,84E-04	TXmisReg, TGFB,
						МАРК
THBS1	0,8960	0,7693	1,0226	2,40E-06	5,16E-04	TGFB, PI3K
TLX1	0,8955	0,5866	1,2044	7,50E-04	2,55E-02	TXmisReg
ΤΝϹ	0,5513	0,3990	0,7037	1,95E-04	1,01E-02	РІЗК
TNFAIP3	1,4017	0,8458	1,9576	1,67E-03	4,50E-02	
TNFRSF10B	0,8766	0,6836	1,0696	4,58E-05	3,80E-03	Арор
TNFRSF10D	-0,8258	-0,9705	-0,6812	1,02E-05	1,43E-03	Арор
TNFSF10	1,9171	1,7193	2,1149	2,79E-07	1,29E-04	Арор

TP53	-0,7094	-0,8720	-0,5467	5,95E-05	4,37E-03	Wnt, TXmisReg,
						МАРК, РІЗК, Арор,
						CC
WEE1	0,3231	0,1986	0,4475	1,42E-03	3,92E-02	СС
WHSC1	-0,1818	-0,2341	-0,1295	2,51E-04	1,23E-02	TXmisReg
XRCC4	0,2186	0,1531	0,2841	3,21E-04	1,48E-02	DNARepair

Tabelle A-8: Alle differenziell exprimierten Gene mit FDR<0,05 nach 72h Inkubation von BON Zellen mit 40nM siRNA gegen *FOXM1*

Assoziierte Signalwege: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog

7.14 Anhang 14

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
ABL1	-0,2395	-0,3325	-0,1465	1,48E-03	2,98E-02	RAS, CC
ARID1B	-0,4505	-0,5792	-0,3218	2,39E-04	6,79E-03	
ARID2	-0,6189	-0,8067	-0,4311	3,48E-04	8,99E-03	
AXIN1	-0,2971	-0,3873	-0,2069	3,48E-04	8,99E-03	Wnt
B2M	0,4519	0,2723	0,6316	1,69E-03	3,24E-02	
BAP1	0,3707	0,2377	0,5037	9,41E-04	2,06E-02	
BAX	0,5567	0,3359	0,7775	1,67E-03	3,22E-02	Арор
BCL2	-0,8599	-1,0312	-0,6887	2,38E-05	1,42E-03	РІЗК, Арор
BCL2L1	0,6539	0,5093	0,7984	4,70E-05	2,08E-03	TXmisReg, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
BMP4	1,3851	1,2288	1,5414	5,16E-07	1,45E-04	HH, TGFB
BMP7	-1,1668	-1,4165	-0,9171	3,80E-05	1,83E-03	TGFB
BMPR1B	0,2036	0,1181	0,2891	2,29E-03	4,16E-02	TGFB
BRCA1	1,1323	0,9164	1,3483	1,79E-05	1,13E-03	DNARepair, PI3K
BRIP1	0,7396	0,4862	0,9929	7,19E-04	1,64E-02	DNARepair
CACNA1H	-0,8598	-0,9873	-0,7322	3,32E-06	4,29E-04	МАРК
CACNA2D2	-1,2440	-1,5503	-0,9377	9,41E-05	3,63E-03	МАРК
CAPN2	0,6840	0,4117	0,9563	1,71E-03	3,25E-02	Арор
CASP7	0,9737	0,7899	1,1576	1,67E-05	1,10E-03	Арор
CASP8	0,5531	0,4114	0,6949	1,21E-04	4,31E-03	Арор
CBLC	-0,6842	-0,9446	-0,4238	1,32E-03	2,74E-02	STAT
CCNB1	-1,1543	-1,3297	-0,9790	3,90E-06	4,47E-04	CC
CCND1	0,6829	0,5981	0,7677	9,96E-07	2,14E-04	Wnt, STAT, PI3K, CC
CCND3	0,5754	0,5165	0,6343	2,65E-07	8,57E-05	Wnt, STAT, PI3K, CC
CCNE2	1,1464	1,0530	1,2397	5,43E-08	3,28E-05	РІЗК, СС
CDC25A	1,0172	0,9176	1,1169	1,95E-07	8,57E-05	CC
CDC25B	0,3979	0,2289	0,5668	2,44E-03	4,36E-02	МАРК, СС
CDC6	0,8585	0,7236	0,9934	4,90E-06	5,11E-04	CC
CDC7	0,6874	0,4844	0,8904	2,94E-04	7,92E-03	CC

CDH1	-0,5876	-0,7706	-0,4047	4,06E-04	1,03E-02	
CDK6	-0,6684	-0,7895	-0,5472	1,27E-05	9,36E-04	РІЗК, СС
CHEK2	0,7722	0,4609	1,0835	1,83E-03	3,44E-02	CC
CREB3L1	0,5743	0,4930	0,6556	2,42E-06	3,54E-04	РІЗК
CXXC4	-1,4967	-1,9402	-1,0533	3,00E-04	8,02E-03	Wnt
DDB2	0,8618	0,5764	1,1472	5,88E-04	1,38E-02	DNARepair
DKK1	1,0080	0,7206	1,2955	2,37E-04	6,78E-03	Wnt
DKK4	2,8233	2,1521	3,4945	7,52E-05	3,12E-03	Wnt
DLL3	-1,9196	-2,1588	-1,6804	1,02E-06	2,14E-04	Notch
DNMT1	0,4123	0,3454	0,4793	6,11E-06	5,67E-04	
DNMT3A	-0,4005	-0,5206	-0,2804	3,23E-04	8,53E-03	
DUSP4	0,2428	0,1614	0,3242	6,34E-04	1,46E-02	МАРК
DUSP5	0,7419	0,6466	0,8372	1,25E-06	2,21E-04	МАРК
E2F1	0,4022	0,2287	0,5758	2,66E-03	4,65E-02	CC
E2F5	-0,9909	-1,2442	-0,7376	1,19E-04	4,31E-03	TGFB, CC
EIF4EBP1	-0,6873	-0,8537	-0,5209	8,46E-05	3,38E-03	РІЗК
EPHA2	1,2138	1,0920	1,3356	2,30E-07	8,57E-05	PI3K, RAS
EPOR	-1,1116	-1,4558	-0,7674	3,93E-04	9,99E-03	STAT, PI3K
ERBB2	1,1675	0,7470	1,5881	9,64E-04	2,09E-02	
ETS2	-0,4659	-0,5616	-0,3701	2,93E-05	1,58E-03	RAS
ETV1	-0,6844	-0,8094	-0,5594	1,34E-05	9,61E-04	TXmisReg
EZH2	0,3287	0,2137	0,4438	8,16E-04	1,81E-02	
FANCA	0,3598	0,2859	0,4338	2,92E-05	1,58E-03	DNARepair
FANCG	0,4827	0,2874	0,6780	1,87E-03	3,49E-02	DNARepair
FANCL	0,4575	0,3704	0,5446	1,77E-05	1,13E-03	DNARepair
FAS	1,6881	1,2016	2,1746	2,53E-04	6,99E-03	МАРК, Арор
FEN1	0,2312	0,1316	0,3308	2,64E-03	4,64E-02	DNARepair
FGF11	-0,7101	-0,9554	-0,4648	7,56E-04	1,71E-02	MAPK, PI3K, RAS
FGF12	-1,7999	-1,9833	-1,6166	2,55E-07	8,57E-05	MAPK, PI3K, RAS
FGF14	-1,3050	-1,4807	-1,1293	1,72E-06	2,65E-04	MAPK, PI3K, RAS
FGFR3	1,7571	1,3737	2,1405	4,32E-05	2,00E-03	MAPK, PI3K, RAS
FLNA	0,5120	0,4087	0,6152	2,58E-05	1,47E-03	МАРК
FN1	0,7628	0,5901	0,9355	5,49E-05	2,37E-03	РІЗК

FOSL1	1,0222	0,8128	1,2315	2,85E-05	1,58E-03	Wnt
FOXO4	-0,7870	-1,0098	-0,5642	2,27E-04	6,66E-03	RAS
FUBP1	-0,8550	-0,9964	-0,7137	6,91E-06	6,16E-04	
GADD45B	0,7622	0,4826	1,0418	1,07E-03	2,28E-02	МАРК, СС
GADD45G	-1,8114	-2,1229	-1,4998	8,99E-06	7,09E-04	МАРК, СС
GPC4	-0,7089	-1,0183	-0,3995	2,83E-03	4,86E-02	Wnt
GSK3B	-0,7733	-0,9837	-0,5629	1,77E-04	5,56E-03	Wnt, HH, PI3K, CC
НЗҒЗА	-0,7158	-0,8993	-0,5323	1,22E-04	4,31E-03	TXmisReg
НЗҒЗС	-0,3566	-0,4102	-0,3030	3,65E-06	4,47E-04	TXmisReg
HDAC11	0,5853	0,3482	0,8223	1,88E-03	3,49E-02	ChromMod
HDAC2	-0,7209	-0,8766	-0,5652	4,04E-05	1,89E-03	Notch, ChromMod,
						TXmisReg, CC
HDAC4	-0,9394	-1,1654	-0,7134	8,12E-05	3,28E-03	ChromMod
HDAC5	0,6023	0,3935	0,8111	7,72E-04	1,72E-02	ChromMod
HELLS	0,5446	0,4174	0,6718	6,71E-05	2,82E-03	ChromMod
HHEX	0,6544	0,3988	0,9100	1,53E-03	3,01E-02	TXmisReg
HIST1H3B	-1,7242	-1,9201	-1,5284	5,39E-07	1,45E-04	TXmisReg
HIST1H3G	-1,4937	-1,7425	-1,2450	7,24E-06	6,16E-04	TXmisReg
HIST1H3H	-1,9539	-2,1065	-1,8014	4,07E-08	3,28E-05	TXmisReg
HMGA2	-0,6109	-0,8624	-0,3593	2,06E-03	3,78E-02	TXmisReg
HOXA10	0,6318	0,4170	0,8466	6,87E-04	1,58E-02	TXmisReg
НОХА9	-0,6357	-0,7379	-0,5334	5,73E-06	5,62E-04	TXmisReg
HSP90B1	-0,8634	-1,0825	-0,6444	1,14E-04	4,18E-03	РІЗК
HSPB1	1,1755	1,0081	1,3429	2,52E-06	3,54E-04	МАРК
ID2	-1,3134	-1,5065	-1,1202	3,13E-06	4,22E-04	TXmisReg, TGFB
IDH1	-1,4270	-1,6691	-1,1849	8,20E-06	6,63E-04	
IDH2	-0,5021	-0,7123	-0,2918	2,26E-03	4,13E-02	
IGF1R	-0,4376	-0,5462	-0,3290	9,91E-05	3,76E-03	TXmisReg, PI3K, RAS
IL6R	0,7118	0,5624	0,8611	3,35E-05	1,72E-03	STAT, PI3K
IRAK2	1,1842	0,9577	1,4107	1,82E-05	1,13E-03	Арор
IRS1	1,2156	0,8656	1,5657	2,52E-04	6,99E-03	РІЗК
ITGA2	1,2588	1,0227	1,4948	1,60E-05	1,10E-03	РІЗК
ITGA6	0,8559	0,7168	0,9950	6,14E-06	5,67E-04	РІЗК

ITGB8	1,2120	0,9135	1,5105	9,43E-05	3,63E-03	РІЗК
JAG1	0,3565	0,2195	0,4934	1,40E-03	2,84E-02	Notch
JAK1	0,4835	0,3556	0,6115	1,48E-04	5,05E-03	STAT, PI3K
JAK2	0,9214	0,6261	1,2166	4,83E-04	1,17E-02	STAT, PI3K
KITLG	1,4906	1,3889	1,5923	1,59E-08	2,57E-05	PI3K, RAS
KLF4	0,6571	0,4060	0,9081	1,35E-03	2,79E-02	
LAMA3	2,1865	1,9041	2,4689	1,30E-06	2,21E-04	РІЗК
LAMC2	0,9584	0,8054	1,1115	5,46E-06	5,52E-04	РІЗК
LEPR	-1,2252	-1,6497	-0,8006	7,69E-04	1,72E-02	STAT
LFNG	-0,7844	-0,9502	-0,6186	3,51E-05	1,74E-03	Notch
LIF	1,2900	0,9225	1,6576	2,36E-04	6,78E-03	STAT
LIG4	-0,5277	-0,6861	-0,3694	3,25E-04	8,53E-03	DNARepair
МАР2К2	-0,4550	-0,5634	-0,3467	7,61E-05	3,12E-03	MAPK, PI3K, RAS
МАР2К6	0,7415	0,6115	0,8714	1,02E-05	7,85E-04	МАРК
MAP3K12	1,1307	0,6521	1,6092	2,40E-03	4,30E-02	ChromMod, MAPK
МАРК8	-0,7234	-0,9211	-0,5256	1,82E-04	5,56E-03	Wnt, MAPK, RAS
ΜΑΡΚ8ΙΡ2	-0,2452	-0,3440	-0,1464	1,83E-03	3,44E-02	МАРК
МАРК9	-0,6435	-0,8034	-0,4835	9,99E-05	3,76E-03	Wnt, MAPK, RAS
ΜΑΡΤ	-2,0489	-2,3892	-1,7086	7,11E-06	6,16E-04	МАРК
МСМ2	0,5707	0,3869	0,7546	4,98E-04	1,20E-02	CC
MCM4	0,5500	0,4423	0,6578	2,13E-05	1,30E-03	CC
МСМ5	-0,4959	-0,6892	-0,3026	1,52E-03	3,01E-02	CC
MDM2	0,2948	0,2036	0,3860	3,90E-04	9,99E-03	TXmisReg, PI3K, CC
MET	0,7133	0,5302	0,8964	1,23E-04	4,31E-03	TXmisReg, PI3K, RAS
MLLT3	0,6265	0,4473	0,8058	2,42E-04	6,80E-03	TXmisReg
MSH2	0,3368	0,2656	0,4079	3,50E-05	1,74E-03	
МҮС	0,2738	0,1875	0,3602	4,39E-04	1,08E-02	Wnt, TXmisReg,
						TGFB, MAPK, STAT,
						РІЗК, СС
MYD88	1,2458	1,1524	1,3391	3,06E-08	3,28E-05	Арор
NFKBIA	1,1302	0,7988	1,4617	2,82E-04	7,65E-03	Арор
NFKBIZ	0,6835	0,4039	0,9631	1,99E-03	3,67E-02	TXmisReg
NPM1	-1,0519	-1,3368	-0,7670	1,72E-04	5,56E-03	

NPM2	-1,1819	-1,6432	-0,7205	1,53E-03	3,01E-02	ChromMod
NR4A3	1,3254	0,8943	1,7565	5,29E-04	1,27E-02	TXmisReg
PBX1	-0,4235	-0,5883	-0,2586	1,50E-03	3,00E-02	TXmisReg
PCNA	0,3966	0,2266	0,5667	2,57E-03	4,57E-02	DNARepair, CC
PDGFD	-1,0379	-1,3183	-0,7574	1,69E-04	5,56E-03	PI3K, RAS
PIK3R3	0,5186	0,3552	0,6820	4,36E-04	1,08E-02	STAT, PI3K, RAS, Apop
ΡΚΜΥΤ1	0,9078	0,7076	1,1080	4,63E-05	2,08E-03	CC
PLAU	2,5636	2,2360	2,8912	1,21E-06	2,21E-04	TXmisReg
PLCB1	-1,0550	-1,3453	-0,7648	1,90E-04	5,72E-03	Wnt
PLD1	0,9970	0,7247	1,2693	1,81E-04	5,56E-03	RAS
PML	1,5896	1,4581	1,7212	6,09E-08	3,28E-05	TXmisReg
POLD4	0,5005	0,3554	0,6456	2,62E-04	7,18E-03	DNARepair
POLR2D	-0,2755	-0,3814	-0,1697	1,40E-03	2,84E-02	DNARepair
POLR2H	-0,3749	-0,4921	-0,2578	4,16E-04	1,04E-02	DNARepair
POLR2J	0,4640	0,3111	0,6169	5,71E-04	1,35E-02	DNARepair
PPP2R1A	-0,6420	-0,7785	-0,5054	3,66E-05	1,79E-03	TGFB, PI3K
PPP2R2C	-1,7933	-2,5655	-1,0211	2,63E-03	4,64E-02	РІЗК
РРРЗСВ	-0,8671	-1,0931	-0,6412	1,35E-04	4,69E-03	Wnt, MAPK, Apop
PRKAR2A	-0,7190	-0,8940	-0,5440	8,75E-05	3,45E-03	Арор
РТСН1	-0,4611	-0,6560	-0,2661	2,38E-03	4,30E-02	HH
PTEN	0,2176	0,1480	0,2872	4,79E-04	1,17E-02	РІЗК
PTPN11	-0,5020	-0,6340	-0,3700	1,43E-04	4,91E-03	STAT, RAS
RAD21	-0,5206	-0,6391	-0,4020	5,70E-05	2,42E-03	CC
RAD50	0,4268	0,2693	0,5843	1,11E-03	2,35E-02	DNARepair
RAD51	0,4283	0,2585	0,5981	1,67E-03	3,22E-02	DNARepair
RASA4	1,3517	0,9919	1,7114	1,54E-04	5,13E-03	RAS
RFC3	0,5768	0,4124	0,7411	2,36E-04	6,78E-03	DNARepair
RFC4	0,8718	0,7078	1,0358	1,63E-05	1,10E-03	DNARepair
RPS27A	-0,8118	-0,9343	-0,6892	3,74E-06	4,47E-04	DNARepair
RUNX1	1,1957	0,8663	1,5250	1,91E-04	5,72E-03	TXmisReg
RXRG	1,1004	0,8020	1,3987	1,73E-04	5,56E-03	TXmisReg
SHC1	0,4167	0,3237	0,5096	4,98E-05	2,18E-03	RAS
SHC2	-0,8059	-1,1551	-0,4567	2,72E-03	4,73E-02	RAS

SHC4	2,9208	2,5330	3,3086	1,57E-06	2,53E-04	RAS
SKP1	-0,2513	-0,3421	-0,1605	9,82E-04	2,12E-02	Wnt, TGFB, CC
SMAD3	0,9388	0,7927	1,0848	4,58E-06	4,94E-04	Wnt, TGFB, CC
SMARCA4	-0,4591	-0,5541	-0,3642	3,04E-05	1,61E-03	
SMC3	0,2699	0,2138	0,3260	3,14E-05	1,64E-03	CC
SOCS1	1,5337	1,2527	1,8146	1,37E-05	9,61E-04	STAT
SOS1	-0,5229	-0,7124	-0,3334	1,00E-03	2,14E-02	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS
SOX9	0,5243	0,3216	0,7270	1,45E-03	2,92E-02	
SPRY2	-0,5334	-0,6793	-0,3876	1,82E-04	5,56E-03	STAT
SPRY4	-1,1613	-1,3383	-0,9842	4,01E-06	4,47E-04	STAT
SRSF2	-0,3791	-0,5435	-0,2146	2,74E-03	4,74E-02	
STAT1	3,7731	3,5874	3,9587	1,64E-09	5,29E-06	STAT
<i>SYK</i>	-0,1944	-0,2582	-0,1305	5,60E-04	1,33E-02	РІЗК
TBL1XR1	-0,4881	-0,6116	-0,3647	1,11E-04	4,14E-03	Wnt
TET2	-0,2955	-0,4070	-0,1840	1,26E-03	2,64E-02	
TGFB1	0,4786	0,3517	0,6055	1,50E-04	5,07E-03	TGFB, MAPK, CC
TGFB3	-0,7408	-0,8664	-0,6152	8,18E-06	6,63E-04	TGFB, MAPK, CC
TGFBR2	1,0348	0,9086	1,1609	8,76E-07	2,14E-04	TXmisReg, TGFB,
						МАРК
THBS1	0,8823	0,7246	1,0401	1,16E-05	8,73E-04	TGFB, PI3K
TIAM1	-0,6138	-0,7839	-0,4437	1,98E-04	5,89E-03	RAS
TLX1	1,4134	1,0286	1,7982	1,77E-04	5,56E-03	TXmisReg
TMPRSS2	2,0203	1,3462	2,6945	6,16E-04	1,43E-02	TXmisReg
TNFAIP3	1,7579	1,0656	2,4502	1,61E-03	3,13E-02	
TNFRSF10B	1,0985	0,8582	1,3389	4,40E-05	2,00E-03	Арор
TNFRSF10D	-0,6625	-0,8427	-0,4823	1,76E-04	5,56E-03	Арор
TNFSF10	1,9657	1,7193	2,2120	1,06E-06	2,14E-04	Арор
UBE2T	0,4301	0,3434	0,5169	2,58E-05	1,47E-03	DNARepair
WEE1	0,7229	0,5679	0,8779	3,85E-05	1,83E-03	CC
WNT3	0,9383	0,6018	1,2748	9,40E-04	2,06E-02	Wnt, HH
WNT7B	2,5004	1,5510	3,4497	1,31E-03	2,73E-02	Wnt, HH
XRCC4	-0,4042	-0,4858	-0,3227	2,59E-05	1,47E-03	DNARepair

Tabelle A-9: Alle differenziell exprimierten Gene mit FDR<0,05 nach 24h Inkubation von BON Zellen mit 40nM siRNA gegen *FOXM1* und und anschließender 48h Inkubation mit 5μM Cisplatin

Assoziierte Signalwege: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog

7.15 Anhang 15

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
AKT1	0,1592	0,1110	0,2074	3,43E-04	1,71E-02	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS, Apop
ARID1B	-0,4099	-0,5386	-0,2812	4,27E-04	1,94E-02	
BAX	0,6153	0,3945	0,8361	9,44E-04	3,28E-02	Арор
BMP4	1,0217	0,8654	1,1780	4,09E-06	1,20E-03	HH, TGFB
BMP7	-0,6754	-0,9251	-0,4258	1,12E-03	3,73E-02	TGFB
BMP8A	1,0277	0,6759	1,3794	7,15E-04	2,83E-02	TGFB
BRCA1	0,9228	0,7068	1,1388	6,80E-05	6,11E-03	DNARepair, PI3K
C19orf40	0,7812	0,5025	1,0598	9,12E-04	3,24E-02	DNARepair
CACNA1H	-0,6698	-0,7973	-0,5423	1,77E-05	2,48E-03	МАРК
CACNA2D1	-0,6204	-0,7752	-0,4656	1,02E-04	8,08E-03	МАРК
CAPN2	1,0273	0,7550	1,2995	1,50E-04	1,00E-02	Арор
CCNA2	0,3966	0,2600	0,5331	7,40E-04	2,85E-02	CC
CCND1	0,7330	0,6481	0,8178	6,14E-07	3,54E-04	Wnt, STAT, PI3K, CC
CCND3	0,4751	0,4162	0,5341	9,85E-07	3,54E-04	Wnt, STAT, PI3K, CC
CCNE1	0,8043	0,6699	0,9388	7,43E-06	1,55E-03	РІЗК, СС
CCNE2	0,8394	0,7461	0,9328	4,66E-07	3,54E-04	РІЗК, СС
CDC25A	1,0141	0,9145	1,1138	1,99E-07	2,15E-04	CC
CDC25B	0,8720	0,7031	1,0410	1,98E-05	2,67E-03	МАРК, СС
CDC6	0,6078	0,4729	0,7427	4,82E-05	5,20E-03	CC
CDC7	0,5976	0,3946	0,8006	6,84E-04	2,82E-02	CC
CDKN1A	1,2809	1,0304	1,5314	2,11E-05	2,73E-03	TXmisReg, PI3K, CC
CHEK1	0,3152	0,1958	0,4346	1,29E-03	4,08E-02	CC
CREB3L1	0,2921	0,2108	0,3734	2,04E-04	1,19E-02	РІЗК
DDB2	0,9342	0,6488	1,2196	3,62E-04	1,75E-02	DNARepair
DDIT4	-1,0098	-1,2406	-0,7789	5,84E-05	5,73E-03	РІЗК
DKK4	2,0202	1,3490	2,6914	6,00E-04	2,55E-02	Wnt
DLL3	-1,3229	-1,5621	-1,0837	1,25E-05	1,93E-03	Notch
DNMT1	0,2418	0,1748	0,3087	1,97E-04	1,19E-02	

	-0 7028	-0 8660	-0 5396	6 47E-05	5 98F-03	TYmisReg MAPK
5251	-0,7020	-0,8000	0,3330	2,025,04	1 105 02	
E2F1	0,6239	0,4503	0,7974	2,03E-04	1,19E-02	
EIF4EBP1	-0,5327	-0,6991	-0,3662	4,15E-04	1,92E-02	РІЗК
EPHA2	0,3136	0,1918	0,4354	1,48E-03	4,51E-02	PI3K, RAS
ETV1	-0,7585	-0,8835	-0,6335	6,75E-06	1,55E-03	TXmisReg
FANCA	0,2501	0,1761	0,3241	2,97E-04	1,50E-02	DNARepair
FANCL	0,2474	0,1603	0,3345	8,45E-04	3,05E-02	DNARepair
FGF12	-1,0784	-1,2618	-0,8951	8,32E-06	1,58E-03	MAPK, PI3K, RAS
FGF14	-1,0864	-1,2621	-0,9107	5,95E-06	1,55E-03	MAPK, PI3K, RAS
FGFR3	1,4589	1,0755	1,8424	1,42E-04	1,00E-02	MAPK, PI3K, RAS
FOXO4	-0,6152	-0,8380	-0,3924	9,97E-04	3,42E-02	RAS
FUBP1	-0,8142	-0,9556	-0,6728	9,58E-06	1,63E-03	
GADD45A	-0,3105	-0,4052	-0,2158	3,58E-04	1,75E-02	МАРК, СС
GADD45G	-1,2704	-1,5820	-0,9589	9,17E-05	7,41E-03	МАРК, СС
GSK3B	-0,5865	-0,7969	-0,3761	9,42E-04	3,28E-02	Wnt, HH, PI3K, CC
НЗF3C	-0,4389	-0,4925	-0,3853	8,89E-07	3,54E-04	TXmisReg
HDAC2	-0,4052	-0,5609	-0,2495	1,40E-03	4,33E-02	Notch, ChromMod,
						TXmisReg, CC
HDAC4	-0,7735	-0,9995	-0,5475	2,76E-04	1,41E-02	ChromMod
HIST1H3B	-1,1655	-1,3614	-0,9697	7,69E-06	1,55E-03	TXmisReg
HIST1H3G	-1,2400	-1,4887	-0,9913	2,49E-05	3,10E-03	TXmisReg
HIST1H3H	-1,9009	-2,0535	-1,7484	4,92E-08	7,95E-05	TXmisReg
НОХА9	-0,4811	-0,5833	-0,3789	3,64E-05	4,06E-03	TXmisReg
HSP90B1	-0,6039	-0,8230	-0,3848	1,01E-03	3,42E-02	РІЗК
HSPA1A	-0,5689	-0,7460	-0,3918	4,05E-04	1,90E-02	МАРК
HSPB1	1,3595	1,1921	1,5269	9,36E-07	3,54E-04	МАРК
ID2	-0,9201	-1,1132	-0,7269	3,36E-05	4,02E-03	TXmisReg, TGFB
IDH1	-1,0699	-1,3120	-0,8279	5,47E-05	5,52E-03	
IGF1R	-0,4816	-0,5902	-0,3730	5,36E-05	5,52E-03	TXmisReg, PI3K,
						RAS
IL6R	0,4308	0,2814	0,5801	7,72E-04	2,89E-02	STAT, PI3K
IL8	-0,7061	-0,9778	-0,4345	1,41E-03	4,33E-02	TXmisReg
IRΔK2	0.8309	0,6045	1,0574	1,79E-04	1,13E-02	Арор

KITLG	1,2915	1,1898	1,3931	4,30E-08	7,95E-05	PI3K, RAS
LAMA3	0,7255	0,4431	1,0079	1,51E-03	4,51E-02	РІЗК
LEPR	-1,2049	-1,6294	-0,7804	8,48E-04	3,05E-02	STAT
LFNG	-0,4721	-0,6378	-0,3063	8,32E-04	3,05E-02	Notch
LTBP1	-1,8233	-2,1376	-1,5090	9,13E-06	1,63E-03	TGFB
МАР2К2	-0,3148	-0,4232	-0,2064	7,42E-04	2,85E-02	MAPK, PI3K, RAS
МАРЗК5	-0,5286	-0,7120	-0,3451	7,77E-04	2,89E-02	МАРК
ΜΑΡΤ	-2,0395	-2,3798	-1,6992	7,33E-06	1,55E-03	МАРК
МСМ2	0,6943	0,5105	0,8781	1,49E-04	1,00E-02	CC
МСМ4	0,5080	0,4003	0,6157	3,59E-05	4,06E-03	СС
MET	0,5719	0,3888	0,7550	4,81E-04	2,16E-02	TXmisReg, PI3K,
						RAS
MSH2	0,2289	0,1577	0,3000	4,02E-04	1,90E-02	
NF1	-0,4628	-0,6443	-0,2812	1,57E-03	4,66E-02	MAPK, RAS
NFKB1	-0,4512	-0,6187	-0,2837	1,15E-03	3,76E-02	TXmisReg, MAPK,
						PI3K, RAS, Apop
NR4A1	1,2066	0,8147	1,5985	5,24E-04	2,32E-02	МАРК, РІЗК
NR4A3	1,5556	1,1245	1,9867	1,98E-04	1,19E-02	TXmisReg
PBX1	-0,4838	-0,6486	-0,3189	6,97E-04	2,82E-02	TXmisReg
PDGFD	-1,1503	-1,4307	-0,8699	8,83E-05	7,32E-03	PI3K, RAS
PKMYT1	0,7709	0,5707	0,9711	1,32E-04	9,70E-03	СС
PLCB1	-1,2201	-1,5103	-0,9298	7,55E-05	6,46E-03	Wnt
POLR2J	0,5349	0,3820	0,6878	2,40E-04	1,29E-02	DNARepair
PPP2R1A	-0,3634	-0,5000	-0,2269	1,23E-03	3,94E-02	TGFB, PI3K
РРРЗСВ	-0,9788	-1,2048	-0,7528	6,23E-05	5,92E-03	Wnt, MAPK, Apop
PRKAA2	-0,3478	-0,4616	-0,2341	5,46E-04	2,38E-02	РІЗК
RAD51	0,5991	0,4293	0,7688	2,28E-04	1,25E-02	DNARepair
RASA4	1,4094	1,0497	1,7692	1,18E-04	8,89E-03	RAS
RASGRP1	-0,7698	-0,9705	-0,5691	1,35E-04	9,73E-03	MAPK, RAS
RFC3	0,5875	0,4231	0,7518	2,10E-04	1,19E-02	DNARepair
RFC4	0,6136	0,4496	0,7776	1,58E-04	1,02E-02	DNARepair
RPS27A	-0,4864	-0,6090	-0,3639	1,09E-04	8,38E-03	DNARepair
RUNX1	0,8867	0,5573	1,2161	1,15E-03	3,76E-02	TXmisReg

SF3B1	-0,2536	-0,3543	-0,1528	1,69E-03	4,96E-02	
SMAD3	0 5154	0 3693	0 6614	2 28F-04	1 25E-02	Wht TGEB CC
	0,3131	0,0000	0,0011	2,202 01	1,232 02	
SMARCA4	-0,3987	-0,4936	-0,3038	7,59E-05	6,46E-03	
SOCS1	0,9707	0,6897	1,2516	2,60E-04	1,38E-02	STAT
SOX9	0,5448	0,3422	0,7475	1,16E-03	3,76E-02	
SPRY1	-0,3618	-0,4857	-0,2379	7,18E-04	2,83E-02	STAT
SPRY2	-0,4364	-0,5823	-0,2906	6,21E-04	2,61E-02	STAT
SPRY4	-1,1968	-1,3739	-1,0197	3,27E-06	1,06E-03	STAT
TBL1XR1	-0,3621	-0,4855	-0,2387	6,98E-04	2,82E-02	Wnt
TET2	-0,3828	-0,4943	-0,2713	2,70E-04	1,41E-02	
TGFB1	0,3874	0,2605	0,5143	5,51E-04	2,38E-02	ТGFB, МАРК, СС
TGFB3	-0,7009	-0,8266	-0,5753	1,18E-05	1,91E-03	TGFB, MAPK, CC
THBS1	0,4052	0,2475	0,5629	1,50E-03	4,51E-02	TGFB, PI3K
TIAM1	-0,6087	-0,7788	-0,4386	2,09E-04	1,19E-02	RAS
TMPRSS2	1,8357	1,1615	2,5098	1,08E-03	3,63E-02	TXmisReg
UBE2T	0,4677	0,3810	0,5545	1,48E-05	2,18E-03	DNARepair
VEGFA	-0,2464	-0,3318	-0,1610	7,71E-04	2,89E-02	PI3K, RAS
WNT3	1,2666	0,9301	1,6031	1,52E-04	1,00E-02	Wnt, HH
WNT4	0,7650	0,4745	1,0555	1,31E-03	4,10E-02	Wnt, HH
XRCC4	-0,6928	-0,7743	-0,6112	6,89E-07	3,54E-04	DNARepair

Tabelle A-10: Alle differenziell exprimierten Gene mit FDR<0,05 nach 24h Inkubation von BON Zellen mit 40nM Kontroll siRNA und und anschließender 48h Inkubation mit 5μM Cisplatin

Assoziierte Signalwege: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog

7.16 Anhang 16



Abbildung A-6: Ergebnisse eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse des Zellzyklus von 5µM Nutlin-3 versus DMSO über 96h

A-E: GEP-NEN Zelllinien wurden über 96 h mit 5 μ M Nutlin-3 inkubiert und mittels Mitoseindex-Durchflusszytometrie analysiert. Bei BON (A), LCC-18 (B) und QGP-1 (C) Zellen konnten keine Veränderungen in den Zellzyklusphasen dargestellt werden. D) In KRJ-I Zellen zeigten sich eine Zunahme der Sub-G1 Zellpopulation und eine deutlich Abnahme der Mitosen. Zudem zeigte die um die Sub G1 Population bereinigte Darstellung, dass die Größe der S Phase Population leicht abnahm (E).



Abbildung A-7: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse des Zellzyklus von 5µM Nutlin-3a.

A) BON, B) QGP-1, C) KRJ-1 und D) LCC-18 Zellen wurden über 72h mit Nutlin-3a versus DMSO versus DMSO behandelt und mittels Mitose-Index-Durchflusszytometrie analysiert.

7.17 Anhang 17



Abbildung A-8: Repräsentative Rohdaten eines Experimentes zur Durchflusszytometrie-Analyse der Apoptoseinduktion (JC-1) von 5 µM Nutlin-3a und Kombination mit Cisplatin versus DMSO

7.18 Anhang 18

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
NR4A3	-1,46	-1,9075	-1,0193	0,0075	0,8267	TXmisReg
CDKN1C	-1,39	-1,6227	-1,1478	0,0014	0,8000	CC
PLA2G4A	-1,12	-1,4496	-0,7859	0,0071	0,8267	MAPK, RAS
DDIT4	-1,10	-1,3900	-0,8103	0,0050	0,8267	РІЗК
BNIP3	-0,98	-1,2741	-0,6942	0,0069	0,8267	ChromMod
VEGFA	-0,93	-1,1191	-0,7473	0,0022	0,8000	PI3K, RAS
IDH2	-0,69	-0,8576	-0,5239	0,0039	0,8000	
ITGB7	-0,69	-0,8960	-0,4783	0,0076	0,8267	TXmisReg, PI3K
DDIT3	-0,63	-0,7455	-0,5133	0,0018	0,8000	TXmisReg, MAPK
COL24A1	-0,62	-0,8896	-0,3417	0,0217	1,0000	РІЗК
DDB2	-0,60	-0,6970	-0,4953	0,0014	0,8000	DNA Reparatur
GADD45A	-0,57	-0,8398	-0,3025	0,0252	1,0000	МАРК, СС
PTEN	-0,52	-0,6926	-0,3464	0,0098	0,8691	РІЗК
E2F5	-0,52	-0,6287	-0,4082	0,0027	0,8000	TGFB, CC
PTTG2	-0,50	-0,6525	-0,3521	0,0072	0,8267	CC
ERCC2	-0,47	-0,7394	-0,1907	0,0450	1,0000	DNA Reparatur
PLCG2	-0,44	-0,5739	-0,2997	0,0083	0,8408	RAS
CASP3	-0,43	-0,6378	-0,2139	0,0292	1,0000	МАРК, Арор
TNFSF10	-0,40	-0,5415	-0,2623	0,0110	0,8691	Арор
SYK	-0,38	-0,6100	-0,1509	0,0476	1,0000	РІЗК
GSK3B	-0,38	-0,4912	-0,2623	0,0075	0,8267	Wnt, HH, PI3K, CC
UBE2T	-0,38	-0,5997	-0,1518	0,0461	1,0000	DNA Reparatur
CDKN1A	-0,36	-0,4633	-0,2530	0,0068	0,8267	TXmisReg, PI3K, CC
IDH1	-0,33	-0,4700	-0,1942	0,0180	1,0000	
PIK3R3	-0,32	-0,4519	-0,1919	0,0167	1,0000	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
BRIP1	-0,29	-0,4674	-0,1179	0,0464	1,0000	DNA Reparatur
PHF6	-0,28	-0,3911	-0,1664	0,0166	1,0000	
HSP90B1	-0,27	-0,3471	-0,2013	0,0052	0,8267	РІЗК

GRB2	-0,27	-0,4086	-0,1215	0,0363	1,0000	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS
RHOA	-0,24	-0,3707	-0,1024	0,0408	1,0000	Wnt, TGFB, RAS
SMARCB1	-0,22	-0,3098	-0,1306	0,0171	1,0000	
B2M	-0,21	-0,2963	-0,1256	0,0168	1,0000	
MCM4	-0,21	-0,2992	-0,1178	0,0204	1,0000	CC
PTPN11	-0,20	-0,2828	-0,1264	0,0144	1,0000	STAT, RAS
H3F3C	-0,20	-0,2496	-0,1423	0,0056	0,8267	TXmisReg
RAD21	-0,19	-0,2539	-0,1234	0,0109	0,8691	СС
STAT3	-0,18	-0,2492	-0,1115	0,0143	1,0000	STAT
TCF3	-0,17	-0,2424	-0,0942	0,0211	1,0000	TXmisReg
RB1	-0,15	-0,1875	-0,1052	0,0061	0,8267	CC
DAXX	-0,13	-0,1620	-0,0918	0,0058	0,8267	МАРК
RBX1	-0,12	-0,1935	-0,0508	0,0439	1,0000	Wnt, TGFB, CC
UBB	0,15	0,1141	0,1865	0,0039	0,8000	DNA Reparatur
WHSC1L1	0,16	0,0663	0,2619	0,0461	1,0000	ChromMod
КМТ2С	0,17	0,0658	0,2709	0,0486	1,0000	
RASGRP1	0,19	0,1257	0,2505	0,0097	0,8691	MAPK, RAS
МСМ7	0,22	0,1491	0,2908	0,0089	0,8691	CC
MEN1	0,24	0,1825	0,2895	0,0033	0,8000	TXmisReg
МАРЗК5	0,26	0,1047	0,4109	0,0457	1,0000	МАРК
DUSP10	0,27	0,1653	0,3663	0,0139	1,0000	МАРК
МАРЗК1	0,28	0,1375	0,4279	0,0317	1,0000	МАРК
IL2RB	0,29	0,1289	0,4570	0,0395	1,0000	TXmisReg, STAT, PI3K
PIK3CD	0,29	0,1791	0,4084	0,0152	1,0000	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
BAD	0,31	0,1473	0,4651	0,0325	1,0000	PI3K, RAS, Apop
SMAD2	0,36	0,2718	0,4456	0,0039	0,8000	TGFB, CC
SOX9	0,39	0,2317	0,5391	0,0161	1,0000	
FZD3	0,41	0,2155	0,6094	0,0262	1,0000	Wnt
ТР53	0,45	0,3565	0,5342	0,0022	0,8000	Wnt, TXmisReg,
						МАРК, РІЗК, Арор,
						CC

PRKAR1B	0,45	0,1820	0,7232	0,0465	1,0000	Арор
МҮС	0,46	0,2499	0,6711	0,0233	1,0000	Wnt, TXmisReg,
						TGFB, MAPK, STAT,
						РІЗК, СС
MED12	0,54	0,4137	0,6639	0,0035	0,8000	
NOTCH1	0,55	0,2370	0,8544	0,0405	1,0000	Notch
NTRK2	0,55	0,3069	0,7876	0,0210	1,0000	МАРК
ITGA2	0,57	0,3474	0,7956	0,0154	1,0000	РІЗК
JAK3	0,58	0,2931	0,8646	0,0286	1,0000	STAT, PI3K
CD19	0,59	0,3867	0,7879	0,0105	0,8691	РІЗК
FLT1	0,59	0,3427	0,8382	0,0185	1,0000	TXmisReg, PI3K, RAS
DTX4	0,60	0,4764	0,7170	0,0023	0,8000	Notch
PLA2G4C	0,70	0,4627	0,9317	0,0101	0,8691	MAPK, RAS
CREB5	0,70	0,5471	0,8507	0,0029	0,8000	РІЗК
DUSP5	0,71	0,6509	0,7612	0,0001	0,3938	МАРК
ΑΤΜ	0,73	0,3426	1,1099	0,0340	1,0000	TXmisReg, DNA
						Reparatur, Apop, CC
ITGB3	0,75	0,5172	0,9821	0,0080	0,8408	РІЗК
МИТҮН	0,81	0,5347	1,0777	0,0101	0,8691	DNA Reparatur
ITGB8	0,88	0,5488	1,2024	0,0134	1,0000	РІЗК
CDH1	1,34	0,7421	1,9468	0,0221	1,0000	

Tabelle A-11: Alle 75 differenziell exprimierten Gene mit *p*<0,05 nach 60h Inkubation von KRJ-I Zellen mit 100nM Everolimus und assoziierte Signalwege

Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen HH=Hedgehog; Fett gedruckte Gene markieren eine differenzielle Expression mit einer FDR<0.05.

7.19 Anhang 19

	Log2	Oberes	Unteres			
	fold	Konfidenz-	Konfidenz-			
Gensymbol	change	limit	limit	P-Wert	FDR	Signalwege
AKT1	-0,4386	-0,4904	-0,3867	0,0005	0,0591	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS, Apop
ALKBH3	0,4885	0,1900	0,7870	0,0491	0,6614	DNARepair
APC	0,8264	0,4818	1,1710	0,0182	0,3382	Wnt
ASXL1	-0,6098	-0,8229	-0,3968	0,0112	0,2673	
AXIN2	0,8269	0,5524	1,1014	0,0097	0,2440	Wnt
B2M	-0,1561	-0,2415	-0,0708	0,0371	0,5456	
BAD	0,4026	0,2436	0,5615	0,0157	0,3054	PI3K, RAS, Apop
BAX	1,0046	0,8564	1,1529	0,0009	0,0685	Арор
BCL2L1	1,1952	0,9662	1,4243	0,0020	0,0922	TXmisReg, STAT,
						PI3K, RAS, Apop
BCOR	0,3679	0,1474	0,5885	0,0468	0,6474	
BID	0,6373	0,3382	0,9364	0,0250	0,4156	Арор
BIRC3	0,8401	0,4640	1,2163	0,0221	0,3867	TXmisReg, Apop
BNIP3	-1,2712	-1,5611	-0,9813	0,0033	0,1324	ChromMod
BRAF	0,3687	0,1917	0,5456	0,0265	0,4267	МАРК
BRCA1	-1,7092	-2,1560	-1,2624	0,0049	0,1607	DNARepair, PI3K
BRCA2	-0,9503	-1,1904	-0,7102	0,0045	0,1525	DNARepair
BRIP1	-1,6630	-1,8377	-1,4882	0,0003	0,0503	DNARepair
CACNA1E	1,9904	1,0666	2,9142	0,0243	0,4155	МАРК
CACNB4	-1,3143	-1,8190	-0,8096	0,0145	0,2982	МАРК
CACNG4	1,6427	0,8991	2,3862	0,0227	0,3916	МАРК
CAPN2	0,3810	0,1725	0,5896	0,0373	0,5456	Арор
CASP3	-0,6667	-0,8787	-0,4547	0,0086	0,2255	МАРК, Арор
CASP7	-0,7785	-1,0776	-0,4795	0,0146	0,2982	Арор
CCNA2	-3,6616	-4,2263	-3,0969	0,0011	0,0685	CC
CCNB1	-2,3463	-2,7253	-1,9673	0,0012	0,0713	CC
CCND1	1,6566	1,0564	2,2568	0,0124	0,2851	Wnt, STAT, PI3K, CC
CCND2	0,8239	0,6939	0,9539	0,0011	0,0685	Wnt, TXmisReg,
						STAT, PI3K, CC
CCR7	1,7445	1,4837	2,0054	0,0010	0,0685	TXmisReg
CD40	0,6256	0,4513	0,7999	0,0059	0,1750	TXmisReg
CDC25A	-1,4396	-2,0670	-0,8121	0,0205	0,3645	CC
CDC25B	-2,0833	-2,8909	-1,2758	0,0149	0,2982	МАРК, СС
CDC6	-3,1697	-3,6108	-2,7285	0,0008	0,0685	CC
CDC7	-1,4822	-2,0538	-0,9105	0,0147	0,2982	CC
CDH1	1,5857	0,9833	2,1880	0,0141	0,2982	
CDK2	-1,2704	-1,4550	-1,0857	0,0009	0,0685	РІЗК, СС

CDKN1A	1,7423	1,6371	1,8474	0,0001	0,0391	TXmisReg, PI3K, CC
CDKN1B	-0,8000	-1,1427	-0,4573	0,0196	0,3564	TXmisReg, PI3K, CC
CDKN1C	0,5047	0,2673	0,7421	0,0252	0,4156	CC
CDKN2C	-1,6677	-2,1624	-1,1730	0,0071	0,2005	TXmisReg, CC
CHEK1	-2,0593	-2,2012	-1,9175	0,0001	0,0391	CC
CHEK2	0,5316	0,3010	0,7623	0,0203	0,3621	CC
COL24A1	-1,3459	-1,6198	-1,0719	0,0024	0,1039	PI3K
CREB3L1	1,5726	1,2449	1,9004	0,0025	0,1096	PI3K
CREB5	0,4762	0,3244	0,6279	0,0087	0,2255	PI3K
CUL1	-0,3097	-0,4245	-0,1949	0,0132	0,2939	Wnt, TGFB, CC
CYLD	0,4211	0,1933	0,6489	0,0362	0,5408	
DDB2	0,2055	0,1046	0,3063	0,0281	0,4368	DNARepair
DDIT3	-0,2964	-0,4125	-0,1803	0,0154	0,3008	TXmisReg, MAPK
DDIT4	0,8607	0,5709	1,1506	0,0101	0,2517	PI3K
DNMT1	-1,2923	-1,5421	-1,0424	0,0020	0,0922	
DTX1	0,7181	0,3142	1,1219	0,0399	0,5633	Notch
DTX4	1,5603	1,4400	1,6806	0,0001	0,0391	Notch
DUSP10	0,4518	0,3513	0,5523	0,0031	0,1268	МАРК
DUSP4	1,0218	0,8700	1,1736	0,0009	0,0685	МАРК
DUSP5	0,5536	0,4985	0,6088	0,0003	0,0479	МАРК
E2F1	-1,7407	-2,2203	-1,2611	0,0057	0,1740	CC
E2F5	-0,8387	-0,9489	-0,7284	0,0007	0,0657	TGFB, CC
EFNA1	0,9779	0,5183	1,4375	0,0251	0,4156	PI3K, RAS
EIF4EBP1	-1,6574	-2,2365	-1,0783	0,0112	0,2673	РІЗК
EZH2	-0,5289	-0,6531	-0,4046	0,0036	0,1335	
FANCB	-0,9628	-1,5452	-0,3804	0,0478	0,6534	DNARepair
FANCG	-1,3056	-1,7467	-0,8646	0,0102	0,2517	DNARepair
FANCL	-0,6569	-0,9657	-0,3481	0,0251	0,4156	DNARepair
FAS	0,7583	0,6479	0,8688	0,0009	0,0685	МАРК, Арор
FEN1	-2,1538	-2,4132	-1,8944	0,0005	0,0591	DNARepair
FGFR1	-0,4175	-0,5763	-0,2587	0,0142	0,2982	MAPK, PI3K, RAS
FLNA	0,9232	0,5663	1,2802	0,0148	0,2982	МАРК
FLT1	-0,9140	-1,1618	-0,6663	0,0055	0,1722	TXmisReg, PI3K, RAS
FOSL1	1,7109	1,1959	2,2259	0,0074	0,2070	Wnt
FUBP1	-0,2383	-0,3337	-0,1428	0,0163	0,3136	
GADD45A	1,3941	1,1254	1,6627	0,0020	0,0922	МАРК, СС
GLI3	0,4801	0,2480	0,7122	0,0270	0,4268	HH
GNAS	-0,6750	-0,7958	-0,5541	0,0016	0,0843	
GSK3B	0,6536	0,5392	0,7681	0,0015	0,0804	Wnt, HH, PI3K, CC
H2AFX	-1,3830	-1,8288	-0,9372	0,0089	0,2307	DNARepair
H3F3A	-0,9465	-1,1700	-0,7229	0,0037	0,1335	TXmisReg
НЗГЗС	0,1468	0,0931	0,2004	0,0127	0,2862	TXmisReg
HDAC10	-0,1793	-0,2539	-0,1047	0,0181	0,3382	ChromMod

HDAC2	-0,3511	-0,4647	-0,2376	0,0090	0,2307	Notch, ChromMod,
						TXmisReg, CC
HDAC5	-0,3459	-0,4954	-0,1963	0,0201	0,3615	ChromMod
HELLS	-1,2358	-1,3317	-1,1399	0,0001	0,0391	ChromMod
HES1	0,8010	0,4253	1,1766	0,0250	0,4156	Notch
HIST1H3B	-5,3962	-5,7708	-5,0216	0,0001	0,0391	TXmisReg
HIST1H3G	-5,3998	-5,9553	-4,8443	0,0003	0,0498	TXmisReg
HIST1H3H	-3,6493	-3,9747	-3,3240	0,0002	0,0421	TXmisReg
HMGA1	-0,3055	-0,3327	-0,2784	0,0002	0,0421	ChromMod
HMGA2	1,2904	0,9344	1,6464	0,0057	0,1740	TXmisReg
HOXA10	1,0418	0,4598	1,6238	0,0392	0,5574	TXmisReg
НОХА9	0,8945	0,5221	1,2668	0,0181	0,3382	TXmisReg
HRAS	1,2870	1,1403	1,4338	0,0004	0,0554	MAPK, PI3K, RAS
HSP90B1	-0,4659	-0,5388	-0,3930	0,0011	0,0685	PI3K
HSPA1A	1,2036	0,9495	1,4577	0,0026	0,1121	МАРК
IDH2	-0,9901	-1,1569	-0,8233	0,0014	0,0744	
IFNG	1,6620	1,1763	2,1477	0,0068	0,1960	TGFB, STAT
IGF1	0,8620	0,3960	1,3281	0,0361	0,5408	TXmisReg, PI3K, RAS
IL13	2,1414	1,5103	2,7726	0,0069	0,1989	STAT
IL1R2	1,2786	0,7499	1,8073	0,0178	0,3373	TXmisReg, MAPK
IL3RA	0,8107	0,4840	1,1375	0,0166	0,3165	STAT, PI3K, Арор
IRAK2	0,7850	0,3620	1,2080	0,0358	0,5408	Арор
ITGA2	0,9782	0,7541	1,2023	0,0034	0,1324	РІЗК
ITGA3	1,8409	1,3324	2,3494	0,0058	0,1740	РІЗК
ITGB3	0,7327	0,5003	0,9652	0,0085	0,2255	РІЗК
ITGB6	0,9387	0,5903	1,2871	0,0132	0,2939	РІЗК
ITGB7	-0,7900	-0,9989	-0,5812	0,0051	0,1639	TXmisReg, PI3K
ITGB8	1,0572	0,7304	1,3840	0,0079	0,2189	РІЗК
JAG1	1,3007	0,8896	1,7117	0,0084	0,2255	Notch
JAK2	-0,3879	-0,6264	-0,1495	0,0498	0,6668	STAT, PI3K
ЈАКЗ	0,7535	0,4678	1,0393	0,0141	0,2982	STAT, PI3K
КАТ2В	0,6252	0,2797	0,9708	0,0382	0,5522	Notch
ΚΙΤ	1,3464	1,0185	1,6743	0,0040	0,1405	PI3K, RAS
КМТ2С	0,3017	0,1992	0,4042	0,0104	0,2537	
LIF	2,2368	1,5400	2,9335	0,0081	0,2194	STAT
LIG4	0,3305	0,1312	0,5298	0,0475	0,6517	DNARepair
MAD2L2	-0,3103	-0,3537	-0,2669	0,0008	0,0685	DNARepair, CC
MAP2K2	0,3246	0,2104	0,4389	0,0114	0,2706	MAPK, PI3K, RAS
MAP2K4	0,5398	0,3239	0,7557	0,0163	0,3136	МАРК
MAP3K1	-0,4238	-0,5690	-0,2786	0,0106	0,2575	МАРК
MCM2	-1,1555	-1,3334	-0,9776	0,0010	0,0685	CC
MCM4	-3,1568	-3,2475	-3,0661	0,0000	0,0119	СС
MCM5	-1,1144	-1,3843	-0,8445	0,0039	0,1400	CC
MCM7	-2,3150	-2,3859	-2,2442	0,0000	0,0119	CC
----------	---------	---------	---------	--------	--------	------------------------------
MDC1	-0,4132	-0,6579	-0,1684	0,0454	0,6326	DNARepair
MDM2	2,7270	2,5677	2,8862	0,0001	0,0391	TXmisReg, PI3K, CC
МЕСОМ	1,2061	0,9219	1,4904	0,0036	0,1335	МАРК
MED12	0,6236	0,4985	0,7487	0,0023	0,1011	
MEN1	-0,1097	-0,1632	-0,0563	0,0276	0,4308	TXmisReg
MGMT	0,4781	0,2495	0,7067	0,0263	0,4267	DNARepair
MLLT3	-0,7573	-1,0334	-0,4813	0,0126	0,2862	TXmisReg
MSH2	-1,3664	-1,4541	-1,2787	0,0001	0,0391	
MSH6	-1,4985	-1,7182	-1,2788	0,0009	0,0685	
МҮВ	-1,7562	-2,0538	-1,4585	0,0014	0,0744	PI3K
МҮС	-0,8222	-1,0328	-0,6116	0,0046	0,1568	Wnt, TXmisReg,
						TGFB, MAPK, STAT,
		0.4070			0.0054	РІЗК, СС
NF2	-0,3208	-0,4372	-0,2044	0,0124	0,2851	
NFATCI	-0,8161	-1,0698	-0,5624	0,0081	0,2194	Wht, MAPK
NFE2L2	0,5345	0,4360	0,6331	0,0018	0,0866	•
NFKBIA	0,6575	0,4780	0,8370	0,0056	0,1/38	Арор
NFKBIZ	0,8949	0,4622	1,3275	0,0270	0,4268	TXmisReg
NOTCH1	1,6128	1,3041	1,9216	0,0020	0,0922	Notch
NRAS	0,2995	0,1830	0,4161	0,0151	0,2982	MAPK, PI3K, RAS
NSD1	0,4339	0,2043	0,6635	0,0342	0,5194	ChromMod
NTRK2	0,9285	0,6881	1,1688	0,0048	0,1598	МАРК
PAX8	1,0100	0,8746	1,1453	0,0007	0,0657	TXmisReg
PBRM1	-0,2531	-0,3763	-0,1299	0,0275	0,4308	
PDGFA	1,0244	0,3982	1,6506	0,0491	0,6614	TXmisReg, MAPK, PI3K, RAS
PGF	2,2341	1,6112	2,8571	0,0059	0,1750	PI3K, RAS
PHF6	-0,2332	-0,3455	-0,1208	0,0268	0,4268	
PIK3CD	0,6874	0,5728	0,8020	0,0013	0,0744	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PIK3R3	0,2378	0,1078	0,3678	0,0371	0,5456	STAT, PI3K, RAS,
						Арор
PIM1	-2,2610	-2,9994	-1,5225	0,0093	0,2351	STAT
PLA2G4A	-0,5998	-0,9317	-0,2680	0,0383	0,5522	MAPK, RAS
PLA2G4C	1,5343	1,2998	1,7688	0,0010	0,0685	MAPK, RAS
PLAU	2,3954	2,0743	2,7165	0,0007	0,0657	TXmisReg
PML	0,7339	0,4583	1,0095	0,0137	0,2982	TXmisReg
POLB	0,4346	0,3916	0,4776	0,0003	0,0479	DNARepair
POLE2	-1,1912	-1,6521	-0,7303	0,0149	0,2982	DNARepair
PPARGC1A	0,9811	0,5631	1,3991	0,0193	0,3562	ChromMod
PPP3R1	-0,2797	-0,3996	-0,1599	0,0196	0,3564	Wnt, MAPK, Apop

PRKACA	0,2700	0,1721	0,3678	0,0124	0,2851	Wnt, HH, MAPK, RAS,
						Арор
PRKACG	0,9409	0,4468	1,4350	0,0335	0,5120	Wnt, HH, MAPK, RAS,
						Арор
PRKAR2A	0,3260	0,2027	0,4493	0,0140	0,2982	Арор
PRKDC	-0,6358	-0,6866	-0,5849	0,0001	0,0391	DNARepair, CC
PTPN11	-0,4227	-0,5009	-0,3444	0,0018	0,0866	STAT, RAS
PTTG2	-0,2709	-0,4211	-0,1207	0,0385	0,5526	CC
RAD21	-0,5926	-0,6579	-0,5274	0,0004	0,0523	CC
RAD50	0,4918	0,2691	0,7146	0,0227	0,3916	DNARepair
RAD51	-1,8774	-2,5559	-1,1988	0,0123	0,2851	DNARepair
RAD52	0,8450	0,5221	1,1680	0,0143	0,2982	DNARepair
RAF1	-0,3477	-0,4831	-0,2123	0,0151	0,2982	MAPK, PI3K, RAS
RASGRP1	0,5078	0,4454	0,5702	0,0005	0,0591	MAPK, RAS
RBX1	-0,1487	-0,2201	-0,0774	0,0265	0,4267	Wnt, TGFB, CC
RFC3	-1,5887	-2,0104	-1,1669	0,0051	0,1640	DNARepair
RFC4	-2,0406	-2,5424	-1,5388	0,0041	0,1428	DNARepair
RNF43	0,9493	0,4777	1,4209	0,0290	0,4483	
RPS27A	0,1811	0,1381	0,2241	0,0037	0,1339	DNARepair
SETD2	-0,2179	-0,3305	-0,1054	0,0321	0,4933	
SF3B1	-0,2307	-0,3416	-0,1199	0,0266	0,4267	
SKP1	0,3743	0,3337	0,4148	0,0004	0,0523	Wnt, TGFB, CC
SKP2	-0,6520	-0,8382	-0,4659	0,0063	0,1852	CC
SMAD2	0,1598	0,0730	0,2467	0,0366	0,5443	TGFB, CC
SMAD4	-0,4349	-0,5691	-0,3006	0,0079	0,2189	Wnt, TGFB, CC
SMARCB1	-0,1895	-0,2791	-0,0999	0,0255	0,4187	
SMC1A	-0,7880	-1,2264	-0,3496	0,0388	0,5544	CC
SMC3	-0,7907	-0,9123	-0,6692	0,0010	0,0685	CC
SMO	0,8898	0,3887	1,3910	0,0401	0,5633	HH
SOCS1	1,3854	1,0856	1,6852	0,0028	0,1187	STAT
SOCS2	0,6331	0,3465	0,9197	0,0227	0,3916	STAT
SOS1	-0,2973	-0,4605	-0,1341	0,0376	0,5472	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS
SOS2	0,4865	0,2599	0,7132	0,0245	0,4156	MAPK, STAT, PI3K,
						RAS
SOX9	0,9716	0,8179	1,1253	0,0011	0,0685	
SP1	-0,6340	-1,0216	-0,2463	0,0491	0,6614	TXmisReg, TGFB
STAG2	-0,4995	-0,7138	-0,2851	0,0197	0,3564	CC
STAT3	0,4408	0,3720	0,5096	0,0011	0,0685	STAT
STK11	0,8832	0,5421	1,2243	0,0148	0,2982	РІЗК
STMN1	-3,1415	-3,5526	-2,7304	0,0006	0,0657	МАРК
SUV39H2	-0,5498	-0,7911	-0,3085	0,0209	0,3689	ChromMod
SYK	-0,8778	-1,1074	-0,6483	0,0049	0,1607	РІЗК

TCF3	-0,8291	-0,9033	-0,7550	0,0002	0,0421	TXmisReg
TFDP1	-0,7202	-0,8315	-0,6090	0,0011	0,0685	TGFB, CC
TGFB1	0,5798	0,4846	0,6750	0,0013	0,0734	TGFB, MAPK, CC
TNFAIP3	1,1309	0,9230	1,3388	0,0018	0,0866	
TNFRSF10A	0,8010	0,6136	0,9883	0,0036	0,1335	Арор
TNFRSF10B	0,8990	0,6908	1,1071	0,0035	0,1335	Арор
TNFRSF10C	2,3227	1,7828	2,8627	0,0035	0,1335	Арор
TNFSF10	-1,1326	-1,2723	-0,9930	0,0005	0,0591	Арор
TRAF7	0,2738	0,1128	0,4348	0,0446	0,6246	
ТТК	-2,1889	-2,5594	-1,8185	0,0014	0,0744	СС
UBB	0,4500	0,4139	0,4862	0,0002	0,0391	DNARepair
UBE2T	-2,2654	-2,4894	-2,0415	0,0003	0,0479	DNARepair
VEGFA	0,3097	0,1238	0,4956	0,0469	0,6474	PI3K, RAS
WHSC1	-1,4605	-1,7255	-1,1955	0,0017	0,0861	TXmisReg
WHSC1L1	-0,4327	-0,5305	-0,3349	0,0032	0,1310	ChromMod
WNT10A	-0,6510	-0,8964	-0,4057	0,0138	0,2982	Wnt, HH

Tabelle A-12: Alle 212 differenziell exprimierten Gene mit *p*<0,05 nach 60h Inkubation von KRJ-I Zellen mit 5μM Nutlin-3a und assoziierte Signalwege

Legende: STAT, TGFB, PI3K, RAS, MAPK, Wnt, Notch, DNA Reparatur, Apop=Apoptose, TXmisReg=Transkriptionelle Misregulation, CC=Zellzyklus, ChromMod= Chromatin Modifikationen, HH=Hedgehog; Fett gedruckte Gene markieren eine differenzielle Expression mit einer FDR<0.05.

8. Erfolgte Publikationen und Präsentationen

8.1 Wissenschaftliche Publikationen im Rahmen der Dissertation

Freitag H, Christen F, Lewens F, Grass I, **Briest F**, Iwaszkiewicz S, Siegmund B, Grabowski P. Inhibition of mTORs catalytic site by PKI-587 is a promising therapeutic option for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. In Revision bei Neuroendocrinology in 02/2016

Lewens F, **Briest F**, Arsenic R, Sänger J, Kunze A, Möbs M, Freitag H, Christen F, Kaemmerer D, Lupp A, Heilmann M, Schneider CP, Richter K, Hummel M, Siegmund B, Grabowski P. The pro-proliferative protein FOXM1 serves as clinical marker and potential target in bronchopulmonary neuroendocrine cancer. <u>In Revision</u> bei Oncotarget

Briest F, Grass I, Möbs M, Christen F, Mende S, Kaemmerer D, Freitag H, Lewens F, Iwaszkiewicz S, Sänger J, Kunze A, Siegmund B, Hummel M, Grabowski P. Targeting the MDM2-p53-FOXM1 axis is highly effective in p53 wild type GEP-NENs. <u>In Revision</u> bei Endocr Relat Cancer

Briest F, Berg E, Freitag H, Kaemmerer D, Grass I, Lewens F, Christen F, Arsenic R, Altendorf-Hofmann A, Kunze A, Sänger J, Knösel T, Siegmund B, Hummel M, Grabowski P. FOXM1 is a novel drug target in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. Oncotarget. 2015 Apr 10;6(10):8185-99.

Briest F, Grabowski P. The p53 network as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. Cancer Treat Rev. 2015 May;41(5):423-30. Review

8.2 Poster und Vorträge

Briest F, Christen F, Worpenberg L, Welzel M, Freitag H, Fischer C, Grabowski P. The Proteasome Inhibitor Bortezomib is a highly effective Treatment Option for Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms and sensitizes to DNA damaging Therapy in vitro. ENETS conference 2016, Barcelona, Spain. Poster

Briest F*, Grass I*, Siegmund B, Grabowski P. The CDK4/6 Inhibitor Palbociclib induces antiproliferative Mechanisms in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms in vitro. ENETS conference 2016, Barcelona, Spain. Poster Lock A, Wirtz R, Kaemmerer D, Haugvik S P, Kure E, Buchholz M, Gress T, Arsenic R, **Briest F**, Siegmund B, Hörsch D, Grabowski P. Is mTOR pathway activity a good predictor for Everolimus therapy? A pilot study to build up a Phase II trial in pancreatic neuroendocrine neoplasias (pNENs). ENETS conference 2016, Barcelona, Spain. Poster

Nölting S, Rentsch J, Freitag H, **Briest F**, Schrader J, König A, Aristizabal Prada ET, Siegmund B, Auernhammer CJ, Grabowski P. Selective Inhibition of PI3Kalpha (BYL719) - Promising Therapeutic Option for neuroendocrine tumors? (Basic Science - mTOR and other pathways, signalling, receptors). ENETS conference 2016, Barcelona, Spain. Poster

Briest F. DNA damage response as chemotherapy-sensitizing therapeutic target in neuroendocrine tumors: preclinical studies and translational perspectives. Neuroendocrine Tumors Scientific Exchange Meeting 2016, Rome, Italy. Vortrag

Spenke C, Jöhrens K, Arsenic R, **Briest F**, Lammert H, Kaemmerer D, Hummel M, Scheibenbogen C, Busse A, Grabowski P. Tumor infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression differ between low and high grade neuroendocrine tumors – first results of a protein- and array-based pilot study. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie. 2015, Basel, Switzerland. Poster

Briest F, Grabowski P. From Bench to bedside - Emerging Targets in NEN. INKEP Meeting 2015, Bad Berka, Germany. Vortrag

Briest F, Grass I, Christen F, Lewens F, Freitag H, Kaemmerer D, Möbs M, Sänger J, Hummel H, Siegmund B, Grabowski P. Role of MDM2 as therapeutic target in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NENs). EORTC-NCI-AACR Symposium 2014, Barcelona, Spain. Poster

Briest F, Berg E, Freitag H, Kaemmerer D, Lewens F, Altendorf-Hofmann A, Sänger J, Knösel T, Siegmund B, Hörsch D, Hummel M, Grabowski P. Forkheadbox-Proteins as novel drug targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease: Inhibition of FoxM1 exerts antiproliferative effects in GEP-NEN cell lines. ENETS conference 2014, Barcelona, Spain. Poster

Briest F, Freitag H, Lewens F, Kaemmerer D, Lingnau A, Berg E, Hummel M, Siegmund B, Grabowski P. Forkheadbox-Proteins and their regulators in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasias –

new targets on the horizon? Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2013, Wien, Switzerland. Poster

*geteilte Erstautorenschaft

9. Curriculum Vitae

Auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes wird aus Datenschutzgründen verzichtet.