

**Transkriptionsregulation der Sekretoglobuline
Mammaglobin 1 und Lipophilin B in
mGPx4-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellen**

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

Dino Illanes-Céspedes

aus Berlin

Juli, 2010

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 2005 und 2009 am Paul-Ehrlich-Institut für experimentelle Medizin, Campus Charité Mitte unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kühn.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Kühn

2. Gutachter: Prof. Dr. V. Haucke

Disputation am _05.11.10__

[...] aber immer liegt noch im Grunde das Regellose, als könnte es einmal wieder durchbrechen, und nirgends scheint es, als wären Ordnung und Form das Ursprüngliche, sondern als wäre ein anfängliches Regellose zur Ordnung gebracht worden.

Friedrich Wilhelm Joseph Ritter von Schelling

Zusammenfassung

Sekretoglobuline wie Mammaglobin 1 (MGB1) und Lipophilin B (LipB) sind kleine, selten glykosylierte Proteine, deren Expressionsmuster vorwiegend im sekretorischen Epithel von Säugetieren nachweisbar sind. Diese liegen als Homo- bzw. Heterodimere vor, deren genaue physiologische Bedeutung bis dato unbekannt ist. Allerdings scheinen einigen Vertretern der SCGBs eine funktionelle Bedeutung in der Genese diverser Tumore zuzukommen. Die Expression von LipB sowie MGB1 ist im humanen Mammakarzinom hochreguliert. Eine deutliche Hochregulation konnte in einer transgenen Brustkrebszelle (7G4) gezeigt werden, die die mGPx4, ein reduzierendes Enzym mit anti-apoptotischen Eigenschaften, überexprimiert. MGB1 ist ein relativ gut erforschter Tumormarker für Brustkrebs. Dagegen ist nur sehr wenig über die Expressionsregulation seines Dimerpartners LipB bekannt. Zu klärende Kernpunkte dieser Arbeit waren deshalb zum einen die Beleuchtung der transkriptionellen Aktivierung der LipB-Expression. Zum anderen die Diskussion der möglichen biologischen und mechanistischen Funktion der mGPx4, die mit einem veränderten Expressionsmuster im Brustkrebs assoziiert ist. Zur Klärung der erst genannten Problematik konnten initiale *in silico*-Analysen *cis*-aktivierende Elemente im proximalen LipB-Promotor identifizieren. Funktionelle Promotorstudien bestätigten innerhalb dieser Sequenz deutliche transkriptionelle Aktivitäten. Daran anschließende EMSA-Versuche zeigten spezifische DNA-Protein-Interaktion der Faktoren Sp1 sowie NF1. Jedoch konnten darin keine differentiellen Gelshifts nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der potentiellen Beteiligung der mGPx4 in die Transkriptionelongation und -stabilität ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen 7G4 und VC. Die Erforschung epigenetischer Mechanismen wie der CpG-Methylierung und Histonacetylierung waren in ihrer Aussage uneinheitlich. 5-Aza-2'-desoxycytidin, ein Methyltransferase-Inhibitor, bewirkte eine generelle transkriptionelle Aktivierung. TSA und Butyrat dagegen reprimierte die MGB1/LipB-Expression. Schließlich gaben real time-PCR-Analysen Hinweise auf den Zusammenhang von Proliferationsarrest und HDACI-induzierte p21^{WAF1/CIP1}-Hochregulation.

Abstract

Mammaglobin A (MGB1) and lipophilin B are (LipB) members of the secretoglobin superfamily, a group of small, secretory, rarely glycosylated, dimeric proteins with unclear physiologic functions, mainly expressed in mammalian secretory epithelia. It seems that the secretoglobin polypeptides could be of functional importance in the development of various human cancers. Moreover, the expression levels of mammaglobin A in breast tumors were up-regulated and significantly correlated with those of lipophilin B. An explicit up-regulation was shown in a gene-modified mammary carcinoma cell (7G4), which overexpressed the mitochondrial GPx4, a reductive and anti-apoptotic protein. Since Mammaglobin A is a well-known marker for breast tumor, there are some studies about its regulation and expression, but on the other hand it is still little known about the gene regulation of its dimeric partner Lipophilin B. The aims of the present study are on the one hand to investigate the transcriptional activation of the LipB gene expression in 7G4 and control cells (vector control). On the other hand the discussion about the possible biological and mechanistic relation of GPx4 associated with the changed expression pattern of secretoglobins in breast cancer. Initial *in silico*-analysis of the proximal LipB-up stream sequence could identify *cis*-acting elements. Luciferase reporter assays confirm transcriptional activities in this promoter region. Following studies of end-labeled DIG probes in EMSAs demonstrated specific DNA-protein-interactions with the maximum likelihood, indicating the binding of Sp1 and NF1. However no differential shift binding was observed. The analysis of the involvement of the mitochondrial GPx4 in transcript stability and elongation revealed no significant differences. Elucidating epigenetic regulatory mechanisms (e.g. DNA Methylation and Histone Acetylation) adduced inconsistent conclusions. The use of 5-Aza-2'-desoxycytidine confirmed general transcriptional activity, whereas Trichostatin A and Butyrate could downregulate MGB1/LipB gene expression in mGPx4 transfectant and vector control. In addition, real time PCR analysis revealed the relation of cell growth arrest and the up regulation of p21^{WAF1/CIP1} due to TSA/Butyrate application.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1.	Die Sekretoglobulin-Superfamilie.....	1
1.1.1	Allgemeine Einführung.....	1
1.1.2	Die Sekretoglobulin-Gene.....	1
1.1.3	Expression und evolutionäre Verwandtschaft der SCGB-Superfamilie.....	2
1.1.4	Struktur und physiologische Funktionen der SCGBs	4
1.1.5	Implikation von Mammaglobin 1 und Lipophilin B in der Kanzerogenese	8
1.1.5.1	Strukturelle Charakteristika des MGB1/LipB-Komplexes	9
1.1.5.2	Forschungsstand zur Regulation der Mammaglobin 1-Expression	10
1.2	Epidemiologie, Ätiologie und Therapie des Mammakarzinoms	12
1.3	Epigenetische Ereignisse in der Genregulation	14
1.3.1	CpG-Methylierungen und Regulation der Genexpression.....	14
1.3.1.1	Molekularer Mechanismus der DNA-Methylierung	16
1.3.2	Nukleosomale Organisation und Genregulation.....	18
1.4	Pharmakologische Eingriffe in die epigenetische Genregulation	20
1.4.1	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTI)	20
1.4.2	Der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin	21
1.4.3	Histonacetylasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs)	23
1.4.3.1	HDAC-Inhibitoren: Mechanismus und Wirkstoffklassen	23
1.4.3.2	Antitumoraktivitäten von HDAC-Inhibitoren	25
1.4.3.3	Der HDAC-Inhibitor (<i>R</i>)-Trichostatin A.....	26
1.4.3.4	Der HDAC-Inhibitor Butyrat.....	27
1.5	Die biologische Bedeutung der Glutathion-Peroxidase GPx4 in Mammalia.....	28
1.5.1	mGPx4-Funktionen im Zusammenhang mit oxidativen Streß	30
1.5.2	mGPx4 als anti-apoptotisches Protein	31
2	Zielsetzung und methodisches Vorgehen.....	32
3	Material und Methoden.....	34
3.1	Materialien.....	34
3.1.1	Chemikalien und Gebrauchswaren	34
3.1.2	Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	34
3.1.3	Chemikalien	35
3.1.4	Enzyme und Kits	35

3.1.5	Geräte und Gebrauchswaren	36
3.1.6	DNA-Banken und Plasmide	37
3.1.7	Bakterienstämme und Zellen	37
3.1.8	Antikörper.....	37
3.2	Allgemeine Labortechniken	37
3.2.1	Rechnergestützte Sequenzanalyse	38
3.2.2	Statistische Berechnungen	38
3.2.3	RNA-Extraktion und reverse Transkription (RT).....	38
3.2.3.1	Real time-PCR	39
3.2.4	Funktioneller Promotor Assay.....	41
3.2.4.1	Konstruktion der Reportergene.....	41
3.2.4.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	42
3.2.4.3	Transiente Transfektion	42
3.2.5	Kontroll-Restriktionsspaltung von Plasmid DNA.....	43
3.2.6	Zellyse und Immunodetektion nukleärer Proteine	44
3.2.6.1	Aufschluß eukaryotischer Zellen zur Analyse von Histonproteinen.....	44
3.2.6.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.2.6.3	„Semi-dry“-Western Proteintransfer und ECL-Analyse	45
3.2.6.4	Blotmembran Stripping.....	46
3.2.7	DNA-Gelshift Assay	47
3.2.8	Analyse der Transkriptelongation und mRNA-Reifung.....	49
3.2.9	Zellkultur der Mammakarzinom-Zellen COH-BR1 (WT, VC, 7G4).....	50
3.2.10	Zellzahlbestimmung mittels Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer).....	51
3.2.11	Inhibition der Histonacetylierung bzw. DNA-Methylierung	52
4	Ergebnisse.....	54
4.1	<i>In silico</i>-Analysen des LipB-Promotors	54
4.1.1	Identifizierung <i>cis</i> -regulatorischer Elemente.....	54
4.1.2	Vergleichendes Alignment der Promotoren von MGB1, MGB2 und LipB	56
4.1.3	Multiples Alignment der distalen 8 kbp Upstream-Sequenz	58
4.1.4	Phylogenetische Aspekte und Konservierung in Mammalia	59
4.2	Funktionelle Promotorstudien am Lipophilin B-Gen.....	62
4.2.1	<i>In vitro</i> Aktivitätsassays des LipB-Promotors in HEK-und COH-BR1-Zellen	62
4.2.2	LipB-Promotoraktivität in modifizierten Mammakarzinom-Zellen	63
4.2.2.1	Charakteristika der mGPx4-Überexpression in Mammakarzinom-Zellen.....	64
4.2.2.2	MGB1/LipB-Expression in modifizierten COH-BR1-Zellen	65
4.2.2.3	Vergleichende Aktivitätsstudien von LipB-Promotorkonstrukten	66
4.3	DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des LipB-Gens	67

4.3.1	Detektion von spezifischen DNA-Protein-Interaktionen (EMSA).....	67
4.3.1.1	Kompetitionsexperimente mit unmarkierten LipB-DNA-Sonden.....	68
4.3.1.2	EMSA-Gelshift-Experimente mit faktorspezifischer Kompetitor-DNA.....	69
4.3.1.3	Differentielle DNA-Protein-Interaktion im vergleichenden Gelshift Assay	73
4.4	Experimentelle Analysen des mRNA-Transkriptes	74
4.4.1	Einfluß der mGPx4 auf die Transkriptstabilität	74
4.4.2	Einfluß der mGPx4 auf die Transkriptelongation und mRNA-Reifung	75
4.5	Modifizierungen der genomischen DNA als Regulator der Genexpression	76
4.5.1	Verifizierung der CpG-Hypomethylierung	76
4.5.1.1	Einfluß der CpG-Methylierung auf die Expression von MGB1 und LipB	78
4.5.2	Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB.....	79
4.5.2.1	Analyse der Histon H3-Acetylierung nach HDACI-Inkubation (I).....	79
4.5.3	Expressionsanalyse von MGB1 und LipB nach HDACI-Inkubation (I)	81
4.5.3.1	Real time-PCR zur Quantifizierung der MGB1-Transkripte.....	81
4.5.3.2	Effekte von (<i>R</i>)-Trichostatin A auf die LipB-Expression.....	82
4.5.4	Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB.....	83
4.5.4.1	Analyse der Histon H3-Acetylierung nach HDACI-Inkubation (II).....	83
4.5.5	Expressionsanalyse von MGB1 und LipB nach HDACI-Inkubation (II)	84
4.5.5.1	Real time-PCR zur Quantifizierung der MGB1-Transkripte	84
4.5.5.2	Effekte von Natriumbutyrat auf die LipB-Expression	85
4.6	Einfluß von Zellproliferation und Apoptose auf die MGB1/LipB-Expression	87
4.6.1	Zellproliferation in HDACI-behandeltem Medium (I).....	87
4.6.2	Die p21 ^{WAF1/CIP1} -Expression nach HDACI-Inkubation (I).....	89
4.6.3	Zellproliferation in HDACI-behandeltem Medium (II).....	90
4.6.4	Die p21 ^{WAF1/CIP1} -Expression nach HDACI-Inkubation (II).....	91
5	Diskussion	93
5.1	Expressionsregulation von Lipophilin B.....	93
5.1.1	Identifizierung <i>cis</i> -regulatorischer Elemente.....	93
5.1.2	Vergleichendes Alignment der Promotoren von MGB1, MGB2 und LipB	96
5.1.3	Multiples Alignment der distalen 8000 bp Upstream-Sequenz.....	97
5.1.4	Phylogenetische Aspekte und Konservierung in Mammalia	98
5.2	<i>In vitro</i> Aktivitätsassays des LipB-Promotors in HEK und COH-BR1-Zellen.....	99
5.2.1	Vergleichende Aktivitätsstudien von Promotorkonstrukten in VC/7G4.....	102
5.3	DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des LipB-Gens (EMSA).....	103
5.4	Experimentelle Analysen des mRNA-Transkriptes: Stabilität und Elongation.....	104

5.5 Einfluß der CpG-Methylierung auf die Expression von MGB1 und LipB	105
5.6 Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB	106
5.6.1 (R)-Trichostatin A und Natriumbutyrat.....	106
5.7 Einfluß von Zellproliferation und Apoptose auf die MGB1/LipB-Expression ...	108
5.7.1 (R)-Trichostatin A und Natriumbutyrat.....	108
5.8 Abschließende Betrachtung und Ausblick	111

meinen Eltern und meiner Freundin Kerstin

Abkürzungsverzeichnis

A, Ala	Alanin	MAF	musculoaponeurotic
APS	Ammoniumpersulfat		fibrosarcoma
bp	Basenpaar(e)	MEF2	Myocyte enhancer factor 2
BSA	Bovines Serumalbumin	mGPx4	mitochondriale Glutathion- Peroxidase
C	Cytosin	MGB1	Mammaglobin 1
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA	mRNA	Messenger RNA
CDK	Cyclin abhängige Kinase	NaBu	Natriumbutyrat
CKI	Cyclin abhängiger Kinase- Inhibitor	NZY-Medium	Medium für die Bakterienzucht
dH ₂ O	deionisiertes Wasser	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dNTPs	Desoxyribonucleotid	PBS	phosphate buffered saline
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	PEA3	Polyoma-enhancer-related
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PCR	Polymerase Kettenreaktion
dGTP	Desoxyguanintriphosphat	RT	Raumtemperatur
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
Da	Dalton	ROS	Reactive oxygen species
DIG	Digoxygenin	rpm	Umdrehungen pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s	Sekunde
Dnmt 1	DNA-Methyltransferase 1	SCGB	Sekretoglobulin
DPE	Downstream promoter element	SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiaminteressigsäure	Sp1	Stimulierendes Protein 1
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay	SV40	Simian Virus 40
5-Aza-CdR	5-Aza-2'-desoxycytidin	T	Thymidin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
h	Stunde	TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
HAT	Histonacetyltransferase	TF	Transkriptionsfaktor
HEK	Humane embryonale Nierenzellen	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan
HDAC	Histondeacetylase	TSA	(R)-Trichostatin A
HDACI	Histondeacetylase-Inhibitor	UTR	Untranslatierte Region
kbp	kilo Basenpaar(e)	ÜN	Über Nacht
kDa	kilo Dalton	v/v	Volumenprozent
LB-Medium	Medium für die Bakterienzucht	VC	Vektorkontrolle
LipB	Lipophilin B	WT	Wildtyp
		w/v	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1. Die Sekretoglobulin-Superfamilie

1.1.1 Allgemeine Einführung

Sekretoglobuline (SCGB) bezeichnen kleine, lipophile Proteine, deren Expressionsmuster vorwiegend mit dem Auftreten in exokrinen Drüsen und dem sekretorischen Epithel assoziiert ist [1]. Nach gegenwärtigem Stand der Forschung konnten SCGB-Gene ausschließlich im Säugetier-Genom nachgewiesen werden [2, 3]. Von den bislang 49 bekannten Mitgliedern der SCGB-Familie sind die meisten nicht glykosyliert [2, 4, 5]. Des Weiteren konnten im humanen Genom die folgenden neun SCGB-Gene identifiziert werden: Lipophilin B (SCGB1D2, BU 101,[6]), Lipophilin A (SCGB1D1, [7]), Lymphoglobulin (SCGB1D3, YGB, [2]), Uteroglobulin (SCGB1A1, Clara cell protein, CC10, [8]), Mammaglobin 1 (SCGB2A2, Mammaglobin A, [9].), Mammaglobin 2 (SCGB2A1, Lipophilin C, Lacryglobin, Mammaglobin B, [10, 11]), High in normal-1 (HIN-1, SCGB3A1, [12]) sowie das Uteroglobulin related protein-1 (SCGB3A2, UGRP-1, [13]). Bis dato existieren keine gesicherten physiologischen Funktionen, die den SCGBs zugesprochen werden können [1, 2, 14], so daß sie derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen sind. Dies gilt insbesondere für die in dieser Arbeit untersuchten Gene Mammaglobin 1 sowie Lipophilin B, da Experimente mit Knockout-Mäusen bis dato hierzu nicht vorliegen.

1.1.2 Die Sekretoglobulin-Gene

Eingehende Analysen des UGB-Gens in Kaninchen ergaben, daß es eine Länge von 3 kbp umfaßt [15]. Es ist in drei Exons und zwei Introns untergliedert [15, 16]. Die 5'-flankierende Region beinhaltet Steroidhormon sensitive *cis*-regulatorische Elemente [17]. Insbesondere Progesteron und Estrogen sind für die Regulation der Genexpression in Kaninchen verantwortlich [18]. Nach Erforschung der humanen UGB-cDNA und Charakterisierung des UGB-Gens wurde eine hohe Homologie der Genstruktur von Mensch und Kaninchen experimentell belegt [19, 20]. Indes sind nach derzeitigem Forschungsstand die Kenntnisse um den strukturellen Aufbau sowie um die regulatorischen Upstream-Sequenzen (Promotoren) der übrigen

SCGB-Gene weitestgehend begrenzt. Allerdings konnten einige allgemeine molekulargenetische Charakteristika den SCGBs zugeordnet werden, die bemerkenswert ähnlich zu den des UGB sind. Hierzu gehört der konservierte Genaufbau. Alle Gene bestehen aus drei Exons mit zwei konservierten Intronpositionen [2], wobei die Größe der Gene von der variablen Intronlänge abhängt [16]. Das erste Intron hat eine durchschnittliche Länge von 1 bis 2 kbp, währenddessen das zweite Intron mit einer Länge von 300 Nukleotiden signifikant kürzer ist [5]. Zudem zeigen die Nukleotidsequenzen eine hohe Konservierung hinsichtlich der Kodierung von vornehmlich hydrophoben Aminosäuren [21]. Forschungsarbeiten konnten darüber hinaus belegen, daß sechs der humanen SCGB-Vertreter (Lipophilin A, Lipophilin B, Mammaglobin 1, Mammaglobin 2, Lymphoglobulin sowie Uteroglobulin) auf dem Chromosom 11q12.2 innerhalb eines Clusters lokalisiert sind [2]. Zudem konnte in weiteren Forschungsarbeiten festgestellt werden, daß diese Region in der Karzinogenese der Brust stark exprimiert wird [9, 22]. Auch wurden Deletionen im Chromosom 11q12.2 mit der Entwicklung von Hypophysenadenomen in Verbindung gebracht [1].

1.1.3 Expression und evolutionäre Verwandtschaft der SCGB-Superfamilie

Singh und Mitarbeiter konnten durch Vergleich der Aminosäuresequenz von Kaninchen und Human UGB eine 61%ige Homologie nachweisen [23], die eine enge Verwandtschaft der beiden Proteine nahelegt. Bereits 1977 konnten Arbeiten von Nieto und Mitarbeitern dokumentieren, daß eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der UGB-Proteinstruktur von Kaninchen, Mensch und Ratte bestand [24]. Im Laufe der Zeit wurden weitere UGB-Orthologe in diversen Spezies entdeckt. So konnte nach Untersuchung der UGB-mRNA aus der Maus [25, 26], Ratte [27], Hamster [28], Hase [29], Schwein [30], Kuh [31], Pferd [32] und aus Primaten [33] eine auffallend hohe Homologie nachgewiesen werden. Studien der UGB-Genstruktur sowie der Primärstruktur des Proteins bewiesen eine hohe Konservierung in diversen Spezies [15]. Darüber hinaus wurden bis dato 49 Proteine entdeckt, die zu der SCGB-Superfamilie zählen. Dabei zeichnet sich die Proteinfamilie durch Ähnlichkeiten der genomischen Struktur der jeweiligen Gene sowie des strukturellen Aufbaus der Proteine aus, währenddessen die Untergruppen aus Unterschieden der Primärstruktur resultieren

[5]. Verdeutlicht und graphisch umgesetzt wurde dies in einem Dendrogramm (Abb.1) zur phylogenetischen Analyse [5].

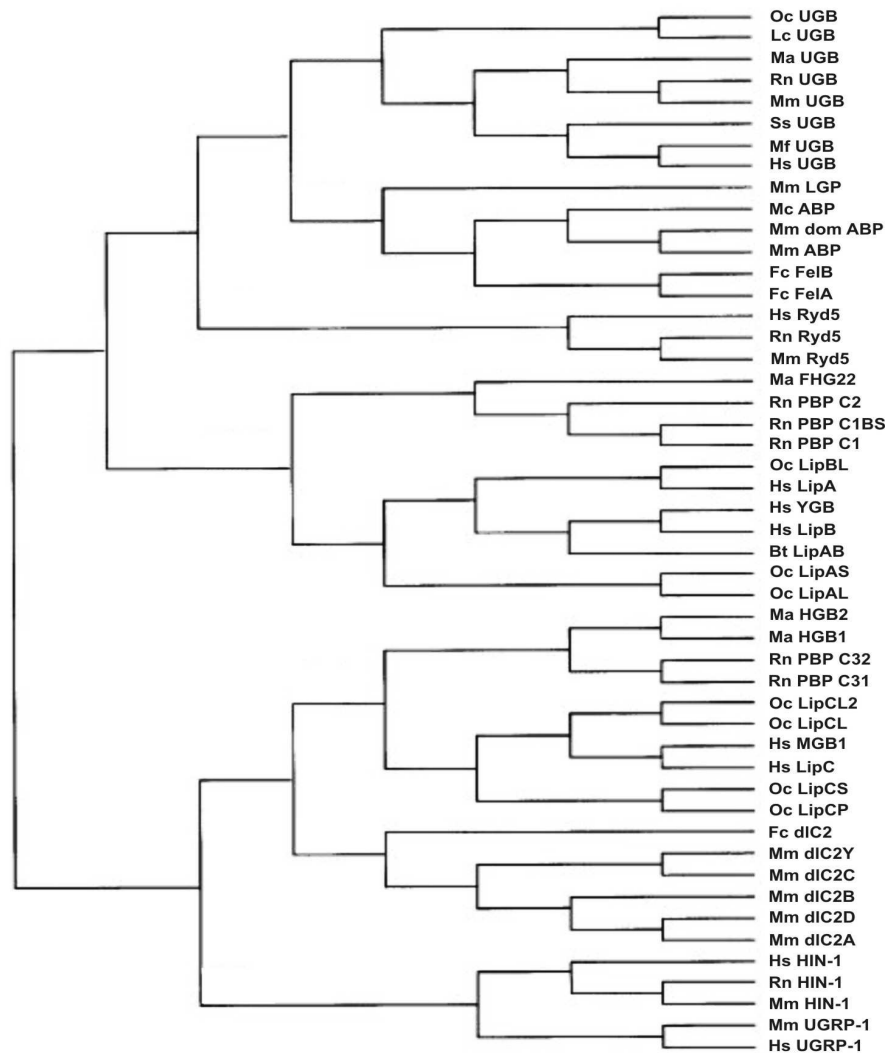


Abb.1: Phylogenetischer Baum der Sekretoglobulin-Superfamilie (Graphik aus [5]). Die Abkürzungen der jeweiligen Speziesnamen: Bt *Bos taurus*, Fc *Felis catus*, Hs *Homo sapiens*, Lc *Lepus capensis*, Ma *Mesocricetus auratus*, Mf *Macaca fuscata*, Mm dom *Mus musculus domesticus*, Mm *Mus musculus*, Oc *Oryctolagus cuniculus*, Rn *Rattus norvegicus*, Ss *Sus scrofa*. Die Abkürzungen der jeweiligen Proteinnamen: ABP androgen binding protein, Fel (A,B) major allergen I (*Felis catus*), HGB Heteroglobin (1,2), HIN-1 high in normal-1, LGP lacrimal gland protein, Lip(A,B,C) Lipophilin, MGB1 Mammaglobin 1, Mm dIC2 allergen di chain C2(Y,A,B,C,D), PBP unnamed protein product, Ryd potential ligand-binding protein, UGB Uteroglobin, UGRP-1 uteroglobin related protein-1, YGB lymphoglobin. Dieses Dendrogramm basiert auf den SCGB-Aminosäuresequenzen.

Nach heutigem Kenntnisstand ist die Verteilung der SCGB-Gene ausschließlich auf das Säugetier-Genom beschränkt [2, 3, 5]. Hierin ist diese Proteinklasse durch eine gewebsspezifische Expression gekennzeichnet. Zudem ist die Expression auf ein charakteristisches Set von epithelialen Geweben beschränkt [1, 5, 34, 35]. Dieses

umfaßt die Gewebe der Brust-, Tränen-, Schweiß- und Speicheldrüse, außerdem Prostata, Lunge und Uterus, in denen die Existenz von SCGBs bisher nachgewiesen werden konnte [2, 3]. Miele und Mitarbeiter entdeckten überdies, daß die transkriptionelle Expression bislang bekannter SCGBs der Kontrolle durch Steroidhormone unterliegt, was auf die Existenz entsprechender *cis*-regulatorischer Elemente innerhalb der ersten 1000 bp zurückzuführen ist [36]. Wie einige Studien zeigen konnten, existiert in Drüsengeweben von Tieren eine geschlechtsspezifische SCGB-Expression, welche hormonell-regulierten Mechanismen unterliegt [37]. Im Menschen konnten Vertreter der SCGB-Superfamilie in reproduktiven Organen [38, 39], lymphatischen [12, 40], Brust- sowie Lungengeweben [13, 35] gezeigt werden konnten. Des Weiteren fand man heraus, daß SCGBs in Darm [41], Herz, Skelettmuskel, Niere [2, 38] und im Liquor cerebrospinalis [42] nachzuweisen waren.

1.1.4 Struktur und physiologische Funktionen der SCGBs

Die Tertiärstruktur der SCGBs weist einige strukturelle Charakteristika auf, die ebenso im Hämoglobin zu finden sind. Dazu gehört die Globinfaltung α -helikaler Proteindomänen. Diese Proteinstruktur besteht typischerweise aus einem Bündel von acht helikalen Hauptsegmenten, die eine annähernd kugelförmige Raumstruktur annimmt. Alle α -Helices sind rechtsgängig und durch fünf kurze Loops miteinander verbunden. Die innere Architektur dieses Moleküls bildet eine Kavität, die beinahe gänzlich aus unpolaren Aminosäureresten zusammengesetzt ist [3, 15, 21]. Inwiefern kann nun dieser Strukturtyp auf die Sekretoglobuline übertragen werden? Diese und Fragen der biologischen Funktion sollen anhand des Kaninchen Uteroglobins erläutert werden, da Eigenschaften und Aufbau dieses Proteins hinreichend erforscht wurden.

Ausgiebige Untersuchungen der Kristallstruktur konnten die Globinfaltung bestätigen [24, 43-46]. Vier α -Helices sind dabei die wichtigsten Strukturelemente, die mit Hilfe von drei Schleifen miteinander in Verbindung stehen [15, 47]. Darüber hinaus wird eine kompakte, globuläre Gestalt sowie Richtungswechsel der Polypeptidkette durch die Ausbildung von Haarnadelschleifen ermöglicht [15]. Verdeutlicht wird dies in Abbildung 2 A, die die strukturellen Charakteristika des monomeren Kaninchen-UGBs darstellt. Eine weitere Übereinstimmung mit dem Hämoglobin-Monomer betrifft

die interne Proteintasche, die aus den α -Helices 1,2 und 3 ausgebildet wird [24, 47]. Vorwiegend hydrophobe Aminosäurereste kleiden das Innere der Kavität aus [2, 48]. Jedoch beschränkt sich die Ähnlichkeit mit Hämoglobin nicht nur auf sekundärstrukturelle Gegebenheiten, sondern umfaßt auch den nächst höheren Organisationsgrad zur Bildung von Multimeren. Die Unter-einheiten des Sauerstoffbindenden Proteins assoziieren zu einem Tetramer. Ähnlich verhalten sich die Vertreter der Sekretoglobulin-Superfamilie. Allen reifen SCGBs gemein ist ihre Fähigkeit der Homo- bzw. Heterodimerisierung [1, 3, 14]. Strukturelle Voraussetzung hierfür ist die Interaktion der beteiligten monomeren Untereinheiten über Disulfidbrücken (rote Balken in Abb.2 **B**), die maßgeblich zur Stabilisierung des Komplexes beitragen [2, 35, 49]. Dabei sind die Positionen 1 und 70 der bindungsnotwendigen Cysteine innerhalb der Proteinfamilie sowie ein zentrales Lysin an der Position 42 stark konserviert [35]. Ebenso tragen die Disulfidbrücken zur Ausbildung einer weiteren, größeren Kavität im Inneren des Dimers bei [15], die in Abb.2 **B** als schwarz schraffierte Fläche gekennzeichnet ist. Die Existenz der UGB-Kavität konnte durch Forschungsarbeiten bestätigt werden [24]. Vornehmlich hydrophobe Aminosäurereste sowie jeweils ein Tyrosinrest bilden hier eine zentrale Bindungstasche im Inneren des Proteins aus [15], auf deren Funktion zu einem späteren Zeitpunkt in diesem Abschnitt eingegangen werden soll.

Außerdem existiert ein weiteres konserviertes Cystein an der Position 44, welches jedoch nicht in allen SCGBs (UGB und UGB-ähnliche Proteine) nachgewiesen werden konnte [35]. In den Proteinkomplexen Mammaglobin 1/Lipophilin B [14, 34, 35], Mammaglobin 2/Lipophilin A [7] sowie die C3-Untereinheit von Estramustine-binding-protein (EMBP) [50] konnte Cys 44 bislang gezeigt werden, welches vermutlich in diesem Kontext verantwortlich für die Heterodimerisierung ist [3]. Zudem ergaben biochemische Analysen des EMBP-Komplexes, daß zwei Heterodimere nicht-kovalent zu einem Heterotetramer assoziieren [49]. Beweise für eine heterogene Quartärstruktur konnte darüber hinaus für den Mammaglobin 1/Lipophilin B-Komplex gezeigt werden [35]. Zudem verfügen die beiden Tetramere über N-glykosidische Modifikationen der Polypeptidkette, die in der SCGB-Familie nicht häufig vorhanden sind. Obgleich diese Familie aus Vertretern klassischer, sekretorischer Proteine besteht, ist die Glykosylierung keine allgemeine kovalente

Modifikation der SCGB-Polypeptidkette [2, 49]. Somit bleibt festzuhalten, daß die SCGB-Superfamilie über eine hohe Konservierung der Polypeptidkette von 70 bis 80 Aminosäuren verfügt. Darüber hinaus besitzen die SCGBs eine hoch konservierte Signalsequenz von 20 Aminosäuren [5].

Eine Kombination aus Bindungsstudien und computerunterstütztem Molekulardesign (molecular modeling) lieferten Hinweise, daß die UGB-Kavitäten sowohl im Mono- als auch im Dimer adäquate Voraussetzungen zur Bindung von hydrophoben, niedermolekularen Verbindungen wie Progesteron [51], polychlorierten Biphenylen PCB [52] oder Retinol [53] besitzen [15]. In Abb.2 C wird im UGB-Dimer der Ratte die Bindungssituation von PCB in der großen Kavität dargestellt. Der oben erwähnte Tyrosinrest (in der Graphik nicht gezeigt) koordiniert im Zusammenspiel mit den hydrophoben Aminosäuren die organische Verbindung [5, 54]. Obgleich diese Eigenschaft des UGB bzw. allgemein der SCGBs bis dato unverstanden ist, besteht die Möglichkeit, daß hierdurch die biochemischen Wirkungen dieser Verbindungen abgeschwächt werden [15]. Zudem wird durch die potentielle Bindung von Prostaglandinen in der UGB-Kavität eine Beteiligung in potentielle anti-inflammatorische und immunomodulatorische Mechanismen wahrscheinlich. Dies wird besonders durch die Arbeit von Levin *et al.* unterstrichen. Dieser konnte erstmals nachweisen, daß UGB die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂) inhibiert [55], was auch verifiziert werden konnte [56]. Die Hemmung unterdrückt in diesem Kontext die Bildung von Arachidonsäure [57] durch die Hydrolyse der Esterbindung von Phosphoglyceriden aus der Zellmembran durch PLA₂. Dabei bezeichnet AA die relevante Vorstufe zur biochemischen Synthese von proinflammatorischen Lipid-Mediatoren, die mit Hilfe von Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen zu Prostaglandine und Leukotriene metabolisiert werden.

Um die physiologische Bedeutung von UGB *in vivo* zu studieren, wurden in verschiedenen Laboren Knockout-Mäuse generiert. Dabei konnte beispielsweise festgestellt werden, daß UGB-defiziente Mäuse (UGB^{-/-}) deutliche morphologische Veränderungen in Clara-Zell-Ultrastrukturen im Vergleich zum Normaltier aufwiesen. Außerdem zeigten UGB^{-/-}-Mäuse in Gegenüberstellung zum WT eine 95%ige Verminderung des Endoplasmatischen Reticulums [58]. Die von Zhang *et al.* entwickelte UGB-null-Maus manifestierte einen auffälligen Phenotyp, der durch ein reduziertes Größenwachstum gekennzeichnet war.

Zudem konnten hier abnormale Ablagerungen von Fibronectin und Kollagen in den Nieren festgestellt werden [59]. Diverse Forschergruppen vermuten eine weitere Eigenschaft der SCGB in einem anderen physiologischen Kontext. So existieren Indizien, die für die Involvierung als Pheromon-Carrier in der biochemischen Kommunikation zwischen Organismen einer Spezies sprechen [3, 47, 60]. Generell konnten den SCGBs Carrier-Funktionen für einige biochemische Verbindungen und Polypeptiden zugesprochen werden. Hierzu gehört die Bindung von Steroiden und Fibronectin [59, 60]. Vieles um die biologischen Funktionen und die Implikation in zelluläre Prozesse der übrigen Vertreter der SCGB-Superfamilie ist momentan noch

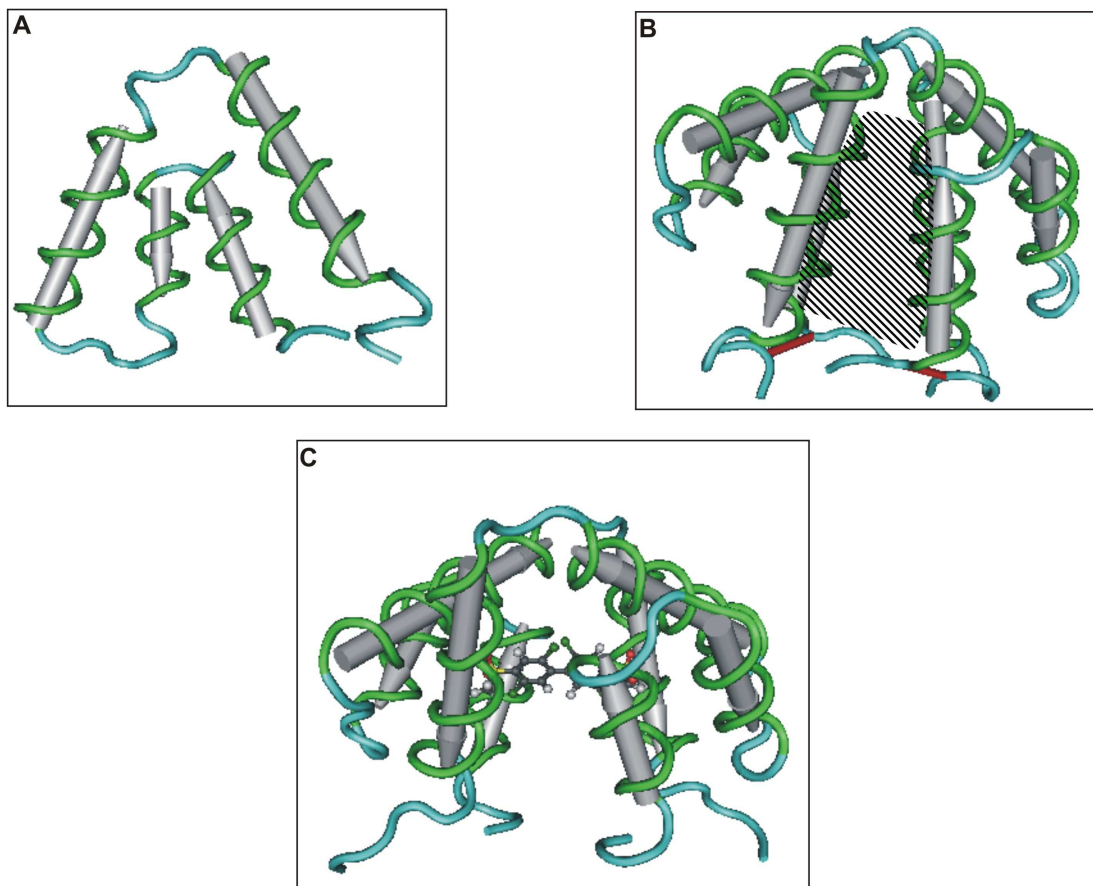


Abb.2: Strukturelle Charakteristika des Uteroglobins (UGB) aus Kaninchen [61] (A und B) sowie dem orthologen Proteindimer aus der Ratte [62] (C). Abbildung A zeigt die Tertiärstruktur des UGB-Monomers aus dem Kaninchen, die grauen Pfeile demonstrieren die Ausrichtung der entsprechenden α -Helix (grün markiert). Graphik B stellt das UGB-Homodimer aus dem Kaninchen dar. Die schwarz schraffierte Fläche weist auf die große, zentrale Kavität im Inneren des Komplexes hin. In rot sind die Disulfidbrücken markiert, die die Untereinheiten im Dimer stabilisieren. Abbildung C zeigt das UGB-Dimer aus der Ratte, welches im Zentrum der Kavität eine polychlorierte biphenyle Verbindung (PCB) komplexiert hat. Es ist unwahrscheinlich, daß UGB dieses Molekül bindet, da es sich dabei um keine natürlich vorkommende Verbindung handelt. Jedoch wird dadurch die Hydrophobizität der Kavität verdeutlicht.

im Dunklen und längst nicht in dem Maße erforscht, wie es bei Uteroglobulin der Fall ist. Daher stehen sie derzeit im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen, insbesondere auf Grund der Tatsache, da einige SCGBs im Verdacht stehen in neoplastischen Prozessen bzw. der Kanzerogenese involviert zu sein [1, 63-66]. So sind beispielsweise Mammaglobin 1 und Lipophilin B im Brustkrebs deutlich überexprimiert [9, 67, 68]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß Mammaglobin 2-Genexpression im Ovarialkarzinom hochreguliert ist [65]. Dagegen ist die HIN-1-Expression in Nichtkleinzelligen Karzinomen (NSCLC) der Lunge runterreguliert [3, 66]. Ebenso ist UGB-Genexpression im Prostatakarzinom vermindert, was mit dem Tumorgrad zu korrelieren scheint [64]. Dies erhärtet den Verdacht, daß die SCGB-Proteine eine funktionale Bedeutung in der Entwicklung diverser, humaner Krebsarten innehaben [1, 9, 14]. Die Erforschung des molekulargenetischen Hintergrundes der SCGB-Superfamilie ist daher auch in der medizinischen Krebs-Diagnostik von besonderer Bedeutung.

1.1.5 Implikation von Mammaglobin 1 und Lipophilin B in der Kanzerogenese

MGB1 sowie LipB bezeichnen Mitglieder der SCGB-Superfamilie und sind u.a. durch eine gewebsspezifische Expression gekennzeichnet. Insbesondere das Expressionsmuster des MGB1-Gens macht es in einem medizinischen-physiologischen Kontext zu einem Objekt intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen.

Das humane MGB1-Gen sowie -Protein ist in einem hohen Anteil in primären und metastatischen Brusttumoren nachzuweisen [69-72]. Dagegen erweist sich auch das normale Brustgewebe nach real time-PCR-Analyse positiv für MGB1-Transkripte [73], jedoch in einer weitaus geringeren Ausprägung. MGB1 zeichnet sich durch eine strenge gewebsspezifische Expression in epithelialen Brustzellen aus [35, 74]. Dieses Charakteristikum ermöglicht die Verwendung in der Krebsdiagnostik als Markerprotein zur Detektion von metastatischen Mammakarzinom-Zellen im Blut [75, 76]. Neueste Studien konnten zudem aufzeigen, daß MGB1 mit LipB im Brustgewebe ko-exprimiert werden [35] und zu einem heterodimeren Komplex kovalent assoziiert sind [34, 35]. Darüber hinaus existieren Beweise, die die strukturelle Organisation zu einem Heterotetramer, bestehend aus zwei Heterodimeren, belegen [35]. Das mRNA-Expressionsprofil von LipB zeigt eine hohe Korrelation im

Brustkrebs mit dem des MGB1-Muster [34, 35, 77]. Hinzu kommt, daß LipB in bis zu 70% aller Brusttumore überexprimiert ist [68, 78]. Interessanterweise bezeichnet LipB kein brustspezifisches Gen [34, 35]. So konnte es bislang in der Brust, Haut, Retina sowie im Skelettmuskel nachgewiesen werden [4]. Zudem wird es im Kolon- [41] und Ovarial-Karzinom [65] überexprimiert. Zur Zeit ist die generelle Relevanz dieses Komplexes im physiologischen Gefüge der Brustzelle sowie die Rolle in der Kanzerogenese nicht hinreichend geklärt. Ein Ansatz hierfür stellt die Erforschung der Expressionsregulation bzw. der Kontrollmechanismen der MGB1/LipB-Transkription dar. Momentan existieren einige Studien zur Regulationsproblematik von MGB1. Jedoch liegen keine Ergebnisse diesbezüglich für das LipB-Gen vor, so daß hier Aufklärungsbedarf besteht.

1.1.5.1 Strukturelle Charakteristika des MGB1/LipB-Komplexes

MGB1 und LipB werden im Mammakarzinom ko-exprimiert und treten auf Proteinebene assoziiert als Heterotetramer auf [35]. Analysen des gereinigten Komplexes ergaben, daß die jeweiligen monomeren Polypeptidketten antiparallel zueinander orientiert sind. Diese Konformation ermöglicht den drei Cysteinyresten der beiden Bindungsproteinen in enge Nachbarschaft zu rücken, so daß sie in der Lage sind Disulfidbrücken auszubilden [34]. Wie in Abschnitt 1.1.4 erläutert, besitzen die

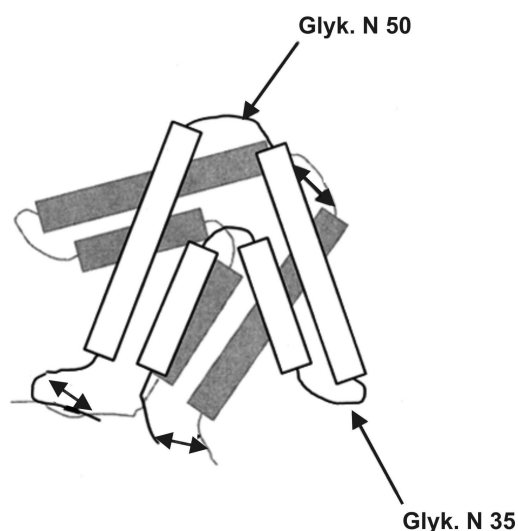


Abb.3: Schema des MGB1/LipB-Komplexes. Die Doppelpfeile markieren jeweils die Positionen der Disulfidbrücken im Komplex, währenddessen die Abkürzung Glyk. den Ort der N-Glykosylierung von MGB1 kennzeichnet (Graphik nach [34]). Lipophilin B ist grau unterlegt.

Mitglieder der SCGB-Superfamilie in den Positionen 1 und 70 ihrer Primärstruktur zwei konservierte Cysteine, wobei ein drittes Cystein nur im EMBP- und im MGB1/LipB-Komplex nachgewiesen werden konnte [35]. In der heterotetrameren Organisation wechselwirken zwei Heterodimere nur über nicht-kovalente Bindungen miteinander [35]. Das vorausgesagte Molekulargewicht des heterodimeren Komplexes betrug 16,2 kDa [34, 35]. Jedoch konnte anhand von Massenspektrometrie schließlich ein Molekulargewicht von 23,4 kDa ermittelt werden. Klärende Untersuchungen der gereinigten Proteine konnten hierzu an den Tag bringen, daß MGB1 glykosyliert ist [34]. Die strukturelle Voraussetzung hierfür bieten zwei potentielle Orte zur N-glykosidischen Bindung in der MGB1-Aminosäuresequenz. Diese befinden sich in den Schleifen an jedem Pol des globulären Proteins [34], wie in Abb.3 mit Pfeilen markiert wurde.

1.1.5.2 Forschungsstand zur Regulation der Mammaglobin 1-Expression

Aufgrund der Involvierung von Mammaglobin 1 im neoplastischen Geschehen im Brustgewebe, existiert diverse Arbeiten zur Klärung der Expressionsregulation und Identifizierung von funktionellen DNA-Motiven. So liefern u.a. die Ergebnisse von Shi, Watson und Hesselbrock Ansätze zum Verständnis des distalen bzw. proximalen MGB1-Promotors im Hinblick auf die Expressionssteuerung in Brustkrebs- sowie normalen Brust- bzw. Nicht-Brustzellen. Ungewöhnlich war in diesem Kontext die Entdeckung, daß innerhalb der ersten 1000 bp flankierend zum Transkriptionsstart des MGB1-Gens keine klassischen „steroid responsive elements“ *in silico* identifiziert werden konnten. Ebenso konnte keine Veränderung der Transkription in Steroidrezeptor-positiven Mammakarzinom-Zellen durch Estradiol, Progesteron oder Androgenen registriert werden. Lediglich zwei schwache ERE (**E**strogen **R**esponsive **E**lements)-Motive konnten lokalisiert werden [74]. Dafür konnten insgesamt vier PEA3-Konsensus-Sequenzen in der Upstream-Region detektiert werden. Das erhöhte Auftreten dieser Konsensus-Sequenz weist darauf hin, daß PEA3 regulatorisch Einfluß auf die Expression des MGB1-Gens nehmen könnte. Insbesondere jene in der Region stromaufwärts vom Transkriptionsstart (TSS) könnten expressionsrelevant sein. Außerhalb der 5'-untranslatierten Region (UTR) konnte darüber hinaus ein schwacher TATA-Konsensus als relevantes Promotor-Grundelement sowie vier

Sp1-DNA-Motive festgestellt werden. Jedoch bleibt die Funktionalität dieser Elemente im MGB1-Promotor noch zu klären.

In den Forschungsarbeiten von Shi *et. al.* wurde der Region stromaufwärts vom offenen Leseraster zwischen 4,4 und 5,5 kbp eine besondere Bedeutung für die Transkriptexpression zuerkannt. In diesem Bereich werden ein oder mehrere starke Enhancer-Elemente vermutet [79].

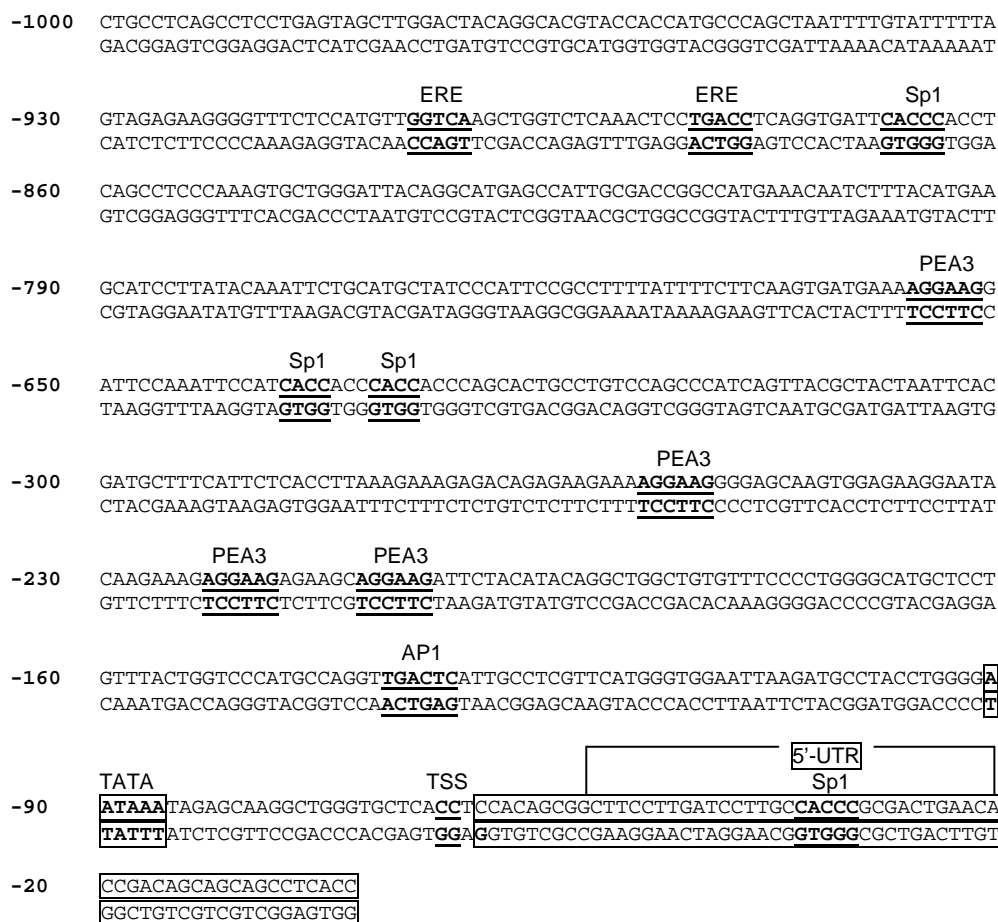


Abb.4: Nukleotidsequenz der distalen 1000 bp des Mammaglobin 1-Promotors. Die DNA-Motive wurden von Watson und Mitarbeiter *in silico* festgestellt (Graphik verändert nach [74]). TSS markiert den durch die Primer-Extension- sowie S1-Nuklease-Methode ermittelten Transkriptionsstart.

Außerdem legen ihre Ergebnisse den Schluß nahe, daß der Minimalpromotor mit einer Länge von 340 bp regulatorisch relevante Abschnitte beinhalten muß.

Nachfolgende Forschungsarbeiten konnten zeigen, daß die MGB1-Überexpression in Tumorzellen transkriptionell reguliert wird [80]. Hesselbrock und Mitarbeiter fanden hierzu heraus, daß die beiden Transkriptionsfaktoren AP1 und PEA3 (Polyomaenhancer-related) in der Expressionskontrolle involviert sind. Diese Aussage beruht

auf der Tatsache, daß sie in ihrer Arbeit funktionelle PEA3- sowie AP1-DNA-Motive im 200 bp Minimalpromotorbereich, d.h. stromaufwärts vom TSS (siehe Abb.4), identifizieren und deren Aktivität experimentell verifizieren konnten. Damit konnten sie die von Watson vorausgesagten PEA3-Motive experimentell bestätigen, zumindest jene proximal zum Transkriptionsstart. Überdies wurde im Core-Promotor ein repetitives Element vermutet, welches im Stande ist, die MGB1-Expression zu beeinflussen. Darüber hinaus scheint es mit dem PEA3-Motiv zu interagieren. Das PEA3-Protein ist für die medizinische Forschung von besonderem Interesse, da viele Brusttumore einen hochregulierten PEA3-Level aufweisen [81]. Wie weitere Studien belegen konnten, ist diese Überexpression mit dem metastatischen Phänotyp epithelialer Brustzellen assoziiert [82].

1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Therapie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom bezeichnet bei Frauen weltweit die häufigste neoplastische Erkrankung der Brustdrüse mit zunehmender Inzidenz [83, 84] (siehe Abb.5). In der westlichen Welt ist Brustkrebs die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr [85]. Nach Angaben der IARC (International Association on Research of Cancer) erkranken weltweit pro Jahr etwa 1,2 Millionen Frauen an Brustkrebs, 410000 davon erliegen dieser Erkrankung [86]. In Deutschland ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von 28% aller Krebsneuerkrankungen die häufigste Neuerkrankung maligner Neoplasien [87]. Hier erkrankten im Jahr 2002 nach der neuesten Schätzung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) etwa 55000 Frauen neu an Brustkrebs [88]. Die brustkrebsbedingte Letalität liegt über alle Stadien gemittelt in Deutschland bei ca. 30% [87], währenddessen die Mortalität sich in den letzten fünf Jahrzehnten in den Industriestaaten kaum verändert hat, wodurch sie an zweiter Stelle nach dem Lungenkarzinom steht [89]. Das Mammakarzinom tritt hauptsächlich bei Frauen auf, nur etwa jeder hundertste Erkrankte ist ein Mann. Nach Schätzungen sind es in Deutschland etwa 400 Männer im Jahr [90]. Die Bemühungen diese Krebserkrankung erfolgreich auszulöschen, scheitern nicht zuletzt daran, daß die molekularen Mechanismen zur Initiation und Progression des Mammakarzinoms nicht vollständig verstanden sind [89]. Bislang werden zwei Hauptrisiken zur

Brustkrebsentstehung diskutiert, welche einen genetischen bzw. erblichen oder hormonellen Hintergrund besitzen. Zum einen werden viele Mammakarzinome in ihrem Wachstum durch Hormone wie Estrogene und Gestagene beeinflusst. Dies zeigt sich besonders drastisch in der Tatsache, daß Estrogen- und progesteronhaltige Hormonpräparate das Erkrankungsrisiko um bis zu 45% erhöhen [91]. Derartige Medikamente kommen während der Hormonersatztherapie zur kurativen Behandlung von menopausalen Beschwerden zum Einsatz. Auch wird die Verwendung hormoneller Kontrazeptiva im Zusammenhang mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko kontrovers diskutiert. Zum anderen konnte hinsichtlich der genetischen Faktoren festgestellt werden, daß nur etwa 5% der Brustkrebserkrankungen erblich bedingt sind [92]. Hierbei besteht die höchste Wahrscheinlichkeit an der erblichen Form des Brustkrebses zu erkranken bei Frauen mit Mutation in den Brustkrebs-Genen BRCA1 und BRCA2 [93]. In diesem Kontext werden auch die Gene für HoxA5, p21^{WAF1/CIP1},

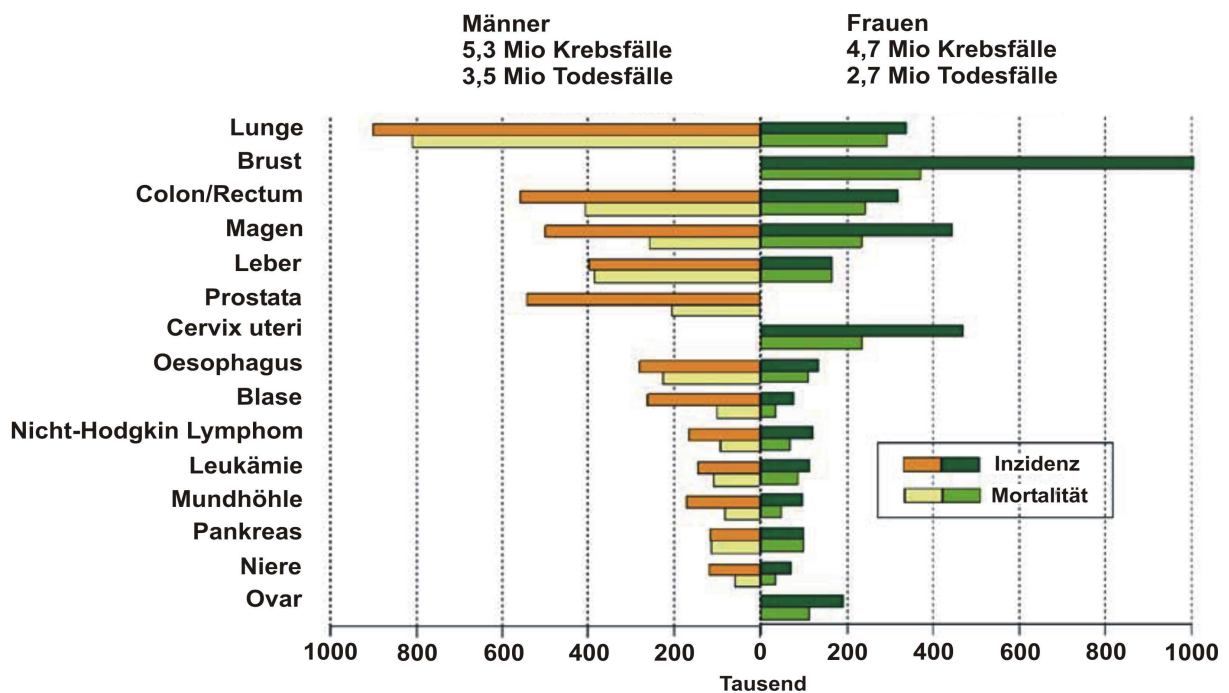


Abb.5: Geschätzte Statistik der globalen Krebsneuerkrankungen und krebssbedingte Todesfälle im Jahr 2002 [83, 84].

E-Cadherin sowie Steroidhormon- oder all-*trans*-Retinsäure Rezeptoren genannt [94]. Jedoch besitzen Frauen mit Mutationen in den BRCA1/2-Genen ein lebenslanges Brustkrebsrisiko von 65 bzw. 45% [93]. Die Mutationen, die im Zusammen-

hang mit der Karzinogenese der Brust angesehen werden, beinhalten Veränderungen der epigenetischen Chromatinstruktur [94]. Da solche Modifikationen reversibler Natur sind, stellen chemische Verbindungen, die das epigenetische Muster beeinflussen, potentiell neue Therapeutika bei der Bekämpfung des Mammakarzinoms dar [94]. Zu den Hauptparametern epigenetischer Ereignisse gehören die Histon-Acetylierung und die Methylierung regulatorischer CpG-Inseln der DNA. Diese nehmen direkt Einfluß auf die Chromatinstruktur, dem primären Regulator der Genexpression.

1.3 Epigenetische Ereignisse in der Genregulation

In den letzten 30 Jahren der Brustkrebsforschung wurde der Fokus des Interesses auf die Identifizierung von Mutationen und deren Einfluß auf die Karzinogenese der Brust gerichtet. Es konnte festgestellt werden, daß das Mammakarzinom eine Erkrankung beschreibt, in der durch erbliche Veränderungen der Nukleotide von Onko- und Suppressorgenen deren Expressionen entscheidend verändert werden. Hierin werden die kausalen Ereignisse zur Genese und Progression des Brustkrebses gesehen [95]. Die verantwortlichen Mechanismen sind epigenetischer Natur, zu denen insbesondere die Hypermethylierung der DNA sowie die Hypoacetylierung der Histone zählt [94-96]. Dadurch wird verständlich, daß intakte Prozesse zur Expressionsregulation für die genetische Integrität des Genoms unabdingbar sind.

1.3.1 CpG-Methylierungen und Regulation der Genexpression

Methylierungsreaktionen finden *in vivo* an definierten Positionen der DNA statt und gehen mit der Stilllegung der genetischen Aktivität einher. Sie definieren eine entscheidende epigenetische Modifikation des Genoms, welche in vielen zellregulatorischen Prozessen (embryonale Entwicklung, Transkription, Chromatinstruktur, X-Chromosom-Inaktivierung, genomisches Imprinting sowie Chromosomstabilität) involviert ist [94, 97]. Detailliert betrachtet korrelieren DNA-Methylierungen in regulativen Regionen wie Promotoren oder Enhancer-Elementen diverser Gene mit transkriptioneller Inaktivierung [98]. Gene in aktivem Zustand können in weiterführender Konsequenz zumeist als hypomethyliert bezeichnet werden, wohingegen hyper-

methylierte Gene in den meisten Fällen inaktiv sind. Es konnte nachgewiesen werden, daß die meisten CpG-Inseln gewebsspezifischer Gene inaktiviert sind [99], während jene ubiquitär und konstant exprimierter Gene hypomethyliert sind [100].

DNA-Methylierungen stellen essentielle Mechanismen für die normale Entwicklung in verschiedenen Organismen dar. Diese umfassen aus biochemischer Sicht, die enzymatisch gesteuerte Substitution einer Methylfunktion (-CH₃) an die C5-Position der heterozyklischen Pyrimidinbase Cytidin in CpG-Inseln der DNA zu 5-Methylcytidin 5-mC. Diese Inseln bezeichnen bestimmte Areale in eukaryotischen DNA-Promotorsequenzen, die eine statistisch erhöhte CG-Dinukleotiddichte aufweisen. Sie sind daher von besonderer Bedeutung, da an anderen Stellen in den Genomen vieler Tier- und Pflanzenarten besagtes Nukleotidpaar seltener vorkommt, als aus rein statistischen Abschätzungen aufgrund der Kombinationsmöglichkeiten der vier Basen zu erwarten wäre. Dies kann als Ergebnis eines Selektionsprozesses angesehen werden, da CpG-Folgen Hot Spots für Mutationen sind. Der Grund hierfür ist darin zu sehen, daß Cytosin-Reste in einem CG-Nukleotiddoublet von Mammalia-Genomen oftmals methyliert vorliegen. Durch hydrolytische Desaminierungsreaktionen von 5-mC kann dauerhaft Thymin entstehen, welches nicht von den DNA-Glykosylasen des Reparatursystems erkannt wird [101]. Ebenso kann aus Cytosin durch die gleiche Reaktion Uracil spontan gebildet werden, jedoch ist die Umwandlungsrate bei 5-mC ungleich höher (siehe Abb.6) [102].

Die Methylierung von Cytosin spielt eine überaus wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen, weswegen das Methylierungsprofil einer Zelle während der frühen Entwicklung kontrolliert wird. Die Modifikation von Cytosin-Resten zu 5-mC erfolgt direkt im Anschluß an die DNA-Replikation. DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysieren die Übertragung einer Methylfunktion von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methyldonator auf Cytosin (siehe Abb.6). Verantwortlich für die Substitution der Methylfunktionalitäten sind dabei zwei Typen von DNMTs: *de novo*- und „maintenance“-Methyltransferasen [103].

Die DNMT1 sorgt mit extremer Genauigkeit für die Weitergabe und Erhaltung des Methylierungsmusters mit jeder Zellteilung. Für die Funktion notwendig ist die Existenz von 5-mC-Basen im parentalen DNA-Strang, d.h. das Enzym überführt die hemimethylierte in vollständig methylierte DNA. Die DNMT3a/3b währenddessen

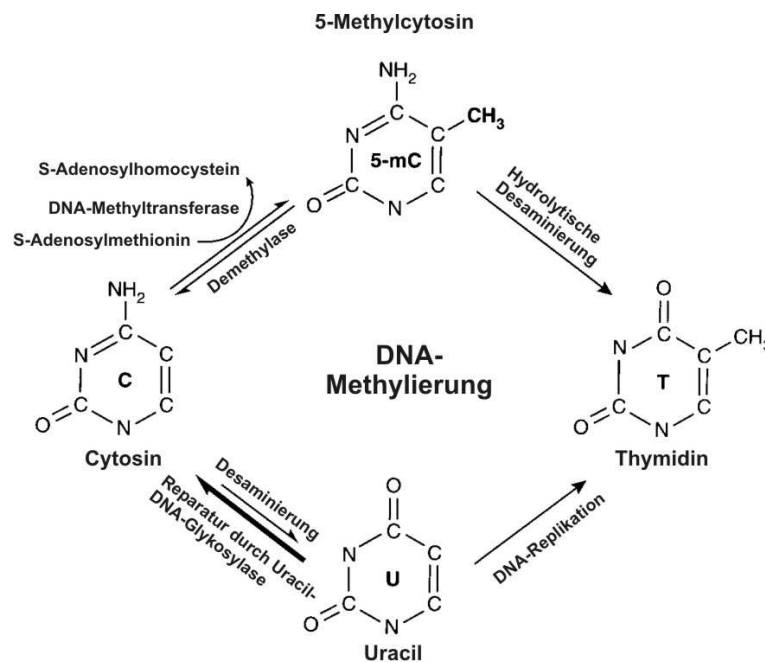


Abb.6: Schematische Darstellung der biochemischen Reaktionswege zur Methylierung von Cytosin in regulatorischen CpG-Boxen. Zudem werden die mutagenen Reaktionen von 5-mC sowie Cytosin dargestellt (Graphik nach [104]).

sorgt in frühen Entwicklungsstadien einer Zelle für die *de novo*-Methylierung von CpG-Folgen. Dieses Enzym ist nicht auf Methylreste im parentalen Strang angewiesen.

1.3.1.1 Molekularer Mechanismus der DNA-Methylierung

Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden innerhalb der regulatorischer Promotorregion eines Gens ist mit der Repression der transkriptionellen Aktivität assoziiert [98, 105, 106]. Die CpG-Methylierung reprimiert die Transkription entweder direkt durch Verdrängung von spezifischen Transkriptionsfaktoren oder durch die Rekrutierung von Proteinen mit einer hohen Affinität für methylierte DNA sowie assoziierten repressiven Chromatin-Remodelling-Aktivitäten (siehe Abb.7 **B** und **C**) [57, 107]. Zum ersten Mechanismus (Abb.7 **B**); hierbei wird die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) durch die Maskierung von Cytidin mit Methylfunktionen verhindert. Diverse TFs (wie AP2, CREB, E2F und NF- κ B) benötigen CpG-Reste zur Erkennung ihres *cis*-regulatorischen Elementes, weswegen Cytidin-Methylierungen eine Interaktion inhibieren [108, 109]. Darüber hinaus existieren TFs

(SP1 und CTF), die nicht sensitiv gegenüber 5-mC in ihrem Konsensus-Element sind [110]. Ein weiterer potentieller Mechanismus zur Stilllegung genetischer Aktivität durch DNA-Methylierungen, besteht in der direkten Bindung von Transkriptionsrepressoren an 5-mC (Abb.7 C) [103].

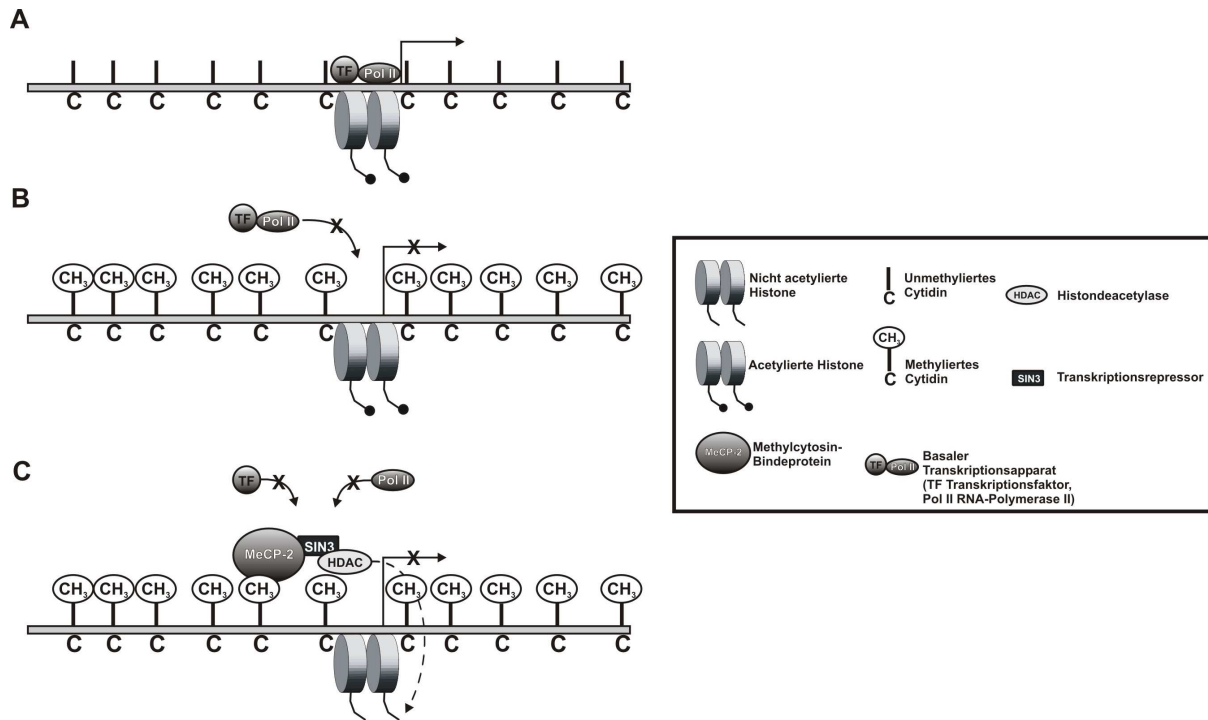


Abb.7: Die Mechanismen der transkriptionellen Repression durch DNA-Methylierungen (Graphik nach [104]). **A)** beschreibt die aktive, nicht reprimierte Transkription am DNA-Promotor, **B)** Repression der Genexpression durch Inhibition der TF-Interaktion mit entsprechenden *cis*-regulatorischen Elementen der DNA. **C)** Indirekte Repression der Transkription durch Bindung von MeCP-2. Dieses Protein wechselwirkt bevorzugt mit DNA-Sequenzen, die eine 5-mC-Base enthalten. MeCP-2 bildet eine Plattform für weitere repressorische Proteine wie SIN3 und HDACs.

1992 konnten Lewis und Mitarbeiter das Repressorprotein MeCP-2 isolieren und charakterisieren [111]. Dieses Polypeptid bindet spezifisch an methylierte DNA und bewirkt dadurch eine sterische Blockade der Bindung von TFs. Zudem verfügt es über zwei Bindungsdomänen. Einerseits ermöglicht die MBD-(**M**ethyl-**C**pG-**B**inde-) Domäne die Erkennung eines symmetrisch methylierten CpG-Dinukleotids über Kontakte mit der großen Rinne der Doppelhelix [112]. Andererseits besitzt es eine transkriptionelle Repressor-Domäne (TRD), die mit einigen anderen regulatorischen Proteinen interagiert [113]. Hierzu gehört ein Ko-Repressor-Komplex, bestehend aus dem Repressor bzw. Adapterprotein SIN3 (switch independent) sowie Histon-

Deacetylasen (HDAC). Insbesondere die Beteiligung letzterer Proteinklasse verdeutlicht, daß zwei prinzipielle, regulatorische Mechanismen durch MeCP-2 miteinander verwoben sind. HDACs führen durch Deacetylierung verschiedener Lysinreste, vornehmlich an den Histonen H3 und H4, zu Konformationsänderungen der Nukleosomen, woraus schließlich eine weitere transkriptionelle Suppressorfunktion resultiert. Diese sieht die Kondensation des Chromatins vor [94, 114]. Es ist heutzutage bekannt, daß die CpG-Hypermethylierung nur eine Facette im Prozeß zum „gene silencing“ darstellt (siehe Abb.9) [115]. Der Mechanismus hierzu beinhaltet zudem Veränderungen der Chromatinstruktur sowie der Histonmodifizierung [116, 117]. Dies impliziert die Histon H3 und H4-Deacetylierung [118], die Methylierung des Lysins 9 im Histon H3 [119] und die SUMOylierung von H4 [120]. Der CpG-Methylierung kommt dabei im epigenetischen Sinne eine stabilisierende Funktion bei der transkriptionellen Inaktivierung zu.

1.3.2 Nukleosomale Organisation und Genregulation

Das Chromatin ist ein integraler und dynamischer Bestandteil in der Maschinerie zur Regulation der Genexpression [121]. Es existieren ausführliche Arbeiten, die belegen, daß die meisten posttranskriptionelle Modifikationen an den flexiblen Enden der Histone stattfinden [122, 123]. In diesen Bereichen haben kovalente Modifikationen wie Acetylierungen weitreichende Konsequenzen hinsichtlich der Wechselwirkung mit benachbarten Nukleosomen-Kernen und deren übergeordneter Chromatinstruktur. Die Substitution von Acetylfunktionen bewirkt hier die Neutralisierung der positiven Partialladung der Lysinreste. Die Folge hieraus ist, daß sich die Affinität zur negativ geladenen, nukleosomalen DNA verringert [124]. Die Konformation des Chromatins verändert bzw. lockert sich [125] und erhöht dadurch die Zugänglichkeit für regulatorische Transkriptionsproteine an das DNA-Template [126]. Histonacetylierungen werden von einer Reihe von Enzymen der Histonacetyltransferase-Gruppe (HAT) katalysiert. Diese übertragen die Acetylfunktion von Acetyl-CoA auf die ϵ -Aminogruppe von Lysinen. Dem gegenüber stehen Histon-Deacetylasen (HDAC), welche die Entfernung von Acetylsubstitutionen katalysieren. An dieser Stelle sollte nicht außer Acht gelassen werden, daß die Zelle weitere Modifikationen der Nukleosomen-Kerne sich zu eigen macht. Beispielhaft zu erwähnen sind in diesem Kontext

Histon-Methylierungen. So stellt die Methylierung des H3 Lysins 9 sowie 27 eine Markierung zur Repression der genetischen Aktivität dar. Der Grund hierfür ist, daß das Heterochomatin-Protein 1 (HP1) spezifisch an methyliertes K9 bindet und so zur Kondensation des Chromatins beiträgt [127].

Umgekehrt geht eine Methylierung von K4 und gleichzeitiger Acetylierung von K14

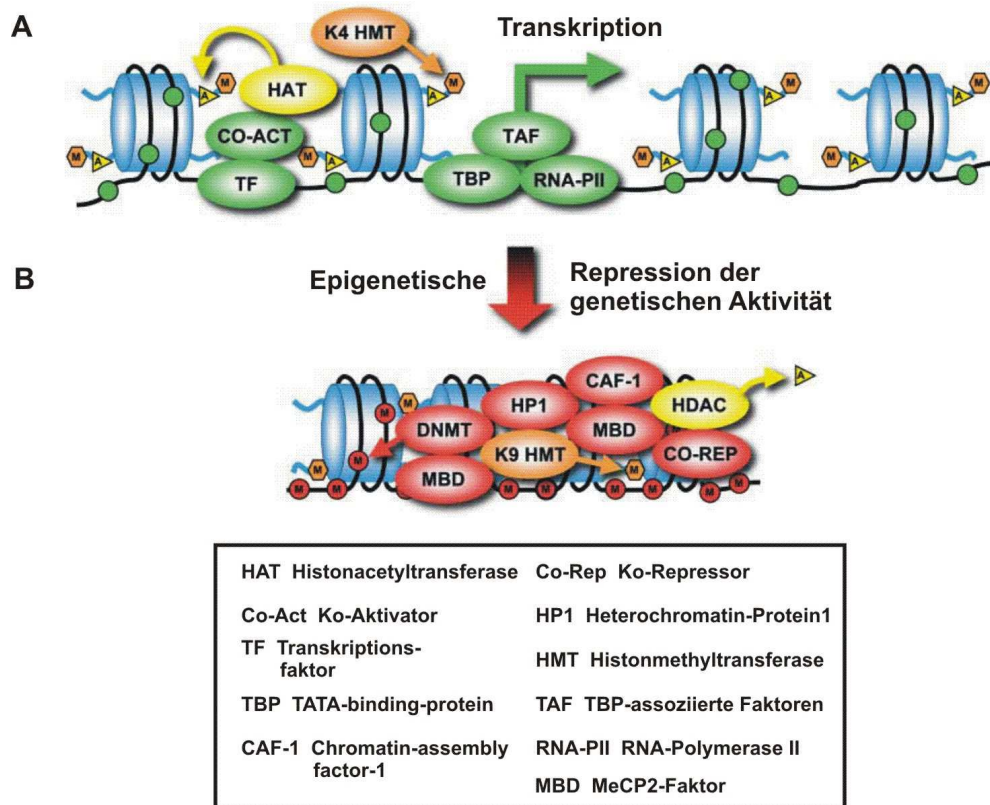


Abb.8: Schematische Darstellung des Mechanismus der epigenetischen Inaktivierung der Genaktivität (Graphik nach [115]). Jedoch ist es auch nach intensiver Forschung schwer, das Zusammenwirken sowie die Interpretation der Vielzahl der epi- bzw. molekulargenetischen Ereignisse in einem konsistenten, hypothetischen Modell zu erfassen [115]. Dokumentiert ist die Vorstellung zur koordinierten Rekrutierung von Histon-modifizierenden Aktivitäten im Zusammenspiel mit CpG-Methylierungen. Dies erfüllt den Zweck der regulatorischen Kondensierung bzw. Dekondensation des Chromatins und der damit verbundenen (Un)Zugänglichkeit des Initiationskomplexes sowie des basalen Transkriptionsapparates an die entsprechenden DNA-Bereiche (in der Graphik als schwarzes Band markiert). Bezeichnet werden hiermit CpG-reiche Promotorareale, an denen dieses regulatorische Ereignis nachweisbar ist. Unmethylierte CpG-Dinukleotide sind in der Graphik grün unterlegte Kugeln, während methylierte Dinukleotide rote Kugel symbolisieren. Histonmodifizierungen sind mit Drei- bzw. Sechsecken markiert. Aktivierende Proteine sind zudem grüne, reprimierende Faktoren rote Ovale. **A)** zeigt den Euchromatin-Status, d.h. das Chromatin weist durch die Konformation der Nukleosomen eine allgemeine Auflockerung auf. Dadurch sind kleine, definierte Regionen des DNA-Stranges zugänglich für Komponenten der Transkriptionsmaschinerie. **B)** Die epigenetische Repression der Transkription. Die Hypoacetylierung geht mit der Kondensation des Chromatins sowie der Reprimierung der genetischen Expression einher, während hingegen hyperacetylierte Histone die Transkriptionsaktivität erhöhen [114, 128].

mit der Aktivierung der Genexpression einher [127]. Damit soll hervorgehoben werden, daß multiple Markierungen der flexiblen, aminoterminalen Enden die

Oberfläche nukleosomaler Histone in jeweils eigentümlicher Weise, zum Zweck der Kommunizierung mit ihrer Umgebung, modifizieren. Transkriptionell inaktive DNA-Regionen weisen allerdings neben Anreicherungen hypoacetylierter Histone auch CpG-Hypermethylierungen in den betreffenden Abschnitten auf [110]. Das molekular-genetische Bindeglied zwischen DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung besteht im MeCP2-Protein, welches für die Assemblierung eines repressorischen Multi-proteinkomplexes mit intrinsischer HDAC-Aktivität sorgt [57, 129]. Um den multi-dimensionalen Charakter epigenetischer Regulation zu dokumentieren, soll Abbildung 8 **A** und **B** ein Eindruck darüber vermitteln, wie das Zusammenspiel von CpG-Methylierung und Histonmodifizierung zur genetischen Aktivierung bzw. Repression führt.

1.4 Pharmakologische Eingriffe in die epigenetische Genregulation

1.4.1 DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTI)

Die Reversibilität aberranter epigenetischer Regulierungsmuster der DNA liefert die Grundlage für den Einsatz von niedermolekularen Inhibitoren in der modernen Krebstherapie. Zu den am ausführlichsten untersuchten Verbindungen dieser Hemmstoffklasse gehören DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTI) [130]. Diese lassen sich in zwei Gruppen untergliedern, Nukleosid-DNMTI sowie Nicht-Nukleosid-DNMTI. Der archetypische Vertreter der ersten Gruppe ist 5-Azacytidin (5-Aza-CR), ein einfaches Derivat des Nukleosids Cytidin [131, 132]. Ein weiterer DNMTI bezeichnet 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-CdR, Decitabin) [131]. Hierbei handelt es sich um ein Desoxyribose-Analogon von 5-Azacytidin, welches derzeit aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften zur Therapie myelodysplastischer Syndrome (MDS) verwendet wird [133, 134]. Der Wirkmechanismus von 5-Aza-CR und seinen Analoga setzt die Inkorporation in die DNA voraus [135], was in der deutlich verminderten enzymatischen Aktivität der DNMT mündet [130, 136, 137]. Zu diesem Zweck müssen diese Verbindungen von der Zelle aufgenommen und in die entsprechenden Desoxynukleotidtriphosphate umgewandelt werden, bevor sie während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA anstelle von Cytosin eingebaut werden können (siehe Abb.10, **A**). Dort werden sie von den DNA-Methyltransferasen im Kontext mit Guanin

als natürliches Substrat erkannt [138]. Cytidin-Analoga sind Mechanismus-basierte Hemmstoffe, deren inhibitorische Reaktionswege gut untersucht sind [132]. Der katalytische Mechanismus aller DNMTs zur Cytidin-Methylierung ist in Abbildung 9 B dargestellt [138-140].

1.4.2 Der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin

In der vorliegenden Arbeit kam 5-Aza-CdR zum Einsatz, um den potentiellen epigenetischen Einfluß von CpG-Methylierungen auf die MGB1/LipB-Expression im biologischen Kontext einer GPx4-transfizierten Mammakarzinom-Zelle zu bewerten. Daher soll im Folgenden kurz auf versuchsrelevante Eigenschaften dieses Hemmstoffes eingegangen werden.

Allen Azanukleotiden gemein ist ihre hinlänglich bekannte Instabilität, was eine sorgfältige Handhabung in Labor und Klinik erfordert [141]. Wässrige Lösungen dieser Verbindungen weisen eine hohe Zerfallsrate auf. So erfolgt in alkalischer Lösung eine schnelle reversible Öffnung der Ringstruktur zu N-(Formylamidino)-N'-β-D-2'-deoxyribofuranosyl-Harnstoff gefolgt von einem irreversiblen Verlust einer Acylfunktion (R-(C=O)) hin zu 1-β-D-2'-deoxyribofuranosyl-3-Guanylharnstoff [142, 143]. In saurer Lösung wird die glykosidische Bindung des Azanukleotids in 5-Azacytosin und Desoxyribose gespalten [144]. Stresemann und Lyko untersuchten die Stabilität und die Halbwertszeit von Azanukleotiden in pH-neutralen, wäßrigen Lösungen und kamen zu der Erkenntnis, daß bei einer Temperatur von 4°C die Halbwertszeit 7 Tage betrug [141]. Mit steigender Temperatur verlagerte sich jedoch das Reaktionsgleichgewicht zu Gunsten der Addukte. Nach Inkubation bei 37°C konnte schließlich eine Halbwertszeit für 5-Aza-CdR von 20-21h gemessen werden [141, 145]. *In vivo* tragen zusätzliche Faktoren zur Instabilität von Azanukleotiden bzw. 5-Aza-CdR bei. Man analysierte daher die Stabilität und DNA-Methylierung in einem biologischen Zellmodell (HCT116-Zellen). Die Analyse der Cytosinmethylierung bei einer 5-Aza-CdR-Konzentration von 2 µM ergab, eine progressive Demethylierung nach 1,6,5 sowie 48h, wobei der letzte Zeitpunkt das Maximum anzeigte [141]. Auch nach einer Inkubation von 72h konnte der inhibitorische Effekt auf die DNMTs registriert werden. Dies bestätigte die Annahme, daß eine anhaltende Exposition mit 5-Aza-CdR eine stärkere Demethylierung verursacht [146].

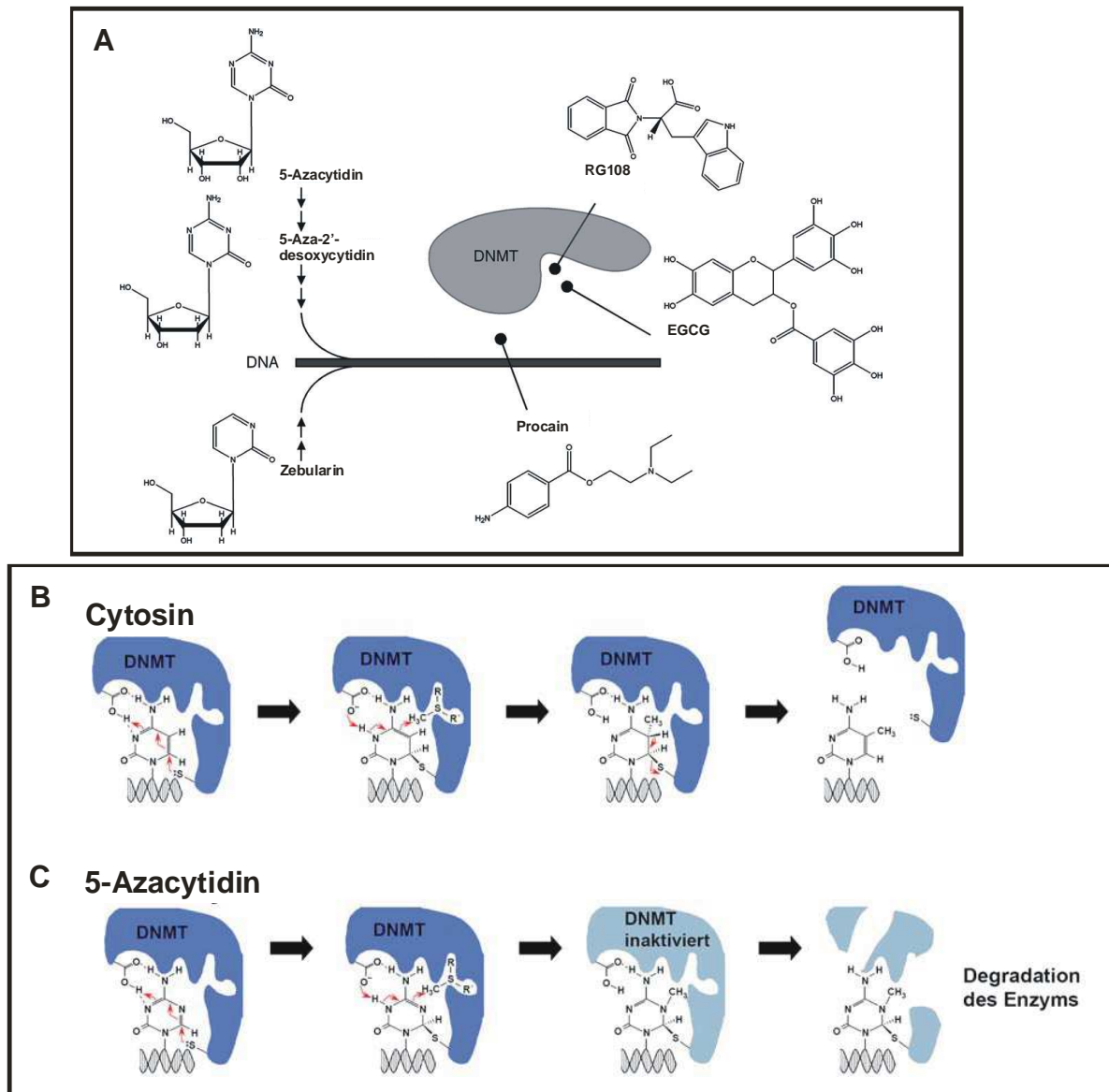


Abb.9: A) Die Strukturformeln der verschiedenen DNA-Methyltransferase-Inhibitoren sowie deren Zielort für die inhibitorische Wirkung (Graphik nach [130]). Dargestellt sind die Nukleosid-DNMTIs 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-desoxycytidin und Zebularin. Diese Verbindungen werden durch zelluläre Stoffwechselffade metabolisiert, bevor sie in die DNA inkorporiert werden (dargestellt durch kleine schwarze Pfeile). Die inhibitorische Wirkung beruht auf kovalenten Bindung des Enzyms. Nicht-Nukleosid-DNMTIs werden nicht in den wachsenden DNA-Strang eingebaut. Sie entfalten ihre Wirkung durch Blockierung der katalytischen Tasche von freien DNMTs [130]. Procain hingegen bindet an CpG-reiche Sequenzen, wodurch das Erkennungselement der DNA-Methyltransferasen maskiert wird [130]. Reaktionsmechanismen am unmethylierten bzw. methylierten Cytosin. **B)** Schema des Katalysemechanismus der CpG-Methylierung durch DNMTs (verändert nach [141]). Durch den nukleophilen Angriff einer Thiolfunktion an die C6-Position der heterozyklischen Nukleobase wird ein kovalent gebundenes Protein-DNA-Intermediat gebildet, welches durch SAM an C5 methyliert werden kann. Nach einer β -Eliminierung wird das methylierte Cytidin aus der Enzymtasche entlassen. **C)** Schema des Inhibitionsmechanismus der Nukleosid-DNMTIs am Beispiel von 5-Azacytosin. Die kovalente Bindung zwischen dem Enzym und der DNA kann nicht über eine β -Eliminierungsreaktion aufgelöst werden, da sich an der Position 5 der Base ein Stickstoff befindet. Die Konsequenz ist die Erhaltung des kovalenten gebundenen Protein-DNA-Intermediates [147, 148]. Die DNMT ist somit inaktiviert und führt zur späteren Degradation des Enzyms. Die Methylierungen der DNA werden nicht mehr vollständig kopiert, was letztlich zur Demethylierung führt.

1.4.3 Histonacetylasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs)

Die dynamische Histonacetylierung in eukaryotischen Zellen an regulierenden Genloci wird durch die enzymatischen Aktivitäten von Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDAC) reguliert. Insbesondere HDACs haben sich im Laufe der Zeit als Zielproteine für die Entwicklung von Inhibitoren zur Behandlung von Krebs herausgebildet. Anlaß hierzu war die Tatsache, daß die HDAC-Aktivität in Krebszellen ausnahmslos erhöht ist, was mit veränderter Transkription, beeinträchtigteter Differenzierung und Dysregulation der Proliferation einhergeht [149]. HATs beschreiben häufig transkriptionelle Ko-Aktivatoren, die, sobald sie an den Promotor rekrutiert werden, den Level acetylierter Histonproteine sowie die transkriptionelle Aktivität erhöhen [150]. Sie katalysieren den Transfer von Acetylfunktionen auf die partiell positiv geladene ϵ -Aminogruppe von Lysinreste in den flexiblen, aminoterminalen Enden der Histone H3 und H4.

In Säugetieren konnten bislang 18 HDACs identifiziert werden [139]. Diese werden in drei Hauptgruppen bzw. -klassen unterteilt, basierend auf ihrer strukturellen Homologie zu den drei HDACs in der Hefe [151]. Klasse I und II sind dadurch charakterisiert, daß ihr enzymatische Katalyse unabhängig vom Kofaktor NAD^+ abläuft. Sie besitzen ein enzymatisch wirksames Zinkion im aktiven Zentrum. Überdies weisen HDAC I und II-Enzyme katalytisch relevante Wassermoleküle auf [151]. Der Mechanismus der Katalyse dieser beiden Gruppen ist folglich gleich und verläuft NAD^+ -unabhängig. Klasse III HDACs hingegen besteht aus einer großen Familie der Sirtuine, die über einen NAD^+ -abhängigen Katalysemechanismus wirksam sind [139, 152]. Jene Enzymklasse ist nahezu gänzlich unempfindlich gegenüber den bislang erforscht und entwickelten HDACIs [153, 154]. Untersuchungen an Core-Histonproteinen konnten belegen, daß die Histonacetylierung sowie –deacetylierung ist ein hochdynamischer Prozeß ist [155].

1.4.3.1 HDAC-Inhibitoren: Mechanismus und Wirkstoffklassen

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI) stellen eine äußerst heterogene Gruppe von Molekülen mit unterschiedlichen biologischen Wirkungsmustern dar. Bis dato konnten sieben strukturell sowie mechanistisch unterschiedliche HDACI-Klassen

identifiziert werden [151]: Kurzkettige Fettsäuren (z.B. Butyrat), Hydroxaminsäuren (z.B. (*R*)-Trichostatin A, SAHA, Oxamflatin), Epoxyketone (z.B. Trapoxin A), Zyklische Peptide (z.B. Apicidin), Benzamide (z.B. MS-275), Hybridmoleküle (z.B. CHAP31). Diese Inhibitorclassen entfalten ihre Wirkung, indem sie in verschiedenen Konzentrationen an das katalytische Zentrum von HDAC I und II-Enzymen binden [151]. Die Mechanismen der Inhibitionsreaktionen (soweit bekannt) variieren dabei mit den jeweiligen Hemmstoffklassen, und würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen, wären jene detailliert an dieser Stelle beschrieben. Daher sollen im weiteren nur die Inhibitoren bzw. Inhibitorclassen näher erläutert werden, die Verwendung in der vorliegenden Arbeit fanden. Zu jenen Verbindungen gehören (*R*)-Trichostatin A [156] sowie Natriumbutyrat (NaBu), die zwei strukturell unterschiedliche Hemmstoffklassen beschreiben (siehe Abb.10 **A**).

Hydroxaminsäuren wie TSA bilden eine Gruppe von sehr potenten Inhibitoren, die bereits bei nanomolaren Konzentrationen eine ausreichende Aktivität besitzen, um die HDAC Enzyme I und II reversibel zu inhibieren [157]. Hinsichtlich der Aufklärung des Inhibitionsmechanismus wurden kristallographische Studien an HDAC-ähnlichen Proteinen (HDLP) durchgeführt [157]. Hierzu wurden HDLPs mit dieser Hemmstoffklasse ko-kristallisiert. In diesem Kontext konnte festgestellt werden, daß Inhibitoren des Hydroxaminsäure-Typs wie TSA über drei relevante strukturelle Komponenten verfügen: a) die Zink-Bindungsgruppe (ZBG) bzw. die Hydroxaminsäurefunktion, b) den hydrophoben Spacer und c) die hydrophobe Kappe [151]. Weitere Informationen zum inhibitorischen Mechanismus der Hydroxaminsäuren sind der Abbildung 10 **B** zu entnehmen. Der zweite, in dieser Arbeit verwendete Inhibitor, wirkt vermutlich über einen anderen Mechanismus. Natriumbutyrat stellt das Natriumsalz der Monocarbonsäure Butansäure dar. Kurzkettige Fettsäuren haben eine wesentlich geringere inhibitorische Wirkung, so daß wirksame Konzentrationen im millimolaren Bereich liegen [151]. Auch in diesem Fall tritt die Inhibition der enzymatischen Aktivität der HDACs durch Blockierung des katalytischen Zentrums ein. Hierzu koordiniert die Carboxylfunktion das katalytische Zinkion, wenngleich wesentlich schwächer als im Fall der Hydroxaminsäuren [139, 151]. Möglicherweise binden zwei Butyrat-Moleküle in der katalytischen Kavität. Jedoch ist der genaue Mechanismus der kurzkettigen Fettsäuren derzeit unbekannt [158].

Expression ↑	Physiologische Funktion	Quellennachweis
Fas/Fas-Ligand	Proapoptotisches Protein	[162]
p53	Proapoptotisches Protein	[163]
Caspase 3	Cystein-Protease als Bestandteil der Apoptose	[164, 165]
p21 ^{WAF1/CIP1}	Protein der Zellzyklus-Regulation	[166, 167]
Expression ↓	Physiologische Funktion	Quellennachweis
TGF-β	Protein zur Regulation und Differenzierung über TGF-β Typ II-Rezeptor	[168, 169]
VEGF	Relevanter Faktor der Angiogenese	[163, 170]
Cyclin A	Zellzyklus-Regulator	[171]
Cyclin B	Zellzyklus-Regulator	[171]

Tab.1: Von Histondeacetylasen regulierte, pathogenetisch relevante Proteine. Deren Expression wird als Antwort auf die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren verändert.

Angiogenese [163] als weitere Faktoren der Tumorregression durch HDACIs *in vivo* diskutiert. Die transkriptionelle Aktivierung der HDACIs ist demzufolge sehr selektiv; allerdings wird die Transkription von weniger als 2% der exprimierten Gene verändert [172]. HDAC-Inhibitoren scheinen somit nur die Transkription eines bestimmten Anteils von Genen zu beeinflussen [118]. Allerdings ist der Mechanismus der selektiven Modulation der Genexpression in weiten Teilen nur mangelhaft geklärt.

1.4.3.3 Der HDAC-Inhibitor (R)-Trichostatin A

(R)-Trichostatin A ([R-(E,E)-7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamid), TSA) ist ein äußerst wirksamer Inhibitor des Zellzyklus, der zudem ein Auslöser von morphologischer Reversion des transformierten Phänotyps darstellt [173, 174]. Stereoselektive Analysen ergaben, daß die natürlich vorkommende Konfiguration das (R)-Enantiomer beschreibt, welches ausschließlich biologisch und physiologisch aktiv ist [175]. Die inhibitorische Wirkung konnten durch Experimente an aufgereinigten murinen HDACs belegt werden [176]. Schon in nanomolaren Konzentrationen induziert TSA spezifisch und reversibel eine Hyperacetylierung von Histonen. Die Konzentration, bei der 50% der HDAC-Aktivität verringert ist (IC₅₀), beträgt *in vitro* zwischen 1,4 und 38 nM für verschiedene HDACs [177-179]. Darüber hinaus gehört zu den prominentesten pharmakologischen Charakteristika

die Inhibition der Zellzyklusprogression, Induktion der Zelldifferenzierung und der Apoptose in zahlreichen neoplastischen Zellarten.

Derzeit existieren zahlreiche Arbeiten, die den Einfluß von (*R*)-Trichostatin A auf den Zellzyklus *in vitro* erforschen. In diesem Kontext konnte nachgewiesen werden, daß TSA einen Zellzyklusarrest in der G1 und G2/M-Phase induzieren kann [180, 181]. Die Experimente von Tóth konnten diese Erkenntnisse spezifizieren, indem sie zeigen konnten, daß die Effekte auf den Zellzyklus abhängig von der TSA-Konzentration und der verwendeten Inkubationszeit waren. So ergab eine Behandlung mit Konzentrationen von 50 und 100 ng/ml über 12 Stunden einen moderaten Zellzyklusstop in der G1- und in der G2/M-Phase. Nach einer Inkubation von 24 Stunden konnte allerdings ein ausgeprägter Arrest in der S-Phase festgestellt werden [182]. Der kausale Hintergrund des induzierten Zellzyklusarrests besteht in der Hochregulierung des p21^{WAF1/CIP1}-Gens, einem relevanten Tumorsuppressor sowie Regulator des Zellzyklus. Hierin agiert p21^{WAF1/CIP1} als Inhibitor (CKI), der Cyclin abhängige Kinasen (CDK) bindet und dadurch deren enzymatische Aktivität reprimiert. Dies hat letztlich die Suppression der Zellproliferation zu Folge [183]. Normalerweise wird die p21^{WAF1/CIP1}-Expression durch p53 infolge eines DNA-Schadens induziert [184], jedoch ist die HDAC-Inhibition mit einer p53-unabhängigen Induzierung des CKI-Gens verbunden [159]. Der genaue Mechanismus ist bislang nicht dokumentiert, allerdings gilt als geklärt, daß dieser innerhalb des p21-Promotors ein Sp1-Bindungsmotiv benötigt [185, 186].

1.4.3.4 Der HDAC-Inhibitor Butyrat

HDAC-Inhibitoren aus der Klasse der kurzkettigen Fettsäuren gehören zu den wichtigsten nicht-Hydroxamat-Hemmstoffen [139]. Obgleich ihre inhibitorische Aktivität deutlich geringer ist ($IC_{50} > 0,1$ mM) als die der Hydroxaminsäure-Verbindungen, verfügen sie dennoch über antiproliferative sowie differenzierende Eigenschaften in verschiedenen Krebszellen [187, 188]. Natriumbutyrat (NaBu) bezeichnet ein kurzkettiges Carboxylsäure-Derivat, das natürlicherweise durch bakteriell-anaerobe Fermentation von Ballaststoffen bzw. nichtresorbierter komplexer Kohlenhydrate im Säugetier-Kolon gebildet wird [189, 190]. Als Hauptenergielieferant der Kolonozyten wird es von diesen via β -Oxidation metabolisiert [191] und stimuliert gleichzeitig

deren physiologische Proliferation *in vivo* [192, 193]. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß Butyrat in millimolaren Konzentrationen auf eine Vielzahl maligner Zellen antineoplastisch wirkt. Hierunter fallen die Regression der Zellproliferation, Aktivierung der Differenzierung sowie die Wiederherstellung des normalen Phänotyps [194].

Zur Klärung der molekularen Mechanismen von Butyrat wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Experimente durchgeführt. So ging aus vergleichenden Studien mit (*R*)-Trichostatin A hervor, daß Butyrat einen Arrest hauptsächlich in der G1-Phase der Zyklusprogression hervorruft. Im Gegensatz dazu induziert TSA sowohl in der G1 als auch in der G2-Phase eine Inhibition der Proliferation [195], was darauf deutet, daß beide Hemmstoffe auf verschiedene Weise die Zellzyklusprogression beeinflussen. Zudem weisen beide Verbindungen merklich unterschiedliche IC₅₀-Werte auf, wonach Butyrat erst in millimolaren Konzentrationen die enzymatische Aktivität der HDACs I und II wirksam hemmt. Diese ungleichen Effizienzen beruhen vermutlich auf unterschiedlichen intrazellulären Stabilitäten bzw. Kernzugänglichkeiten. Butyrat könnte demnach größtenteils β -oxidiert werden, bevor es die Histondeacetylasen im Zellkern erreicht [195]. Obgleich der genaue Mechanismus der Differenzierungs-/Proliferationsregulation noch nicht hinreichend geklärt ist, liegt die Vermutung nahe, daß der G1-Arrest mit der Butyrat-bedingten Hochregulation des Zellzyklusregulators p21^{WAF1/CIP1} korreliert [196]. Auch in diesem Fall ereignete sich die Expressionsinduktion unabhängig vom p53-Protein, wie Untersuchungen an unterschiedlichen Krebszellen ergaben [197, 198]. Dabei konnte eine Reihe von Promotoranalysen des p21^{WAF1/CIP1}-Gens aufdecken, daß für dessen transkriptionelle Aktivierung ein Sp1-Konsensus-Element notwendig ist [199]. Jedoch liegen noch keine gesicherten Daten bezüglich des Mechanismus von Butyrat zur Modulation der transkriptionellen Funktion von Sp1 vor. Größtenteils unverstanden ist bislang auch die Involvierung von Butyrat (und TSA) in die Aktivierung der Apoptose in mehreren humanen Krebszelllinien [200, 201].

1.5 Die biologische Bedeutung der Glutathion-Peroxidase GPx4 in Mammalia

Reaktive Sauerstoffspezies (**R**eactive **O**xxygen **S**pecies, ROS) werden von sämtlichen aeroben Organismen zur Erhaltung normaler Zellfunktionen sowie im Rahmen

ausgeglichener, physiologischer Konzentrationen gebildet und abgebaut. Übermäßige Quantitäten hingegen tragen in der Zelle zum oxidativen Streß bei.

Die physiologische Verwendung von ROS liegt in deren Bedeutung für die intrazelluläre Signaltransduktion und die Redox-Regulation. Zu diesen reaktiven Verbindungen gehören Peroxide wie Wasserstoffperoxid oder Lipidperoxide aber auch Ionen bzw. energiereiche Moleküle wie das Hyperoxid-Anion und freie Radikale. ROS sind in der Lage die enzymatischen Aktivitäten mehrerer Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Proteinen der Apoptose-Maschinerie regulierend zu beeinflussen [202]. In Anbetracht dessen wird deutlich, daß eine strenge Kontrolle der Bildung und Degradierung reaktiver Sauerstoffspezies für den Erhalt normaler zellulärer Funktionen unabdingbar ist.

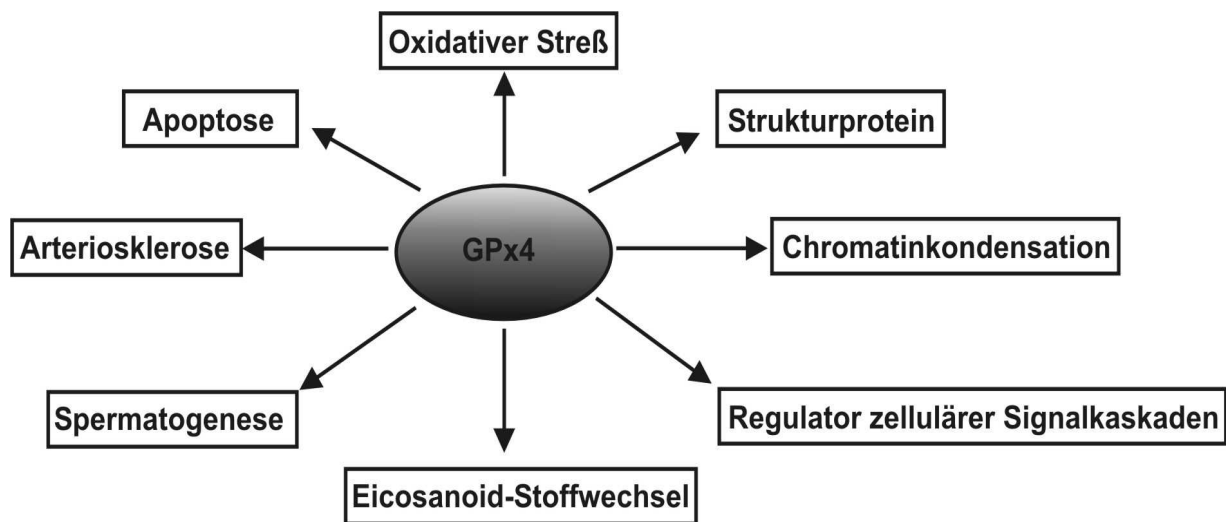


Abb.11: Schema zur Verdeutlichung der GPx4-Beteiligung in diversen zellulären Prozessen.

Die Familie der Selen-abhängigen Glutathion-Peroxidasen besteht aus drei tetrameren Glutathion-Peroxidasen (GPx1, GPx2 und GPx3) sowie der monomeren phGPx (GPx4). Die Enzyme GPx5 und GPx 6 verfügen über kein Selenocystein im katalytischen Zentrum [203, 204]. Die GPx4 wurde erstmals von Ursini als „Peroxidation-hemmendes Protein“ mit einer Größe von etwa 20 kDa identifiziert und beschrieben [205]. Dieses Enzym ist imstande effizient organische und anorganische Hydroperoxide mit Hilfe von GSH (Glutathion) als physiologischem Elektronendonator zu den entsprechenden Alkoholen zu reduzieren [206], auch wenn sich diese in

Membranen bzw. Lipoproteinen befinden. Derzeit sind drei Isoformen der GPx4 bekannt, die sich in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden: cytosolische (c-) GPx4 [205], mitochondriale (m-)GPx4 [207] und nukleäre GPx4 [208]. Das katalytische Zentrum mit dem Selenocystein und die 3'-untranslatierte Region sind hingegen in allen Isoformen erhalten. Hinsichtlich der breiten Substratspezifität ist die GPx4 jedoch nicht nur an der GSH abhängigen Entgiftung von Phospholipid-, Cholesteryl- und Alkylhydroperoxiden beteiligt, sondern erfüllt darüber hinaus in vielen zellulären Prozessen die unterschiedlichsten Funktionen [209] (Abb.11).

1.5.1 mGPx4-Funktionen im Zusammenhang mit oxidativen Streß

Oxidativer Streß bezeichnet eine Stoffwechsel-Imbalance, bei der eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet wird, bzw. vorhanden ist. Diese Situation führt, sofern es die Entgiftungsfunktion der Zelle übersteigt, zur Schädigung aller zellulären Makromoleküle. Hierzu gehören beispielsweise die Lipidoxidation, oxidative Modifikationen an Proteinen sowie Schädigungen der DNA. Durch die Eigenschaft der GPx4 neben freien Hydroperoxiden auch membrangebundene Hydroperoxide reduzieren zu können, nimmt sie eine besondere Rolle im Schutzsystem der Membranen gegen oxidative Schädigungen ein [210]. Diese Funktion der phGPx konnte in diversen experimentellen Untersuchungen bestätigt werden. Als besonders geeignetes Modell hatten sich dabei Experimente mit GPx4-überexprimierenden Zelllinien erwiesen [211]. Diesbezüglich konnte experimentell festgestellt werden, daß mGPx4-überexprimierende Brustkrebs-Zellen (COH-BR1) weitaus resistenter gegenüber photochemisch generierten Cholesterol-Hydroperoxiden sind als solche, die nicht mit dem mGPx-Konstrukt transfiziert wurden [212]. Die Vermutung ist naheliegend, daß die mGPx4 schädigende Veränderungen mitochondrialer Funktionen durch Reduzierung intrazellulärer Hydroperoxide verhindert. Ein ähnliches Ergebnis konnte ebenso in MCF-7-Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie, registriert werden. Die Überexprimierung der mGPx4 inhibierte dort die Singulett-Sauerstoff induzierte Lipidperoxidation sowie den damit verbundenen Zelltod, während die nicht-mitochondriale GPx4 diesen Effekt nicht zeigte [213]. Auch erwiesen sich mGPx4-transfizierte RBL2H3-Zellen resistenter gegenüber direkten mitochondrialen Schäden und extrazellulärem

Streß [207]. Der Erklärung wird die berechtigte Annahme zugrundegelegt, daß die mGPx4 Veränderungen der Mitochondrienfunktion sowie den Zelltod unterbindet, da sie in der Lage ist, intrazelluläre Hydroperoxide zu reduzieren [214].

1.5.2 mGPx4 als anti-apoptisches Protein

Krebszellen produzieren große Mengen von ROS und sind in der Lage die Apoptose zu umgehen. Hydroperoxide unterstützen in bestimmten Konzentrationen die Proliferation, Invasion, Migration sowie die Angiogenese. In höheren Konzentrationen können sie jedoch auch Apoptose induzieren [215]. Wie bereits erwähnt, können Glutathion-Peroxidasen den intrazellulären ROS-Level vermindern, so daß ihnen konsequenterweise eine anti-apoptische Funktion zukommt. Experimente mit basophilen Leukämiezellen (RBL2H3) aus der Ratte konnten aufzeigen, daß die Überexpression der mitochondrialen GPx4 (mGPx4) die Freisetzung von Cytochrom c in der chemisch induzierten Apoptose unterbindet. Vergleichbare Ergebnisse mit nicht-mitochondrialer GPx4 konnten nicht dokumentiert werden. Zudem konnte festgestellt werden, daß weniger ROS in den Mitochondrien aus mGPx4-überexprimierenden Zellen entsteht, was als Hauptfaktor in der Unterbindung der Apoptose angesehen wird [216]. Um auszuschließen, daß anti-apoptische Faktoren in diesen Prozeß involviert sind, wurden Expressionsanalysen an den Bcl-2- sowie Bcl-xL-Genen durchgeführt. Hierbei konnte keine Unterschiede zwischen Kontrollzellen und mGPx4-überexprimierenden Zellen registriert werden. Somit konnte gezeigt werden, daß diese Proteine an der Inhibition der Cytochrom c-Freisetzung nicht direkt beteiligt waren [216]. Weiterführende Experimente konnten GPx4 als anti-apoptischen Faktor in verschiedenen Zellsystemen bestätigten [217-219].

2 Zielsetzung und methodisches Vorgehen

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand eine mGPx4-überexprimierenden Transfektante, welche sich von der humanen Mammakarzinom-Zelle COH-BR1 ableitete. Wie eingehende real time-PCR-Analysen ergaben, war die Bildung von MGB1 bzw. LipB-Transkripten deutlich hochreguliert. Zu analysieren waren folglich die kausalen Hintergründe der gemessenen Hochregulierung. Dies impliziert die transkriptionelle, post-transkriptionelle sowie epigenetische Regulation der Genexpression. Dementsprechend lassen sich folgende Fragestellungen formulieren:

- Welche Faktoren sind in welchem Umfang an der basalen Transkriptionsregulation des LipBs beteiligt?
- Lassen sich auf der Ebene der Transkriptionsregulation Faktoren identifizieren, die Rückschlüsse auf die Hochexpression des LipB-Gens in der mGPx4-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelle zulassen?
- Inwiefern nimmt die mGPx4 Einfluß auf die post-transkriptionelle Regulation des MGB1 bzw. LipB-Gens?
- Inwieweit tragen epigenetische Faktoren zur transkriptionelle Regulation der MGB1 bzw. LipB-Expression bei?
- Beeinflusst die Zellproliferation und Apoptose die MGB1/LipB-Expression?

Die Klärung dieser Problematik könnte wichtige Anhaltspunkte zum besseren Verständnis der molekularbiologischen Prozesse im Brustkrebs liefern. Zudem würde zum besseren Verständnis der physiologischen Funktionen sowie der transkriptionellen Regulation der Sekretoglobuline MGB1 und LipB beigetragen werden. Ferner könnte die putative Involvierung der mGPx4 in transkriptionelle Mechanismen aufgeklärt werden. Infolgedessen wird die Thematik der vorliegenden Arbeit gemäß diesen Fragestellungen folgendermaßen untersucht:

Analysen des Lipophilin B-Promotors

I.) *In silico*-Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente für *trans*-aktivierende Faktoren in der Lipophilin B-Promotorregion

Derzeit liegen aufklärende Arbeiten zur Untersuchung der MGB1-Promotorregion hinsichtlich der transkriptionellen Regulation vor. Jedoch wurden bis dato nur unzureichend Daten gesammelt, die die potentielle 5'-flankierende Region des LipB-Gens näher beleuchten.

II.) Funktionelle Promotorstudien am Lipophilin B-Gen

In vitro Reporter-Gen-Assay (Dual-Luziferase Reporter Assay-System) bilden in diesem Kontext die Basis zur Beleuchtung der Expressionsproblematik.

III.) DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des Lipophilin B-Gens

Zur Detektion von spezifischen DNA-Protein-Interaktionen stehen Gelshift-Assays (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) als methodische Strategie zur Verfügung.

Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene

IV.) Epigenetische Modifizierungen der genomischen DNA

Hierbei soll der Einfluß von Modifizierungen der genomischen DNA als Regulator der Genexpression von MGB1 und LipB in transfizierten COH-BR1-Zellen analysiert werden. In diesen Experimenten kommen die Inhibitoren der DNA-Methyltransferase (5-Aza-2'-desoxycytidin) und der Histon-Deacetylase ((*R*)-Trichostatin A, Natriumbutyrat) zum Einsatz.

Untersuchungen auf post-transkriptioneller Ebene

V.) Experimentelle Analysen des mRNA-Transkriptes im Hinblick auf eine potentielle Beeinflussung durch die mGPx4

An dieser Stelle soll das mRNA-Transkript eingehend spezifiziert werden: Dabei wird zum einen durch Actinomycin D ein Stopp der Transkription bewirkt. Hierdurch soll der Einfluß der mGPx4 auf die Messenger-Stabilität in mGPx4-überexprimierenden CHO-BR1-Zellen (7G4) charakterisiert werden. Zum anderen soll die potentielle Bedeutung der mGPx4 für die Transkriptelongation und mRNA-Reifung via real time-PCR analysiert werden.

Untersuchungen des Einflusses der Zellproliferation und Apoptose auf die MGB1/LipB-Expression

VI.) Experimentelle Analysen auf zellulärer Ebene nach HDACi-Inkubation

Dieser Abschnitt umfaßt zeitabhängige Untersuchungen zum Zellwachstum und Zelltod nach Kultivierung mit (*R*)-Trichostatin A bzw. Natriumbutyrat. Die Analyse der kausalen Hintergründe zieht die molekulargenetische Betrachtung der Expression des Zellzyklusproteins p21^{WAF1/CIP1} nach sich.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Gebrauchswaren

Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien von den Firmen Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt) oder J.T.Baker (Deventer, Niederlande) bezogen. Weitere Chemikalien und Gebrauchswaren werden in der Beschreibung der jeweiligen Methoden aufgeführt.

3.1.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
50x TAE 10x Ladepuffer für DNA-Elektrophorese	2 M Tris, 100 mM EDTA Na ₂ , 1 M Essigsäure ; pH 8,1 0,025% Bromphenolblau, 20% Ficoll 400, 0,1 M EDTA (pH 8,0), 1% SDS
10x TBE TEN TBS RT 5x PBS	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM NaCl; pH 8,0 25 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, 5 mM KCl; pH 7,4 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 15 mM KCl, 0,6 mM MgCl ₂ 7,8 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O, 0,815g KH ₂ PO ₄ , 43,83 g NaCl, pH 7,4
Acryamid-Gel SDS-12,5% Trenngel SDS-4% Sammelgel	5 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 3 ml Trenngelpuffer, 4 ml H ₂ O (bidest.), 20µl TEMED, 120µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat 1,35 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1), 2,5 ml Sammelgelpuffer, 6 ml H ₂ O (bidest.), 20µl TEMED, 100µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat
SDS-Elektrophorese Sammelgelpuffer Trenngelpuffer 5x Elektrophoresepuffer	0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,7 1,5 M Tris, 0,6% SDS, pH 8,8 125 mM Tris, 100 mM Glycin, 17 mM SDS
Blot Anodenpuffer I Anodenpuffer II Kathodenpuffer	0,3 M Tris, pH 10,4, 20% Methanol 0,025 M Tris, pH 10,4, 20% Methanol 0,025 M Tris pH 9,4, 0,040 M 6-Aminocapronsäure
Coomassiefärbung Coomassie-Lösung Entfärber-Lösung	0,2% (w/v) Coomassiebrillantbau in 10% Methanol, 20% Essigsäure (v/v) 40% Methanol, 10% Essigsäure, 50% H ₂ O (bidest.) (v/v/v), 20% Methanol

Nährmedien	Zusammensetzung
Bakterien	
LB-Medium	1% Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA), 0,5% Hefe-Extrakt (Difco, Detroit, USA) 0,5% NaCl, 1mM NaOH, 100mg/l Ampicillin
LB-Agar	1,5% Bacto-Agar, 1% Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA), 0,5% Hefe-Extrakt (Difco, Detroit, USA) 0,5% NaCl, 1mM NaOH, 100mg/l Ampicillin
SOC-Medium	2% Bacto-Tryptone, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
Zellkultur	
HEK293	Dulbecco's Mod Eagle Medium (31885-023); Invitrogen (Karlsruhe) 10% Fötale Kälberserum; Sigma (Deisenhofen) 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung, Sigma (Deisenhofen) Dulbecco's PBS 1x (1x DPBS); Invitrogen (Karlsruhe)
COH-BR1 (WT, VC, 7G4)	DMEM/F12 Medium (Sigma, Deisenhofen); 10% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456x, Biochrom KG, Berlin); 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching); 1x Penicillin/Streptomycin (aus 100x-Lösung; PAA, Pasching), 5 µg/10 µl Natriumselenit

3.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Promega, Heidelberg
Complete, Mini Proteaseinhibitor Cocktail, Tabletten	
Magermilchpulver, Bacto SKIM MILK	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Roti-Load 1	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1)	
Roti-Quant	
Western Lightning Chemiluminescence Peagent Plus	Perkin Elmer Life Science, Boston, USA
Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Freiburg
Nährmedien und Antibiotika für Zelllinien	PAA, Pasching

3.1.4 Enzyme und Kits

Kits	Hersteller
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
RNeasy Mini oder Midi Kit	
QIAquick Gel Extraction Kit	
Plasmid Midi Kit	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
pBlue-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
ECLTM direct nucleic acid labelling and detection system RPN 3000	Amersham Pharmacia biotech, England
QuantiTect SYBR Green PCR-Kit	Qiagen, Hilden
FuGene 6 Transfektionskit	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Gel Shift Kit	Promega, Mannheim

Enzyme	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Advantage 2 Polymerase	CLONTECH, Palo Alto, USA
T4 DNA Ligase	ROCHE Diagnostics, Mannheim
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Geräte und Gebrauchswaren

Geräte	Hersteller
Elektrophoreseeinheit Hoefler	Amersham Biosciences, Freiburg
Blot-Kammer, Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseeinheit, Modell S2	Biometra, Göttingen
Brutschrank	COTECH, Berlin
Inkubator	COTECH, Berlin
Laminarboxen	Stuart Scientific, UK
Gel-Imager	Biometra, Göttingen
Wasserheizer	Haake, Karlsruhe
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Laborrührer	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Stromversorgungsgerät	Biometra, Göttingen
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
GeneQuant	Amersham Biosciences, Freiburg
UV Transilluminator Ti5	Biometra, Göttingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Sorvall TC, Rotor H400	DuPont
Zentrifuge Sorvall RC28S; Rotor GS3 und SS-34	DuPont
UV-160A UV-visible Spektrophotometer	Shimadzu, Duisburg
Rotor Gene RG-3000	Corbett Research, Sydney, Australien
Luminometer	Berthold, Bundoora, Australien
Ultraschallsonde Labsonic U	B.Braun, Melsungen
Ultraschallsonde UP 50H	Dr. Hielscher, Teltow
Plattformschwenker WT12	Biometra, Göttingen
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Hybridisierungsofen	MWG Biotech
Dounce Homogenisator 10 ml	Wheaton, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand Gläser, Wertheim
pH-Meter Typ 761	Calimatic, Knick
Mikrowellenherd	Bosch, Stuttgart
Wärmeschrank	Stuart Scientific, Surrey, UK
Sterilbank Modell Antair BSK 4-MP	COTECH, Berlin

Gebrauchswaren	Hersteller
6-well Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Einfrierkästen	National Lab, Mölln
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Falcon Zellkulturflasche 25 und 75 cm ²	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon sterile Plastikröhrchen 15 und 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier	Amersham Biosciences, Freiburg
Nitrozellulose-Membran NC 45	Serva, Heidelberg

Gebrauchswaren	Hersteller
Tropilon-Plus, Nylon-Membran	Bedford, USA
Hyperfilm ECL 5x7 inch	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwickler/Fixierer	Kodak
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Braunschweig
Parafilm®	American National Can™, Neeah, USA

3.1.6 DNA-Banken und Plasmide

Plasmide	Hersteller
pGL3, Luciferase Kontrollvektor	Promega, Mannheim
pCR 2.1-TOPO Klonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.7 Bakterienstämme und Zellen

Escherichia coli:

- TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)
- XL1Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Humane Zellen:

- Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293), DSM ACC 305 Zelltyp (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)
- COH-BR1 humane Mammakarzinom-Zellen; Albert W. Girotti, Department of Biochemistry, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

3.1.8 Antikörper

Primärantikörper:

- Anti-Acetyl-Histon H3 (Lys9) (New England Biolabs, Schwalbach)
- Anti-Histone H3 (New England Biolabs, Schwalbach)

Sekundärantikörper:

- Goat α Rabbit: gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, gerichtet gegen die F_C-Region Maus Immunglobuline (Santa Cruz, Biotechnology (USA))

3.2 Allgemeine Labortechniken

Grundlegende Labortechniken wie Nukleinsäurepräparationen, Reinigung von DNA-

Fragmenten, Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen, Agarose-Gelelektrophorese, Klonierungen, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Ligation sowie Transformation in *E. coli* erfolgten nach Standardmethoden entsprechend der Produktinformationen und Vorschriften der Hersteller. Sequenzierungen wurden bei MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

3.2.1 Rechnergestützte Sequenzanalyse

Für Sequenzvergleiche wurde das Programm DNAssist genutzt. Außerdem ermöglichte das Online-Programm MatInspector (www.genomatix.de) eine definierte DNA-Sequenz auf potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu analysieren. Das Programm arbeitete mit Hilfe einer Datenbank, in welcher Konsensus-Elemente (core-Matrix) für prominente Transkriptionsfaktoren gespeichert waren. Zudem konnten Kernsequenz-Homologien in Prozent angegeben werden. Darüber hinaus kam das Programm DNAssist sowie DNAStar Lasergene zum Einsatz. Diese fanden Verwendung im Design genspezifischer PCR- sowie DNA-Gelshift-Primer. Des Weiteren wurden sie zur Herstellung der Lipophilin B-Promotorkonstrukte angewendet. Weiterhin wurden auf die folgende Internetressourcen zurückgegriffen:

- Genbank des nationalen Zentrums für biotechnologische Informationen NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Homologiesuche in Nukleotid- und Proteindatenbanken: www.ebi.ac.uk
- Sequenz-basierte Suche nach spezifischen DNA-Motiven wie TATA-Boxen und CpG-Inseln: www.linux1.softberry.com/berry.phtml

3.2.2 Statistische Berechnungen

Die für diese Arbeit notwendigen Berechnungen zur statistischen Signifikanz wurden auf der Grundlage des Zweistichproben T-Tests mit unterschiedlichen Varianzen durchgeführt.

3.2.3 RNA-Extraktion und reverse Transkription (RT)

Zur Quantifizierung relativer Transkriptmengen in verschiedenen Zelllinien wurde die

RNA präpariert sowie im Anschluß die RNA in cDNA transkribiert. Die einzelsträngige cDNA wiederum konnte daraufhin als PCR-Matrize für die real time-PCR verwendet werden. Das Umschreiben der gewonnenen RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels der Reversen Transkription (RT) erfolgte mit der SuperScript II Reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe). Die RT-Reaktion wurde dabei gemäß den Anweisungen des Herstellers angesetzt. Zur weiteren Analyse der Transkriptmenge der jeweiligen Gene via real time-PCR, wurden Verdünnungen der cDNA-Lösungen mit RT-Puffer angefertigt.

3.2.3.1 Real time-PCR

Die real time-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA-Molekülen. Hierdurch wurde es ermöglicht, den Verlauf der Amplifikation kinetisch zu verfolgen. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfaßt wurden. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Als interkalierender Farbstoff wurde in allen Versuchen SYBR Green verwendet. Die Quantifizierung der DNA erfolgte an dem real time PCR-Gerät Rotor-Gene 3000 (LTF, Wasserburg) mit dem ready-to-use Reaktionsmix ImmoMix (Bioline, London, UK) entsprechend der Herstelleranweisungen. Als PCR-Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von DNA-Matrize. Die real time-PCR erfolgte für das zu untersuchende Gen und gleichzeitig für das Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Die DNA wurde nach anschließendem Programm mittels der unten aufgeführten Primer amplifiziert:

Vordenaturierung:	95°C	7 min	
PCR-Zyklen:	95°C	20 s] 40x
	65°C	30 s	
	72°C	60 s	
			und Fluoreszenzmessung

Die Analyse der real time-PCR-Daten geschah mit der Rotor-Gene 3000 Software (Version 4.6.94). Zur Quantifizierung der relativen Transkriptmengen wurden

Zielgen	Primersequenz	Fragmentlänge (bp)
GAPDH do	5'-GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3'	520
GAPDH up	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA-3'	
MGB1 do	5'-GAG AAG GTG TGG TTT GCA GCA ATC-3'	360
MGB1 up	5'-GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT-3'	
LipB do	5'-GTG TCA TTG AAA GAC AGT GGA AAC C-3'	317
LipB up	5'-TGA AGC TGT CGG TGT GTC TCC TG-3'	
p ^{21WAF1/CIP1} do	5'-GGT GAC AAA GTC GAA GTT CCA TCG-3'	350
p ^{21WAF1/CIP1} up	5'-ATG TCA GAA CCG GCT GGG GAT GT-3'	

Tab.2: Primerkombinationen zur Quantifizierung von Transkriptmengen via Real time-PCR.

Standardverdünnungen (Standards) der zu amplifizierenden Genabschnitte erzeugt. Die Herstellung des genspezifischen externen Standards, die für die exakte Quantifizierung des Amplifizierungsprozesses benötigt wurden, unterlag folgendem Protokoll. Mit den jeweiligen Primer-Kombinationen wurden die gewünschten PCR-Fragmente amplifiziert und hiernach einem 1%igen Agarose/1x TAE-Gel (siehe 2.2.3) elektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem QiaQuick Gel-extraktionskit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die gereinigten Amplifikate wurden anschließend als Matrizen zur Reamplifikation eingesetzt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und die DNA-Konzentration mit der Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) ermittelt. Daraus ließen sich die DNA-Molekülmengen mit Hilfe der folgenden Formel berechnen: $(c(\text{DNA}[\text{g}/\mu\text{l}])/\text{Fragmentlänge} [\text{bp}] \cdot M_r) \cdot N_A = \text{Moleküle}/\mu\text{l}$, mit $N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ Moleküle/mol und $M_r = 660 \text{ g/mol} \cdot \text{bp}$ (Molgewicht der doppelsträngigen DNA). Dadurch wurde es ermöglicht, geeignete Standards herzustellen. Diese wurden zur Bestimmung der DNA-Molekülzahlen in den jeweiligen Zelllinien herangezogen. Zur weiteren Bearbeitung wurden die PCR-Produkte in den pCR 2.1-Vektor kloniert (TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe) und deren Sequenz verifiziert. Die jeweiligen Standards wurden schließlich als DNA-Matrizen für die real time-PCR eingesetzt mit deren Hilfe die Rotor-Gene-Software die absoluten Transkriptmengen berechnen konnte. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurden mit Hilfe des Excel-Programms T-Tests durchgeführt. P-Werte wurden in den entsprechenden Abbildungen folgendermaßen gekennzeichnet: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

3.2.4 Funktioneller Promotor Assay

3.2.4.1 Konstruktion der Reportergene

Zwecks Analyse der spezifischen Aktivität potentieller Promotorsequenzen in verschiedenen Zellmodellen, wurden die in Tab.3 aufgeführten Reportergen-Konstrukte hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, daß *in silico* identifizierte *cis*-regulatorische Konsensus-Elemente in den jeweiligen Promotorkonstrukten weitestgehend erhalten blieben. Für die TOPO-Klonierung wurde der Vektor pCR 2.1-TOPO der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet. Als Template für die PCR diente gereinigte Plasmid-DNA des subklonierten humanen Lipophilin B-Gens (LipB). Die verwendeten Primer wurden in Tabelle 3 zusammengefaßt. Ligation und Klonierung erfolgte entsprechend den Vorgaben des mitgelieferten Protokolls. XL1-Blue chemisch kompetente Bakterien wurden im Anschluß transformiert, in Flüssigkultur vermehrt und

Reportergen-Konstrukt	Primersequenz	Fragmentlänge (bp)
LipB 100 do	5'-GTA CAA ATA GCC CTG GGC TCT GCA-3'	100
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 211 do	5'-TCA GAG TGC AGG GAG GCG TGG G-3'	211
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 318 do	5'-ACT CAG AAG GAA ACA GAA TCC CAG G-3'	318
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 411 do	5'-CCA GAA CAC AGC CTT CCA GCT TCC-3'	411
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 504 do	5'-TAG ACT TGC TCA ATG TGC AAC TGA A-3'	504
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 619 do	5'-AGT TGC TTT TCC CCA GGA AAT CCT C-3'	619
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 727 do	5'-AAA GCT TGC TCC TCG TAG AGA GAA A-3'	727
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 813 do	5'-GGA CAC TCC AAA AGC TAC TTG GAA A-3'	813
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 906 do	5'-CCT GAT CAT CTG TCT CTT CTT TTC C-3'	906
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	
LipB 1019 do	5'-TTT GTC TGG GTG CTT CCT TCC CTT T-3'	1019
LipB up	5'-CCA CCGAAC AAA ACG ACA CTC G-3'	

Tab.3: Primer zur Herstellung von Lipophilin B-Promotorkonstrukten.

für die Isolierung der DNA präpariert. Durch Kontrollspaltungen mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurde die Orientierung der insertierten PCR-Produkte überprüft. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle durch Sequenzierung bei der Firma MWG-Biotech AG.

3.2.4.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

- dNTP-Mix mit je 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP
- Advantage 2 DNA Polymerase
- Advantage 2 PCR-Puffer
- dH₂O

Zur Amplifikation spezifischer DNA Segmente wird die PCR angewandt. Hierzu wurde folgendes Thermocyclerprogramm als Grundlage verwendet.

1. Vordenaturierung	95°C	1 min	
2. Denaturierung	95°C	30 s] 35x
3. Annealing	68°C	3 min	
4. Elongation	68°C	3 min	
5. Nachelongation	70°C	10 min	
6. Aufbewahrung	10°C	Pause	

Die erforderlichen Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech AG durchgeführt.

3.2.4.3 Transiente Transfektion

- Transfektionsmedium: Opti-MEM I (Invitrogen, Karlsruhe); 10% (v/v) fötales Kälberserum (Biochrom KG, Berlin); 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching)

Die Transfektion von HEK293- sowie humanen Mammakarzinom-Zellen COH-BR1 (Wildtyp, Vektorkontrolle und mGPx4-Transfektante) erfolgte mit dem Lipofektionskit FuGene 6 entsprechend der Herstellerangaben. Hierzu wurden die Zellen wie folgt vorbereitet. In 6-Well Kulturschalen wurden 200000 Zellen pro Well in antibiotikafreiem Nährmedium ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Transfektion. Zu diesem Zweck wurden zwei Mixe hergestellt. Die Mischung A enthielt 24 µl Transfektionsmedium sowie 4 µl des Luciferase Reporter-gen-Vektors mit den entsprechenden Promotorfragmenten in einer Konzentration von $c = 250 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Da die Transfektionseffizienz in den einzelnen Ansätzen Schwankungen unterworfen ist, wurden 10 µg eines Luciferase-Kontrollvektors als interner Standard (pGL3)

hinzupipettiert. In das Reaktionsgefäß der Mischung B wurden 96,97 µl Transfektionsmedium und 3,03 µl FuGene 6-Reagenz vorgelegt. Die Mixe wurden im Anschluß vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde frisches Nährmedium in die Wells gegeben und das hergestellte Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Als Positivkontrolle fungierte der pGL3-Vektor mit insertiertem SV-40-Promotor. Der pGL3-Basic-Vektor ohne promotoraktive Sequenz wurde als Negativkontrolle eingesetzt. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden diese zweimal mit DPBS (PAA, Pasching) gewaschen und darauf folgend vom Boden des Wells in Gegenwart von 500 µl 1x Reporter-Lysepuffer (Luciferase-Assay Kit, Promega) gekratzt und lysiert. Dabei wurde darauf geachtet, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren eine homogene Suspension zu erhalten. Daraufhin wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, so daß durch 1-2maligen Einfrier/Tau-Zyklus (Aufbewahrung bei -80°C/ 37°C Wasserbad) die Zellyse ver vollständig werden konnte. Im Anschluß wurde das Lysat bei Raumtemperatur für 15 sec bei 12000 rpm zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand diente zur Ermittlung der Luciferase-Aktivität (Luciferase-Assay-System, Promega) und der Proteinkonzentration nach Bradford. Die Transfektionen wurden in Doppelversuchen durchgeführt und die Mittelwerte der relativen Luciferase-Aktivitäten ergeben sich aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurden mit Hilfe des Excel-Programms T-Tests durchgeführt. P-Werte wurden in den entsprechenden Abbildungen folgendermaßen gekennzeichnet: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001.

3.2.5 Kontroll-Restriktionsspaltung von Plasmid DNA

- 10x Nuklease-Puffer
- Restriktionsendonuklease (das eingesetzte Enzym variierte mit den Schnittstellen im jeweiligen Klonierungs- bzw. Plasmidvektor)
- 10x Ladepuffer
- Nukleinsäuremarker

Die Spaltungsreaktion dient zur Überprüfung und Bewertung einer korrekten

Insertion bzw. Ligation eines DNA-Fragmentes im Plasmidvektor im Anschluß einer Minipräparation. Dazu wird der Vektor mittels einer Endonuklease geschnitten, deren Schnittstellen in der Nähe des Inserts liegen, so daß dieses freigelegt wird. In der Agarose Gelelektrophorese kann anhand der Fragmentlänge das Insert mit Hilfe eines DNA-Markers identifiziert werden. In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1 µl ligierte Plasmid-DNA ($\approx 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 1 µl 10x Nuklease-Puffer (entsprechend dem Restriktionsenzym) vorgelegt. Das Volumen an Endonuklease ergab sich aus den Vorgaben des Herstellers: 1 u Nuklease/ 1 µg DNA mit einem 3-5fachen Enzym-Überschuß. Der Ansatz wurde ad 10 µl dH₂O aufgefüllt und im Thermocycler für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die geschnittenen DNA-Fragmente mit 1,5 µl 10x Ladepuffer versetzt und diese Mischung auf ein 1,5%iges Agarose-Gel geladen und ein Elektrophoreselauf gestartet.

3.2.6 Zellyse und Immunodetektion nukleärer Proteine

3.2.6.1 Aufschluß eukaryotischer Zellen zur Analyse von Histonproteinen

- 1,5x Roti-Load 1-Puffer (Roth, Karlsruhe)
- 1x PBS

Zur Bewertung des Acetylierungsstatus von Histonproteinen via Immunodetektion (Western Blot), wurden humane Zellen wie folgt präpariert.

Im Vorfeld der Präparation wurden 500000 Zellen gezählt, geerntet und im Anschluß pelletiert. Diese Zellzahl wurde für jede zu untersuchende Probe beibehalten, so daß eine annähernd gleiche Proteinkonzentration gewährleistet war. Das Zellpellet wurde danach in 10 µl PBS-Puffer resuspendiert und im Anschluß in 100 µl 1,5x Roti-Load 1-Puffer lysiert. Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurden die Proben 10 min im Wasserbad aufgekocht. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Lysate schließlich bei -20°C gelagert.

3.2.6.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- SDS Gellaufpuffer: 100 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,1% SDS
- 12,5%iges Trenngel

- 4%iges Sammelgel
- dH₂O

Die elektrophoretische Auftrennung der Histonproteine erfolgte durch eine Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen mit einer konstanten Zusammensetzung des Trenngels und einem niederprozentigen Sammelgel. Das 12,5%ige Trenngel wurde hierbei zwischen zwei Glasplatten gegossen, die mit Hilfe von Abstandshaltern 0,75 mm voneinander getrennt waren. Danach wurde das Trenngel mit deionisiertem Wasser überschichtet, um durch den Sauerstoffabschluß die Polykondensation zu beschleunigen. Das Wasser wurde entfernt, das Sammelgel über das Trenngel gegossen und der Kamm gesteckt. Nachdem das Sammelgel polykondensiert war, wurden die Proteinproben 10 Minuten bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei einer Stromstärke von 25 mA und einer Spannung von 60 V 1,5 h statt. Nach dem Gellauf wurde das Gel zur Analyse der Proteinproben einem „Semi-dry“-Proteintransfer mit anschließender Western Blot-Analyse zugeführt.

3.2.6.3 „Semi-dry“-Western Proteintransfer und ECL-Analyse

- Semi-dry Blotapparatur: Fa. Biometra (Göttingen)
- Nitrozellulose Membran: Fa. Serva (Heidelberg)
- Kathodenpuffer
- Anodenpuffer I
- Anodenpuffer II
- Ponceau-Färbelösung: 0,2% Ponceau S-Farbstoff: Fa. Sigma (Deisenhofen) in 3% Trichloressigsäure
- 1x TBS-Puffer
- TBS/Tween-Lösung: 1x TBS; 0,1% Tween-20
- Blockierungspuffer: 1x TBS; 0,1% Tween-20 mit 5% w/v Magermilch
- Antikörper: Acetyl-Histone H3 (Lys9), New England Biolabs, Schwalbach; Histone H3, New England Biolabs, Schwalbach

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose Membranen geschah mit einer Semi-

dry Blotapparatur mit horizontalen Edelstahl/Titan-Platten. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System. Proteinhaltige Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und danach das Gel in die Apparatur eingelegt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine zur Nitrozellulosemembran erfolgte bei RT für 1h bei einer Spannung von 10V. Anschließend wurde die Blotfolie mittels Ponceau-Färbelösung angefärbt, um den korrekten Blotvorgang zu bewerten. Die anschließende Immunodetektion der Proteinbanden erfolgte nach den Angaben des Protokolls des jeweiligen Antikörpers. Hiernach wurde die Membran 1h bei RT in TBS mit 5% Magermilchpulver (Blockierungspuffer) abgesättigt. Die Blotfolie wurde im Anschluß dreimal 5 Minuten in 1x TBS/Tween-Lösung gewaschen und ÜN mit dem Primärantikörper bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert (Antikörper 1:1000 in Blockierungspuffer). Danach wurde die Membran dreimalig mit TBS/Tween-Lösung gewaschen und 1 h mit dem an die Meerrettich-Peroxidase konjugierten GoatRabbit-Sekundärantikörper (1:4000 in Blockierungspuffer) inkubiert. Die Blotmembran wurde anschließend dreimal 5 Minuten mit TBS/Tween gewaschen. Die Detektion der Chemolumineszenzsignale erfolgte mit dem Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA) entsprechend der Herstellerangaben durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences, Freiburg). Nach dieser Prozedur wurde die Blotmembran dem Protokoll des Membran-Strippings unterworfen, um entweder acetylierte oder nicht-acetylierte Histonproteine (je nach Immunodetektion im Vorfeld) zu detektieren.

3.2.6.4 Blotmembran Stripping

- Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7; 2% w/v SDS
- β -Mercaptoethanol
- TBS/Tween-Lösung

Dieses Protokoll kam zum Einsatz, um nach einem vollzogenen Western-Blot die Membran abermals auf bestimmte Proteine zu detektieren.

360 μ l β -Mercaptoethanol wurden in 50 ml Stripping-Puffer eingetragen sowie vermengt und danach in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. In dieses Gefäß wurde jeweils eine Blotmembran gegeben und bei 50°C 30 min im Hybridisierungs-

ofen inkubiert. Hiernach wurde der Stripping-Puffer sorgfältig von der Membran entfernt, indem diese 3-5x für 20 min mit TBS/Tween auf einem Horizontalschüttler gewaschen wurde. Im Anschluß daran konnten die fixierten Proteine auf der Blotmembran nach jeweiligem Procedere wieder mit Antikörper detektiert werden.

3.2.7 DNA-Gelshift Assay

- 5x Bindungspuffer: 100 mM HEPES; 250 mM KCl; 15,63 mM EDTA; 40% Glycerol; 2,5 mM DTT
- 10x TEN-Puffer
- 10x TBE-Puffer
- 5%iges Acrylamid-Gel: 2,5 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1) (Roth, Karlsruhe); 1,25 ml 40% (w/v) Acrylamid; 1,2 ml 10x TBE; 19,18 ml destilliertes Wasser; 20 µl TEMED; 240 µl 10% (w/v) APS
- Oligonukleotide (synthetisiert von BIOTeZ, Berlin):

Der „Gelshift Assay“ oder „**E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay“ (EMSA) bezeichnete eine schnelle und einfache Methode zur Charakterisierung von DNA-Protein-Interaktionen. Diese basierte auf differentiellen elektrophoretischen Mobilitäten von freier DNA bzw. DNA-Protein-Komplexen in nativen (nicht-denaturierenden) Polyacrylamidgelen. Die resultierenden Shifts konnten auf einer Blotmembran mit Hilfe von markierter DNA visualisiert werden. Einzelsträngige, komplementäre DNA-Oligonukleotide wurden hierzu gemäß der Protokolle des DIG Gel Shift Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) dimerisiert und endständig mit Digoxigenin markiert. Für die Gelshift-Reaktion wurden eine Verdünnung doppelsträngiger, Digoxigenin-markierter Sonden ($c = 0,016 \text{ pmol/l}$ in TEN-Puffer) mit nukleären Extrakten (10 µg) in Gegenwart von 1 µg/µl Poly-[d(I-C)] (Amersham Biosciences, Freiburg) und $0,1 \text{ µg/µl}$ Poly-L-Lysin in 5x Bindungspuffer 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne nukleäre Extrakte. Die Sequenz der verwendeten DNA-Sonden wurde in Tabelle 4 aufgelistet. Die elektrophoretische Auftrennung wurde mit einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (5%) in 0,5x TBE-Puffer bei 200V und unter Wasserkühlung durchgeführt. Darauf folgend wurden die DNA/Protein-Komplexe

durch Kontaktblotting (1h) auf eine Nylonmembran übertragen (Tropilon-Plus). Die Detektion erfolgte mit dem DIG Gel Shift Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL 5x7 inches, Pharmacia Amersham Biotech) visualisiert. Zur Verifizierung der Spezifität der DNA-Protein-Interaktion, wurden neben den

Sonde	Sequenz (5'...3')
1 do	ATC ACT CAT TGT TTG TGA AAG CTG AGC TCA CAG CAA AAC AAG CCA CCA TG
up	GCT TCA TGG TGG CTT GTT TTG CTG TGA GCT CAG CTT TCA CAA ACA ATG AG
2 do	TGG GCT CTG CAG CTC CAC AGG CTC CTG GGG TGG AGT CCA AAT CAC TCA TT
up	AAA CAA TGA GTG ATT TGG ACT CCA CCC CAG GAG CCT GTG GAG CTG CAG AG
3 do	ATG ACC AGT ACC AGC TAG ACT CCC TAG GTA CAA ATA GCC CTG GGC TCT GC
up	AGC TGC AGA GCC CAG GGC TAT TTG TAC CTA GGG AGT CTA GCT GGT ACT GG
4 do	ACA GCC CTG GGA AGG AGA GGT GGG CTG GGA GCC AGG CCT CAT GAC CAG TA
up	CTG GTA CTG GTC ATG AGG CCT GGC TCC CAG CCC ACC TCT CCT TCC CAG GG
5 do	AGT GCA GGG AGG CGT GGG GAG GTG ACA CAG ATG GAT GGC AAC AGC CCT GG
up	CTT CCC AGG GCT GTT GCC ATC CAT CTG TGT CAC CTC CCC ACG CCT CCC TG
5 A do	AGT GCA GGG AGG CGT GGG GAG GTG ACA
up	TCT GTG TCA CCT CCC CAC GCC TCC CTG
5 B do	GTG ACA CAG ATG GAT GGC AAC AGC CCT GG
up	CTT CCC AGG GCT GTT GCC ATC CAT CTG

Tab.4: Verwendete DNA-Oligonukleotide für den DNA Gelshift Assay.

markierten Oligonukleotiden im 166fachen Überschuß unmarkierte Oligonukleotide in den Ansatz eingetragen. Die unmarkierten DNA-Moleküle konkurrierten dabei um die Bindung des entsprechenden Proteins. Bei genügend großem Überschuß wurde demzufolge die Shiftreaktion unterbunden, was zur deutlichen Abschwächung bzw. zur Auslöschung des Shiftsignals (Kompetition) führte.

Konsensus-Oligonukleotid	Sequenz
Sp1 do	5'-GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T-3'
up	5'-ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3'
T-MAF palindr. do/up	5'-TGC TGA CTC AGC A-3'
C-MAF palindr. do/up	5'-TGC TGA CGT CAG CA-3'
NF1 do	5'-TTT TGG ATT GAA GCC AAT ATG ATA A-3'
up	5'-TTA TCA TAT TGG CTT CAA TCC AAA A-3'
AP1 palindr. do/up	5'-TGAGCTCA-3'
MEF2 do	5'-CTA AAA ATA G-3'
up	5'-CTA TTT TTA AG-3'

Tab.5: Konsensus-Oligonukleotide für verschiedene Transkriptionsfaktoren.

Darüber hinaus wurden zwecks Identifizierung der komplexierten Proteine weitere

Kompetitionsexperimente mit Konsensus-Oligonukleotiden durchgeführt (siehe Tab.5). Diese zeichneten sich dadurch aus, daß sie das spezifische DNA-Motiv hinlänglich bekannter Transkriptionsfaktoren beinhalteten.

3.2.8 Analyse der Transkription und mRNA-Reifung

Mit Hilfe dieses Experimentes sollte die Frage nach dem transkriptionellen sowie post-transkriptionellen Einfluß des erhöhten intrazellulären mGPx4-Levels in der 7G4-Transfektante auf die Transkription und auf die Prozessierung der prä-mRNA (Capping, Spleißen und Polyadenylierung) untersucht werden.

Hiefür wurde die mRNA von Vektorkontrolle (VC) und mGPx4-Transfektante auf zwei verschiedenen Wegen in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von Oligo-d(T)₁₈-Primern wurden nur die Transkripte umgeschrieben, die in der Länge vollständig waren, d.h. das letzte Exon polyadenyliert war. Die reverse Transkription mit Random-Hexamer-Primern ermöglicht auch das Umschreiben von unvollständigen Transkripten. Die Transkripte für Mammaglobin 1 und Lipophilin B wurden für beide cDNA-Varianten mit Hilfe der real time-PCR quantifiziert. Dafür kamen je zwei Primerkombinationen zum Einsatz (siehe Tab.6 und 7). Für die Oligo-d(T)₁₈-Primern umgeschriebene mRNA erfaßt Primerkombination A (siehe Abb.12) nur vollständig prozessierte (gespleißt und polyadenyliert) Transkripte. Auch die Primerkombination B erfaßt für diese cDNA nur vollständig prozessierte Transkripte. Wird dagegen die Random-Hexamer-cDNA eingesetzt, werden auch die Transkripte erfaßt, die nicht vollständig sind (polyadenyliert). Die exonüberspannende Position des jeweiligen up-Primers

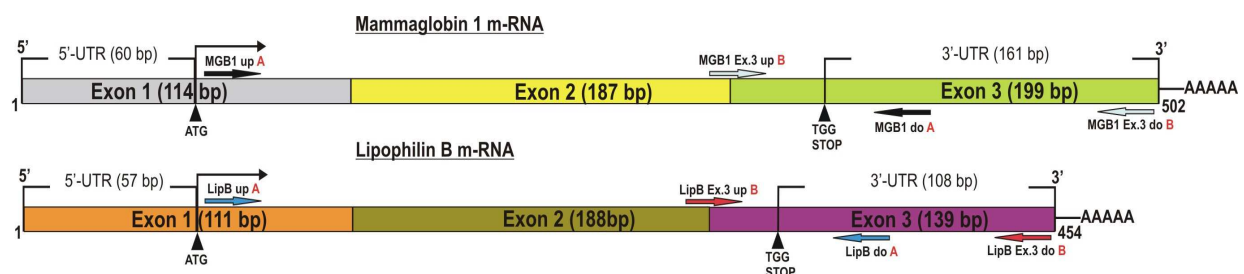


Abb.12: Vereinfachte schematische Darstellung der gespleißten und polyadenylierten mRNA von MGB1 und LipB und der Positionierung der in diesem Versuch verwendeten Primer. Die hellblau bzw. rot unterlegten Pfeile im MGB1 bzw. LipB-Schema markieren die Bindungsorte der für diesen Versuch entwickelten exonübergreifenden Elongationsprimer (Primer B), währenddessen die schwarz bzw. blau unterlegten Pfeile die herkömmlich verwendeten Primer zur Amplifikation in real-time-PCR kennzeichnen (Primer A).

in Primerkombination B stellt sicher, daß nur vollständig gespleißte Transkripte von MGB1 bzw. LipB erfaßt werden. Das Umschreiben der gewonnenen RNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels der reversen Transkription (RT) erfolgte mit der SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe). Die Reaktion wurde jeweils für Oligo-d(T)₁₈-Primer sowie für Random-Hexamer-Primer (Bioline, London, UK) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die anschließende real time-PCR wurde mit den in Tab.2 und 7 aufgelisteten Primern durchgeführt.

Zielgen	Primersequenz
GAPDH do	5'-GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3'
GAPDH up	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA-3'
MGB1 do	5'-GAG AAG GTG TGG TTT GCA GCA ATC-3'
MGB1 up	5'-GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT-3'
LipB do	5'-GTG TCA TTG AAA GAC AGT GGA AAC C-3'
LipB up	5'-TGA AGC TGT CGG TGT GTC TCC TG-3'

Tab.6: Primerkombination A zur Analyse der Transkriptelongation und RNA-Reifung via real time-PCR.

Zielgen	Primersequenz
Mammaglobin 1, Exon 3 do	5'-ACA TGT ATA GCA GGT TTC AAC AAT T-3'
Exon 2/3 up	5'-TGA GGT GTT TAT GCA ATT AAT ATA TG-3'
Lipophilin B, Exon 3 do	5'-GGA GAG CAA GTG ATT TAT TAA AGC-3'
Exon 2/3 up	5'-GCG GAA GTC CTG GTG AAA ATA TT-3'

Tab.7: Primerkombination B zur Analyse der Transkriptelongation und RNA-Reifung via real time-PCR.

3.2.9 Zellkultur der Mammakarzinom-Zellen COH-BR1 (WT, VC, 7G4)

- Kulturmedium: DMEM/F12 Medium (Sigma, Deisenhofen); 10% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456x, Biochrom KG, Berlin); 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching); 1x Penicillin/Streptomycin (aus 100x-Lösung; PAA, Pasching), 5 µg/10 µl Natriumselenit
- Einfriermedium: 70% (v/v) Kulturmedium; 20% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456x, Biochrom KG, Berlin); 10% (v/v) DMSO
- Trypsin/EDTA (PAA, Pasching)

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen (Sterilbank).

Humane COH-BR1-Zellen wurden bei 37°C, 5% Kohlendioxid sowie 95%iger Wasserdampfsättigung kultiviert. Zur Passage wurden das verbrauchte Nährmedium entfernt und 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (PAA, Pasching) auf den Zellrasen gegeben und verteilt. Anschließend wurde die Flasche 7-10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde mikroskopisch untersucht, ob sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. War dies noch nicht der Fall, wurden die Zellen nochmals für 6 min inkubiert. Sobald sich der Zellrasen gelöst hatte, wurden 10 ml Medium zur Inaktivierung des Trypsins in die Flasche gegeben. Die Zellen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde hiernach vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde für einen 1:6-Split in 6 ml Nährmedium aufgenommen und resuspendiert. In eine neue Kulturflasche (75 cm²) wurden 10 ml Zellmedium vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension darin eingetragen. Diese wurde danach unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Das Nährmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Nach Erreichen der Präkonfluenz (5-7 Tage) wurden die adhärennten Zellen wieder passagiert. Für die Kryokonservierung wurden Aliquots von 2-3x10⁶ Zellen in Einfriermedium langsam bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.10 Zellzahlbestimmung mittels Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer)

- Trypanblau-Lösung
- Dulbecco's PBS 1x (1x DPBS); Invitrogen (Karlsruhe)
- spezifisches Nährmedium
- Trypsin/EDTA (PAA, Pasching)

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen (Sterilbank).

Für Experimente zur Bestimmung der zeitabhängigen Proliferation, der Genexpression sowie für funktionelle Promotorstudien, wurden humane Mammakarzinom- bzw. HEK-Zellen, nach präkonfluenter Kultivierung in 75 cm² Kulturflaschen, mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und geerntet. Gleichzeitig wurde die Zellvitalität durch Trypanblau-Färbung überprüft. Die Substanz wurde von vitalen Zellen nicht aufgenommen, d.h. durchdrang nicht die Zellmembran. Abgestorbene Zellen nahmen indessen den Farbstoff auf und wurden dadurch dunkelblau angefärbt. Man konnte

aus der Nichtaufnahme des Farbstoffes in weiterer Konsequenz auf den Zustand der Zellmembran folgern. Die Neueinsaat der Zellen erfolgte in Doppelbestimmung in einer 6-Well-Kulturplatte. Die Zellzahl richtete sich nach dem jeweiligen Experiment und betrug zwischen 150000 und 200000 Zellen pro Well. Für zeitabhängige Proliferations- und Expressionsstudien wurde nach den jeweiligen Inkubationszeiten die Zellen in den entsprechenden Wells geerntet sowie deren Anzahl bestimmt. Dabei erfolgte die Zellernte mit 0,5 ml Trypsin pro Well mit anschließender Inkubation bei 37°C für 7-10 min. Danach wurde mit 2 ml Medium die enzymatische Reaktion gequencht und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierauf wurde diese für 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Hiervon wurden 20 µl zur Zellzahlbestimmung und Überprüfung der Vitalität entnommen. Die Zellsuspension wurde im Anschluß schließlich der weiteren Verarbeitung unterworfen.

3.2.11 Inhibition der Histonacetylierung bzw. DNA-Methylierung

- Inhibitoren: (*R*)-Trichostatin A (Sigma, Deisenhofen) gelöst in DMSO nach Angaben des Herstellers; 5-Aza-2'-desoxycytidin (Sigma, Deisenhofen) gelöst in H₂O (dest.); Natriumbuytrat (Sigma, Deisenhofen) gelöst in H₂O
- Kulturmedium: DMEM/F12 Medium (Sigma, Deisenhofen); 10% (v/v) fötales Kälberserum (Charge 456x, Biochrom KG, Berlin); 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching); 1x Penicillin/Streptomycin (aus 100x-Lösung; PAA, Pasching), 5 µg/10 µl Natriumselenit
- Dulbecco's PBS 1x (1x DPBS); Invitrogen (Karlsruhe)

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen (Sterilbank).

Zur Untersuchung epigenetischer Einflüsse auf die Genexpression von Mammaglobin 1 sowie Lipophilin B, wurden 150000 humane Mammakarzinom-Zellen in 6-Well-Kulturplatten eingesät. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid sowie 95%iger Wasserdampfsättigung zur Erlangung der Adhärenz 24h inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium entfernt und frisches Zellmedium mit dem jeweiligen Inhibitor (TSA c = 25 ng/ml; 5-Aza-CdR = 5 µM;

Natriumbutyrat = 2 mM) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden hiernach in Doppelwerten kultiviert und nach den festgelegten Inkubationszeiten durch Typsinierung geerntet, die Zellvitalität mittels Trypanblau-Lösung überprüft und die Zellzahl bestimmt. Die anschließende RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe der Komponenten des RNeasy Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

4 Ergebnisse

4.1 In silico-Analysen des LipB-Promotors

4.1.1 Identifizierung cis-regulatorischer Elemente

Es existieren aufklärende Studien und Daten zur Identifizierung von *cis*-regulatorischen Elementen für *trans*-aktivierende Faktoren in der MGB1-sowie MGB2-Promotorregion; jedoch liegen keine aufschlußreichen Experimente zur Klärung der LipB-Promotor-Thematik vor. Aus diesem Grund wurden im Vorfeld *in silico*-Analysen des proximalen sowie des distalen Lipophilin B-Promotors B-Gens mit Hilfe des MatInspector und des Soft-Berry Programms durchgeführt. In der vorliegenden Abbildung 13 wurde die 1000 bp-Upstream-Region des humanen LipB-Gens analysiert und potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. Diese Analyse läßt jedoch letztlich nur die Voraussage potentiell bindender TFs zu, die eine denkbare Rolle in der Expressionsregulation spielen könnten. Die Funktionalität der Faktoren bleibt zu klären.

Die computergestützte Promotoranalyse ergab eine totale Anzahl potentieller Bindungsorte von 231 (siehe Abb.13). Jedoch wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Transkriptionsfaktoren mit der höchsten Homologie („core“-Matrix (Kernsequenz-Ähnlichkeit)) zu den in der MatInspector-Datenbank enthaltenen Konsensus-Elementen ausgewählt und in der DNA-Sequenz markiert. Hierzu gehörte ein wichtiges Promotor-Grundelement, das für die effiziente und beschleunigte Ausbildung des basalen Transkriptionsapparates um den Pol II-Komplex verantwortlich war, nämlich die TATA-Box [220]. Auffällig war die Positionierung dieses Elementes, welches sich außerhalb der 5'-UTR befand. Es befand sich somit nicht in direkter Nähe zum offenen Leseraster. Zudem zeigte der TACAAATA-Konsensus ein schwaches TATA-Erkennungsmotiv. DNA-Motive weiterer initialer Transkriptionsfaktoren wie das Downstream promoter element (DPE) [221, 222] oder TFIIB recognition elements (BREs) [223] konnten *in silico* nicht gezeigt werden. Das TATA-Motiv stellte gleichzeitig ein **Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2)**-Bindungsort dar. Dieses Protein bezeichnet einen wichtigen Bestandteil der transkriptionellen Regulation der Zelldifferenzierung und Organogenese [224]. Überdies konnten auf-

fällig viele MAF (**M**usculo**a**poneurotic **F**ibrosarcoma)-Erkennungsmotive [225] gezeigt werden, von denen eines innerhalb der ersten 66 Basenpaare der 5'-untranslatierten Region (UTR) lokalisiert war. Dieses Onkoprotein hat relevante Funktionen innerhalb der embryonalen Entwicklung und Zelldifferenzierung inne und ist darüber hinaus in der humanen Kanzerogenese involviert [226]. Das Konsensus-Element schien teilweise mit einem ebenfalls dort befindlichen AP1-Transkriptionsfaktor zu interagieren, da beide Core-Sequenzen sich lediglich um eine Base unterschieden. Interessant war ebenso, daß ein PEA3 (**P**olyoma-**e**nhancer-related)-Motiv identifiziert wurde, dessen Protein eine Schlüsselfunktion im Prozeß der Metastasierung des

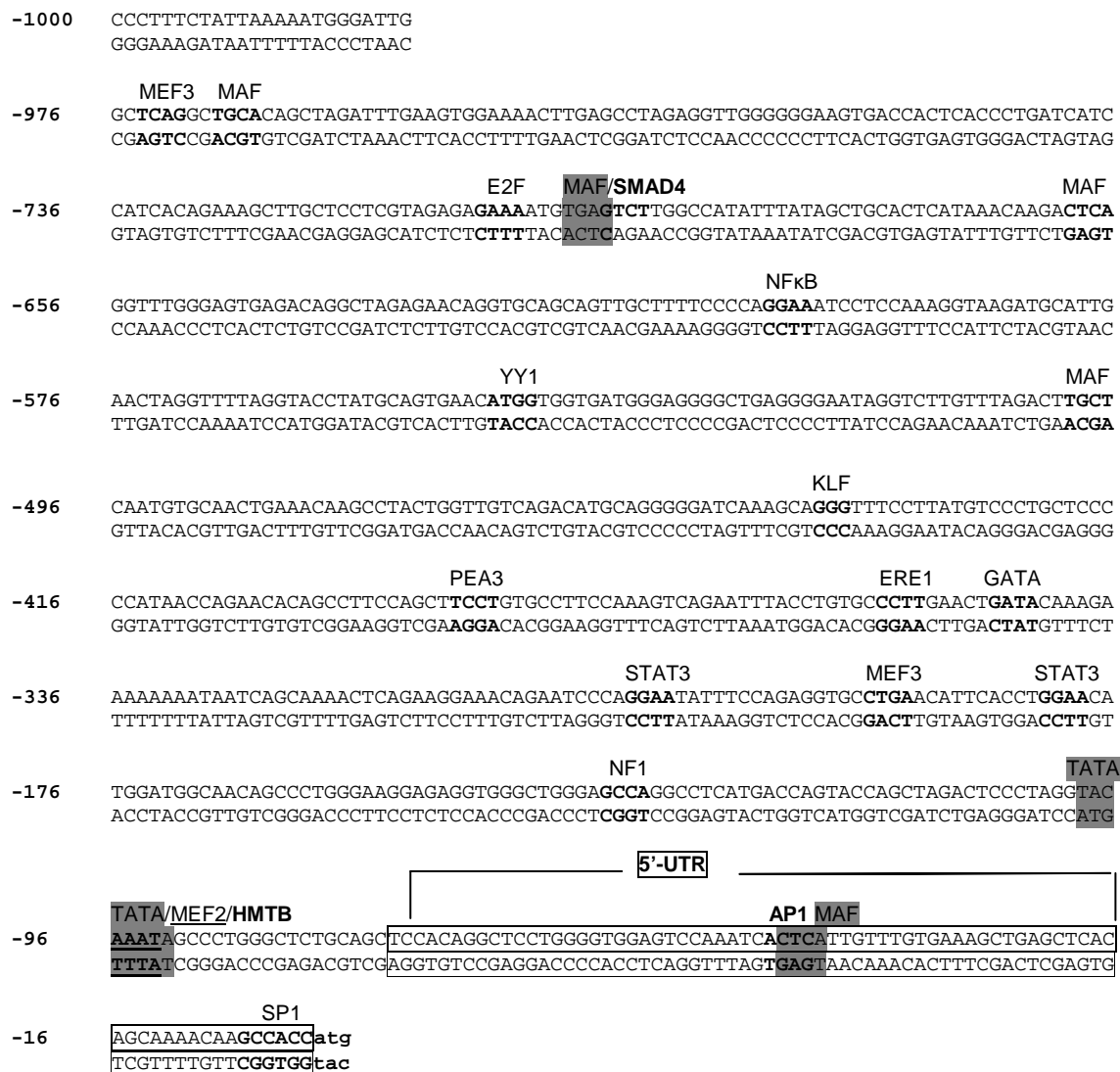


Abb.13: Schematische Darstellung der Upstreamregion des humanen LipB-Gens innerhalb eines Bereiches von 1000 bp. Potentielle *cis*-regulatorische Elemente (Core-Sequenz) sind unterstrichen oder fett unterlegt, während der dazugehörige Faktor oberhalb der Sequenz angegeben ist; das offene Leseraster ist ebenfalls fett unterlegt.

Brustkrebses nachgewiesen werden konnte [82]. Ein Sp1-Konsensus-Element [227] flankierte unmittelbar das offene Leseraster. Der Sp1- und der AP1-Transkriptionsfaktor gehören zu jenen Proteinen, die durch redox-sensitive Mechanismen reguliert werden. Dies impliziert Signalkaskaden oxidativen Streß, der auch in der Tumorgenese involviert ist. Weiter stromaufwärts gelegen befand sich außerhalb der 5'-UTR ein KLF (**k**rueppel-**l**ike **f**actor)-Motiv, dessen Protein ebenfalls zu der Sp-Familie zählt [228]. Zusätzliche relevante (zell)-regulatorisch Transkriptionsfaktoren, deren *cis*-aktivierenden Elemente *in silico* identifiziert werden konnten, waren Yin Yang 1-Protein, NF1 und NFκB.

Neben einer schwachen TATA-Box konnten potentielle Erkennungsmotive für den MAF- sowie für PEA3, Sp1 und AP1-Faktor in der 5'-flankierenden Region des LipB-Gens dokumentiert werden konnten.

4.1.2 Vergleichendes Alignment der Promotoren von MGB1, MGB2 und LipB

In der folgenden Abbildung 14 wurde ein multiples Alignment der ersten 300 bp stromaufwärts des offenen Leserasters des humanen Mammaglobin 1 & 2 und Lipophilin B-Promotors angefertigt. Dies geschah, um Homologien zu bestimmen bzw. konservierte Regionen in der Sequenzstruktur innerhalb der Sekretoglobulin-Familie zu lokalisieren. Hierzu wurden die Promotorregionen der drei Sekretoglobuline mittels des MatInspector Programms untersucht. Die homologen Regionen wurden im Anschluß mit den in der Literatur für MGB1 und MGB2 bereits bestätigten Faktoren im LipB-Promotor abgeglichen und in der Sequenz markiert.

Die Auswertung des multiplen Alignments der Promotorsequenzen ergab eine errechnete sequentielle Übereinstimmung bzw. Konservierung zwischen Mammaglobin 1 und 2 von 62%. Indes konnte für MGB1 und LipB nur eine 22% Homologie festgestellt werden, währenddessen zwischen MGB2 und LipB 28% der proximalen 300 bp homolog sind. In den zu untersuchenden Minimalpromotoren konnten fünf konservierte Regionen identifiziert werden. Zwei Bereiche enthielten Core-Sequenzen von bereits in der Literatur für Mammaglobin 1 bzw. 2 an diesen Positionen beschriebenen Faktoren [11, 74, 80]. Dazu gehörten das Sp1-Motiv und die TATA-Box. Diese befand sich nicht in unmittelbarer Nähe zum offenen

Leseraster. Sie war überdies in allen drei Promotoren positionsähnlich vertreten und konnte mit Hilfe des Soft Berry Programms im LipB-Promotor verifiziert werden. Die TATA-Box wies jedoch mit der Erkennungssequenz (A(C)ATAAATA) ein nur schwaches Konsensus-Element auf. Das Sp1-DNA-Motiv hingegen war nahe dem offenen Leseraster lokalisiert, wobei im LipB-Promotor es sich unmittelbar an das ATG anschloß. Das in der DNA-Sequenz markierte (PEA3)-Motiv wurde besonders hervorgehoben, da im MGB1-Promotor dieses Element bereits identifiziert werden konnte [80]. Jedoch konnte PEA3 innerhalb einer proximalen Länge von 300 bp im LipB-Promotor *in silico* nicht nachgewiesen werden. Schließlich konnte ein AP1- und NF1-Konsensus gezeigt werden, deren Existenzen bereits im LipB-Promotor mittels des MatInspector Programms dokumentiert werden konnten (Abschnitt 4.1.1).

MGB1	-300	-----GATGCTTTCATTCACCTTAAA
MGB2	-300	aaacActgtcacatccATTTTACTAAAGCCATGTATCATTATGTAGTC
LipB	-300	tcccAgga-----ATATTTCCAGAGGTGCCTGAACATTCACCTGGAA
		PEA3
MGB1	-277	GAAAGAgacagagaagaaaaggaaggggagcaagtggagaAGGAATACAA
MGB2	-250	CCCAGAttgtc-----AGGgATCCAA
LipB	-258	CACAGA-----
MGB1	-227	gaAagAggaagagaagcaggaagaTTCTACat-----ACAGGCTGGCT
MGB2	-229	atAttActgccttcttggT-----TTCTACAaacagagcACAGGCTGGCT
LipB	-252	-----GCA
MGB1	-184	GTGTTTCCCTGGGGCATGCTCCTGTTTACTGGTCCCATGCCAGGT----
MGB2	-184	GTGTTCCCATTGGTGTACTACTATGTGTCTGGTCCCATGCCAGGT----
LipB	-249	GAGTTCTGCAGGGCTACCCTCCTGTGCTCTGCCagTcagAGTgcagg
		AP1
MGB1	-138	-----TGACTC-----ATTGCCTCGTTCATGGGtGCaT
MGB2	-138	-----TGACAC-----ATTGCCTCATTCTGGGAGGGAcT
LipB	-199	gaggcgtggggaggTGACACagatggATGGCAACAGCCCTGGGAAGGaga
MGB1	-108	AAGATGC-----CTaCCTGGG
MGB2	-108	AAGGTGC-----CTCCCTGGG
LipB	-149	ggtGgGctgggagccaggcctcatgaccagtagaccagctagaCTCCCTa-G
		TATA
MGB1	-92	GAATAAATAGAGCAAGGCTGGGTgCTCACCTCCACAGCGGCTTCCTTGAT
MGB2	-92	GAATAAATAGAGCAGGGCTGGGTaCTCACCTCCACAGCAACTTCCTTGAT
LipB	-100	GTAcAAATAGCCCTGGGCTctG----CAGCTCCACAGgctCctTgggggtgg
MGB1	-42	CCTT-----GC
MGB2	-42	CCCT-----GC
LipB	-54	agTccaaatcactcattgtttgtgaaagctgagctcacagcaaaacaaGC
		SP1
MGB1	-36	CACCCgCGACTGAACACCGACAGCAGCAGCCCTCACCATG
MGB2	-26	CACgCaCGACTGAACACAGACAGCAGCCCTCGCCATG
LipB	-4	CACCATG-----

Abb.14: Multiples Alignment der proximalen Promotoren von -1 bis -300 bp der Gene MGB 1, MGB 2 und Lip B; farbig unterlegte Sequenzen stellen putative *cis*-regulatorische Elemente im MGB 1 bzw. MGB 2-Promotor dar, welche mit der jeweiligen Literatur übereinstimmend beschrieben und ebenfalls im Lipophilin B-Promotor gefunden wurden; gelb unterlegten Sequenzen markieren homologe Bereiche.

Ein wesentlicher Unterschied hierbei bestand darin, daß die Core-Sequenzen im 300 bp-Alignment an unterschiedlichen Orten lokalisiert waren und somit nicht mit denen aus Abschnitt 4.1.1 übereinstimmten.

Das Alignment der 300 bp Upstream-Sequenz ergab keine hohe Homologie der putativen Promotoren von MGB1 und LipB. Zudem konnten im LipB-Promotor die Existenz der putativen Bindungsorte für AP1 bzw. NF1 bestätigt werden.

4.1.3 Multiples Alignment der distalen 8 kbp Upstream-Sequenz

Im Jahr 2004 konnte ein starkes Enhancer-Element in einem 8 kbp- Promotor-fragment des MGB1-Gens experimentell identifiziert werden [79]. Weitere Experimente ergaben, daß es sich zwischen 4,4 und 5,5 kbp stromaufwärts von der kodierenden Sequenz befinden muß. Hieraus resultierte konsequenterweise die Frage, ob ein derartiges Element ebenso im LipB-Promotor zu lokalisieren sei. Dazu sollten die distalen 8000 bp der 5'-flankierenden Region von MGB1, MGB2 und LipB mit Hilfe des MatInspector Programms *in silico* abgeglichen und nach *cis*-regulatorischen Elementen untersucht werden. Dabei wurde insbesondere nach konservierten Sequenzbereichen gesucht.

Es konnte nach der computergestützten Untersuchung der vorliegenden Sekretoglobulin-Promotoren festgestellt werden, daß einige konservierte bzw. homologe Regionen im multiplen Alignment aufzufinden waren. MGB1 und LipB wiesen eine 5%ige Homologie auf, währenddessen zwischen den verwandten Sekretoglobulinen MGB1 und MGB2 eine etwas größere Homologie von 26% bestand. Diese Situation spiegelte Abb.15 wider, in der nur die übereinstimmenden Sequenzbereiche mit einer Länge von mindestens vier Basenpaaren dargestellt wurden. Diese rot markierten Basenfolgen schienen in allen 5'-flankierenden Regionen konserviert, jedoch konnte ihnen nach der Analyse mittels des MatInspector-Programmes keine *cis*-regulatorischen Elemente zugewiesen werden. Insbesondere innerhalb einer Region zwischen 4,4 und 5,5 kbp konnte kein Enhancer-Motiv im LipB-Promotor identifiziert werden. Ein Bereich zeigte eine deutliche Übereinstimmung in einer Sequenz von 13 Basenpaaren in der LipB- sowie MGB1-Upstream-Sequenz. Auch hier konnten keine *cis*-regulatorischen Elemente identifiziert werden.

Basierend auf den Accession-Nummern der jeweiligen Gene wurde ein phylogenetischer Baum mit Hilfe des DNASTAR/Lasergene Programms errechnet (Abb.16). Des Weiteren wurde ein multiples Alignment der LipB-Promotorsequenz mit Hilfe des MatInspector Programmes erstellt. Hierdurch sollten Hinweise zur möglichen Konservierung und Homologie zwischen den Spezies *Bos taurus* und *Homo sapiens* gezeigt werden. Diese könnten mögliche Ähnlichkeiten hinsichtlich der Expressionsregulation im Lipophilin B-Promotor verdeutlichen (Abb.16).

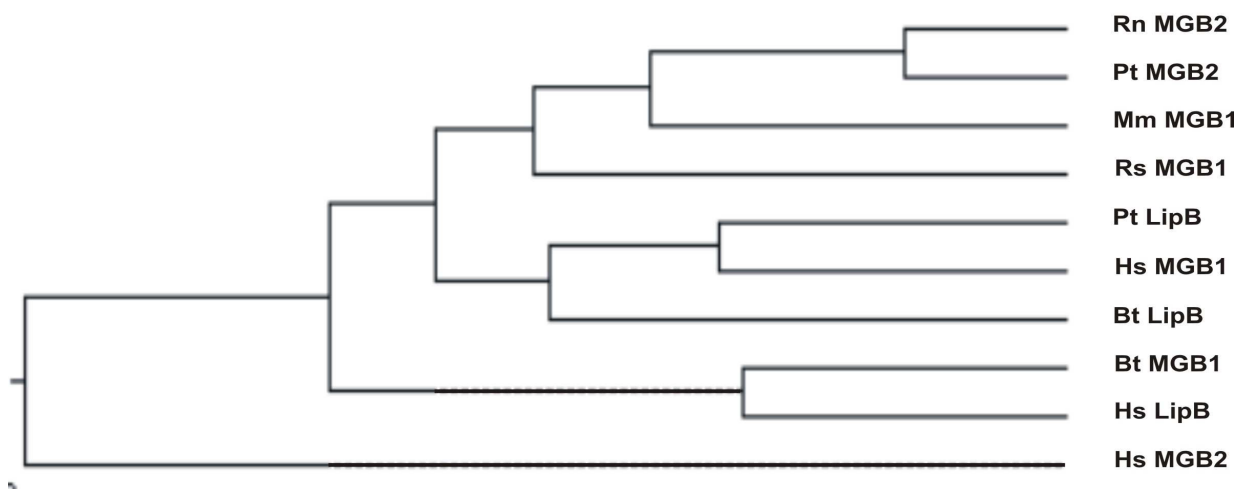


Abb.16: Phylogenetischer Baum der Sekretoglobuline MGB1, MGB2 und LipB in unterschiedlichen Säugetier-spezies. Rn = *Rattus norvegicus*, Pt = *Pan troglodytes*, Mm = *Mus musculus*, Hs = *Homo sapiens*, Bt = *Bos Taurus*, * vorhergesagt, nach automatisierter Computeranalyse. Der Datensatz hierzu stammt aus der genomischen Sequenz.

Wie aus dem phylogenetischen Baum in Abb.16 hervorging, entwickelte sich das humane MGB1 sowie MGB1/2 und LipB der Spezies *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* aus einem gemeinsamen Vorfahren. Währenddessen waren die nächsten Verwandten des humanen LipB-Gens MGB1 aus *Bos taurus*. Hieraus folgte, daß die Gene LipB und MGB1 im Laufe der Evolution sich unterschiedlich entwickelt hatten. Eine ähnliche Aussage machte das Alignment aus Abb.17. Dabei wurde deutlich, daß im Lipophilin B-Promotor von *Homo sapiens* und *Bos taurus* eine Homologie von kaum mehr als 16% bestand. In dieser Analyse wurden die Bereiche ausgewählt, die homologe Übereinstimmungen in einer längeren Folge aufwiesen und damit mögliche Erkennungsmotive für DNA-Bindungsfaktoren repräsentieren. Einige dieser Regionen konnten gehäuft innerhalb des proximalen Promotors beschrieben werden, doch konnten keine *cis*-regulato-

rischen Elemente identifiziert werden. Allerdings sagte das MatInspector-Programm innerhalb der ersten ca. 100 Basenpaare des Lipophilin B-Promotors ein putatives HMTB (Human muscle-specific mt binding site)-Motiv voraus. Dabei handelte es sich um ein Protein, welches normalerweise nicht in Zellen der Brustdrüse exprimiert wird. Stattdessen reguliert dieser Transkriptionsfaktor im Myostatin-Promotor das Wachstum und die Entwicklung des Skelettmuskels [229, 230].

LipB	-996	-----TTCTa
LipB*	-992	tgtgatccccctgcaagcactccttcatgtcaaaattctacataTTCTt
LipB	-991	TTAAAAATgggatTggctcaggctgcacagctagatttgaagtggaaaac
LipB*	-942	TTAAAAATatataTat-----
LipB	-841	agtacctgtccgatgcatgATTGGCTcTGgacactccaaaagctacttgg
LipB*	-883	-----ATTGGCTgTGctg-----
LipB	-791	aaaaagttaggctatgtaatcatcaGGTCAACcCatCAACATgTGGTgg
LipB*	-870	-----GGTCTTCaCtgCAGCATaTGGGctt
LipB	-691	gCCatAtTTATAgcTgcAcTCaTaAacaagACTCAGGttTCggagtgaga
LipB*	-835	-CCcAgTTATAtaTatAtTCtTgAgtgccACTCAAAATg-----
LipB	-441	agggtttccttatgtccctgcTCCCCataACcAGaAcaCaGcCTTCCag
LipB*	-795	-----TCCCCTtacACaAGcAgcCtGaCTTCCca
LipB	-318	-----ACTCAGAAGGaa-----
LipB*	-666	gggaccctgtgACTCAGAAGGtgtagactctctatttgacaaggaaaagt
LipB	-304	AGAAatCCCAGCaataTTTcCAgaggTgcctgaAcatTcaccTgGaac---
LipB*	-316	CGAcaCCCAGGgggtTTgCATccaTtaaccgAttaTacatTtGtgaac
LipB	-257	-----ACAGAGCAGAGTtTcctgcagggCTaccctcc
LipB*	-266	tacaaccttggtttttactACAaAGCAGAGgTgtaggtatCTgtgaaatg
LipB	-176	TGGATGGCAaCAgcCctGgaaGgAGAgGt--GGGCTGGAGCCAGcCT
LipB*	-188	TGGATGGCAtCAagCCctGagtGaAGAAgGaaGGGCTGGAGCCAGaCTT
LipB	-128	catgACCaGtaccAgcTagA-----CTCcTAGGT
LipB*	-138	tgccACCTGcgtAtgTccAtgtgggcagggccaacagagCTCtCAGGT
		HMTB
LipB	-98	ACAAATAGCCCTGGGCTCtgcaactccaCAGGCTCCTGgGgtggagTCca
LipB*	-88	ACAAATAGCCCTGGGCTCcc-----CAGGCTCCTGAGtccagcTC--
LipB	-48	aatcaCTCATGTtTTGTGAaagctgAg-----CTCAcAGCAAAAcA
LipB*	-48	-----CTGATTGcTTGTCAttcaccAaggctgaaaaCTCAaAGCAAAAtA
LipB	-7	AgCCaccATG
LipB*	-4	aaCCATG---

Abb.17: Alignment der proximalen 1000bp des Lipophilin B-Promotors. Direkter Vergleich der jeweiligen Spezies (LipB *Homo sapiens*; LipB* *Bos taurus*) im Hinblick auf Konservierung und Homologie innerhalb regulatorischer Regionen. Rot unterlegte Sequenzen wiesen hohe Konservierung in einer durchgehenden Basenfolge von 8-10 Basen auf und könnten somit DNA-Erkennungsmotive darstellen.

Zwischen dem humanen MGB1- bzw. LipB-Gen bestand keine direkte evolutionäre Verwandtschaft. Damit war in weiterer Konsequenz auch keine hohen Homologien zwischen den LipB-Promotoren aus *Bos taurus* und *Homo sapiens* zu erwarten.

4.2 Funktionelle Promotorstudien am Lipophilin B-Gen

4.2.1 *In vitro* Aktivitätsassays des LipB-Promotors in HEK- und COH-BR1-Zellen

In diesen Experimenten wurde das Luciferase-Gen als Reporter zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität des LipB-Promotors in verschiedenen Zellen verwendet. Dieser Reportervektor stand unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotorkonstruktes (Abb.18). Der Nachweis der Promotoraktivität wurde damit indirekt über die quantitative Messung der Biochemolumineszenz dokumentiert.

Der Lipophilin B-Promotor wurde hiermit auf einer proximalen Länge von ca. 1000 bp in HEK (**h**uman **e**mbrionic **k**idney)- und humanen Mammakarzinom COH-BR1-Zellen (Wildtyp, WT) auf Promotoraktivitäten analysiert. Die Wahl der Zellmodelle war darin begründet, da in beiden Zelllinien eine positive LipB- sowie MGB1-Expression in real time-PCR-Experimenten gemessen wurde (Graphiken nicht aufgeführt. HEK: 1043 LipB-Kopien pro 10^6 GAPDH-Kopien, 29 MGB1-Kopien pro 10^6 GAPDH-Kopien, WT: 66 LipB-Kopien pro 10^6 GAPDH-Kopien, 54 MGB1-Kopien pro 10^6 GAPDH-Kopien). Dies ließ den Schluß zu, daß diese Zellen die für die LipB-Genexpression notwendigen *trans*-regulatorischen Proteine aufweisen.

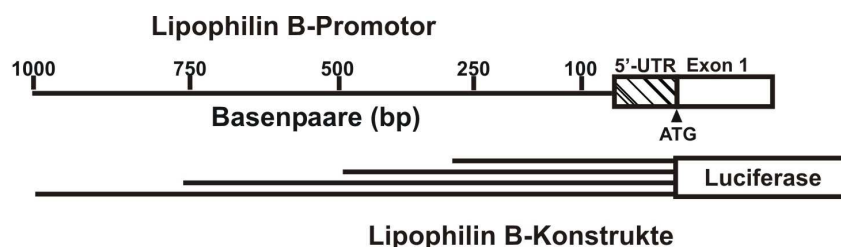


Abb.18: Schematische Darstellung der Promotorkonstrukte des LipB-Gens, die 5'-flankierend zum Reporter gen in den Vektor inseriert und anschließend in HEK transfiziert wurden. Es wurden nicht alle Konstrukte dargestellt, sondern exemplarisch vier Fragmente zur Verdeutlichung ausgewählt.

Der HEK-Luciferase-Aktivitätsassay (Abb.19, **A**) zeigte für das Konstrukt mit einer Länge von 277 bp die größte Promotoraktivität. Diese war 1,4fach größer als die des 504 bp-Konstruktes, das die zweitgrößte Luciferase-Aktivität in diesem Assay zeigte. Kürzere Promotorkonstrukte (LipB 100 bzw. 211 bp) zeigten jedoch im HEK-Zellmodell verminderte Aktivitäten. Augenfällig war auch, daß nach 277 bp die Aktivität signifikant abfiel. Diese Repression der Promotoraktivität konnte bis auf eine Länge

von 410 bp nachgewiesen werden. Nach 504 bp war wieder ein deutlicher Anstieg feststellbar, wobei ab 618 bp die Aktivität signifikant reprimiert wurde. Stromaufwärts von dieser Position konnten relativ gleichbleibend verminderte Aktivitäten registriert werden. Das Diagramm B, Abb. 19 dokumentiert die LipB-Promotoraktivitäten in der Wildtyp-Zelle. Hier wurden jene Konstrukte getestet, die im HEK-Versuch die höchsten Aktivitäten aufwiesen. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt mit reprimierter Aktivität verwendet (983 bp). Auch in diesen Zellen konnten für die Fragmente mit einer Länge von 277 und 504 bp hohe Promotoraktivitäten festgestellt werden.

Konstrukte mit einer Länge von 277 und 504 bp zeigten sowohl in HEK- als auch in COH-BR1-Zellen (WT) hohe Aktivitäten auf.

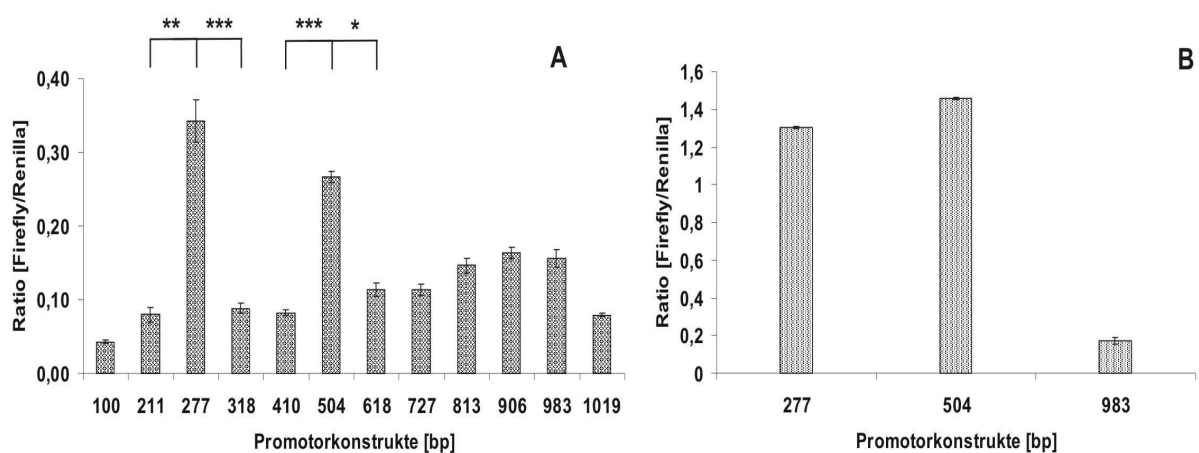


Abb.19: Luciferase-Assay zur Analyse der Aktivität von Lipophilin B-Promotorkonstrukten in HEK (A)- und WT (B)-Zellen. Hierzu wurden die adhärenenten Zellen mit 250 ng/µl des jeweiligen Promotorkonstruktes transient transfiziert und hiernach 72h bei 37°C inkubiert, bevor sie schließlich geerntet und lysiert wurden. Das im Anschluß folgende Procedere verlief nach Protokoll des Luciferase-Assay Kits. Die Standartabweichung ist in B sehr gering, so daß die Fehlerbalken kaum sichtbar sind.

4.2.2 LipB-Promotoraktivität in modifizierten Mammakarzinom-Zellen

Für die nachfolgenden *in vitro*-Experimenten kam eine Zelllinie zum Einsatz, die das peroxidreduzierende Enzym Glutathion-Peroxidase GPx4 überexprimiert und sich von der humanen Mammakarzinom-Zelle COH-BR1 ableitet. Dabei handelt es sich zum einen um eine stabile Transfektante, die den Expressionsvektor (pcDNA 3.1 (-)) trägt. Dieser beinhaltet ein 0,8 kb großes Insert, das die humane mitochondriale Phospholipidhydroperoxid Glutathion-Peroxidase (mGPx4) kodiert (in weiteren Arbeit

wurde diese Zelle mit der Abkürzung 7G4 oder 7G4-Transfektante bezeichnet). Zum anderen wurde als Negativkontrolle die gleiche Transfektante, jedoch mit einem leeren Plasmidvektor (im weiteren benannt als VC oder Vektorkontrolle), verwendet [231]. Im folgenden Kapitel wurden nun all jene zellspezifischen Eigenschaften näher charakterisiert, die aus der Transfektion mit der humanen mGPx4 resultieren.

4.2.2.1 Charakteristika der mGPx4-Überexpression in Mammakarzinom-Zellen

Auf mRNA-Ebene konnte durch Verwendung der quantitativen real time-PCR dargelegt werden, daß die Transfektante mGPx4-Transkripte deutlich überexprimiert. Wie aus Abb.20 **A** ersichtlich wurde, lag die Amplifikatmenge 30fach über der der Vektortransfektante und Wildtypzelle COH-BR1. Des weiteren konnte auf Protein-Ebene via Immunoblot dokumentiert werden, daß vor allem die mitochondriale GPx4-Isoform durch stabile Transfektion in der 7G4-Zelle gebildet wurde. Das immunaktive Protein wurde nach differentieller Zentrifugation in den Mitochondrien nachgewiesen (Abb.20 **B**).

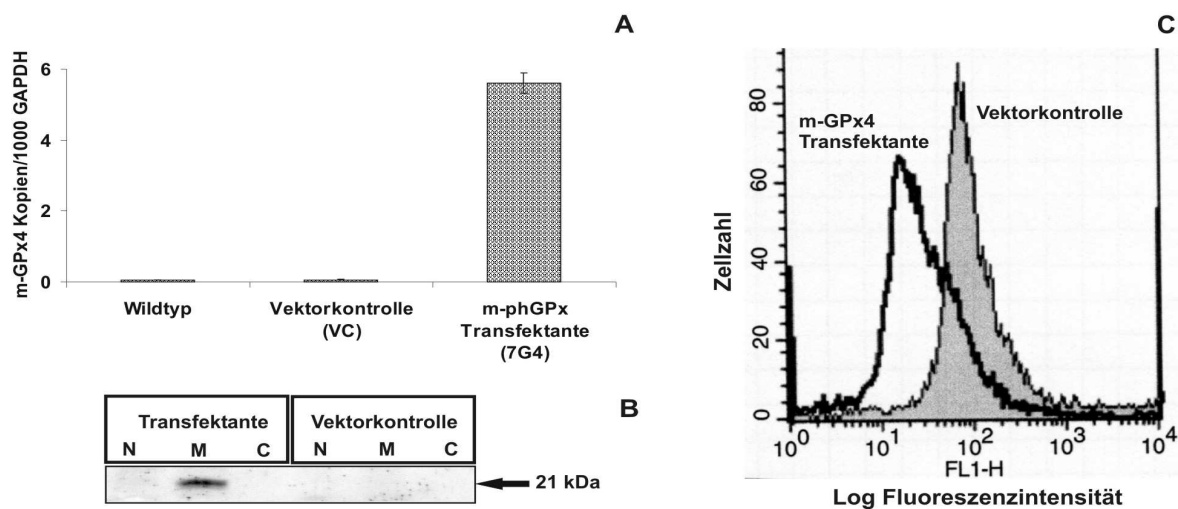


Abb.20: **A**) Humane epitheliale Brustkrebszellen im direkten Vergleich hinsichtlich ihrer mGPx4-Expression. Das Gelfoto zeigt die Ethidiumbromid-gefärbten Banden der m-GPx4-Transkripte in Wildtyp (WT), Vektorkontrolle (VC) und Transfektante (7G4) nach elektrophoretischer Auftrennung; die Graphik wurde nach quantifizierender real-time-PCR angefertigt. **B**) Der Western-Immunoblot der mGPx4 aus Transfektante und Vektorkontrolle nach differentieller Zentrifugation (n nukleär, m mitochondrial, c cytosolisch). **C**) Graphische Analyse der Durchflußzytometrie (FACS) zur Messung des intrazellulären Hydroperoxid-Levels in Transfektante und Vektorkontrolle.

Die mGPx4-Überexpression in der COH-BR1-Transfektante konnte damit auf sowohl mRNA als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Abschließend wurde mittels FACS-Analyse der intrazelluläre Hydroperoxid-Status durch Zugabe

eines Redox-Indikators überprüft, um dadurch indirekt die enzymatische Aktivität der mGPx4 zu verifizieren. Das Ergebnis dieses Versuches liefert Abb.20 **C**. Es konnte festgestellt werden, daß der intrazelluläre ROS-Level in der Transfektanten im Vergleich zur Vektorkontrolle vermindert war. Dies ließ den Schluß zu, daß die mGPx4 über eine ausreichende enzymatische Aktivität verfügt.

Die mGPx4 wurde überexprimiert und war enzymatisch aktiv. Die Überexpression hat eine deutliche Erniedrigung des intrazellulären Peroxidspiegels zur Folge.

4.2.2.2 MGB1/LipB-Expression in modifizierten COH-BR1-Zellen

Zwecks Untersuchung und Abschätzung der Menge an MGB1- und LipB-mRNA in Vektorkontrolle und Transfektante, wurde ein quantitatives real time-PCR-Experiment durchgeführt. Die ermittelten PCR-Daten wurden auf GAPDH als House-

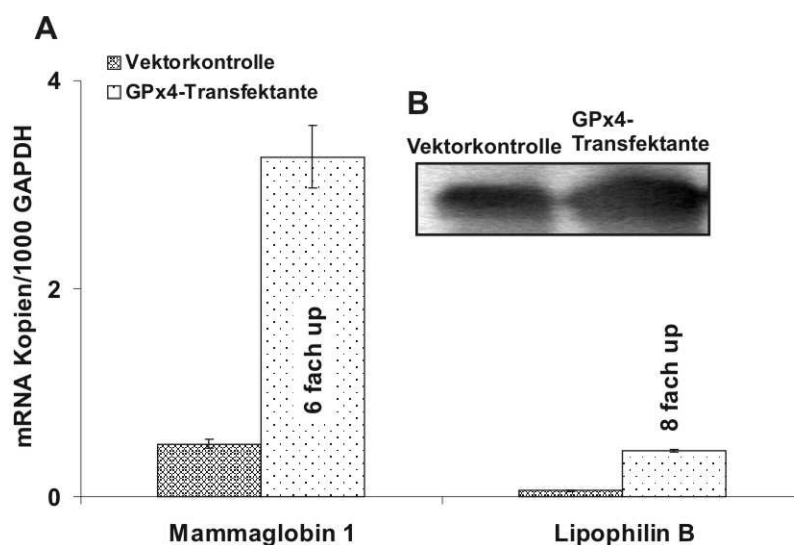


Abb.21: A) Statistische Auswertung der real-time-PCR zur Quantifizierung der Mammaglobin 1- bzw. -Lipophilin B Transkripte *in vitro*. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Standardabweichung ist sehr gering, so daß die Fehlerbalken kaum sichtbar sind. Zusätzlich wurde die MGB1-Überexpression im Immunoblot dokumentiert (**B**).

keeping-Gen standardisiert und hieraus die MGB1/LipB-Kopienanzahl berechnet. Diese Werte wurden in der unten dargestellten Abbildung 21 vergleichend gegenübergestellt. Wie aus den real time-PCR-Experimenten in Abb.21 **A** hervorging, zeigten die mGPx4 überexprimierenden Zellen nach Quantifizierung eine deutlich erhöhte Expression der Sekretoglobuline MGB1 und LipB als in der Vektorkontrolle. Dies konnte ebenfalls auf Protein-Ebene im Immunoblot dokumentiert werden (**B**).

Auf mRNA-Level war die Bildung von MGB1- bzw. LipB-Transkripten 6 bzw. 8fach in der mGPx4-überexprimierenden Zelle hochreguliert, was auch auf Protein-Ebene nachvollziehbar war.

4.2.2.3 Vergleichende Aktivitätsstudien von LipB-Promotorkonstrukten

In den folgenden funktionellen Promotorstudien sollte die Frage geklärt werden, ob die up-Regulation der LipB-Expression in der mGPx4-überexprimierenden Zelle auf Veränderungen der Promotoraktivität zurückzuführen war.

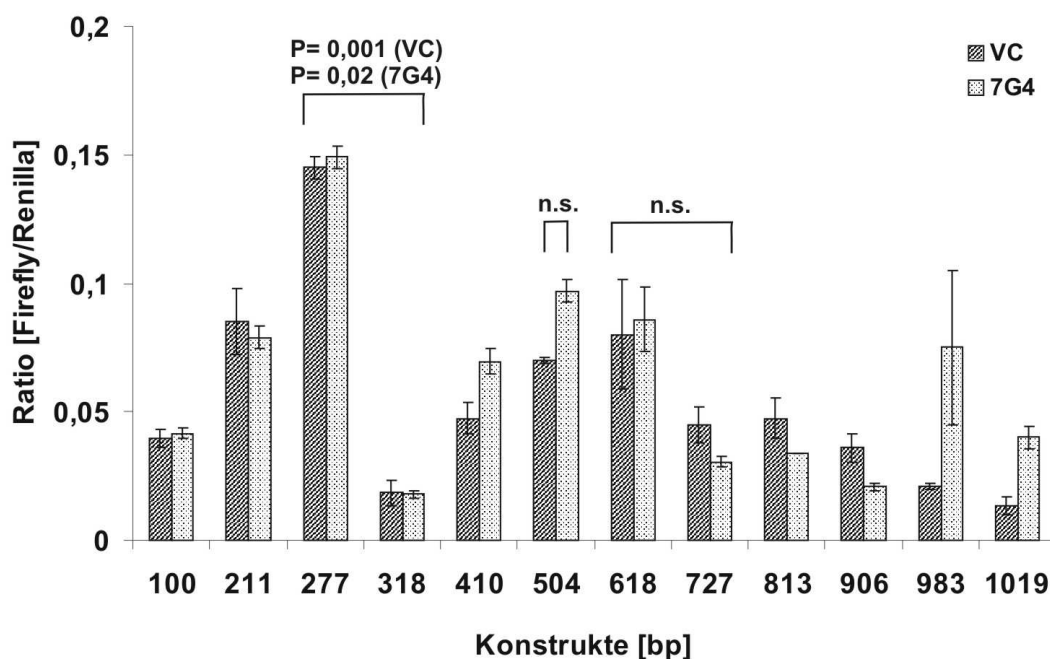


Abb.22: Vergleichende Promotorstudie der Lipophilin B-Promotorfragmente in 7G4-Transfektante und Vektorkontrolle. Hierzu wurden die Zellen nach Ausbildung der Adhärenz mit 250 ng/μl des jeweiligen Promotorkonstruktes transient transfiziert und danach 72h bei 37°C inkubiert, bevor sie schließlich geerntet und lysiert wurden. n.s.: nicht signifikant

Das in Abb.22 dargestellte Diagramm ließ bezüglich der funktionellen Aktivität des Lipophilin B-Promotors die folgenden Aussagen zu. Beide zu untersuchende Zelllinien wiesen ein vergleichbares Aktivitätsprofil auf. Somit konnten für 7G4-Transfektante und Vektorkontrolle (VC) keine differentielle Promotoraktivitäten festgestellt werden konnte. Des Weiteren konnte, wie bereits in den Versuchen mit HEK- bzw. WT-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.1) gezeigt, für das Fragment mit einer Länge von 277

bp die höchste Aktivität in beiden Zelllinien dokumentiert werden. Überdies zeigte der Versuch für eine Konstruktlänge von 318 bp einen signifikanten Abfall der Promotoraktivität. Danach konnte in beiden Zelllinien ansteigende Aktivitäten registriert werden, die ein zweites Maximum nach 504 bp erreichte. Dieses war jedoch in der Transfektante ausgeprägter. Ein absteigender Trend konnte für stromaufwärts liegende Konstrukte ab 618 bp in beiden Zellsystemen gemessen werden.

Es konnten keine differentiellen Promotoraktivitäten in VC sowie in mGPx4-Transfektante gemessen werden. Beide Zelllinien zeigten bis zum 504 bp-Konstrukt ein vergleichbares Aktivitätsprofil wie im HEK-Experiment.

4.3 DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des LipB-Gens

4.3.1 Detektion von spezifischen DNA-Protein-Interaktionen (EMSA)

In den zu untersuchenden Zelllinien wies die 5'-flankierende Region bis -277 bp die höchste Promotoraktivität auf. Diese Tatsache läßt vermuten, daß in dem untersuchten Abschnitt *cis*-regulatorische Sequenzelemente existieren, die durch die Interaktionen mit entsprechenden Proteinen für die Aktivität des Lip-B Promotors verantwortlich sind. Eine adäquate Methode zur Analyse der Bindungssituation *trans*-regulatorischer Proteine an *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen stellte der **E**lectro**p**horetic **M**obility **S**hift **A**ssay (EMSA) dar. Hierfür wurden Promotorfragmente, welche DIG-11-ddUTP-Markierungen trugen, mit nukleären Proteinen inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden danach auf ein natives Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetragen und elektrophoretisch separiert. Diese Komplexe wurden im Gel stärker retardiert als ungebundene DNA, woraus ein Gelshift resultierte. Es sollte somit einerseits untersucht werden, ob hinlänglich bekannte bzw. unbekannte Transkriptionsfaktoren in dieser Region mit der DNA interagieren. Andererseits sollte geklärt werden, ob die unterschiedlichen MGB1/LipB-Level in der Transfektante und Vektorkontrolle auf unterschiedliche DNA-Protein-Interaktionen zurückzuführen waren. Daher stammten die im Verlauf der Experimente verwendeten nukleären Extrakte sowohl aus 7G4-Transfektante als auch aus Vektorkontrolle. Hierfür wurden fünf 50-mer DNA-Oligonukleotidsonden verwendet, die jeweils in fortlaufender Weise die LipB-Upstream-Sequenz beinhalteten. Um das „Zerschneiden“ von potentiellen

DNA-Motiven zu umgehen, kamen Sonden zum Einsatz, die mit 10 Basen des folgenden Oligonukleotid überlappten. Damit wurde eine proximale Region von ca. 200 bp untersucht. Zum besseren Verständnis der folgenden Gelshift-Abbildungen wurde eine Graphik zur Veranschaulichung der Sondenpositionierung am LipB-Promotor beigefügt (siehe Abb.23).

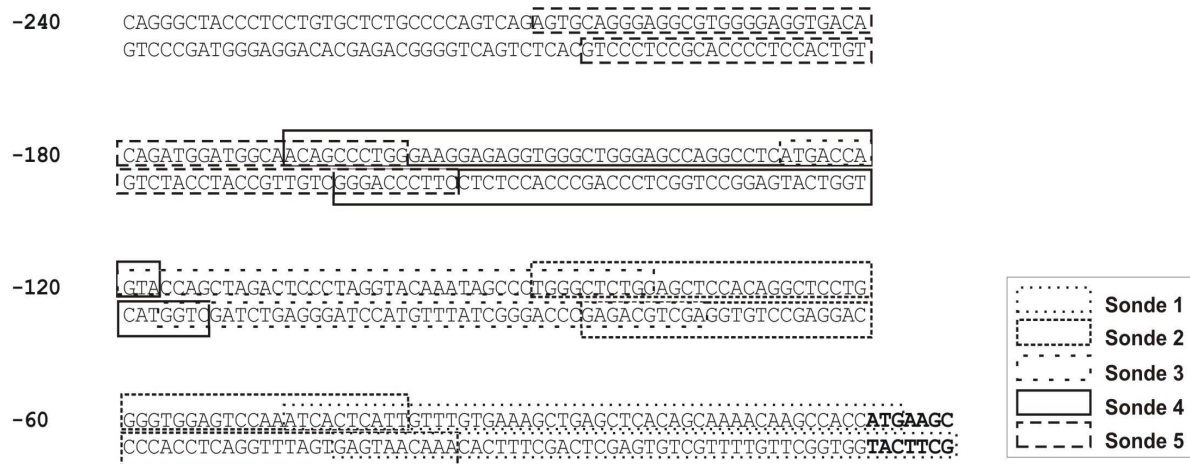


Abb.23: Schematische Darstellung der Sondenpositionierung in der proximalen Lipophilin B-Promotorregion. Die Lage der 50-mer Oligosonden wurde so gewählt, daß jeweils 10 Basen überhängig waren bzw. mit dem darauffolgenden Oligonukleotid überlappten. Das Startcodon des offenen Leserasters ist fett unterlegt.

4.3.1.1 Kompetitionsexperimente mit unmarkierten LipB-DNA-Sonden

Zunächst sollte untersucht werden, ob in der zu untersuchenden LipB-Promotorregion Wechselwirkungen mit DNA-Bindungsproteinen stattfanden. Hierfür erfolgte die Inkubation der markierten Gelshift-Sonden mit nukleären Extrakten aus Vektor-kontrollzellen. Die Spezifität des entstandenen Bandenshifts wurde im Anschluß durch kompetitive Gelshifts (Auslöschung des Bandensignals) mit unmarkierter Sonden-DNA verifiziert. Diese beinhalteten Sequenzen aus der proximalen Promotorregion des LipB-Gens und wurden in 166fachen Überschuß mit markierten Sonden der gleichen Basenfolge sowie nukleärem Extrakt zur Reaktion gebracht.

Die Auswertung der Gelbanden zur Sonde 1 zeigte ein schwaches Signal (mit Pfeilen gekennzeichnet) im oberen Drittel des Geles, dargestellt in Abb.24, mittlere Bahn. Nach Competition verschwand diese Bande bis auf unspezifische Protein-DNA-Interaktionen, d.h. all jene Komplexe, die auf unspezifische Bindungen anderer nukleärer Proteine zurückzuführen sind. Somit konnte die Spezifität der Gelbande bestätigt

werden. Sonde 2 zeigte im Gel nach Extrakt-Inkubation zwei spezifische Banden, die jedoch in ihrer Intensität stärker ausgeprägt waren. Für Sonde 5 konnte im obersten Drittel des Gels ein ähnliches Muster in Form einer Doppelbande dokumentiert werden. Hinzu kam jedoch noch ein weiteres Signal im mittleren Gelabschnitt. Experimente mit Kompetitor-DNA und Oligonukleotid 3 konnten eine spezifische Bande in der mittlere Gelbahn bestätigen. Ein intensives sowie diffuses Signal wurde schließlich durch Komplexierung mit unmarkierten Promotor-Fragmenten und nukleären Proteinen (Sonde 4) nach elektrophoretischer Separation festgestellt.

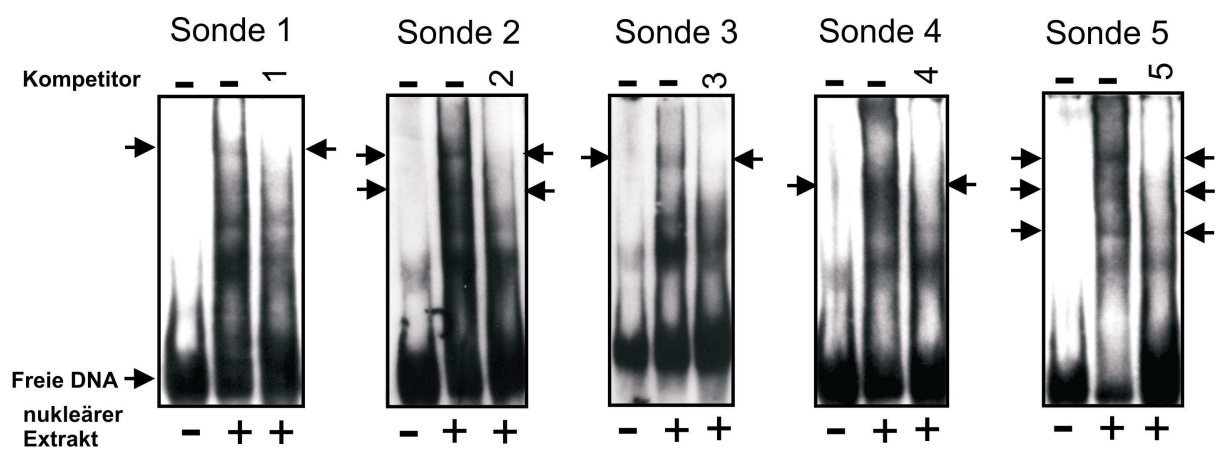


Abb.24: EMSA-Kompetitionsexperimente zur Analyse der Bindungsaktivität von unbekanntem *trans*-regulatorischen Elementen am LipB-Promotor-DNA-Sonden. Die Versuche wurden mit nukleären Extrakten aus Vektor-kontrollzellen und einem 166fachen Überschuss an unmarkierten Lipophilin B DNA-Sonden mit einer Länge von 50 bp durchgeführt. Für jede Reaktion wurden 10 µg nukleärer Extrakt eingesetzt. Die Protein-DNA-Komplexe wurden in einem 6%igen nativen PAA-Gel elektrophoretisch separiert und abschließend auf eine Nylon-Blotmembran elektrotransferiert. Die Pfeile markieren die spezifischen Gelbanden.

Jede untersuchte DNA-Sonde zeigte eine oder mehrere Signalbanden, die nach Kompetition mit unmarkierten Sonden spezifische DNA-Protein-Interaktionen nachwies. Sonde 2 und 5 zeigten ein ähnliches Bandenmuster.

4.3.1.2 EMSA-Gelshift-Experimente mit faktorspezifischer Kompetitor-DNA

Die 50-mer Oligonukleotide wurden zu Beginn der Versuchsreihe unter Zuhilfenahme des MatInspector-Programmes untersucht (Tab.8). Der Grund hierfür lag darin, potentielle *trans*-regulatorischer Elemente zu identifizieren und die sondenspezifische Lokalisierung des Faktors zu bestimmen. Diese Informationen waren

schließlich die Basis zum Einsatz von spezifischen Konsensus-Oligonukleotiden. Zur Spezifizierung der experimentell ermittelten Bandensignale wurden in diesen Untersuchungen ein Überschuß an unmarkierter DNA-Sonden mit faktorspezifischer DNA-Sequenzen (Konsensus-Oligonukleotid) verwendet. Führt die Inkubation mit einem spezifischen Oligonukleotid zur Aufhebung des Gelshift, ist so die Identifizierung des bindenden Proteins möglich. Zum Einsatz kamen dabei die Oligonukleotide mit den Konsensus-Sequenzen für die Faktoren cMAF, tMAF, NF1, Sp1, MEF2 und AP1. Diese wurden in Abb.25 **A** veranschaulichend markiert. Zudem wurde zur erleichterten Identifizierung der Bindungsfaktoren die Oligosonde 5 geteilt und die jeweiligen Hälften sequenziert (Abb.25 **B**) und im Gel analysiert.

Sonde	Transkriptionsfaktor	Literaturverweis
1	I) CCAAT/enhancer binding protein beta	[232]
	II) SOX-5	[233]
2	I) Activating protein 1 (AP1)	[234-236]
	II) MAF/AP1 related factors	[226, 237]
	III) Growth factor independence transcriptional repressor (GF11B)	[238]
3	I) Myocyte-specific enhancer binding factor (MEF2)	[224, 239]
	II) Zinc finger transcription factor RU49	[240]
4	I) Nuclear factor 1 (NF1)	[241, 242]
	II) Zinc finger transcription factor RU49	[240]
5	I) MAF/AP1 related factors	[226, 237]
	II) Myeloid zinc finger 1 factors (MZF1)	[243]
	III) GLI zinc finger family	[244, 245]
	IV) Basic and erythroid krueppel like factors (KLF)	[246, 247]
	V) Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	[248]
	VI) Ras-responsive element binding protein (RREB)	[249, 250]

Tab.8: Tabellarischer Überblick der potentiellen DNA-Bindungsfaktoren der 50-mer Oligonukleotid-Sonden im EMSA-Experiment. Die konstruierten Sonden wurden mittels des MatInspector-Programmes analysiert. Dabei wurden die Faktoren mit der höchsten Homologie zu den in der Datenbank gespeicherten Konsensus-Elementen ausgewählt.

Aus dem EMSA-Screening mit Oligo-DNA-Sonde 2 und faktorspezifischen Oligonukleotiden in Abb.26, Gel 1-3 konnten die folgenden Schlüsse gezogen werden. Die eingesetzten Konsensus-Oligonukleotid-Sonden führten zu einer Bandenauslöschung oder Veränderung des ursprünglichen Signalbildes. Dagegen führte die Inkubation der Sonde 2 mit dem Konsensus-Oligonukleotid für den Sp1-Transkriptionsfaktor zur Aufhebung des Gelshiftes. Da das Gelshiftmuster von Sonde 2

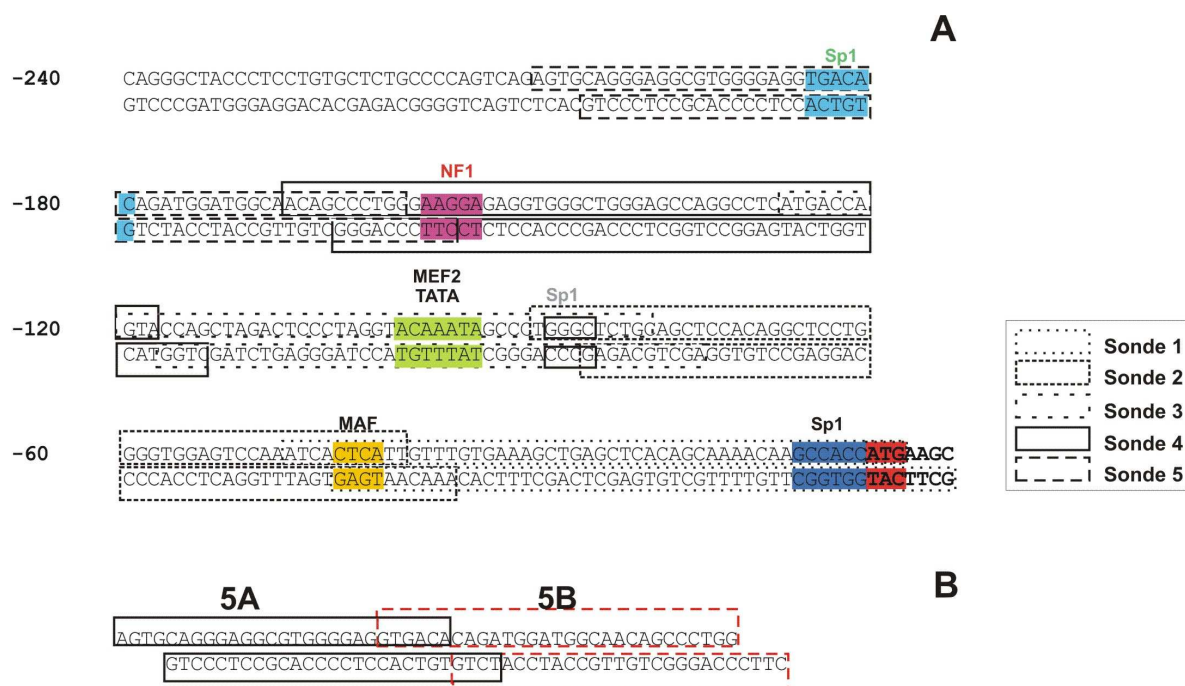


Abb.25: A) Lokalisierung potentieller *trans*-regulatorischer Elemente (schwarz gekennzeichnet) in den jeweiligen Kompetitor-DNA-Sonden. Die farbig unterlegten Core-Sequenzen entsprechen denen in den EMSA-Experimenten eingesetzten Sonden. Angegeben sind darüber hinaus diejenigen Faktoren, die im Gel Indizien für spezifische DNA-Protein-Interaktion lieferten (rot, grau und grün). Hinweise für die Sp1-Bindungsstellen konnten ohne computergestützte Algorithmen via EMSA gezeigt werden. Die TATA-Box konnte *in silico* mittels des Soft Berry-Programms gezeigt werden. **B)** Die Teilung der DNA-Sonde 5.

und Sonde 5 vergleichbar waren, würde geprüft, ob möglicherweise die gleichen Transkriptionsfaktoren zu der Ausbildung des Gelshifft führen. In einem „Kreuz“-Experiment, d.h. Sonde 2 inkubiert mit einem Überschuß an ungelabelter Sonde 5, sollte es daher zu einer Signalauslöschung kommen. Wie in Abb.26 Sonde 2 Gel 2 ersichtlich führte die Konkurrenz mit unmarkierter Sonde 5 zu einer Auslöschung des Bandensignals. Die Oligo-DNA-Sonde 3 indes wurde mit dem MEF2-Kompetitor inkubiert. Das Gelbild hierzu konnte keine eindeutige Aufhebung des Gelshifftes dokumentieren, da ein schwaches Bandensignal sichtbar war. Die EMSA-Sonde 4 (Abb.27) wurde in den jeweiligen Bahnen mit NF1 und cMAF-Kompetitoren zur Reaktion gebracht. Letztere erzielte keine Auslöschung, jedoch konnten Veränderungen der Gelbanden mit NF1 registriert werden. Nach Konkurrenz konnte aus dem unscharfen Bandensignal in Bahn 2 eine Doppelbande herausgefiltert werden. Schließlich konnte in Sonde 5 das Sp1-Protein durch spezifische Oligonukleotide kompetiert werden (Gel 3). Auch das „Kreuz“-Experiment in Gel 2 führte zu einer

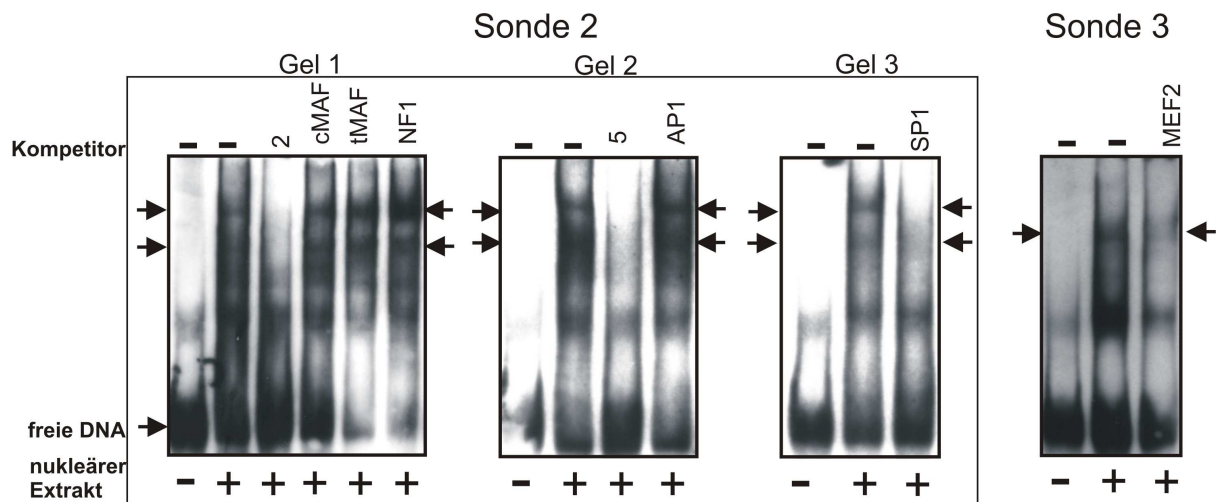


Abb.26: Gelshift-Experimente zur qualitativen Beurteilung der DNA-Protein-Interaktionen bekannter bzw. unbekannter *trans*-regulatorischer Elemente am Lipophilin B-Minimalpromotor. Dokumentiert sind hierbei die Sonden 2 und 3. Hinzugekommen sind hierbei diejenigen Gelbahnen, die Bandensignalen durch DNA-Protein-Komplexierung mit spezifischen Oligo-DNA-Sonden aufweisen. Dies hatte in erster Näherung die Identifizierung hinlänglich bekannter Transkriptionsfaktoren zum Ziel. Die verwendeten nukleären Extrakte stammten aus Vektorkontrollzellen.

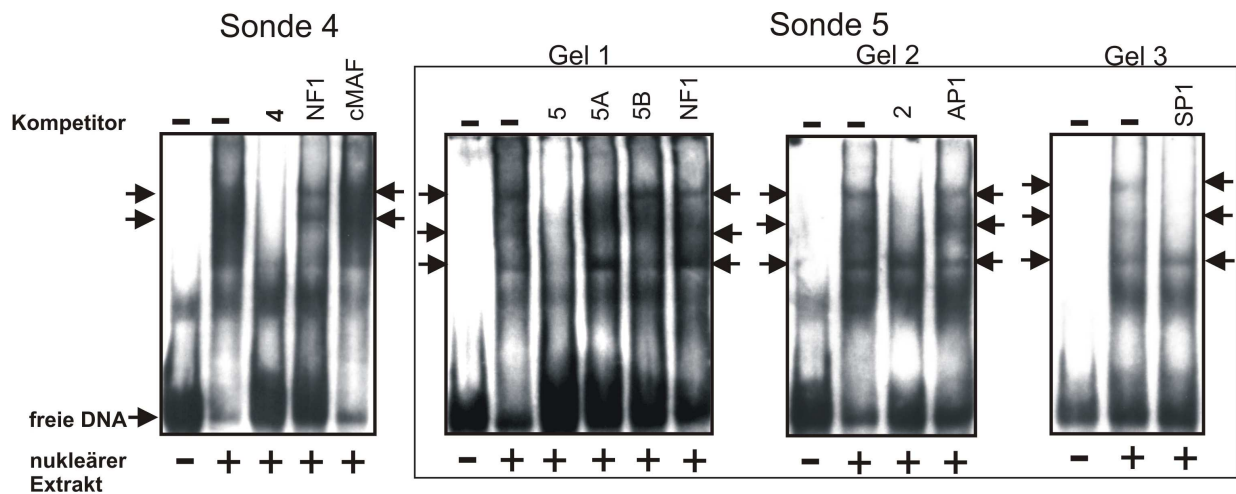


Abb.27: Gelshift-Experimente zur qualitativen Beurteilung der DNA-Protein-Interaktionen bekannter bzw. unbekannter *trans*-regulatorischer Elemente am Lipophilin B-Minimalpromotor. Dargestellt sind die Sonden 4 und 5.

Auslöschung der Bande. Jedoch konnte der AP1-Kompetitor keine Veränderungen des Bandenmusters herbeiführen. Ebenso unverändert blieben die Gelshifts nach Inkubation mit NF1-Sonden. Auch die Untersuchung des geteilten Oligos 5 ergab keine neuen Erkenntnisse hinsichtlich differentieller Protein-Interaktionen. Lediglich die erste Bande in der 5A-Lane erschien etwas unschärfer.

Eine spezifische Sp1-DNA-Protein-Interaktion konnte in Sonde 2 und 5 nachgewiesen werden. Überdies zeigte Sonde 4 eine NF1-spezifische Aufhebung des Bandensignals.

4.3.1.3 Differentielle DNA-Protein-Interaktion im vergleichenden Gelshift Assay

Im abschließenden EMSA-Experiment wurden die nukleären Extrakte aus mGPx4-Transfektante und Vektorkontrolle nacheinander mit den DNA-Sonden 1-5 inkubiert und vergleichend im Gel gegenübergestellt. Dies hatte zum Zweck differentielle und spezifische Gelshifts zu identifizieren, die eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Expressionsniveau liefern könnten.

Die Versuche hierzu konnten eindeutig belegen, daß Extrakte aus Vektorkontrolle und Transfektante keine differentielle Gelshifts verursachten, da beide Zelllinien gleiche Bandenmuster aufwiesen. In erster Näherung führte demnach die Überexpression der mGPx4 zu keinen Veränderungen der Protein-DNA-Interaktionen in der untersuchten LipB-Promotorregion.

Die vorangegangenen Experimente lieferten keine schlüssigen Hinweise auf potentielle Ursachen für die differentielle Expression von MGB1/LipB in der mGPx4-Transfektante.

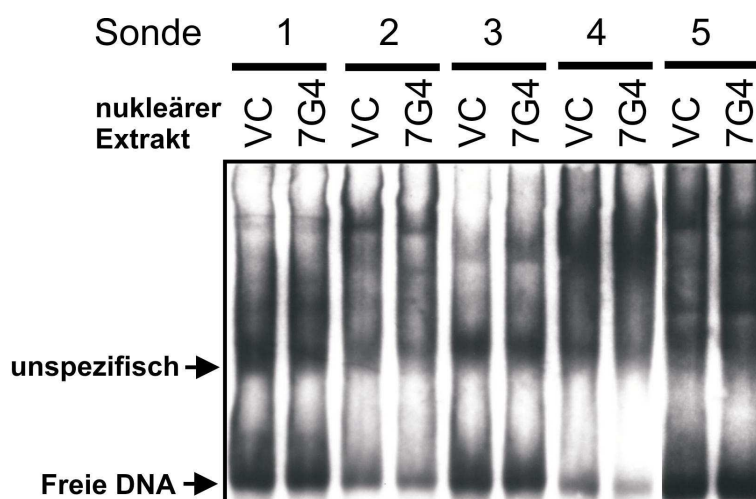


Abb.28: Gelfoto des entwickelten Immunoblots aus der Gelshift-Reaktion mit beiden nukleären Extrakten und sämtlichen Oligo-DNA-Sonden. Ziel und Zwecks dieses Experimentes war die vergleichende Analyse der Protein-DNA-Interaktionen im Hinblick auf Bildung differentielle Gelshiftsignale. Auch hier wurde für jede Reaktion 10 µg Kernextrakt eingesetzt.

4.4 Experimentelle Analysen des mRNA-Transkriptes

In den nächsten Experimenten wurde in weiterer Konsequenz der Status der Stabilität und Elongation des LipB-mRNA-Transkriptes charakterisiert. Diese wurden besonders im Hinblick auf den potentiellen Einfluß der mitochondrialen GPx4 auf post-transkriptionelle bzw. transkriptionelle Mechanismen durchgeführt.

4.4.1 Einfluß der mGPx4 auf die Transkriptstabilität

Um Einblicke in die Regulation auf post-transkriptioneller Ebene zu gewinnen, bestand die Notwendigkeit die Stabilität der mRNA-Transkripte zu untersuchen. Dadurch sollten putative Effekte der mGPx4 auf die strukturelle Integrität der mRNA von MGB1 und LipB dokumentiert werden. In diesen Versuchen kam Actinomycin D zum Einsatz. Diese Verbindung inhibierte als Inkaltor der DNA die zelluläre Transkription durch Blockade der RNA-Polymerase II während der Elongation. Somit konnten keine neuen Messenger gebildet werden und die Stabilität des mRNA-Pools von MGB1 und LipB bewertet werden. VC-Zellen sowie mGPx4-Transfektante wurden zu diesem Zweck in Actinomycin D versetztem Medium inkubiert und zu den gegebenen Zeitpunkten geerntet. Im Anschluß die RNA-Präparation wurden die Transkriptmengen via quantitativer real time-PCR bestimmt.

Die vorliegenden Diagramme in Abb.29 wiesen im Fall von MGB1 (**A**) und LipB (**B**) unterschiedliche Kurvenverläufe auf. Sowohl in Vektorkontrolle als auch in 7G4-Transfektante konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der MGB1-Transkriptmengen gemessen werden. Dies legte den Schluß nahe, daß die mGPx4 keinen direkten Einfluß auf die strukturelle Integrität der Messenger-RNA von MGB1 hatte. Die Kurvenverläufe in Diagramm B waren indes nicht ähnlich. Während die VC-Zellen eine zeitabhängige Degradation der LipB-mRNA aufwiesen, zeigte die Transfektante diesen signifikant nach 7h Actinomycin D-Inkubation. Der Verdacht liegt infolgedessen nahe, daß die mGPx4 innerhalb eines Zeitintervalls von 5h die LipB-Transkripte vor zellulärer Degradation schützt.

Die Stabilität der MGB1-Transkripte wurde durch die mGPx4 nicht beeinträchtigt. Der Umkehrfall schien hingegen für LipB-Transkripte zu gelten.

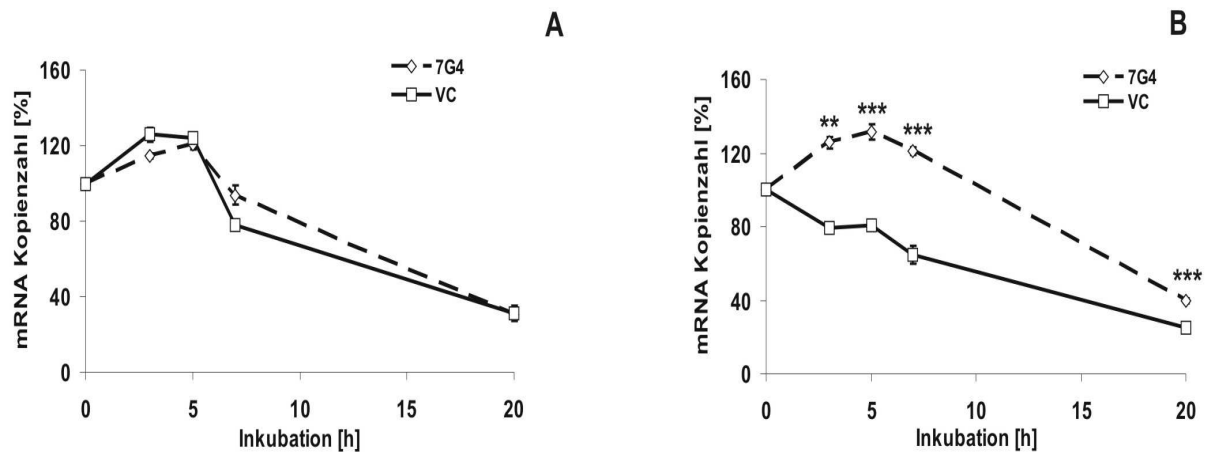


Abb.29: Statistische Auswertung der Inhibition mit Actinomycin D in mGPx4-Transfektante (7G4) und Vektorkontrolle (VC). Hierbei wurde die komplette zelluläre RNA-Synthese gehemmt, so daß keine neuen Transkripte entstehen können. **A** zeigt die gemessene MGB1- und **B** die LipB-Transkriptmenge. Die relative Standardabweichung ist in beiden Diagrammen sehr klein, so daß die Fehlerbalken folglich kaum sichtbar sind. Die Graphiken stellen die Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen dar.

4.4.2 Einfluß der mGPx4 auf die Transkriptelongation und mRNA-Reifung

Das Prinzip der angewendeten Methode ist Abschnitt 3.2.8 zu entnehmen.

Zu klären war im folgenden Abschnitt die Frage nach dem transkriptionellen sowie post-transkriptionellen Einfluß des erhöhten intrazellulären mGPx4-Levels in der 7G4-Transfektante auf die Transkriptelongation und auf die Prozessierung der prä-mRNA (Capping, Spleißen und Polyadenylierung). Die Überlegung zu diesem Versuch basierte auf der These, daß die mGPx4 Einfluß auf den Elongations- und Reifungsprozeß nimmt und hierdurch die Menge an unvollständig transkribierter bzw. prozessierter MGB1- bzw. LipB-mRNA abnimmt. Die vollständig gespleißten und polyadenylierten Transkripte würden somit im Vergleich zur Vektorkontrolle quantitativ ansteigen. Sollte letzteres anhand dieses Experimentes verifiziert werden, wäre dies eine denkbare Ursache für die gemessene Hochregulierung der Genexpression von MGB1 und LipB in der mGPx4-transfizierten Mammakarzinom-Zelle. In beiden RT-Ansätzen (Oligo-d(T)₁₈⁻, Random-Hexamer-Primern) wurde die gleiche up-Regulation für MGB1 bzw. LipB mit beiden Primerkombinationen in der mGPx4-Transfektante detektiert (siehe Abb.30).

Somit konnte eine verbesserte Transkriptelongation in der Transfektante als Ursache für die erhöhte Kopienzahl ausgeschlossen werden.

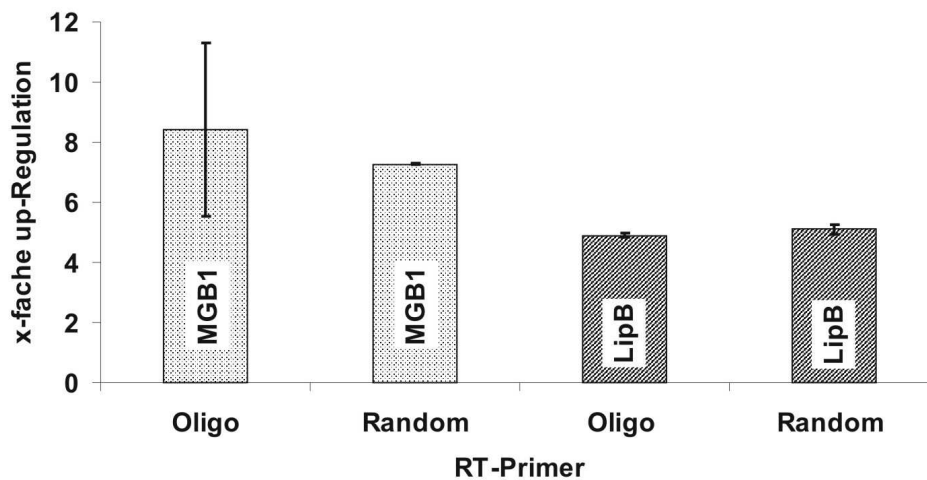


Abb.30: Graphische Darstellung der statistischen Analyse der unterschiedlich gepriemten cDNA nach RT-PCR (Oligo = Oligo-d(T)₁₈-Primer, Random = Random-Hexamere-Primer).

4.5 Modifizierungen der genomischen DNA als Regulator der Genexpression

4.5.1 Verifizierung der CpG-Hypomethylierung

Die Experimente der letzten Abschnitte konnten keine plausible Erklärung für die Hochregulation der MGB1/LipB-Transkriptmenge in der mGPx4-Transfektante liefern. Zur weiterführenden Behandlung dieser Problemstellung gehörte daher das Studium regulatorischer Modifizierungen der genomischen DNA. Zur Erforschung standen hierbei der mögliche epigenetische Einfluß von CpG-Methylierungen bzw. Acetylierungen nukleosomaler Histone auf die Regulation der Expression oben genannter Sekretoglobuline. Dazu sah es das experimentelle Procedere vor, epitheliale Brustkrebszellen COH-BR1 (VC-Zellen & 7G4-Transfektante) mit einem Inhibitor der DNA-Methyltransferase 1 bzw. der Histon-Deacetylase (5-Aza-2'-desoxycytidin und (*R*)-Trichostatin A) zu inkubieren. Anschließend wurden die Auswirkungen auf das Expressionsniveau von MGB1 und LipB bewertet.

Im folgenden Abschnitt sollte die 5-Aza-CdR-bedingte Hypomethylierung DNA-ständiger CpG-Inseln verifiziert werden. Hierzu wurde die Expression des Transglutaminase 2 (TG2)-Transkriptes mit Hilfe der real time-PCR quantifiziert. Dabei war aus der Literatur bekannt, daß die Amplifikation dieses Gens einer methylierungs-sensitiven positiven Regulation unterlag [251]. Die TG2 fungierte somit in den 5-Aza-CdR-Inhibitionsversuchen als Indikator-Gen bzw. Positivkontrolle für eine erfolgte

Demethylierung. Demnach sollte die TG2 Genexpression nach Inkubation mit dem DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt 1)-Hemmer deutlich ansteigen.

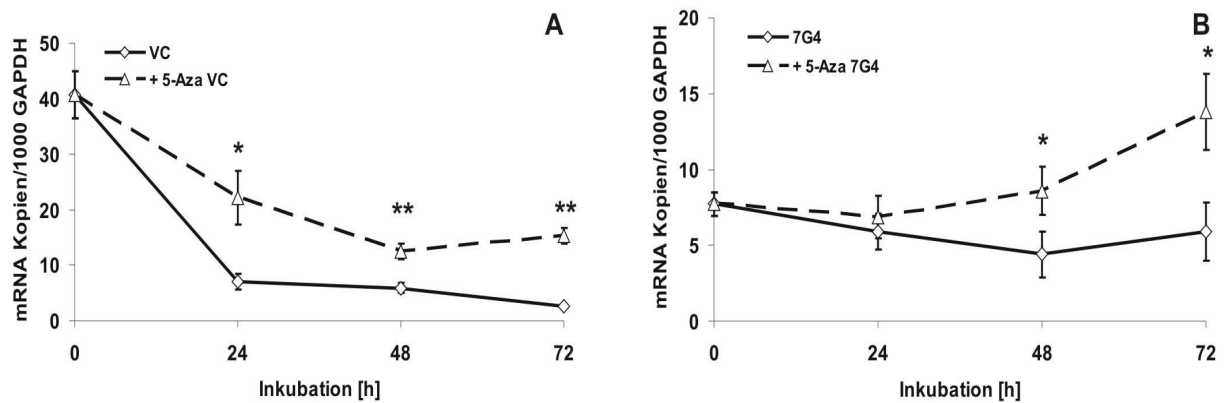


Abb.31: Zeitabhängige Transkriptanalyse der methylierungssensitiven Transglutaminase 2 (TG2) zur Überprüfung der DNA-Hypomethylierung im MGB1/LipB-Promotor mit Hilfe der real time-PCR. Zur statistischen Bewertung des Inhibitoreffektes von 5-Aza-CdR auf die CpG-Methylierung wurde die gemessene Menge an TG2-Kopien gegen Inkubationszeit aufgetragen.

Wie in Abb.31 **A** ersichtlich wurde, konnte nach 48h Inkubation ein deutlicher Anstieg der TG2-Expression in den VC-Kontrollzellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen registriert werden. Die up-Regulation setzte jedoch im Vergleich zur Transfektante zeitverzögert ein und blieb bis zum letzten Meßpunkt signifikant erhöht. Die mGPx4-Transfektante (Abb.31 **B**) zeigte ebenso einen Anstieg der TG2-Expression unter Inhibitoreinwirkung. Die Hochregulierung war jedoch in dieser Zelle ausgeprägter als in der Vektorkontrolle. Die Zunahme setzte signifikant bereits nach 24h ein. Nach 72h Inkubation war ein deutliches Maximum der Transkriptmenge erreicht. Dieses war signifikant höher als die Anzahl der Kopien in der unbehandelten Zelle. Der auffällige Abfall der Transkriptmenge innerhalb der 24h Inkubation war sowohl mit als auch ohne Zugabe des Inhibitors in der Vektorkontrolle feststellbar. In der transgenen Zelllinie war dieser Trend jedoch nicht vergleichbar stark ausgeprägt. Ursächlich können hier zellspezifische Effekte angenommen werden.

Auf mRNA-Ebene konnte somit die 5-Aza-CdR-induzierte Hypomethylierung von CpG-Inseln durch Anstieg der TG2-Expression nachgewiesen werden. Dadurch konnte indirekt die Wirksamkeit des Inhibitors auf die Dnmt 1 nachgewiesen werden.

4.5.1.1 Einfluß der CpG-Methylierung auf die Expression von MGB1 und LipB

Die folgenden Experimente dienten dazu, den Einfluß von DNA-Methylierung in CpG-Inseln auf die Expression von Sekretoglobulinen zu untersuchen. Hierzu wurde nach Inhibition der Dnmt 1 mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-CdR) das Expressionsniveau von MGB1 und LipB via real time-PCR quantitativ analysiert und statistisch ausgewertet.

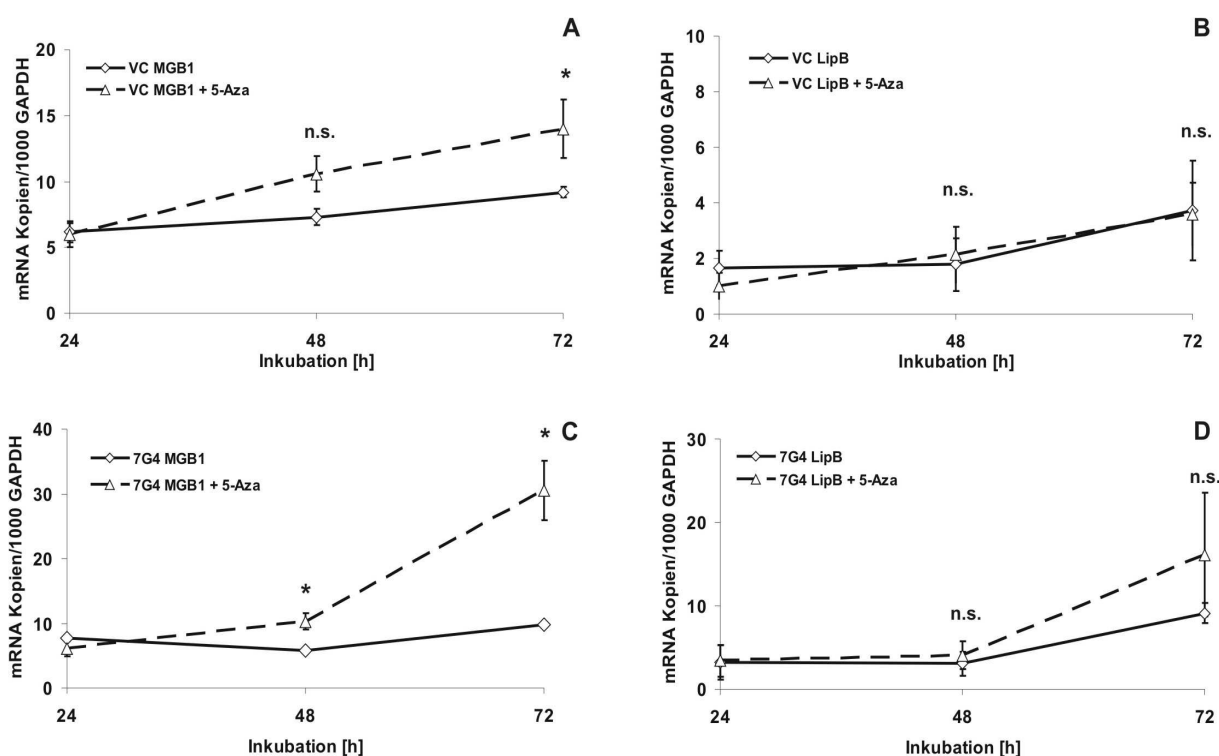


Abb.32: Zeitabhängige Inhibitionsexperimente zur Transkriptquantifizierung der Gene MGB1 (A) und LipB (B) in VC-Kontrollzellen bzw. (C) und (D) in 7G4-Transfektante. Diese Versuchsreihe diente der Untersuchungen der Promotorregion im Hinblick auf den potentiellen Einfluß regulierender CpG-Methylierungen auf die Genexpression. Dazu wurden beide Zelllinien mit 5-Aza-CdR inkubiert und nach Präparation der mRNA die Menge der jeweiligen Transkripte via real-time-PCR ermittelt und zur statistischen Bewertung gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen bestätigt. n.s. = nicht signifikant

Nach Zugabe von 5-Aza-CdR konnte in den Kontrollzellen VC ein kontinuierlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg der MGB1-Expression (Abb.32 A) bis zum Zeitpunkt $t=72h$ im Vergleich zu den Proben ohne 5-Aza-CdR festgestellt werden. Die LipB-Expression zeigte währenddessen ein völlig anderes Bild (Abb.32 B). Hier konnte in der Kontrollzelle VC bis zum 72h-Zeitpunkt keine Beeinflussung der

Expression durch Zugabe des Inhibitors registriert werden. Die Kurven der Leer- bzw. 5-Aza-CdR-Proben verliefen beinahe deckungsgleich. In der mGPx4-Transfektante zeigte die MGB1-Expression einen moderaten Anstieg bis zum 48h-Zeitpunkt nach Zugabe des Inhibitors (Abb.32 C). Danach setzte sich die Zunahme zeitverzögert sowie signifikant in erhöhterem Maße bis zum 72 h Meßpunkt fort. Dieser erwies sich ebenso nach Anwendung des t-Tests als signifikant. Die LipB-Expression indes wies keine Inhibitor bedingten Effekte auf (Abb.32 D). Beide Kurven verliefen annähernd gleich.

5-Aza-CdR übte auf die MGB1-Expression in den Vektorkontrollzellen sowie in der mGPx4-Transfektante nur einen moderaten Effekt aus. Die LipB-Expression zeigte in beiden untersuchten Zelllinien keine Unterschiede.

4.5.2 Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB

4.5.2.1 Analyse der Histon H3-Acetylierung nach HDACI-Inkubation (I)

Abgesehen von der DNA-Methylierung stellt die Histonacetylierung eine weitere Möglichkeit dar, die Expression von Genen maßgeblich zu beeinflussen. Infolgedessen wurde in einem nächsten experimentellen Schritt der Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB untersucht. Hierfür wurden die Zellen (Vektorkontrolle VC, 7G4-Transfektante) zunächst mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACI) (*R*)-Trichostatin A inkubiert und der resultierende Acetylierungsgrad mittels Western Immunoblot nachgewiesen. Für die Immunodetektion wurden Acetyl-H3-Antikörper verwendet, die spezifisch die Histonacetylierung am Lysin 9 nachwiesen. Dieser Antikörper wurde gewählt, da die epigenetische Modifikation des H3-Histons an dieser Position für die Genregulation durch Auflockerung Chromatinstruktur in vielen Organismen sorgte [121].

Die Auswertung des Western-Blots ergab, in den unbehandelten Proben beider Zelllinien einen vergleichbar geringen Acetylierungsstatus (Abb.33 A und B). In der Vektorkontrolle konnte nach 4h Inkubation mit TSA ein deutlicher Anstieg des Acetylierungsgrades registriert werden, der annähernd bis zum 12h-Meßpunkt anhielt. Die Transfektante zeigte nach 4stündiger TSA-Behandlung ebenso eine merkliche Zunahme der Histonacetylierung, die auch 12h nach Inhibitorzugabe meßbar war.

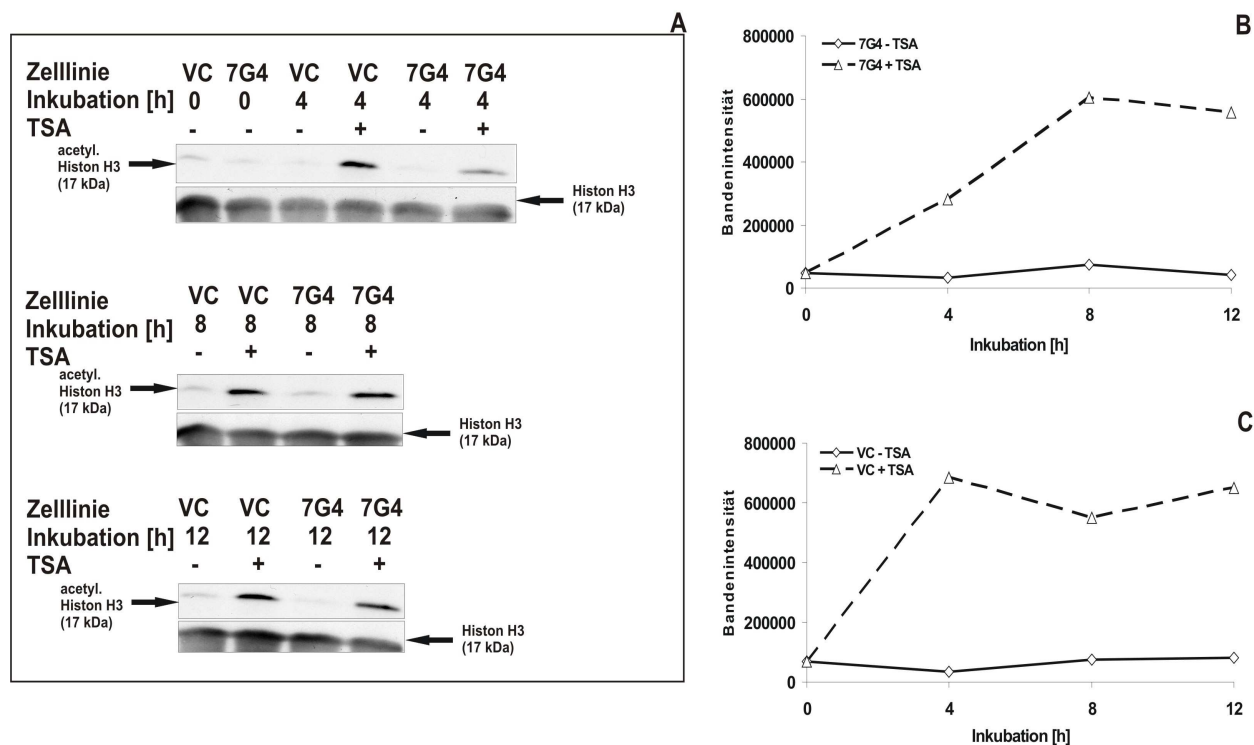


Abb.33: **A)** Western Blot der acetylierten bzw. nicht-acetylierten H3-Histone. Um die Veränderung der Histon-acetylierung durch TSA nachzuweisen, wurde der Gehalt an nicht-acetylierten sowie acetylierten H3-Histonen zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten analysiert. Hierzu wurden die Lysate von 500000 Zellen beider Linien auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretischer separiert. Die im Gel immobilisierten Proteinkomplexe wurden anschließend auf eine Nitrozellulose Blotmembran elektrotransferiert. **B** bzw. **C)** Densitometrische Quantifizierung der Gelbanden im Immunoblot der hyperacetylierten H3-Histone mit und ohne Zugabe von TSA. Dieses Experiment ist repräsentativ für zwei Immunoblots.

Im direkten Vergleich zur VC konnte zudem ausgesagt werden, daß nach 4h TSA-Zugabe auffällig wenig acetylierte Histonproteine H3 in der Gelbahn der mGPx4-Transfektante sichtbar waren, erkennbar an der schwach ausgeprägten Signalbande. Nach 8 bzw. 12h TSA-Inkubation war das Acetylierungsniveau in beiden Zellen vergleichbar hoch. Somit trat der Inhibitionseffekt zeitverzögert in der 7G4-Transfektante ein. Nach 24h TSA-Behandlung (Abbildung nicht gezeigt) konnte schließlich kein Unterschied mehr zwischen den untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Die Hyperacetylierung war hier nicht mehr nachweisbar. Während der gesamten Inkubation war die Menge nicht-acetylierter Histonproteine konstant.

Es konnte eine zeitabhängige Zunahme des Histon-Acetylierungsgrades in beiden Zelllinien nach Zugabe von TSA nachgewiesen werden. Das Maximum war in VC-Zellen bereits nach 4h, in der Transfektante zeitverzögert erkennbar.

4.5.3 Expressionsanalyse von MGB1 und LipB nach HDACI-Inkubation (I)

4.5.3.1 Real time-PCR zur Quantifizierung der MGB1-Transkripte

In den folgenden Expressionsanalysen der Gene MGB1 und LipB wurden die Transkriptmengen mittels real time-PCR quantifiziert und statistisch ausgewertet. Dazu wurden zwei unterschiedliche Zeitfenster gewählt, um die TSA induzierten Effekte innerhalb einer Kurz- bzw. Langzeitinkubation zu bewerten. Kurzzeitinkubationen dienten dazu, Veränderungen der Genexpression während der TSA-Inkubation mit nachweisbarer Hyperacetylierung der Histonproteine zu bewerten. Um eventuell auftretende TSA-Effekte zu registrieren, die nicht auf der Hyperacetylierung basieren, wurde die Expression innerhalb einer 24-96stündigen Inkubationsperiode betrachtet. Auf mRNA-Ebene konnte im Hinblick auf den Einfluß von TSA auf die MGB1-Expression folgende Erkenntnisse festgehalten werden.

Die Kurzzeitinkubationsexperimente (0-12h) ergaben keine Unterschiede in der Transkriptmenge von MGB1 nach TSA-Inkubation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Graphik nicht gezeigt). Beide Zellmodelle zeigten keine eindeutigen Veränderungen in der Transkriptmenge. Unterschiede in der MGB1-Expression wurden erst nach längerer Inkubation meßbar. In Abb.34 **A** und **B** wurde klar, daß die Amplifikatmenge in den Negativkontrollen beider Zelllinien in beinahe identischer Weise zeitabhängig zunahm. Die TSA behandelten Proben wiesen dagegen über die

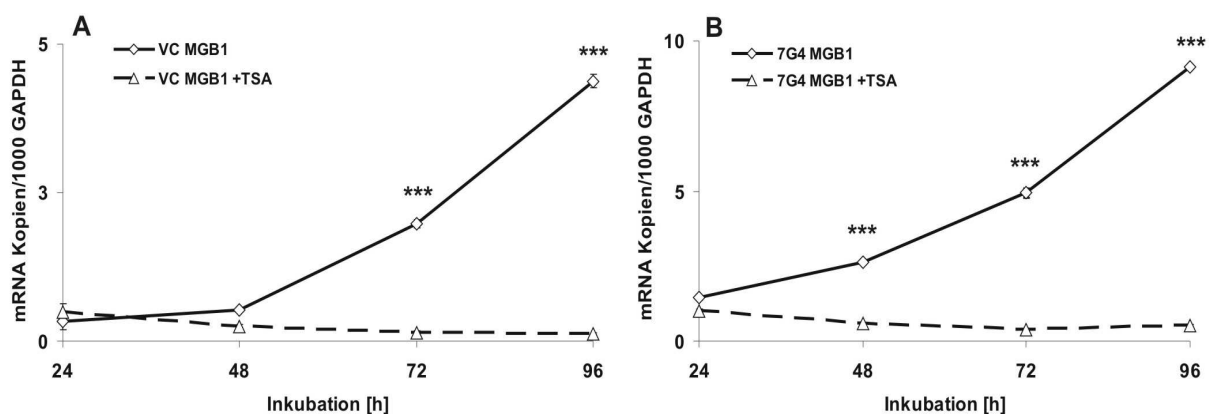


Abb.34: Untersuchung des Expressionssystems von Mammaglobin 1 (MGB1) in Vektorkontrolle (VC) und 7G4-Transfektante (7G4) nach 96h Kultivierung mit und ohne Zugabe von TSA. Die Quantifizierung wurde mittels real time-PCR bestimmt und im Diagramm gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. n.s. = nicht signifikant

gesamte Inkubation eine im Vergleich zur Negativkontrolle gleichbleibend niedrigere, gleichsam reprimierte Genexpression auf. Die TSA-Hyperacetylierung, die bis zu 12h nachweisbar war (siehe Abschnitt 4.5.2.1), bewirkte keine Steigerung der MGB1-Expression.

Keine differentiellen Expressionsmuster waren nach Kurz- bzw. Langzeit-TSA-Behandlung in mGPx4-Transfektante und VC-Zellen meßbar. Eine 96h-Inkubation mit TSA erreichte jedoch eine klare Reprimierung der MGB1-Expression.

4.5.3.2 Effekte von (R)-Trichostatin A auf die LipB-Expression

Die Effekte von TSA auf die LipB-Expression in der Vektorkontrolle und Transfektante ergaben nach Kurzzeitkultivierung (0-12h, Graphik nicht gezeigt) in

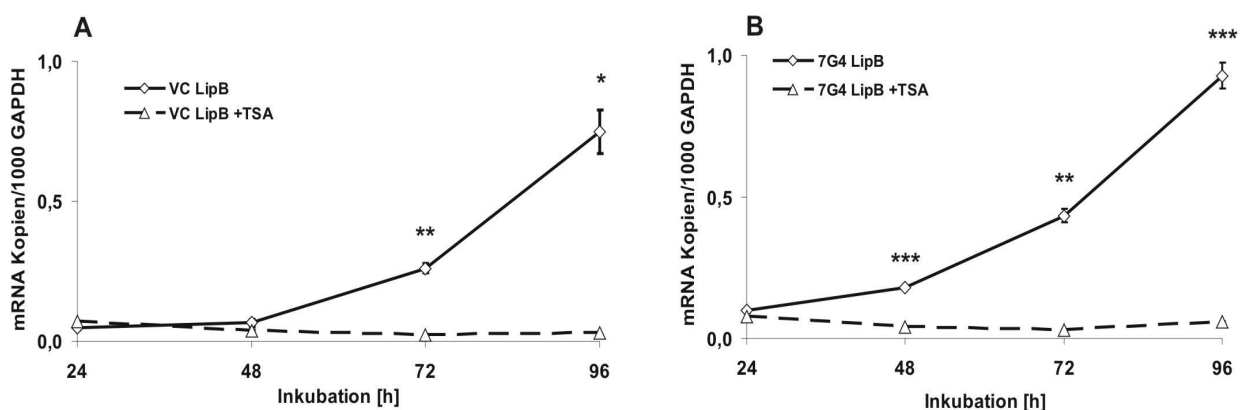


Abb.35: Lipophilin B-Expression in Vektorkontrolle (VC) und 7G4-Transfektante (7G4) nach 96h TSA-Inkubation. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. n.s. = nicht signifikant

TSA versetztem Medium ebenfalls keinen eindeutigen Einfluß auf die Lipophilin B-Expression. Die Diagramme der 96h TSA Inkubation wiesen einen mit den MGB1-Expressionskurven übereinstimmenden Verlauf der LipB-Transkriptamplifikation in Abb.35 **A** und **B** auf. Auch hier wurde die LipB-Expression durch Zugabe des Hemmstoffes in allen Meßpunkten signifikant reprimiert.

Grundsätzlich waren vergleichbare Effekte von TSA auf MGB1 und LipB Expression sowohl in VC als auch in mGPx4-Transfektante meßbar.

4.5.4 Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB

Butyrat (Na-Butyrat, NaBu) bezeichnet ein kurzkettiges Propan-1-carbonsäure-Derivat, welches in dieser Arbeit in Form des Natriumsalzes seine Verwendung als Histon-Deacetylase-Inhibitor fand. Dabei galt es in erster Linie die Fragen zu klären, ob sich Reproduzierbarkeit der durch TSA gewonnenen Ergebnisse erzielen läßt und inwiefern diese aus der Inhibition der HDAC-Aktivität resultieren. In diesem Zusammenhang sollte beachtet werden, daß die Literatur multiple Reaktionen des TSA belegt (siehe Abschnitt 1.4.3.4), die nicht auf nachweislich hyperacetylierte Histonproteine zurückzuführen sind. Denkbar wäre, daß deren Einfluß sich auch auf die Expression von MGB1 und LipB auswirkt. Dies auszuschließen machte den Einsatz eines HDAC-Inhibitor anderer Klassifizierung in weiteren epigenetisch orientierten Experimenten erforderlich.

4.5.4.1 Analyse der Histon H3-Acetylierung nach HDACI-Inkubation (II)

Durch die Untersuchung des Acetylierungsstatus via Westernblot-Detektion (Abb.36 **A** und **B**) konnte festgestellt werden, daß in den unbehandelten Proben beider Zelllinien ein vergleichbar geringer Acetylierungsstatus vorlag. In der Vektorkontrolle konnte zudem nach 4h Inkubation mit Butyrat eine deutliche Verminderung des Acetylierungsgrades registriert werden. Erst nach längerer Inkubation erhöhte sich drastisch die Menge acetylierter Histone. Die mGPx4-Transfektante zeigte währenddessen nach 4stündiger Behandlung mit Butyrat eine sichtliche Zunahme der Histonacetylierung, welche auch 12h nach Inhibitorzugabe meßbar war. Im direkten Vergleich der Inhibitorproben beider Zelllinien konnte darüber hinaus nach 4h registriert werden, daß die Signalbande der Transfektante annähernd doppelt so stark ausgeprägt war. Nach 12stündiger Butyrat-Inkubation war auch in diesem Experiment der Acetylierungsstatus in beiden Zellmodellen wieder vergleichbar hoch. Daraus folgte, daß in der Vektorkontrolle der inhibitorische Effekt des Butyrat verzögert einsetzte. Nach 24h Butyrat-Behandlung (Abbildung nicht gezeigt) konnte schließlich auch hier kein Unterschied mehr zur Kontrolle im Acetylierungsgrad der Histone festgestellt werden. Die Hyperacetylierung war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Während der gesamten Inkubationsperiode war die Menge nicht-acetylierter

Histonproteine konstant.

Eine zeitabhängige Zunahme des Acetylungsgrades konnte nach NaBu-Zugabe in beiden Zellmodellen dokumentiert werden. Hyperacetylierte Histonproteine konnten in der Transfektante bereits nach 4h Inkubation detektiert werden.

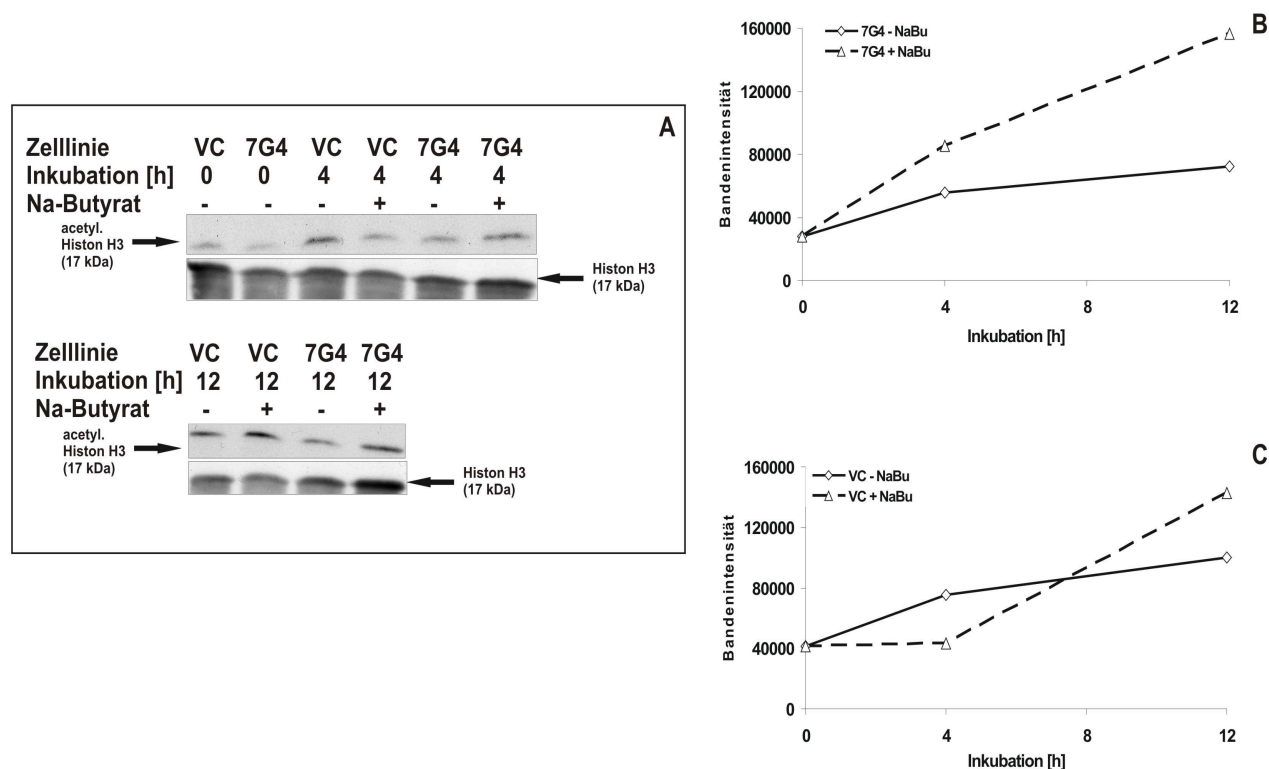


Abb.36: **A)** Fotoausdruck des entwickelten Immunoblots nach Western. Detektiert wurden dabei sowohl acetylierte als auch nicht-acetylierte H3-Histone. Dem voraus ging die Lyse von 500000 Zellen beider Linien mit anschließender Auftragung der gewonnenen Lysate auf ein denaturierendes SDS-PAA-Gel. Dieses wurde einer Elektrophorese zugeführt und die gebildeten Proteinbanden auf eine Blotmembran elektrotransferiert. **B** bzw. **C)** Statistische Auswertung der *in silico*-Analyse der Bandenintensitäten immunodetektierter acetylierter H3-Histone. Dieses Experiment ist repräsentativ für zwei Immunoblots.

4.5.5 Expressionsanalyse von MGB1 und LipB nach HDACI-Inkubation (II)

4.5.5.1 Real time-PCR zur Quantifizierung der MGB1-Transkripte

Zur differenzierteren Bewertung der durch Natriumbutytrat induzierten Effekte *in vitro* wurde die Kopieanzahl von MGB1 bzw. LipB statistisch bewertet. Zur Einhaltung der Versuchsparameter und Gewährleistung der Vergleichbarkeit der beiden Inhibitions-experimente, wurden in den folgenden Untersuchungen abermals zwei unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt (12 und 96h).

Es konnte festgestellt werden, daß keine Unterschiede in der Transkriptmenge von MGB1 nach Kurzzeit-Butyrat-Inkubation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen vorlagen (Graphik nicht gezeigt). Beide Zellmodelle zeigten auch in diesem Experiment keine eindeutigen Veränderungen in der Transkriptmenge. Die Butyrat-Zugabe bewirkte erst nach längerer Inkubation (96h) deutliche Unterschiede im Expressionsmuster von MGB1. Dies wurde in Abb.37 **A** und **B** nach statistischer Auswertung veranschaulicht. Dabei wurde klar, daß die Amplifikatmenge in den Negativkontrollen von Vektorkontrolle und 7G4-Zellen auffallend ähnlich zeitabhängig zunahm. Die Butyrat behandelten Proben wiesen dagegen über die gesamte Inkubationsdauer eine im Vergleich zur Negativkontrolle gleichbleibend reprimierte Genexpression auf.

Beide verwendete HDAC-Inhibitoren wirkten sich in gleicher Weise auf die MGB1-Expression aus. Keine differentiellen Expressionsmuster waren nach Kurz- bzw. Langzeit-TSA-Behandlung in mGPx4-Transfektante und VC-Zellen meßbar.

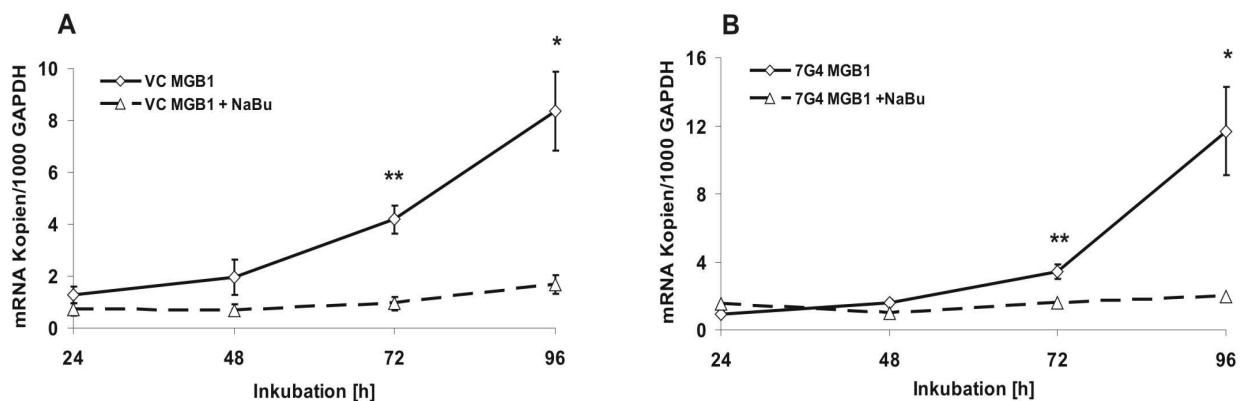


Abb.37: MGB1-Transkriptquantifizierung mittels real time-PCR von MGB1 in Vektorkontrollzellen (VC) (**A**) und mGPx4-Transfektante (7G4) (**B**) nach 96 stündiger NaButyrat-Inkubation. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

4.5.5.2 Effekte von Natriumbutyrat auf die LipB-Expression

Die Amplifikation der Lipophilin B-Transkripte zeigte sehr ähnliche Kurvenverläufe wie die bereits beschriebenen MGB1-Expressionsmuster.

Kurzzeitkultivierungen legten dar, daß die Expression durch Butyrat unabhängig von der Zelllinie in ähnlicher Weise beeinflusst wurden. Innerhalb einer 12 stündigen Kultivierung konnte keine Veränderungen festgestellt werden (Graphik nicht gezeigt).

Auch zeigte Lipophilin B nach 96h Butyrat Kultivierung (**A** und **B**) deutliche Parallelen zur MGB1-Amplifikationsregulation.

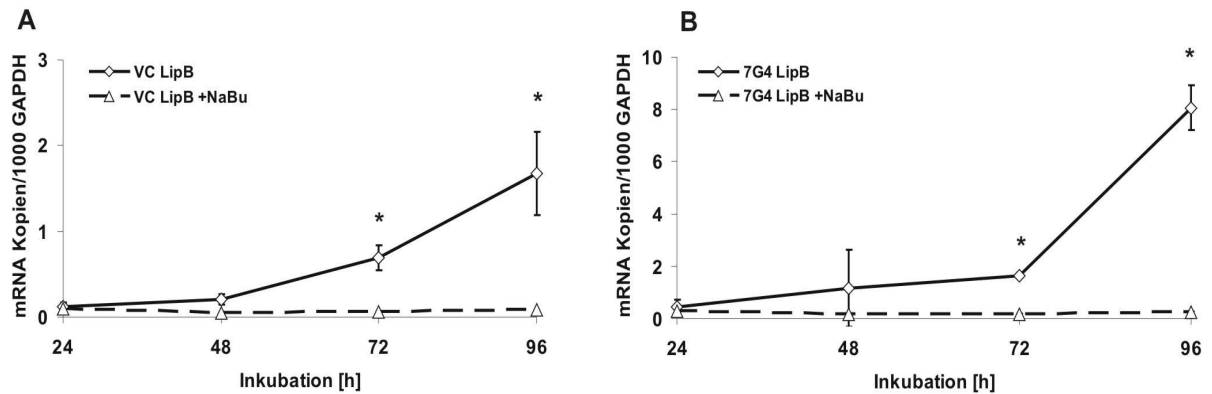


Abb.38: LipB-Expressionsmuster in Vektorkontrolle (VC) und Transfektante (7G4) kultiviert in bzw. ohne Butyrat konditionierten Medium im zeitabhängigen Diagramm. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

Modifizierungen der genomischen DNA zur Regulation der der Genexpression führten zusammenfassend zu folgenden Ergebnissen.

1. Die Experimente mit 5-Aza-CdR bewirkte eine generelle Aktivierung der Genexpression von MGB1. Diese war jedoch unterschiedlich stark in den beiden Zelllinien ausgeprägt. Die LipB-Expression indes zeigte in beiden untersuchten Zelllinien keine markanten Unterschiede.
2. Kurz- bzw. Langzeit-TSA-Inkubation konnten keine differentiellen Expressionsmuster in mGPx4-Transfektante und Vektorkontrolle registriert werden. Die Induzierung der genetischen Aktivität von MGB1/LipB durch TSA konnte nach keiner Inkubationszeit gezeigt werden. Nach 96h Inkubation war die MGB1/LipB-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich reprimiert.
3. Die Butyrat-Experimente konnten diese Beobachtungen bestätigen.
4. Die Effekte waren nicht auf die Hyperacetylierung der Histonproteine zurückzuführen, da nach 24h Inhibitor-Inkubation diese nicht mehr nachweisbar war.

4.6 Einfluß von Zellproliferation und Apoptose auf die MGB1/LipB-Expression

Sowohl (*R*)-Trichostatin A als auch Natriumbutyrat bewirken in geringsten Konzentrationen pleiotropische Effekte, die eine Vielzahl von häufig reversiblen morphologischen und physiologischen Veränderungen in verschiedenen Zelltypen nach sich ziehen. Diese betreffen die regulatorischen Mechanismen der Genexpression und des Zellwachstums und münden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Zelltod (Apoptose) und Arrest des Zellzyklus von Tumorzellen [151]. Beiden HDAC-Inhibitoren (HDACI) gemein ist, daß sie sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die p21^{WAF1/CIP1}-Expression induzieren können [139, 159]. Dabei handelt es sich um einen Cyclin abhängigen Kinase-Inhibitor (CKI), welches in reversibler Weise mit einer CDK (Cyclin dependent protein kinase) oder mit einem CDK-Cyclin-Komplex assoziieren kann, wodurch die CDK-Aktivität inhibiert wird [183]. Das p21^{WAF1/CIP1}-Protein im speziellen interagiert mit der CDK2, woraufhin der Zellzyklus arretiert ist [183]. Der bereits erwähnte stimulierende Effekt von TSA und Natriumbutyrat auf die Expression von p21^{WAF1/CIP1} und die proapoptotische und antiproliferative Wirkung dieses CKIs, kann indes bis zu einem bestimmten Maß zur Klärung der Beobachtungen auf mRNA-Ebene nach Inhibitor-Zugabe herangezogen werden.

4.6.1 Zellproliferation in HDACI-behandeltem Medium (I)

Die folgenden Experimente stehen im Mittelpunkt der Analyse des Einflusses von (*R*)-Trichostatin A auf die Zellproliferation einer mGPx4-transfizierten Mammakarzinomzelle. Verglichen wurden hierbei beide Zelllinien im Hinblick auf die inhibitorabhängige Veränderung der Zellzahl sowie der Zellteilungszeit T_h . Diese wurde gemäß der Formel $T_h = 0,693 \cdot t / \ln(N_t / N_0)$ berechnet, wobei t die Inkubationszeit in Stunden, N_t die Zellzahl zum Zeitpunkt t sowie N_0 die Zellzahl zu Beginn des Experimentes bedeutet [252]. Die unbehandelte Vektorkontrolle wies in Diagramm **A** der Abbildung 39 eine Proliferationskinetik auf, mit einer durchschnittlichen Zellteilungszeit von 90h. Die Plateauphase war allerdings in dieser Kultivierungszeit noch nicht erreicht. Nach Zugabe von TSA konnte innerhalb von 0 bis 48h Inkubation ein deutlicher Proliferationsarrest registriert werden ($T_h = 0$). Im Anschluß an diese Periode erreichte das Zellwachstum nach 120h Verdopplungsgeschwindigkeiten ($T_h =$

69), die sogar unter denen der unbehandelten Zelle lagen. Die unbehandelte mGPx4-Transfektante indes wies in Diagramm **B** der Abb.39 eine Plateauphase auf, die nach 120h noch nicht zur Gänze erreicht war. Die mittlere Verdopplungsrate lag in diesem Fall bei 53h, mit einer Teilungskinetik nach 24h von $T_h = 42$. Die VC-Zellen setzten indes mit ihrem Wachstum um 24h verzögert ein und zeigten insgesamt einen etwas abgeschwächten Kurvenverlauf. Insofern wies die mGPx4-Transfektante im Vergleich zu den VC-Zellen eine deutlich erhöhte Proliferationskinetik auf. Nach Zugabe von TSA konnte zeitverzögert binnen 72h und 96h eine Repression des Zellwachstums in der 7G4-Transfektante mit einer erhöhten Verdopplungszeit von 74h gemessen werden. Davor konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen TSA- und unbehandelter Probe verzeichnet werden. Darüber hinaus ging aus dem Vergleich der beiden Diagrammen **A** und **B** hervor, daß es in der Vektorkontrolle nach 24h zu einem völligem Teilungsarrest kommt, während die Transfektante klar zeitverzögert reprimiert wird.

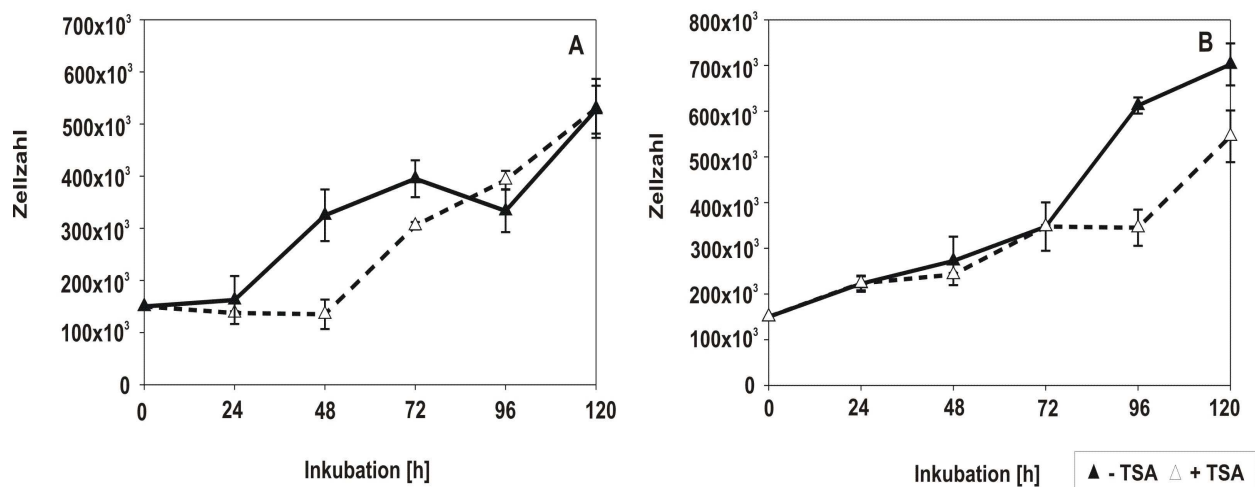


Abb.39: Die Wachstumskinetiken der Vektorkontrolle VC (**A**) und mGPx4-Transfektante (**B**) in An- bzw. Abwesenheit von TSA. Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 25 ng/ml eingesetzt. Für dieses Experiment wurden 150000 adhärenente Zellen eingesät und über einen Zeitraum von 120h bei 37°C und einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt von 5% inkubiert. Hiernach wurden die Zellen im 24h-Rhythmus geerntet und nach Vitalitätstest mit Trypanblau gezählt. Diese Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

Beide Wachstumskinetiken unterscheiden sich in Gegenwart von TSA, wobei die GPx4-Transfektante zeitverzögert nach 72h reprimiert wurde. Die VC-Zellen hingegen zeigten innerhalb von 48h einen Proliferationsarrest.

4.6.2 Die p21^{WAF1/CIP1}-Expression nach HDACI-Inkubation (I)

Das p21^{WAF1/CIP1}-Protein bezeichnet einen relevanten Inhibitor der Zellzyklusprogression (siehe Abschnitt 1.4.3.4). Die Hochregulation dieses Gens ist mit dem Proliferationsarrest assoziiert. Demnach ist es sinnvoll, das Expressionsmuster zu analysieren, um hierdurch Rückschlüsse hinsichtlich des Einflusses des HDAC-Inhibitors auf die p21^{WAF1/CIP1}-Expression zu ziehen. Überdies galt es Ursachen für die in 4.5.3.1 und 4.5.3.2 festgestellten Expressionsmuster der Sekretoglobuline MGB1 und LipB nach Inkubation mit TSA zu finden. Dabei variierten die Experimente in den Inkubationszeiten bis 12 und 48h. Der Sinn hierbei lag darin, durch ein eng gewähltes Zeitfenster ein differenziertes Bild der p21^{WAF1/CIP1}-Expression zu erhalten, welches Zellzyklus diktierten Schwankungen und Veränderungen innerhalb kleiner Zeiträume unterliegt. Dies wurde auch durch in der Fachliteratur beschriebene Versuche bestätigt, die gesicherte Daten innerhalb eines Zeitfensters von 24h lieferten [182]. In dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Zelllinien einer zusätzlichen 48h-Inkubationszeit ausgesetzt, um die daraus resultierenden zeitabhängigen Unterschiede der Genexpression zu dokumentieren.

Wie im Diagramm **A** der Abb.40 zu erkennen war, wies die Vektorkontrolle binnen 12h TSA-Inkubation eine signifikant positiv regulierte p21^{WAF1/CIP1}-Expression auf. Nach dieser Kultivierungsperiode konnte somit ein stimulatorischer Einfluß auf die genetische Aktivität von p21^{WAF1/CIP1} *in vitro* festgestellt werden. Jedoch wurde dieses hohe Expressionsniveau nach 24 und 48h nicht beibehalten. Die unbehandelten VC-Zellen zeigten nach 12h eine im Vergleich zur TSA-Probe geringe Transkriptamplifikation mit Meßpunkten auf annähernd ähnlichem Niveau. Innerhalb einer Inkubation von 48h setzte sich dieser niedrige Expressionslevel weitestgehend fort, wobei nach 24h die Expression leicht anstieg. In Diagramm **B** zeigte die mGPx4-Transfektante nach 12h TSA-Inkubation einen ähnlichen stimulatorischen Effekt auf die p21^{WAF1/CIP1}-Expression wie bereits in den VC-Zellen beobachtet wurde. Nach 24 und 48h war diese Zunahme allerdings nicht mehr nachweisbar. Für die unbehandelte Transfektante konnte während der gesamten Inkubationsperiode eine geringe p21^{WAF1/CIP1}-Expression registriert werden. Zudem konnte beobachtet werden, daß die p21^{WAF1/CIP1}-Amplifikation in dieser Zelllinie insgesamt gesehen schwächer ausgeprägt war als in der Vektorkontrolle.

TSA regulierte innerhalb von 12h die p21^{WAF1/CIP1}-Expression deutlich positiv in sowohl mGPx4-Transfektante als auch in VC-Zellen. Nach 24h war der stimulatorische Effekt des TSA jedoch nicht mehr feststellbar.

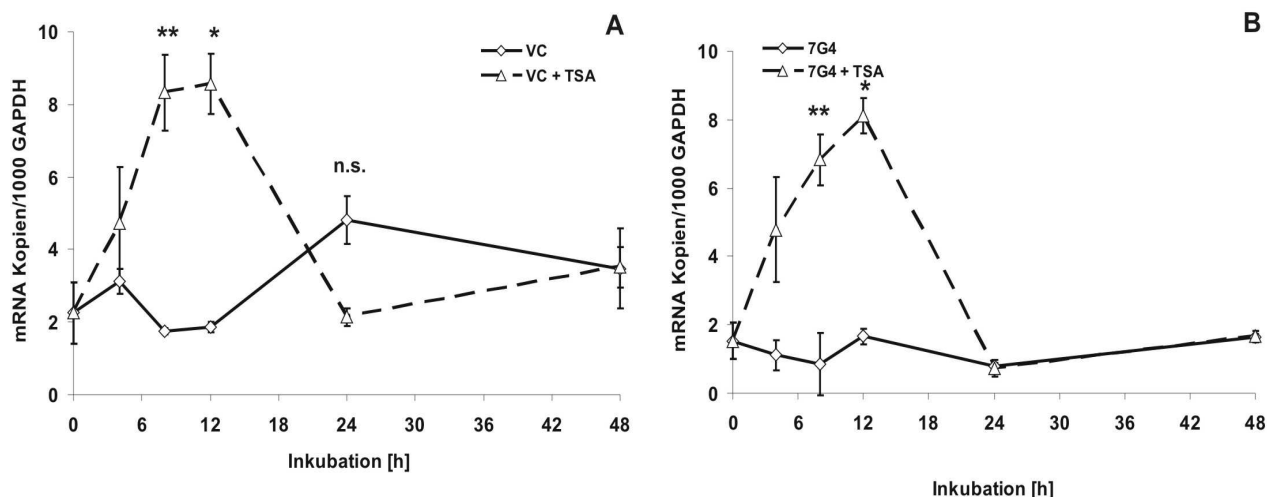


Abb.40: Die Quantifizierung der mRNA-Kopien von p21^{WAF1/CIP1} in der Transfektanten (A) und in der Vektorkontrolle (B, VC) nach Behandlung mit TSA. Diese Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

4.6.3 Zellproliferation in HDACI-behandeltem Medium (II)

Zwecks Bestätigung der Ergebnisse hinsichtlich der durch TSA induzierten Effekte auf Zellproliferation und p21^{WAF1/CIP1}-Expression, kam in dieser Versuchsreihe Natriumbutyrat als Inhibitor zum Einsatz. Im Mittelpunkt des Interesses standen ebenfalls die Wachstumskinetiken beider Zelllinien und deren p21^{WAF1/CIP1}-Expressionsmuster in einer zeitabhängigen graphischen Auftragung. Die Reaktionsbedingungen waren mit denen des Vorversuches identisch.

Die Verdopplungsrate der unbehandelten Vektorkontrolle betrug in diesem Versuch 46h (siehe Abb.41 A). Die mGPx4-Transfektante dagegen zeigte eine Verdopplungszeit von 44h. Der Vergleich der Kurvenverläufe beider Zellsysteme in Abb.41 konnte eine effiziente Repression der Proliferation durch Butyrat dokumentieren. Sowohl Vektorkontrolle (A) als auch mGPx4-Transfektante (B) zeigten gleichermaßen stark gehemmte Wachstumskinetiken während der gesamten Inkubation. Spezifische Unterschiede, welche die zeitabhängige Repression der Proliferation betrafen, konnten nicht beobachtet werden.

Die Kultivierung nach Zugabe von Butyrat führte in GPx4-überexprimierenden Zellen sowie in der Vektortransfektanten zu einem vollständigen Proliferationsarrest, welcher in beiden Linien gleichermaßen stark ausgeprägt war.

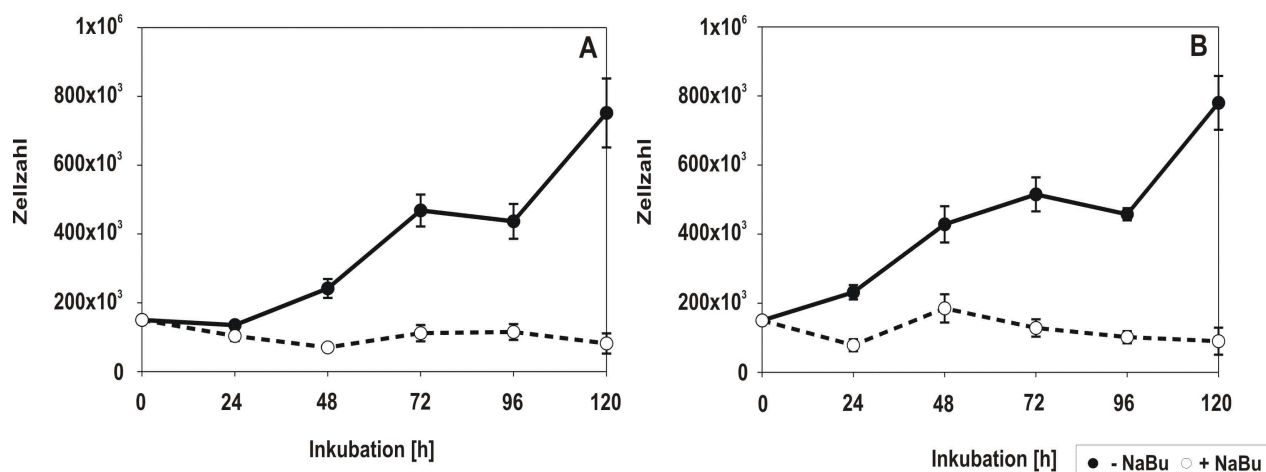


Abb.41: Die Wachstumskinetiken der zu untersuchenden Zelllinien (**A**), VC Vektorkontrolle (**B**) 7G4-Transfektante. 150000 Zellen der jeweiligen Transfektanten wurden in je ein Well einer 6-Well-Kulturplatte eingesät. Nach Erreichen der Adhärenz wurde der Hemmstoff in einer Konzentration von 2 mM zum Nährmedium gegeben. Im Anschluß daran wurden die Zellen zu den gegebenen Zeitpunkten geerntet und nach Überprüfung der Vitalität mit Trypanblau gezählt. Diese Daten wurden durch drei unabhängige Experimente bestätigt.

4.6.4 Die p21^{WAF1/CIP1}-Expression nach HDACi-Inkubation (II)

Die statistische Auswertung in Graphik **A**, Abb.42 konnte belegen, daß sich in der unbehandelten Vektorkontrolle VC die Transkriptmenge nach 12h und 48h-Inkubation zu allen Meßpunkten auf einem vergleichbar niedrigen Niveau befand. Veränderungen traten erst 12h nach Zugabe von Butyrat ein. Hier zeigte insbesondere der 8h-Meßpunkt eine deutlich gesteigerte Expression. Danach fiel diese jedoch stark ab und erreichte ihr Minimum nach 24h. Nach 48h Inkubation wurde interessanterweise das Expressionsmaximum erreicht. In der transfizierten Zelle 7G4 (**B**) konnte in den Leerproben ein ähnlich reduziertes Expressionsmuster, wie bereits in den Diagrammen **A** dokumentiert, festgestellt werden. Auch hier war nach Inhibitor-Zugabe eine deutliche Zunahme der p21^{WAF1/CIP1}-Expression zu registrieren, die jedoch weniger ausgeprägt war als in der Vektorkontrolle. In dieser Zelllinie fiel nach 12h das Expressionsniveau deutlich ab. Auch hier konnte nach 48h eine Zunahme der Transkriptamplifikation gemessen werden.

Beide Zelllinien regulierten die Expression von p21^{WAF1/CIP1} durch Natriumbutyrat deutlich hoch. Überdies konnte die Stimulation der Genexpression auch noch nach 48h Inkubation in Transfektante und Vektorkontrolle *in vitro* nachgewiesen werden.

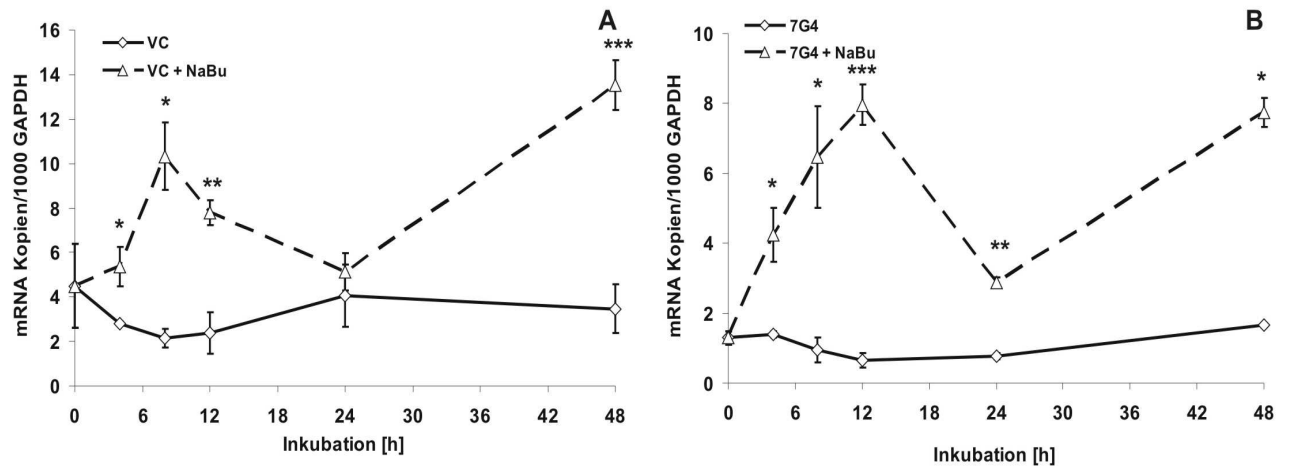


Abb.42: Die real time-PCR zur Bestimmung der Kopienmenge von p21^{WAF1/CIP1} in Butyrat inhibierten Mammakarzinom-Zellen (**A** Vektorkontrolle, **B** mGPx4-Transfektante) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Diese Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

5 Diskussion

5.1 Expressionsregulation von Lipophilin B

5.1.1 Identifizierung cis-regulatorischer Elemente

Für Lipophilin B ist hinsichtlich der Kenntnis um Struktur des Promotors sowie dessen *cis*-regulatorischen Elemente wenig bekannt. Im Hinblick darauf standen im Rahmen der vorliegenden theoretischen Studien die Analyse der distalen promotoraktiven Sequenzen des LipB-Gens.

Das Onkoprotein MAF: Die *in silico*-Untersuchungen hinsichtlich der Verteilung potentieller Konsensus-Elemente innerhalb einer 1000 bp-Promotorsequenz zeigten auf, daß, neben einer schwachen TATA-Box, auffallend viele Erkennungsmotive für das Onkoprotein MAF, sogenannte MARE (**MAF Recognition Element**) dokumentiert werden konnten. In einem expressionsregulatorischen Kontext wäre demzufolge vorstellbar, daß dieser Faktor direkt oder indirekt Einfluß auf die Transkription des Lipophilin B-Gens nimmt. Untermuert wird jene These durch das Faktum, daß es sich bei diesem Transkriptionsfaktor um ein relevantes regulatorisches Protein in diversen zellulären Prozessen handelt [225]. So konnten bis dato Mitglieder dieser Proteinfamilie in diversen Organen und Geweben nachgewiesen werden [253-255]. Der Nachweis im Brustgewebe ist allerdings gegenwärtig noch unbestätigt. Ferner könnte rücksichtlich der relativ hohen Anzahl angeführt werden, daß diese in eine Potenzierung der MAF-Aktivität bezüglich der transkriptionellen Kontrolle resultieren könnte. Eine weitere Eigenschaft des MAF-Faktors belegt zudem, daß jene potentielle Involvierung in die Expressionsregulation über die Interaktion bzw. Dimerisierung mit einem weiteren Faktor stattfindet [256]. Ermöglicht wird dies durch eine relativ gut konservierte basische DNA-Bindungs- sowie eine leucinreiche Dimerisierungsdomäne (b-Zip-Motiv) in der MAF-Proteinarchitektur, das dimere Assoziationen mit anderen b-Zip-Faktoren erlaubt [257]. Wie zahlreiche Forschungsarbeiten hierzu zeigen konnten, komplexieren MAF-Faktoren entweder mit sich selbst oder interagieren mit Mitgliedern der CNC (Cap'n Collar)-Proteinfamilie (p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1 und Bach2) [258-261]. Darüber hinaus konnten Heterodimere mit Faktoren aus der AP1-Superfamilie, Jun und Fos, nachgewiesen werden

[258, 262]. Dies wird insbesondere dadurch hervorgehoben, daß beide Transkriptionsfaktoren überlappende *cis*-regulatorische Elemente aufweisen [237, 263].

AP1-Faktor: Interessanterweise konnte in der promotoraktiven Sequenz des Lipophilin B-Gens ein putativer AP1-Konsensus 39 bp stromaufwärts vom ATG identifiziert werden. Die Position dieses DNA-Motivs in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer MAF-Bindungsstelle in der 5'-UTR der entsprechenden mRNA läßt jene oben angeführte Interaktion der bindenden Proteine zumindest *in silico* annehmen. AP1 (Activating Protein 1) beschreibt einen Transkriptionsfaktor, der regulatorische Funktionen in verschiedenen zellphysiologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose sowie maligner Transformation innehat [235, 264]. Weiterhin konnten durch Studien am MGB1-Promotor festgestellt werden, daß AP1 zur basalen Transkription beiträgt [80]. Aufschlußreich ist zudem, daß AP1 [265, 266] sowie einige Mitglieder der MAF-Proteinfamilie [267] einer redox-sensitiven Regulation, d.h. ROS-induzierten Signalkaskaden, unterliegen. Im Licht dieser Erkenntnis erscheinen diese Faktoren insbesondere in einer mGPx4-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelle interessant. Diese stellen somit eine Verbindung zwischen oxidativen Streß und Redox-Regulation her. Daran anknüpfend wäre eine direkte Kontrolle der Lipophilin B-Genexpression durch die mGPx4 möglich.

PEA3-Faktor: Eine AP1-Interaktion wäre ebenso mit PEA3, einer transkriptionellen Aktivator-Gruppe mit einer Schlüsselrolle im Metastasierungsprozeß, vorstellbar. Wie Studien hierzu ergaben, kann eine Untereinheit des AP1-Komplexes, c-Jun, mit einem Mitglied der PEA3-Gruppe physikalisch wechselwirken [268]. Zudem konnten im Promotor des verwandten Sekretoglobulin MGB1 eine regulatorische Abhängigkeit der beiden Transkriptionsfaktoren *in vitro* nachgewiesen werden [80].

Sp1-Faktor: Ein weiterer redox-sensitiver Transkriptionsfaktor bezeichnet das Sp1- bzw. KLF (**k**rueppel-**l**ike **f**actor)-Protein [269], welches direkt flankierend vom ATG bzw. 437 bp stromaufwärts, identifiziert werden konnte. Die Sp-Proteine zählen zu den Faktoren, für die sich die Beweise für eine kritische Funktion in Proliferation und Metastase diverser Tumore mehren. Dabei greifen sie regulierend in die Expression von zellzyklus-relevanter Genen sowie Wachstumsfaktoren der Angiogenese ein. So besitzt Sp1 die Eigenschaft einige Gene durch kooperative Wechselwirkung mit anderen DNA-bindenden Faktoren zu aktivieren. Hierzu gehören die Proteine E2F,

NF-Y, SMADs, NFκB sowie GATA-Proteine, deren Sp-Interaktionen in Fachkreisen bekannt sind [270, 271]. Sp1-regulierte Gene können die entsprechenden *cis*-regulierenden Konsensus-Elemente aufweisen [227]. Dies scheint auch der Fall hinsichtlich der Transkriptionsregulation des LipB-Gens zu sein, da eine potentielle E2F-, GATA-, NFκB- sowie eine SMAD4-Bindungsstelle identifiziert werden konnte. Für die Argumentation einer Sp1-kontrollierten Expression spräche ebenso, daß dieser Konsensus ebenfalls im Kaninchen-UGB-Promotor die Transkription steuert [272]. Die TATA-Box anliegende Positionierung des Sp1-Motivs wäre darüber hinaus gleichermaßen anzuführen. Dies wird dadurch gefestigt, daß das Sp1-Protein direkt mit den Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie bzw. TAFs (TBP Associated Factors) oder andere nukleare Kofaktoren interagiert [273, 274].

NF1-Faktor: 34 bp stromaufwärts der putativen TATA-Box befindet sich eine ubiquitäre NF1-Bindungssequenz. Ein strukturelles Charakteristikum des NF1-Proteins sieht indes auch hier eine Redox-Regulation vor [275]. Insofern liegt die Vermutung nahe, daß sich innerhalb der ca. ersten 200 bp stromaufwärts vom ATG redox-regulierte Kontrollelemente wie Sp1, AP1, MAF sowie NF1 zur Regulation der spezifischen Expression von LipB befinden.

ERE-Element: Das Kennzeichen vieler Sekretoglobulin-Vertreter ist die Anwesenheit klassischer Steroidhormon-sensitiver Elemente (steroid hormone-responsive elements) innerhalb der distalen 1000 bp vom Transkriptionsstart [36]. Demzufolge kann berechtigt vermutet werden, daß die promotoraktiven Sequenzen des Lipophilin B-Gens ebenso derartige DNA-Motive aufweist. Ein ERE-Element (**E**strogen **R**esponsive **E**lement) konnte 351 bp stromaufwärts festgestellt werden. Die Tatsache, daß Lipophilin B keine gewebs- bzw. brustspezifische Expression wie sein Dimerpartner Mammaglobin 1 aufweist [34, 35], kann eine Erklärung dafür sein, daß keine weiteren hormonell-induzierten ERE-DNA-Motive gefunden werden konnten. Allerdings existiert eine Studie, die eine Implikation von Sp-Konsensus-Elementen in die Estrogen-Induktion von Uteroglobulin-Genen belegt [276].

MEF2-Faktor: 92 bp stromaufwärts vom offenen Leseraster konnte eine MEF2-Bindungsstelle lokalisiert werden. Der Kalzium-sensitive Myocyte Enhancer Factor 2 fungiert in diversen Zellen als Dreh- und Angelpunkt transkriptioneller Regelkreise, denen die Kontrolle der Zelldifferenzierung sowie der Organogenese zukommt.

Ogleich MEF2 einen transkriptioneller Aktivator bezeichnet, beruht diese Eigenschaft auf dem Zusammenspiel bzw. der kooperative Rekrutierung mit anderen Faktoren [224]. Hierbei ist hervorzuheben, daß durch die Interaktion mit Klasse II HDACs dieser zugleich einen Vermittler von epigenetischen Regulationsmechanismen darstellt, die die Veränderungen von Chromatinkonfigurationen impliziert [239, 277, 278]. Diese Erkenntnis kann insbesondere vor dem Hintergrund epigenetischer Experimente von Interesse sein und könnte für deren Interpretation herangezogen werden.

5.1.2 Vergleichendes Alignment der Promotoren von MGB1, MGB2 und LipB

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der theoretisch identifizierten Konsensus-Elemente sowie deren Konserviertheit, wurden die entsprechenden Sequenzen von MGB 1 sowie MGB 2 verglichen sowie mit den in der Literatur für diese Gene belegten *cis*-regulatorischen Elemente abgeglichen.

Wie der Vergleich der drei Promotoren *in silico* ergab, konnten fünf konservierte Regionen identifiziert werden. Weitere Untersuchungen dieser Bereiche brachten ans Licht, daß es sich dabei um die DNA-Motive von AP1, Sp1 sowie NF1 handelt. Zudem konnte eine TATA-Box theoretisch bestätigt werden, deren Sequenz-Motiv jedoch nur schwach ausgeprägt ist und sich außerhalb des Core-Promotors befindet. AP1 sowie NF1 konnten bereits in der 1000 bp langen Promotorsequenz des LipB-Gens identifiziert werden, so daß sich der Verdacht erhärtet, daß durch die Konservierung dieser Motive eine relevante Bedeutung in der transkriptionellen Genregulation möglich ist. Den theoretischen Nachweis für einen potentiellen AP1-Konsensus sowie für die TATA-Box im MGB1-Promotor konnten Shi sowie Watson liefern. Auch hier konnten diese DNA-Motive innerhalb einer proximalen Region von ca. 200 bp gezeigt werden [74, 79]. Der NF1-Konsensus konnte von Xiao *et. al.* in promotoraktiven Sequenzen des Mammaglobin 2-Gens experimentell dokumentiert werden [11]. Des weiteren konnten die Forscher Sp-Faktoren via EMSA-Assay und anschließendem Supershift einwandfrei identifizieren. Es wird schließlich anhand des vorliegenden Alignments der promotoraktiven Sequenzen von MGB1 und MGB2 deutlich, daß relevante regulatorische Elemente in einem proximalen Upstreambereich von 118 bp konserviert vorliegen. Gestützt wird diese Aussage

durch die Ergebnisse von Watson und Mitarbeiter, die nach Luciferase-Assay relevante Determinanten der basalen MGB1-Expression im Mini-malpromotor des MGB1-Gens vermuten [74]. Dies konnte für das Mammaglobin 2-Gen experimentell bestätigt werden [11].

Es erscheint des weiteren einleuchtend, daß MGB1 und MGB2 bei einer errechneten Homologie von 62% der proximalen 300 bp annähernd positionsidentische DNA-Motive aufweisen. Eine andere Situation liegt im Fall der Lipophilin B vor; der direkte Vergleich der ersten 300 bp der promotoraktiven Sequenzen mit MGB1 offenbart eine insgesamt geringe Homologie mit einem errechneten Wert von 22%. Die Vermutung liegt, in Anbetracht dessen, nahe, daß die beiden proximalen Promotoren keine enge evolutionäre Verwandtschaft miteinander verbindet. Dennoch weist die Upstream-Sequenz des LipB-Gens innerhalb der proximalen 186 bp die gleichen potentiellen DNA-Motive auf, was als Indiz für die Involvierung in die transkriptionelle Regulation der Expression von LipB gedeutet werden kann. Es ist jedoch nicht klar, ob einem dieser *cis*-regulatorischen Elemente *in vivo* bzw. *in vitro* funktionelle Eigenschaften in der zelltypischen Expression zukommt.

Die vorliegenden Daten scheinen demnach darauf hinzuweisen, daß wichtige regulatorische *cis*-aktivierende Elemente in den Minimalpromotoren von MGB1, MGB2 sowie LipB in einem Bereich von 1 bis -180 bp konserviert sind. Höchstwahrscheinlich stellt dieses Szenario lediglich ein grobes Gesamtbild der regulatorischen Expressionssituation des Lipophilin B-Gens dar, da hierbei weiter entfernte Silencer- bzw. Enhancer-Elemente außer Acht gelassen werden.

5.1.3 Multiples Alignment der distalen 8000 bp Upstream-Sequenz

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand darin, distale Enhancer-Elemente im LipB-Promotor zu identifizieren und diese auf Homologie in den Promotorsequenzen der Gene MGB1 und MGB2 zu überprüfen. Es galt hierbei auch die Frage zu klären, ob ein konserviertes Enhancer-Element zu identifizieren ist. Der Anlaß hierfür ergab sich aus der Tatsache, daß innerhalb einer Region zwischen 4,4 und 5,5 kbp der promotoraktiven Sequenzen des MGB1-Gens ein derartiges regulatorisches Element bereits empirisch belegt und dokumentiert werden konnte [79]. Enhancer-Elemente bezeichnen definitionsgemäß *cis*-aktivierende DNA-Sequenzen,

die die Transkription unabhängig von ihrer Orientierung sowie Distanz relativ zum Transkriptionsstart erhöhen [279]. Das bedeutet, daß diese Elemente stromauf- bzw. abwärts oder sogar in intronischen Regionen lokalisiert sein können. Dabei variiert die Länge des Enhancers zwischen 50 bp und 1,5 kbp [280].

Die Analyse der distalen 8000 bp hierzu ergab, daß kein Enhancer innerhalb einer Region zwischen 4,4 und 5,5 kbp im Lipophilin B-Promotor dokumentiert werden konnte. Es konnten indessen einige homologe Regionen gezeigt werden, deren biologische Funktionalität jedoch fraglich bzw. zu verifizieren ist. Die Analyse des MatInspector-Programmes konnte diesen Sequenzen keine *cis*-regulatorischen Motive zuordnen. Auch hier wird die entfernte evolutionäre Verwandtschaft der Promotoren von LipB sowie MGB1 durch eine errechnete Homologie von nur 5% verdeutlicht. Die Sekretoglobuline MGB1 und MGB2 indes weisen zwar eine 5fach höhere Homologie auf, bestätigen jedoch damit ebenfalls keine nahe Angehörigkeit der potentiellen regulativen Upstreamsequenzen.

Die Ergebnisse des proximalen Alignments aus Abschnitt 4.1.2 zusammenführend, unterstreicht die Annahme, daß relevante transkriptionelle Kontrollelemente innerhalb der Minimalpromotoren der Gene MGB1, MGB2 und LipB zwischen 1 und -300 bp vorzufinden sind, da auch hier die meisten sequentiellen Übereinstimmungen vorzufinden sind. Die distalen Promotoren hingegen weisen expressionsspezifische Unterschiede auf, das durch die geringe Homologie der promotoraktiven Sequenzen der untersuchten Gene unterstrichen wird. Die phylogenetische Konservierung des Lipophilin B-Promotors ebenso wie die evolutionären Beziehungen zwischen den Sekretoglobulinen MGB1, MGB2 und LipB in Säugetier-Spezies stehen im Vordergrund des nächsten Kapitels.

5.1.4 Phylogenetische Aspekte und Konservierung in Mammalia

Im Jahr 1994 wurde das Uteroglobin-Gen aus Mensch, Affe, Maus sowie Ratte isoliert und auf Homologien untersucht [36]. Dabei konnte festgestellt werden, daß das Gen des orthologen Prostatein der Ratte in anderen Spezies nicht gefunden werden konnte. Zur Untersuchung der phylogenetischen Konservierung des Mammaglobin 1-Gens wurden einige Jahre später Southern Blot-Analysen der genomischen DNA verschiedener Mammalia-Spezies durchgeführt [74]. Es konnte dabei bestimmt

werden, daß Mammaglobin 1 entweder nur schwach konserviert ist oder in den untersuchten Spezies gänzlich fehlt. Treffen diese Erkenntnisse auch auf dessen Dimerpartner Lipophilin B zu? Die Online-Datenbank-Recherche zur phylogenetischen Konservierung ergab, daß Lipophilin B in Säugetieren nicht weit verbreitet zu scheit. Schließlich konnte nur in *Homo sapiens*, *Bos taurus* sowie *Pan troglodytes* die LipB-Gensequenz gezeigt werden, wobei der Nachweis in letztgenannter Spezies lediglich theoretischer Natur ist. *In vivo* konnte die mRNA bzw. das Protein bislang noch nicht dokumentiert werden. Der phylogenetische Baum, der basierend auf den Accession-Nummern der jeweiligen Gene erstellt wurde, brachte dementsprechend ans Licht, daß die Gene Lipophilin B und Mammaglobin 1 im Laufe der Evolution unterschiedliche Wege der Entwicklung eingeschlagen haben müssen. Es ist dabei nicht unwahrscheinlich anzunehmen, daß dies auch transkriptionelle Regulationsmechanismen inkludiert. Insbesondere distale Promotorbereiche scheinen hierbei betroffen zu sein, da die errechnete Homologie zwischen MGB1 und LipB nur bei 5% liegt. Proximale Upstreamsequenzen dagegen erreichen eine Homologie von 22%, was darauf hinweist, daß einige wenige konservierte Regionen vorhanden sein müssen. Das Alignment der ersten 1000 bp stromaufwärts vom ATG von *Homo sapiens* und *Bos taurus* deckte des weiteren auf, daß der gleiche Promotor aus unterschiedlichen Spezies keine höheren Homologien erreicht. Eine mögliche Interpretation dafür wäre, daß Lipophilin B in den jeweiligen Spezies über anders-gearbete regulatorische Sequenzen verfügt.

5.2 *In vitro* Aktivitätsassays des LipB-Promotors in HEK und COH-BR1-Zellen

In den anschließenden Versuchen wurden die ersten 1000 bp der 5'-flankierenden Promotorsequenzen des Lipophilin B-Gens bezüglich der transkriptionellen Aktivität untersucht. Der Reporter-gen-Assay wurde hierzu mit unterschiedlich langen Promotorkonstrukten durchgeführt, und diese in HEK sowie COH-BR1 (WT)-Zellen transient transfiziert. Beide Zelllinien wiesen in real time-PCR-Experimenten eine positive LipB- sowie MGB1-Expression auf, die die Wahl als Versuchsmodell gerechtfertigte. Interessanterweise konnte in diesen Versuchen dokumentiert werden, daß sowohl in HEK- als auch in WT-Zellen eine hohe Promotoraktivität für das 277 bp-Konstrukt meßbar war. In HEK-Zellen waren für kürzere Konstrukte (100 und

211 bp) keine Aktivitäten feststellbar. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß innerhalb einer Region von 211 bp Länge mehrere repressive Faktoren binden. Die Repression durch diese nukleären Proteine wird jedoch von den aktivierenden Effekten ein oder mehrerer Faktoren negiert. Diese binden innerhalb einer Region mit einer Länge von 277 bp. Die transkriptionelle Relevanz regulativer Faktoren konnte auch in den ersten 340 bp der 5'-flankierenden Regionen des MGB1-Gen dokumentiert und belegt werden [79]. Zusätzlich binden höchstwahrscheinlich innerhalb von 504 bp ähnlich wirkende Aktivatoren, da hier ebenso eine deutliche Zunahme der Promotoraktivität festzustellen war. Kürzere Konstrukte (318 und 410 bp) wiesen hingegen verminderte Aktivitäten auf, was darauf hindeutet, daß hier ebenfalls Repressoren binden müssen.

Um Anhaltspunkte zur Klärung der erhöhten Promotoraktivität zu diskutieren, werden die Ergebnisse der *in silico*-Analysen herangezogen. In Anbetracht dieser Daten wird deutlich, daß eine Reihe von ubiquitären Faktoren für eine transkriptionelle Aktivierung verantwortlich sein könnte. Zu nennen sind in diesem Kontext die regulativen Proteine Sp1, AP1, MAF sowie NF1, deren putative *cis*-regulativen Elemente insbesondere innerhalb einer ca. 200 bp langen Sequenz identifiziert werden konnten. In Erwägung gezogen muß ferner, daß zusätzliche, noch unbekannte Faktoren eine Rolle in der Regulation der LipB-Genexpression spielen könnten. Darüber hinaus konnten weitere DNA-Motive, wie PEA3, ERE sowie GATA, dokumentiert werden, die die Erhöhung Promotoraktivität des 504 bp-Konstruktes plausibel machen könnte. Ob diese oder weitere, noch unbekannte Transkriptionsfaktoren ihre funktionelle Relevanz bewahrheiten, ist unklar und muß durch weitere Experimente verifiziert werden. Auffällig war zudem, daß in der Mammakarzinom-Zelle im Durchschnitt 6,4fach höhere Luciferase-Aktivitäten für die 277 und 504 bp-Fragmente bestimmt werden konnten. Wie lassen sich diese Aktivitätsunterschiede begründen? Die Klärung dieser Problematik läßt, basierend auf den vorliegenden Daten, zu viel Raum für Spekulationen, als das sie hinreichend gelöst werden könnte. Folgende Szenarien sind jedoch denkbar; eine Begründung ruht auf der Tatsache, daß der Phänotyp der meisten Krebsarten ursächlich auf mutierten Genen sowie solchen, die durch epigenetische Modifikationen funktionell verändert sind, zurückzuführen ist [95, 96]. Daran anknüpfend können basale und regulative Gene bzw. deren Gen-

produkte epigenetischen Modifikationen unterliegen, die deren aktivierende Eigenschaften durch die Rekrutierung weiterer Faktoren verstärken. Der MEF2-Transkriptionsfaktor stellt einen potentiellen Kandidaten dar, welcher in epigenetischen Regulationsmechanismen involviert ist [224] und im *in silico*-Experiment 96 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart identifiziert wurde (siehe Abschnitt 4.1.1).

Eine andere Argumentation führt die Implikation von ROS und oxidativen Streß im neoplastischen Zellgeschehen an. So konnte festgestellt werden, daß humane Tumor- bzw. Karzinomzellen *in vitro* um ein vielfaches mehr ROS bilden als nicht-transformierten Zellen [281]. Dies wurde durch die Detektion eines erhöhten oxidativen Stresslevels in Mammakarzinom-Zellen *in vivo* untermauert [282]. Die Vermutung liegt daher nahe, daß redox-sensitive Faktoren in jenes Zellgeschehen maßgeblich eingreifen und zur transkriptionellen Aktivierung beitragen könnten.

Eine dritte Theorie, die ebenso auf einem erhöhten ROS-Status fußt, macht eine Aktivierung bestimmter regulatorischer Proteine bzw. Amplifizierung ihrer transaktivatorischen Signale durch ROS-induzierte Signalkaskaden plausibel. Von besonderem Interesse sind dabei Stress-aktivierte MAP-Kinasen. MAPKs (**Mitogen-activated protein kinases**) beschreiben sequentiell hintereinandergeschaltete Proteinkinase, welche extrazelluläre, häufig mitogene Stimuli zu spezifischen Transkriptionsfaktoren weiterleiten. Zu dieser Kinasefamilie gehörend, werden die Faktoren ERK1/2 direkt durch ROS aktiviert [283, 284], was in weiterer Konsequenz zu einer Induzierung der Faktoren Ets sowie AP1 führt [283]. Letzterer konnte anhand des entsprechenden *cis*-regulatorischen Elementes 40 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart identifiziert werden. Kürzere Konstrukte mit einer Länge von 100 und 211 bp wiesen in HEK-Zellen reprimierte Aktivitäten auf. Insbesondere war innerhalb einer Sequenz zwischen 318 und 410 bp die Luciferase-Aktivität deutlich vermindert. Die *in silico*-Untersuchungen hierzu brachten ans Licht, daß stromaufwärts von der Position 318 PEA3, ERE1 sowie GATA1 binden können. Der GATA1-Faktor ist zwar in die transkriptionelle Repression involviert [285], jedoch konnte dessen Expression bislang ausschließlich in endokrine Organe bzw. Gewebe nachgewiesen werden [286]. Dadurch wird die funktionelle Relevanz in der Brustdrüse fraglich. Der PEA3-Transkriptionsfaktor könnte in diesem Kontext ebenfalls von Interesse sein, da dessen Eigenschaft sich zwar hauptsächlich auf die transkriptionelle Aktivierung diverser

Gene konzentriert, er jedoch auch in einigen Fällen repressiv wirken kann [287, 288].

5.2.1 Vergleichende Aktivitätsstudien von Promotorkonstrukten in VC/7G4

Die 7G4-Transfektante ist eine mGPx4-überexprimierende humane Mammakarzinom-Zelle, die sich durch eine erhöhte Expression der Sekretoglobuline MGB1 und LipB auszeichnet. Es galt in diesen Luciferase-Studien zu klären, ob diese Eigenschaft aus Veränderungen der Promotoraktivität hervorgeht. Dabei konnte festgestellt werden, daß sowohl 7G4 als auch die Vektorkontrolle ein vergleichbares Aktivitätsprofil aufwiesen. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die transkriptionelle Aktivität des LipB-Promotors in der mGPx4-überexprimierenden Zelle keine spezifische und signifikante Steigerung erfährt. Es liegt daher nahe, daß die LipB-Überexpression nicht auf differentielle Promotoraktivitäten zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf andere Veränderungen der genetischen Aktivität. In Erwägung gezogen können in diesem Kontext Modifikationen von Nukleotiden sowie stabilen Chromatinstrukturen. Gefestigt wird diese Argumentation durch die Tatsache, daß Mutationen, die im Zusammenhang mit der Karzinogenese der Brust angesehen werden, Veränderungen der epigenetischen Chromatinstruktur beinhalten [94]. Daneben konnte durch verschiedene Arbeiten bestätigt werden, daß in Mammakarzinom-Zellen epigenetische Veränderungen des proximalen BRCA1-Promotors ausgeprägt mit einer verminderten Genexpression korrelieren [289, 290]. Dem ist klärend vorzuschicken, daß die Runterregulierung des BRCA1-Gens vielfach mit dem Phänotyp des nicht-erblichen Brustkrebses assoziiert ist [291, 292]. Zu erwähnen ist auch die Möglichkeit, daß der erhöhte intrazelluläre mGPx4-Level Einfluß auf die strukturelle Integrität der Transkripte sowie die Prozessierung der prä-mRNA von MGB1 bzw. LipB nehmen könnte. Aufschlußreich ist darüber hinaus, daß sowohl in Vektorkontrolle als auch 7G4-Transfektante wiederum das proximale 277 bp-Promotorkonstrukt ein deutliches Aktivitätsmaximum aufzeigt. Dies könnte die in Abschnitt 5.2 aufgestellte These untermauern, die das Vorhandensein von regulativen Elementen in diesem Bereich postuliert. Auch für dieses Zellmodell liegt die Vermutung nahe, daß Repressoren im 318 bp-Fragment binden, da eine eindeutig reduzierte Luciferase-Aktivität im Experiment gemessen werden konnte.

5.3 DNA-Protein-Interaktionen am Promotor des LipB-Gens (EMSA)

Das Ziel der folgenden Versuche bestand darin, die vermuteten aktivierenden sowie reprimierenden Protein-DNA-Interaktionen am proximalen LipB-Promotor mit Hilfe der EMSA-Methodik zu bestätigen. Zur Durchführung der Konkurrenzexperimente im EMSA-Gel wurden DIG-markierte Promotorsonden mit nukleären Extrakten aus VC-Zellen inkubiert. Dabei wurde ein Upstream-Bereich von 213 bp geprüft.

Es konnte festgestellt werden, daß jede untersuchte DNA-Sonde eine oder mehrere Signalbanden aufwies, die nach Konkurrenz mit unmarkierten Sonden spezifische DNA-Protein-Interaktionen belegten. Somit erscheint in erster Näherung die Bindung von regulatorischen Proteinen innerhalb eines proximalen Promotorbereiches von 1 bis -213 bp als gerechtfertigt. Es galt im weiteren Verlauf der EMSA-Studien aufzuklären, welche der *in silico* identifizierten bzw. möglicherweise unbekannt Faktoren spezifische Protein-Interaktionen mit der DNA eingingen. Hierbei kam faktorspezifische Konkurrenz-DNA zum Einsatz, die mit Extrakten aus VC-Zellen inkubiert wurden. Die Untersuchungen zeigten, daß im Gel der Sonden 2 und 5 spezifische DNA-Protein-Interaktionen vorlagen. Die Konkurrenzexperimente legten dabei nahe, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um den Sp1-Transkriptionsfaktor handelte. Außerdem zeigte Sonde 4 eine NF1-spezifische Aufhebung des Bandensignals. Diese Ergebnisse stimmen nur teilweise mit den *in silico* vorhergesagten DNA-Motiven überein. So konnte der Sp1-Konsensus zum einen höchstwahrscheinlich zweifach im Experiment dokumentiert werden, zum anderen konnte die Bindungsstelle unmittelbar 5'-flankierend zum Transkriptionsstart nicht bestätigt werden. Dessenungeachtet konnten Sp1- bzw. NF1-Wechselwirkungen mit den jeweiligen DNA-Motiven ebenso im verwandten Mammaglobin 2-Promotor nachgewiesen werden, wie Xiao *et. al.* mittels ihrer EMSA-Supershift-Experimente belegen konnten [11]. Insofern erhärten diese Ergebnisse die These der Bindung aktivierender Faktoren innerhalb einer proximalen Upstream-Sequenz von 277 bp, da die beschriebenen Proteine sowohl in den jeweiligen EMSA-Sonden Bandenaktivität auslösten, als auch diese in jenem Bereich gezeigt werden konnten. Allerdings fehlt der abschließenden Beweisführung zur Identifizierung der im EMSA-Gel entdeckten Bindungsproteine die Supershift-Komplexierung mit faktorspezifischen Antikörpern. Weitere Proteine, die möglicher-

weise im proximalen Promotor des LipB-Gens binden können (siehe Tabelle 8), konnten nicht dokumentiert werden.

Die abschließende EMSA-Versuchsreihe hatte zum Ziel differentielle und spezifische Gelshifts in nukleären Extrakten aus VC und 7G4-Transfektante zu identifizieren.

Es stellte sich hierbei heraus, daß keine differentiellen Bandenshifts dokumentierbar waren. Dadurch wird klar, daß differentielle DNA-Protein-Bindungen innerhalb einer Promotorlänge von 250 bp nicht wahrscheinlich sind. Dies führt schlußendlich in diesem Kontext zu der Aussage, daß die mGPx4-Überexpression scheinbar keinen im EMSA-Experiment nachweisbaren Einfluß auf die Wechselwirkung von Faktor und *cis*-regulatorischen Element nimmt. Infolgedessen müssen andere zelluläre Mechanismen die Lipophilin B-Expression regulieren, die die erhöhte Transkriptmenge in der 7G4-Transfektante plausibel machen. Möglichkeiten eröffnen sich dazu im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der LipB-mRNA.

5.4 Experimentelle Analysen des mRNA-Transkriptes: Stabilität und Elongation

Die Transkriptstabilität beeinflusst maßgeblich die Genexpression in nahezu allen Organismen. In Mammalia-Zellen kann die Menge bestimmter mRNA durch Änderungen der Halbwertszeit um ein Vielfaches fluktuieren. Die Prozesse, welche die Transkript-Halbwertszeit in Abhängigkeit vom zellulären Umfeld regulieren, bestimmen die Proliferation sowie Differenzierung [293]. Daher steht im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit der potentielle Einfluß der mGPx4 als Regulator der MGB1/LipB-mRNA-Stabilität zur Diskussion. Die Daten legten hierzu nahe, daß nach Actinomycin D-Behandlung keine Unterschiede hinsichtlich der Transkriptmengen in beiden Zellmodellen und für MGB1 gemessen werden konnte. Demgemäß ist es augenscheinlich, daß der Anstieg der Transkripte in der 7G4-Transfektante nicht von der mGPx4 beeinträchtigt wird und somit ein enzymatischer Einfluß auf die Stabilität der Transkripte nicht wahrscheinlich ist. Für das LipB-Gen scheint dies nicht zuzutreffen. Während die VC-Zellen eine zeitabhängige Degradation der LipB-mRNA aufwiesen, zeigte die Transfektante diesen signifikant nach 7h Actinomycin D-Inkubation. Der Verdacht liegt infolgedessen nahe, daß die mGPx4 innerhalb eines Zeitintervalls von 5h die Transkripte vor zellulärer Degradation schützt. Zwecks Erforschung des potentiellen Regulationsmechanismus der MGB1/LipB-Gen-

expression, wurde zudem die Transkriptelongation und mRNA-Reifung in anschließenden Studien näher betrachtet. Dazu wurden die Transkripte von MGB1 sowie LipB nach reverser Transkription mit spezifischen Primern mittels der real time-PCR analysiert (siehe Abschnitt 3.2.11). In diesen Experimenten konnte festgestellt werden, daß in beiden RT-Ansätzen die gleiche Hochregulierung für MGB1 bzw. LipB mit beiden Primerkombinationen in der 7G4-Transfektante detektiert wurde. Folglich konnte durch diese Experimente keine Beeinflussung der Elongation und Prozessierung der mRNA durch die mGPx4 nachgewiesen werden. In Anbetracht der vorliegenden Daten kann geschlußfolgert werden, daß die transfizierte Mammakarzinom-Zelle auf ein anderes mechanistisches Instrumentarium zur Regulation der MGB1/LipB-Genexpression zurückgreift. Wie bereits in Abschnitt 5.2.1 erörtert, können hierfür möglicherweise epigenetische Modifikationen der CpG-Methylierung und/oder Histonacetylierung in Betracht gezogen werden.

5.5 Einfluß der CpG-Methylierung auf die Expression von MGB1 und LipB

Im Mittelpunkt des Interesses stand an dieser Stelle der potentielle Einfluß von DNA-Methylierungen auf die Genexpression der zu untersuchenden Sekretoglobuline. Zum Einsatz kam in diesen Studien der Dnmt-Inhibitor 5-Aza-2'-desoxycytidin (5-Aza-CdR), mit welchem die Vektorkontrolle sowie die 7G4-Transfektante behandelt wurde. Die Experimente hierzu brachten in erster Näherung keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Beeinflussung der transkriptionellen LipB-Aktivität in beiden Zelllinien ans Licht. Die Expression wies nach real time-PCR-Quantifizierung keine Inhibitor bedingten Effekte auf. Dadurch liegt die Vermutung nahe, daß CpG-Methylierung für die Regulation der LipB-Expression keine relevante Rolle spielt. Die Hintergründe dazu können äußerst vielfältig sein. Denkbar wäre, daß regulative Promotorsequenzen bereits von Anfang an drastisch hypomethyliert sind, so daß der erwartete Inhibitor-Effekt konsequenterweise nicht feststellbar ist. Es steht folglich die Frage nach dem generellen Methylierungsstatus des LipB-Promotors in der Mammakarzinom-Zelle COH-BR1 im Raum. Ein anderes Bild ergab sich für die MGB1-Amplifikation. Hier konnte eine generell erhöhte Aktivierung durch 5-Aza-CdR gemessen werden, die allerdings in beiden Zellmodellen keinen äquivalenten Verlauf aufzeigt. Bemerkenswerterweise konnte in der 7G4-Transfektante eine zeitlich ver-

zögerte transkriptionelle Aktivierung nach 48 h Inkubation registriert werden. In Anbetracht der vorliegenden Daten werden dadurch zweierlei Aussagen möglich. Zum einen scheint dem Methylierungsstatus für die MGB1-Genexpression eine größere Bedeutung zuzukommen als für LipB. Führt man sich jedoch vor Augen, daß Mammaglobin 1 über ein starkes Enhancer-Element verfügt [79], welches ebenso epigenetischen Methylierungsreaktionen unterliegen kann, kann dadurch die Steigerung der transkriptionellen Aktivität durch Hypomethylierung verständlich werden. Zum anderen ist eine Wechselwirkung der mGPx4 mit dem Wirkstoff 5-Aza-CdR durchaus wahrscheinlich, wodurch ein zeitversetzter Inhibitoreffekt plausibel wird. Vermutlich wird 5-Aza-CdR durch das Enzym reduziert, was eine Verminderung seiner pharmakologischen Charakteristika bzw. Degradierung zur Folge haben kann. Erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellwertes durch intrazelluläre Akkumulation wird ausreichend 5-Aza-CdR in den DNA-Strang eingebaut, was nach 48 h Inkubation den deutlichen Anstieg der Transkriptmenge hervorruft. Darüber hinaus konnten Forscher für 5-Aza-CdR nach 48 und 72h die maximale Demethylierung in verschiedenen Zellmodellen registrieren [141, 146]. Dieser Trend war ebenso in der Vektorkontrolle zu beobachten.

5.6 Einfluß der Histonacetylierung auf die Expression von MGB1 und LipB

5.6.1 (R)-Trichostatin A und Natriumbutyrat

Das hoch organisierte sowie dicht gepackte Chromatin ist aufgrund seiner Struktur in der Lage, Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren physikalisch zu inhibieren. Folglich müssen zur Initiierung der Transkription regulative Modifikationen der Histonproteine vorausgehen, welche im zellulären Geschehen Acetylierungen und Methylierungen von Lysinresten umfassen. In den nachfolgenden Experimenten wurden VC- sowie 7G4-transfizierte Zellen in **Trichostatin A**-versetztem Medium inkubiert, um im Anschluß den resultierenden Acetylierungsgrad im Western Blot zu untersuchen.

Anhand der vorliegenden Immunoblots konnte eine zeitgekoppelte Steigerung des Histon-Acetylierungsgrades nach TSA-Behandlung in beiden Zelllinien registriert werden. Allerdings konnten auch diese Studien einen zeitverzögerten Inhibitions-effekt in der Transfektanten nachweisen. Die Erkenntnisse bestätigen die Aussage

des vorhergehenden Abschnittes und erhärten damit den Verdacht, daß die Überexpression der mitochondrialen GPx4 kausal zur Verminderung des Inhibitions-effektes von TSA, wenn nicht sogar zur Degradierung des Wirkstoffes beiträgt. Erst nach 8stündiger intrazellulärer Akkumulation ist eine wirksame Konzentration des Inhibitors erreicht, die eine Hyperacetylierung der Histone bewirken kann. Dagegen wird die Hyperacetylierung in der Vektorkontrolle bereits nach 4h im Gel sichtbar.

Auf mRNA-Ebene konnte bezüglich der MGB1/LipB-Expression keine differentiellen Amplifikationsmuster nach Kurz- bzw. Langzeit-TSA-Inkubation (12 bzw. 96h) in beiden Zelllinien festgestellt werden. Die Hyperacetylierung der H3-Histone durch TSA, die bis zu 12h nachweisbar war (siehe Abschnitt 4.5.2.1), bewirkte keine Steigerung der MGB1/LipB-Expression. Somit konnte in der COH-BR1-Zelllinie keine direkte Beeinflussung der MGB1/LipB-Expression innerhalb eines Zeitintervalls von 12h durch TSA-induzierte Hyperacetylierung nachgewiesen werden.

Nach 96h-Inkubation mit TSA wurde die MGB1/LipB-Transkriptamplifikation interessanterweise in Vektorkontrolle sowie Transfektante deutlich reprimiert. Zu diesem Ergebnis kamen bereits andere Forscher, die die TSA-induzierte Runterregulierung intrazellulärer Level diverser mRNA-Transkripte und Proteine in verschiedenen Zellsystemen beobachten konnten [294, 295]. Jedoch beruht dieses Phänomen vermutlich nicht auf HDAC-inhibierende TSA-Effekte, da bereits nach einer 24h-Inkubationsperiode in der Literatur keine hyperacetylierten Histonproteine mehr nachweisbar waren [195]. Infolgedessen wäre der Einfluß von Sekundäreffekten auf die Genexpression seitens TSA möglich. Zur Klärung dieser These können folgende Szenarien herangezogen werden. Denkbar wäre die erhöhte Expression bzw. Aktivierung von RNase-Einheiten, welche für die Degradierung der MGB1/LipB-Transkripte verantwortlich sein kann. Zudem könnte TSA die Expression von Proteinen zur Stabilisierung der mRNA inhibieren [296]. Zu Bedenken wäre auch, daß TSA die Repression der transkriptionellen Aktivität mittels Runterregulierung der Expression von relevanten Transkriptionsfaktoren einleitet [297].

Bei dem zweiten in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor, handelt es sich um **Natriumbutyrat**. Auch in diesen Versuchsreihen konnte eine zeitabhängige Zunahme des Acetylierungsgrades in beiden Zellmodellen gezeigt werden. Anders als in den Experimenten mit TSA konnten in der Vektorkontrolle erst nach längerer Butyrat-

Inkubation hyperacetylierte Histonproteine zeitverzögert registriert werden. Die 7G4-Transfektante zeigte 4h nach Inhibitorzugabe eine Zunahme acetylierter Histone im SDS-Gel. Dies läßt die Annahme zu, daß der Inhibitor in der Vektorkontrolle möglicherweise chemisch verändert bzw. degradiert wird. Denkbar wäre in diesem Kontext, daß NaBu Prozessen des intrazellulären Stoffwechsels unterliegt. Für Kolonozyten beispielsweise dient Butyrat als Hauptenergielieferant, wobei die Verbindung β -oxidiert wird [191]. Übertragen auf die vorliegenden Ergebnisse könnte bedeutet das, daß Butyrat in der Vektorkontrolle teilweise oxidiert wird bevor es mit den Histondeacetylasen interagieren kann [195]. Erst nach längerer Inkubation bzw. Akkumulation des Hemmstoffes im Zytosol können die Histondeacetylasen effizient inhibiert werden. Bestätigung findet diese Hypothese durch die Beobachtungen der 7G4-Transfektante. Als Mammakarzinom-Zelle mit einem nachweislich erhöhten mGPx4-Expressionsstatus liegt der Gedanke nahe, daß das reduzierende Enzym die Verbindung vor zellulärer oxidativer Verstoffwechselung bewahrt. Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, tritt eine Hemmung der Histondeacetylasen bzw. Steigerung acetylierter Histonproteine in der Transfektante bereits nach 4h Inkubation ein. Die real time-PCR-Daten zeigten das gleiche Bild des MGB1- bzw. LipB-Expressionsmuster wie nach TSA-Inkubation zuvor erörtert wurde. Somit kann festgestellt werden, daß reproduzierbare Ergebnisse bzw. jene mit TSA erzielten Daten mit einem Inhibitor einer anderen chemischen Klassifizierung erhalten bzw. verifiziert werden. Beide verwendeten Hemmstoffe wirken sich in identischer Weise auf die Genexpression von MGB1 und LipB aus. Jedoch ist fraglich, ob ebenso ein identischer Mechanismus zur Amplifikationsregulation vorliegt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß die TSA/NaBu-Effekte nicht auf die Hyperacetylierung der Histonproteine zurückzuführen sind, da nach 24h Inhibitor-Inkubation diese nicht mehr nachweisbar war. Daraus folgt, daß beide Hemmstoffe gegebenenfalls indirekt in die Expressionsregulation von MGB1/LipB involviert sind.

5.7 Einfluß von Zellproliferation und Apoptose auf die MGB1/LipB-Expression

5.7.1 (R)-Trichostatin A und Natriumbutytrat

Im folgenden stand der Einfluß von **Trichostatin A** auf die Zellproliferation von

Vektorkontrolle und 7G4-Transfektante zur Diskussion. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die inhibitorabhängige Veränderung der Zellzahl sowie der Zellteilungszeit ermöglicht werden. Zudem stand das Expressionsmuster des zellzyklusrelevanten Proteins p21^{WAF1/CIP1} im Fokus der Analysen. Diese Daten sollten, im Kontext mit den pleiotropischen Effekten der verwendeten HDACIs betrachtet, die zuvor gewonnenen Ergebnisse zur TSA/NaBu-Repression klärend beleuchten.

Es konnte festgestellt werden, daß in Gegenwart von TSA beide Zelllinien unterschiedliche Wachstumskinetiken aufzeigten, wobei die mGPx4-Transfektante zeitverzögert nach 72h Inkubation reprimiert wurde. Führt man sich zur Klärung dieser Beobachtung die Daten zur p21^{WAF1/CIP1}-Expression vor Augen, wird deutlich, daß der Proliferationsarrest höchstwahrscheinlich nicht auf eine TSA-induzierte p21^{WAF1/CIP1}-Amplifikation zurückzuführen ist. Binnen 48h TSA-Inkubation konnte nämlich keine Veränderungen des p21^{WAF1/CIP1}-Transkriptniveaus in der transgenen Mammakarzinom-Zelle dokumentiert werden. Zudem konnte, wie der Graphik **B** der Abbildung 40 zu entnehmen war, nur innerhalb von 12h ein deutlicher Anstieg der Expression registriert werden, was auch in MG63-Zellen belegen werden konnte [185]. Generell war der intrazelluläre p21^{WAF1/CIP1}-Transkriptlevel in der transgenen Brustkrebszelle im Vergleich zur Vektorkontrolle insbesondere nach 24h merklich vermindert. In Anbetracht dessen besteht der Verdacht, daß mGPx4 sowohl das physiologische als auch das TSA-induzierte zelluläre mRNA-Niveau von p21^{WAF1/CIP1} binnen 24h erheblich runterreguliert. Darüber hinaus kann der hohe intrazelluläre mGPx4-Level in der transgenen Mammakarzinom-Zelle durchaus degradierend auf TSA Einfluß nehmen. Diese Funktionen des mGPx4-Enzyms würden dem Bild als anti-apoptotischen Protein entsprechen. Das Gegenteil war in der Vektorkontrolle zu beobachten. Hier war sowohl nach 12 als auch nach 48h TSA-Inkubation eine positive Regulation der p21^{WAF1/CIP1}-Transkriptamplifikation festzustellen. Wie durch andere Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden konnte, kann die p21^{WAF1/CIP1}-Amplifikation als Antwort auf diverse physiologische sowie chemische Aktivierungen deutlich ansteigen [195, 298]. Dadurch wird der Proliferationsarrest binnen 0-48h verständlich; p21^{WAF1/CIP1} arretiert während dieser Kultivierungszeit den Zellzyklus. Alle späteren Meßpunkte wiesen die Proliferation einer normalen Wachstumskinetik

auf. Nach gegenwärtigem Stand der Erkenntnisse fällt es schwer eine plausible Erklärung zum MGB1/LipB-Expressionsmuster nach 12stündiger TSA-Kultivierung zu finden. Es ist fraglich, ob und inwiefern $p21^{WAF1/CIP1}$, deren TSA-induzierte Überexpression in beiden Zellsystemen registriert werden konnte, eine Rolle in der transkriptionellen Regulation von MGB1 bzw. LipB spielt. Es erscheint vielmehr, daß dieses Protein keine relevante Funktion in diesem Kontext innehat. Dennoch konnte, mit Einschränkungen, eine positive Regulierung der $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression in beiden Zelllinien festgestellt werden. Die Ergebnisse hinsichtlich der Proliferation von transgenen Mammakarzinom-Zellen unter Einwirkung von **Butyrat** ergaben, daß sowohl in GPx4-überexprimierenden Zellen als auch in der Vektorkontrolle ein vollständiger Proliferationsarrest beobachtet werden konnte. Dieser war in beiden Zellmodellen gleichermaßen stark ausgeprägt. Verständlich wird jenes Ergebnis bei Betrachtung der $p21^{WAF1/CIP1}$ -Graphiken nach Butyrat-Inkubation. Anders als bei TSA konnte hier festgestellt werden, daß die Induzierung der Genexpression des Zellzyklusinhibitors auch noch nach 48h Inkubation in der Transfektanten nachweisbar war. Dies führt zu dem Schluß, daß Butyrat, in direkter Gegenüberstellung zu TSA, zu einer längeren stabilen Überexpression von $p21^{WAF1/CIP1}$ beiträgt [183, 199], die damit konsequenterweise mit einem längeren Proliferationsarrest assoziiert ist. Bei genauerer Betrachtung fällt zudem auf, daß der Anstieg der Transkriptmenge in der Vektorkontrolle innerhalb von 24h Inkubation sich kaum von der unbehandelten Zelle unterscheidet (Abb.42 **A**). Dies nährt wiederum den Verdacht, daß Butyrat in dieser Zelle degradiert bzw. verstoffwechselt wird (Abschnitt 5.6.1). Die transgene Zelle hingegen verfügt mit der Hochregulierung der mGPx4 über ein effizientes Instrument gegen oxidativen Streß, wodurch ebenfalls Butyrat vor oxidativer Verstoffwechslung geschützt wird. Das hat zur Folge, daß der Hemmstoff in wirksamen intrazellulären Konzentrationen vorhanden ist und somit sofort die $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression transkriptionell aktivieren kann. Trotz dieser physiologischen Unterschiede lieferten die Experimente mit Butyrat reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Induzierung der $p21^{WAF1/CIP1}$ -Expression.

5.8 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten putative Transkriptionsfaktoren *in silico* nachgewiesen werden, die potentielle Kandidaten zur transkriptionellen Regulation der Genexpression von Lipophilin B darstellen. Jedoch bleibt die Funktionalität dieser DNA-Motive noch zu klären. Der daran anschließende funktionelle Luciferase-Assay konnten in Transfektante, Vektorkontrolle, HEK-, sowie COH-BR1 (WT)-Zellen deutlich erhöhte Promotoraktivitäten für die DNA-Konstrukte 277 und 504 bp nachweisen. In weiterer Konsequenz wurde geschlußfolgert, daß der proximale LipB-Promotor über relevante *cis*-aktivierende Elemente verfügen könnte. Mit Hilfe des Gel-shift-Assays (EMSA) konnte über spezifische DNA-Protein-Interaktionen die Anwesenheit der Faktoren Sp1 sowie NF1 in der LipB-Upstreamsequenz berechtigt angenommen werden. Jedoch bedarf der unbeschränkten Verifizierung dieser Transkriptionsfaktoren die Anwendung von spezifischen Antikörpern im Supershift-Assay. Inwieweit jene Faktoren das Amplifikationsmuster in dessen gewebespezifischen Ausprägung beeinflussen, insbesondere in der 7G4-Transfektante, bedarf vertiefender Forschungsarbeit. Das methodische Instrumentarium, welches dabei Anwendung finden könnte, wären Zellsysteme mit gezieltem Knock down (siRNA) bzw. mit stillgelegten Transkriptionsfaktoren zur funktionellen Defizienz. Darüber hinaus stellt die experimentelle Bestätigung weiterer Faktoren, deren *cis*-regulatorischen Elemente im LipB-Promotor 5'-flankierend zum Transkriptionsstart *in silico* identifiziert werden konnten, einen wichtigen Ansatzpunkt für fortführende EMSA-Untersuchungen dar. Zudem wäre in diesem Kontext die Primer Extension- bzw. S1-Nuklease-Analyse zur Lokalisierung des Transkriptionsstarts hilfreich wie interessant. Im Weiteren ergaben experimentelle Analysen zur potentiellen Beeinflussung der Transkriptstabilität sowie mRNA-Elongation durch die mGPx4 keine neuen Erkenntnisse zur MGB1/LipB-Expressionsregulation in einer transgenen Mammakarzinom-Zelle. Die Untersuchung potentieller post-translationaler Modifikationen von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren (wie beispielsweise Sp1) durch die mGPx4 könnte im Mittelpunkt weiterer Experimente stehen. Zur näheren Beleuchtung der Problematik der vorliegenden Arbeit, bestand die Notwendigkeit die Analysen von der (post-)transkriptionellen zur epigenetischen Ebene zu überführen. Dazu wurde das Methylierungsmuster des MGB1- bzw. LipB-Promotors mit Hilfe von 5-Aza-CdR durch Inhibition der Dnmt1

manipuliert. Die quantitativen real time-PCR-Analysen deckten dabei auf, daß MGB1 durch Zugabe des Inhibitors eine transkriptionelle Aktivierung der Genexpression erfährt. Allerdings zeigte die LipB-Expression in beiden Zelllinien keine markanten Unterschiede. Es stellt sich somit die Frage nach dem generellen Methylierungsstatus des LipB-Promotors in der Mammakarzinom-Zelle COH-BR1, davon ausgehend, daß regulative Promotorsequenzen bereits von Anfang an drastisch hypomethyliert sind. Die hierzu notwendigen Versuche könnten beispielsweise die Bisulfit-Sequenzierung oder methylierungsspezifische PCR (MSP) umfassen. Die Analyse der Histonacetylierung beschrieb den konsequenten Schritt in der Aufklärung der epigenetischen Regulation von MGB1 und LipB. Verwendung fanden in diesen Studien die HDAC-Inhibitoren TSA und Butyrat. Beide Hemmstoffe bewirkten eine deutliche Repression der Genexpression von MGB1 sowie LipB. Zum Verständnis des repressiven Mechanismus wären weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des MGB1 /LipB-Transkriptes hilfreich. Dies impliziert die Analyse von Stabilisierungssequenzen sowie deren mögliche Interaktionen mit Stabilisierungsfaktoren. Zudem wäre die putative TSA/NaBu-Sensitivität jener RNA-bindender Proteine Gegenstand zukünftiger Experimente. Den Abschluß der Arbeit bildeten Analysen der Wachstumskinetiken von 7G4-Transfektante sowie VC-Zellen unter Einfluß von TSA/Butyrat. Diese Erkenntnisse wurden im Zusammenhang mit dem Expressionsmuster von p21^{WAF1/CIP1} bewertet. Es konnte festgestellt werden, daß p21^{WAF1/CIP1} durch TSA/Butyrat induziert wird. Jedoch unterschieden sich die Hemmstoffe in ihrer physiologischen sowie pharmakologischen Einflußnahme auf p21^{WAF1/CIP1}. Während der stimulierende Effekt von TSA auf die transkriptionelle Aktivität auf kurze Inkubationszeiten beschränkt war, zeichnete sich Butyrat insbesondere in der 7G4-Transfektante durch eine längere Stimulation der p21^{WAF1/CIP1}-Expression aus. In diesem Kontext wäre interessant zu erforschen, inwieweit Butyrat intrazellulären Stoffwechselprozessen wie der β -Oxidation unterliegt. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf einen potentiellen protektiven Effekt seitens der mGPx4 treffen.

Danksagung

“Eine Symphonie schreiben” so sagte vor gut hundert Jahren Gustav Mahler, der wohl bedeutendste Komponist der Spätromantik, „heißt mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln eine Welt errichten.“ Im künstlerischen Sinne kann dies möglich sein, doch erscheint der Transfer dieses Zitates in den naturwissenschaftlichen Bereich nicht ganz plausibel. Oder vielleicht doch? Und warum in der Danksagung einer naturwissenschaftlichen Dissertation? Begründet ist dies in der vergleichbaren Kraftanstrengung und investierten Mühe, die beide Arbeiten gleichermaßen erfordern, um dem Anspruch und Ziel des Strebens gerecht zu werden. Ich habe natürlich keine Symphonie komponiert, doch verlangt das Anfertigen einer Dissertation der Naturwissenschaften nicht minder viel „Blut und Schweiß“. Ich hatte das Glück diese Aufgabe nicht alleine schultern zu müssen, sondern konnte mich auf die Unterstützung und Beistand zahlreicher Personen verlassen, die aus meinem privaten sowie beruflichen Umfeld kamen. Diesen Personen gebührt hier mein besonderer Dank.

An erster Stelle sei hier meinem Doktorvater, Prof. Dr. H. Kühn, für das Ermöglichen dieser Arbeit, die kritischen Diskussionen und besonders für die gute wissenschaftliche Ausbildung herzlich gedankt. Mein Dank gilt daneben allen meinen Laborkollegen, die immer in einer guten Atmosphäre mit mir zusammengearbeitet haben und mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen dieser Arbeit Sorge getragen haben. Ich möchte mich dabei insbesondere für die vielen vergnüglichen Momente bedanken, welche nicht immer von wissenschaftlichen Inhalten geprägt waren. In diesem Zusammenhang sei meiner Betreuerin Dr. Astrid Borchert für ihre immerwährende Ansprechbarkeit sowie für ihre vielen Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit ganz herzlich gedankt.

Zudem danke ich Dr. Matthias Walther für die unzähligen organisierten Grillabende auf dem Institutsgelände und die nachmittäglichen Kaffeerunden, die mich so manches Mal von frustrierenden Rückschlägen ablenken konnten.

Gedankt sei darüber hinaus Herrn Dr. Christoph Ufer für seine Gespräche jenseits wissenschaftlicher Thematiken und für die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem Labor.

Des Weiteren danke ich Frau Heike Schiebel, Frau Hannelore Stender und Frau Monika Anton, die mich mit aufmunternden Worten zu „Höchstleistungen“ angetrieben und mir dann und wann helfend unter die Arme gegriffen haben.

Frau Heydeck sei an dieser Stelle ebenfalls für Ihre Unterstützung bei meinen Forschungsaktivitäten herzlich gedankt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung (moralisch wie finanziell) und ihren Rückhalt bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Und schließlich möchte ich mich bei meiner Freundin Kerstin für ihre Geduld mit mir in der kritischen Phase meiner Dissertation, ihren Zuspruch, ihr Vertrauen und dafür, daß sie mir fortwährend zur Seite stand von ganzem Herzen bedanken. Ohne sie wäre mir vieles während des Zusammenschreibens um einiges schwerer gefallen.

Literaturverzeichnis

1. Sjodin, A., et al., *Secretoglobins in the human pituitary: high expression of lipophilin B and its down-regulation in pituitary adenomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(4): p. 381-6.
2. Ni, J., et al., *All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **923**: p. 25-42.
3. Sjödin, A., *Human Secretoglobins in Normal and Neoplastic Cells and Tissues*. Dissertation, 2005.
4. Zafrakas, M., et al., *Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 88.
5. Reynolds, S.D., et al., *Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 define secretory cell subsets in mouse and human airways*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(11): p. 1498-509.
6. Zhao, C., et al., *Lipophilins: human peptides homologous to rat prostatein*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(1): p. 147-55.
7. Lehrer, R.I., et al., *Lipophilin, a novel heterodimeric protein of human tears*. FEBS Lett, 1998. **432**(3): p. 163-7.
8. Mantile, G., et al., *Human Clara cell 10-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20343-51.
9. Watson, M.A. and T.P. Fleming, *Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(4): p. 860-5.
10. Becker, R.M., et al., *Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family*. Genomics, 1998. **54**(1): p. 70-8.
11. Xiao, F., et al., *Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(12): p. 2964-78.
12. Krop, I.E., et al., *HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9796-801.

13. Niimi, T., et al., *UGRP1, a uteroglobin/Clara cell secretory protein-related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(11): p. 2021-36.
14. Goedegebuure, P.S., et al., *Mammaglobin-based strategies for treatment of breast cancer*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004. **4**(6): p. 531-42.
15. Mukherjee, A.B., Z. Zhang, and B.S. Chilton, *Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(7): p. 707-25.
16. Laukaitis, C.M., S.R. Dlouhy, and R.C. Karn, *The mouse salivary androgen-binding protein (ABP) gene cluster on Chromosomes 7: characterization and evolutionary relationships*. *Mamm Genome*, 2003. **14**(10): p. 679-91.
17. Snead, R., et al., *Mosaic structure and mRNA precursors of uteroglobin, a hormone-regulated mammalian gene*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(22): p. 11911-6.
18. Krusche, C.A., A. Herrler, and H.M. Beier, *Uteroglobin in situ hybridization: novel monitoring of epithelial differentiation in the rabbit endometrium*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **923**: p. 316-20.
19. Shijubo, N., et al., *Clinical aspects of Clara cell 10-kDa protein/ uteroglobin (secretoglobin 1A1)*. *Curr Pharm Des*, 2003. **9**(14): p. 1139-49.
20. Zhang, Z., et al., *Human uteroglobin gene: structure, subchromosomal localization, and polymorphism*. *DNA Cell Biol*, 1997. **16**(1): p. 73-83.
21. Callebaut, I., et al., *The uteroglobin fold*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **923**: p. 90-112.
22. Han, J.H., et al., *Mammaglobin expression in lymph nodes is an important marker of metastatic breast carcinoma*. *Arch Pathol Lab Med*, 2003. **127**(10): p. 1330-4.
23. Singh, G., et al., *Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **950**(3): p. 329-37.
24. Nieto, A., H. Ponstingl, and M. Beato, *Purification and quaternary structure of the hormonally induced protein uteroglobin*. *Arch Biochem Biophys*, 1977. **180**(1): p. 82-92.
25. Margraf, L.R., et al., *Cloning and tissue-specific expression of the cDNA for the mouse Clara cell 10 kD protein: comparison of endogenous expression to rabbit uteroglobin promoter-driven transgene expression*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993. **9**(3): p. 231-8.

-
26. Ray, M.K., et al., *Cloning and characterization of the mouse Clara cell specific 10 kDa protein gene: comparison of the 5'-flanking region with the human rat and rabbit gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **197**(1): p. 163-71.
 27. Nordlund-Moller, L., et al., *Cloning, structure, and expression of a rat binding protein for polychlorinated biphenyls. Homology to the hormonally regulated progesterone-binding protein uteroglobin*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(21): p. 12690-3.
 28. Sagal, R.G. and A. Nieto, *Molecular cloning of the cDNA and the promoter of the hamster uteroglobin/Clara cell 10-kDa gene (ug/cc10): tissue-specific and hormonal regulation*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **350**(2): p. 214-22.
 29. Lopez de Haro, M.S. and A. Nieto, *Nucleotide and derived amino acid sequences of a cDNA coding for pre-uteroglobin from the lung of the hare (*Lepus capensis*)*. *Biochem J*, 1986. **235**(3): p. 895-8.
 30. Gutierrez Sagal, R. and A. Nieto, *Cloning and sequencing of the cDNA coding for pig pre-uteroglobin/Clara cell 10 kDa protein*. *Biochem Mol Biol Int*, 1998. **45**(1): p. 205-13.
 31. von der Decken, V., et al., *Recombinant bovine uteroglobin at 1.6 Å resolution: a preliminary X-ray crystallographic analysis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005. **61**(Pt 5): p. 499-502.
 32. Muller-Schottle, F., et al., *Full-length complementary DNA and the derived amino acid sequence of horse uteroglobin*. *Biol Reprod*, 2002. **66**(6): p. 1723-8.
 33. Hashimoto, S., K. Nakagawa, and K. Sueishi, *Monkey Clara cell 10 kDa protein (CC10): a characterization of the amino acid sequence with an evolutionary comparison with humans, rabbits, rats, and mice*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **15**(3): p. 361-6.
 34. Carter, D., et al., *Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer*. *Biochemistry*, 2002. **41**(21): p. 6714-22.
 35. Colpitts, T.L., et al., *Mammaglobin is found in breast tissue as a complex with BU101*. *Biochemistry*, 2001. **40**(37): p. 11048-59.
 36. Miele, L., et al., *Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: the uteroglobin family of proteins*. *J Endocrinol Invest*, 1994. **17**(8): p. 679-92.
 37. Zielonka, T.M., et al., *Effects of castration and testosterone on Fel dl production by sebaceous glands of male cats: I--Immunological assessment*. *Clin Exp Allergy*, 1994. **24**(12): p. 1169-73.
-

-
38. Porter, D., et al., *Expression of high in normal-1 (HIN-1) and uteroglobin related protein-1 (UGRP-1) in adult and developing tissues*. Mech Dev, 2002. **114**(1-2): p. 201-4.
 39. Ishii, S., et al., *Sex-associated differences in protein 1 values in urine: immunochemical detection of protein 1 in genital tissues*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994. **32**(1): p. 31-6.
 40. Grunewald, K., et al., *Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Lab Invest, 2002. **82**(9): p. 1147-53.
 41. Aihara, T., et al., *Mammaglobin B gene as a novel marker for lymph node micrometastasis in patients with abdominal cancers*. Cancer Lett, 2000. **150**(1): p. 79-84.
 42. De Jongh, R., et al., *Clara cell protein: concentrations in cerebrospinal fluid, serum and amniotic fluid*. Cytokine, 1998. **10**(6): p. 441-4.
 43. Bally, R. and J. Delettre, *Structure and refinement of the oxidized P21 form of uteroglobin at 1.64 Å resolution*. J Mol Biol, 1989. **206**(1): p. 153-70.
 44. Pattabiraman, N., et al., *Crystal structure analysis of recombinant human uteroglobin and molecular modeling of ligand binding*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **923**: p. 113-27.
 45. Carlomagno, T., et al., *Resonance assignment and secondary structure determination and stability of the recombinant human uteroglobin with heteronuclear multidimensional NMR*. J Biomol NMR, 1997. **9**(1): p. 35-46.
 46. Winkelmann, R., et al., *Solution structure of the recombinant oxidized rabbit uteroglobin using homonuclear and heteronuclear multidimensional NMR*. Eur J Biochem, 1998. **258**(2): p. 521-32.
 47. Mukherjee, A.B., et al., *Uteroglobin: a novel cytokine?* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(5): p. 771-87.
 48. Klug, J., et al., *Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **923**: p. 348-54.
 49. Lehrer, R.I., et al., *Secretory lipophilins: a tale of two species*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **923**: p. 59-67.
 50. Heyns, W., et al., *Purification and characterisation of prostatic binding protein and its subunits*. Eur J Biochem, 1978. **89**(1): p. 181-6.
-

-
51. Beato, M., *Binding of steroids to uteroglobin*. J Steroid Biochem, 1976. **7**(5): p. 327-34.
 52. Gillner, M., et al., *The binding of methylsulfonyl-polychloro-biphenyls to uteroglobin*. J Steroid Biochem, 1988. **31**(1): p. 27-33.
 53. Lopez de Haro, M.S., et al., *Binding of retinoids to uteroglobin*. FEBS Lett, 1994. **349**(2): p. 249-51.
 54. Burmeister, R., et al., *A two-receptor pathway for catabolism of Clara cell secretory protein in the kidney*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 13295-301.
 55. Levin, S.W., et al., *Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity*. Life Sci, 1986. **38**(20): p. 1813-9.
 56. Singh, G., et al., *Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1039**(3): p. 348-55.
 57. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
 58. Stripp, B.R., et al., *Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(2): p. 170-8.
 59. Zhang, Z., et al., *Severe fibronectin-deposit renal glomerular disease in mice lacking uteroglobin*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1408-12.
 60. Austin, C.J., L. Emberson, and P. Nicholls, *Purification and characterization of pheromaxin, the porcine steroid-binding protein. A member of the secretoglobin superfamily*. Eur J Biochem, 2004. **271**(13): p. 2593-606.
 61. Morize, I., et al., *Refinement of the C222(1) crystal form of oxidized uteroglobin at 1.34 Å resolution*. J Mol Biol, 1987. **194**(4): p. 725-39.
 62. Hard, T., et al., *Solution structure of a mammalian PCB-binding protein in complex with a PCB*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(11): p. 983-9.
 63. Sjodin, A., et al., *Dysregulated secretoglobin expression in human lung cancers*. Lung Cancer, 2003. **41**(1): p. 49-56.
 64. Weeraratna, A.T., et al., *Loss of uteroglobin expression in prostate cancer: relationship to advancing grade*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(12 Pt 1): p. 2295-300.
 65. Adib, T.R., et al., *Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays*. Br J Cancer, 2004. **90**(3): p. 686-92.
-

-
66. Marchetti, A., et al., *Down regulation of high in normal-1 (HIN-1) is a frequent event in stage I non-small cell lung cancer and correlates with poor clinical outcome.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1338-43.
 67. Watson, M.A., et al., *Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer.* Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3028-31.
 68. Carter, D., et al., *Serum antibodies to lipophilin B detected in late stage breast cancer patients.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 749-54.
 69. Houghton, R.L., et al., *Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells.* Mol Diagn, 2001. **6**(2): p. 79-91.
 70. Fleming, T.P. and M.A. Watson, *Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **923**: p. 78-89.
 71. Ooka, M., et al., *Selection of mRNA markers for detection of lymph node micrometastases in breast cancer patients.* Oncol Rep, 2000. **7**(3): p. 561-6.
 72. Grunewald, K., et al., *Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19.* Lab Invest, 2000. **80**(7): p. 1071-7.
 73. Watson, M.A. and T.P. Fleming, *Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer.* Cancer Res, 1994. **54**(17): p. 4598-602.
 74. Watson, M.A., et al., *Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13.* Oncogene, 1998. **16**(6): p. 817-24.
 75. Zach, O., et al., *Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA.* J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2015-9.
 76. Zehentner, B.K. and D. Carter, *Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer.* Clin Biochem, 2004. **37**(4): p. 249-57.
 77. O'Brien, N., et al., *Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer.* Clin Chem, 2002. **48**(8): p. 1362-4.
 78. Culleton, J., et al., *Lipophilin B: A gene preferentially expressed in breast tissue and upregulated in breast cancer.* Int J Cancer, 2007. **120**(5): p. 1087-92.

-
79. Shi, C.X., et al., *The human SCGB2A2 (mammaglobin-1) promoter/enhancer in a helper-dependent adenovirus vector directs high levels of transgene expression in mammary carcinoma cells but not in normal nonmammary cells.* Mol Ther, 2004. **10**(4): p. 758-67.
 80. Hesselbrock, D.R., et al., *PEA3, AP-1, and a unique repetitive sequence all are involved in transcriptional regulation of the breast cancer-associated gene, mammaglobin.* Breast Cancer Res Treat, 2005. **89**(3): p. 289-96.
 81. Shepherd, T.G., et al., *The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis.* Curr Biol, 2001. **11**(22): p. 1739-48.
 82. Chen, J.H., et al., *PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells.* Oncogene, 1996. **13**(8): p. 1667-75.
 83. Parkin, D.M., *International variation.* Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6329-40.
 84. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002.* CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
 85. WHO/IARC, *World Cancer Report.* Lyon, 2003.
 86. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.* Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 153-6.
 87. Robert-Koch-Institut, *Brustdrüse der Frau. Krebs in Deutschland 2003-2004.*
 88. *Krebs in Deutschland*
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und RKI, Saarbrücken, 2006(5.Auflage).
 89. Russo, J., et al., *Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer.* J Natl Cancer Inst Monogr, 2000(27): p. 17-37.
 90. Backe, J., *Brustkrebs beim Mann.* Dtsch Ärzteblatt, 2002. **99**(17).
 91. Siegmund-Schultze, N., Zylka-Menhorn, V., Leinmüller, R., Meyer, R., *Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf aktuelle Datenlage.* Dtsch Ärzteblatt, 2008. **105**(6).
 92. Schmutzler, R., Meindl, A., *Das hereditäre Mammakarzinom: Genetik und Prävention.* Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome, 2007.
 93. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for*
-

-
- family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
94. Mielnicki, L.M., H.L. Asch, and B.B. Asch, *Genes, chromatin, and breast cancer: an epigenetic tale*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(2): p. 169-82.
95. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 163-7.
96. Sager, R., *Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 952-5.
97. Robertson, K.D., *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3139-55.
98. Cross, S.H. and A.P. Bird, *CpG islands and genes*. Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(3): p. 309-14.
99. Yeivin, A. and A. Razin, *Gene methylation patterns and expression*. EXS, 1993. **64**: p. 523-68.
100. Elango, N. and S.V. Yi, *DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(8): p. 1602-8.
101. Knippers, R., *Molekulare Genetik*. Thieme, 2006.
102. Shen, J.C., W.M. Rideout, 3rd, and P.A. Jones, *The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(6): p. 972-6.
103. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
104. Singal, R. and G.D. Ginder, *DNA methylation*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4059-70.
105. Wicki, R., et al., *Repression of the candidate tumor suppressor gene S100A2 in breast cancer is mediated by site-specific hypermethylation*. Cell Calcium, 1997. **22**(4): p. 243-54.
106. Brooks, J., P. Cairns, and A. Zeleniuch-Jacquotte, *Promoter methylation and the detection of breast cancer*. Cancer Causes Control, 2009. **20**(9): p. 1539-50.
107. Wade, P.A., et al., *Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation*. Nat Genet, 1999. **23**(1): p. 62-6.
-

-
108. Iguchi-Arigo, S.M. and W. Schaffner, *CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation*. *Genes Dev*, 1989. **3**(5): p. 612-9.
109. Siegfried, Z. and H. Cedar, *DNA methylation: a molecular lock*. *Curr Biol*, 1997. **7**(5): p. R305-7.
110. Claus, R., *Derepression der Transkription des Lysozyngens durch pharmakologische Hemmung der DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung in AML1/ETO-positiven Zellen*. Dissertation, 2006.
111. Lewis, J.D., et al., *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA*. *Cell*, 1992. **69**(6): p. 905-14.
112. Wakefield, R.I., et al., *The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA*. *J Mol Biol*, 1999. **291**(5): p. 1055-65.
113. Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. *Cell*, 1997. **88**(4): p. 471-81.
114. Wang, X., et al., *Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 12764-8.
115. Laird, P.W., *Cancer epigenetics*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14 Spec No 1**: p. R65-76.
116. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 415-28.
117. Lund, A.H. and M. van Lohuizen, *Epigenetics and cancer*. *Genes Dev*, 2004. **18**(19): p. 2315-35.
118. Johnstone, R.W., *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(4): p. 287-99.
119. Kondo, Y., L. Shen, and J.P. Issa, *Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(1): p. 206-15.
120. Shio, Y. and R.N. Eisenman, *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13225-30.
121. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
-

-
122. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
 123. Kornberg, R.D. and Y. Lorch, *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell, 1999. **98**(3): p. 285-94.
 124. Hong, L., et al., *Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA*. J Biol Chem, 1993. **268**(1): p. 305-14.
 125. Norton, V.G., et al., *Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change*. Cell, 1989. **57**(3): p. 449-57.
 126. Vettese-Dadey, M., et al., *Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2508-18.
 127. Lachner, M. and T. Jenuwein, *The many faces of histone lysine methylation*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(3): p. 286-98.
 128. Tse, C., et al., *Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4629-38.
 129. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
 130. Lyko, F. and R. Brown, *DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(20): p. 1498-506.
 131. Sorm, F., et al., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. Experientia, 1964. **20**(4): p. 202-3.
 132. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
 133. Santini, V., H.M. Kantarjian, and J.P. Issa, *Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications*. Ann Intern Med, 2001. **134**(7): p. 573-86.
 134. Leone, G., et al., *Inhibitors of DNA methylation in the treatment of hematological malignancies and MDS*. Clin Immunol, 2003. **109**(1): p. 89-102.

-
135. Li, L.H., et al., *Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia*. *Cancer Res*, 1970. **30**(11): p. 2760-9.
136. Bouchard, J. and R.L. Momparler, *Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase*. *Mol Pharmacol*, 1983. **24**(1): p. 109-14.
137. Creusot, F., G. Acs, and J.K. Christman, *Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(4): p. 2041-8.
138. Chen, L., et al., *Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase*. *Biochemistry*, 1991. **30**(46): p. 11018-25.
139. Suzuki, T. and N. Miyata, *Epigenetic control using natural products and synthetic molecules*. *Curr Med Chem*, 2006. **13**(8): p. 935-58.
140. O'Gara, M., et al., *Enzymatic C5-cytosine methylation of DNA: mechanistic implications of new crystal structures for HhaI methyltransferase-DNA-AdoHcy complexes*. *J Mol Biol*, 1996. **261**(5): p. 634-45.
141. Stresemann, C. and F. Lyko, *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(1): p. 8-13.
142. Lin, K.T., R.L. Momparler, and G.E. Rivard, *High-performance liquid chromatographic analysis of chemical stability of 5-aza-2'-deoxycytidine*. *J Pharm Sci*, 1981. **70**(11): p. 1228-32.
143. Notari, R.E. and J.L. DeYoung, *Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions*. *J Pharm Sci*, 1975. **64**(7): p. 1148-57.
144. Tomankova, H., Zyka, J., *Study of the time dependence of the stability of 5-aza-2'-deoxycytidine in acid medium* *Microchem J*, 1980. **25**: p. 281-8.
145. Yoo, C.B., et al., *Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6400-8.
146. Bender, C.M., et al., *Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6690-8.
147. Santi, D.V., A. Norment, and C.E. Garrett, *Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(22): p. 6993-7.
148. Schermelleh, L., et al., *Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells*. *Nat Methods*, 2005. **2**(10): p. 751-6.
-

-
149. Cress, W.D. and E. Seto, *Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer*. J Cell Physiol, 2000. **184**(1): p. 1-16.
150. Davie, J.R. and M. Moniwa, *Control of chromatin remodeling*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2000. **10**(3-4): p. 303-25.
151. Drummond, D.C., et al., *Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 495-528.
152. Khochbin, S., et al., *Functional significance of histone deacetylase diversity*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 162-6.
153. Imai, S., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
154. Finnin, M.S., J.R. Donigian, and N.P. Pavletich, *Structure of the histone deacetylase SIRT2*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(7): p. 621-5.
155. Sun, J.M., H.Y. Chen, and J.R. Davie, *Effect of estradiol on histone acetylation dynamics in human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49435-42.
156. Shen, X.Z., et al., *Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription*. Endocrinology, 1983. **112**(3): p. 871-6.
157. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 188-93.
158. Davie, J.R., *Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate*. J Nutr, 2003. **133**(7 Suppl): p. 2485S-2493S.
159. Vigushin, D.M. and R.C. Coombes, *Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment*. Anticancer Drugs, 2002. **13**(1): p. 1-13.
160. Magner, W.J., et al., *Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7017-24.
161. Armeanu, S., et al., *Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357*. J Hepatol, 2005. **42**(2): p. 210-7.
162. Kwon, S.H., et al., *Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 2073-80.
163. Kim, M.S., et al., *Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 437-43.
-

-
164. Almenara, J., R. Rosato, and S. Grant, *Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)*. *Leukemia*, 2002. **16**(7): p. 1331-43.
165. Bernhard, D., et al., *Inhibition of histone deacetylase activity enhances Fas receptor-mediated apoptosis in leukemic lymphoblasts*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(10): p. 1014-21.
166. Richon, V.M., et al., *Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(18): p. 10014-9.
167. Han, J.W., et al., *Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin*. *Cancer Res*, 2000. **60**(21): p. 6068-74.
168. Park, S.H., et al., *Transcriptional regulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y in human breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 5168-74.
169. Lee, B.I., et al., *MS-275, a histone deacetylase inhibitor, selectively induces transforming growth factor beta type II receptor expression in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(3): p. 931-4.
170. Sasakawa, Y., et al., *Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(6): p. 897-906.
171. Fournel, M., et al., *Sulfonamide anilides, a novel class of histone deacetylase inhibitors, are antiproliferative against human tumors*. *Cancer Res*, 2002. **62**(15): p. 4325-30.
172. Marks, P.A., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W.K., *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies*. *Nature Reviews Cancer* 1, 2001. **1**: p. 194-202.
173. Morioka, H., Ishihara, M., Takezawa, M., Shibai, H., Komoda, Y., *(+)-Trichostatin A, a Potent Differentiation Inducer of Friend Leukemia Cells*. *Agric. Biol. Chem.* 52, 1988. **52**: p. 251.
174. Yoshida, M., S. Nomura, and T. Beppu, *Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells*. *Cancer Res*, 1987. **47**(14): p. 3688-91.
-

-
175. Yoshida, M., et al., *Structural specificity for biological activity of trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with potent differentiation-inducing activity in Friend leukemia cells*. J Antibiot (Tokyo), 1990. **43**(9): p. 1101-6.
176. Yoshida, M., et al., *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A*. J Biol Chem, 1990. **265**(28): p. 17174-9.
177. Buggy, J.J., et al., *Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 199-205.
178. Furumai, R., et al., *Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 87-92.
179. Hoffmann, K., B. Heltweg, and M. Jung, *Improvement and validation of the fluorescence-based histone deacetylase assay using an internal standard*. Arch Pharm (Weinheim), 2001. **334**(7): p. 248-52.
180. Hoshikawa, Y., et al., *Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines*. Exp Cell Res, 1994. **214**(1): p. 189-97.
181. Yamashita, Y., et al., *Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells*. Int J Cancer, 2003. **103**(5): p. 572-6.
182. Toth, K.F., et al., *Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 18): p. 4277-87.
183. Archer, S.Y., et al., *p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6791-6.
184. Di Leonardo, A., et al., *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. Genes Dev, 1994. **8**(21): p. 2540-51.
185. Sowa, Y., et al., *Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(1): p. 142-50.
186. Sowa, Y., et al., *Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4266-70.
-

-
187. Lea, M.A., et al., *Induction of histone acetylation and inhibition of growth by phenyl alkanoic acids and structurally related molecules*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004. **54**(1): p. 57-63.
 188. Chen, J.S., D.V. Faller, and R.A. Spanjaard, *Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics?* *Curr Cancer Drug Targets*, 2003. **3**(3): p. 219-36.
 189. Gaschott, T., et al., *Tributylin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells*. *J Nutr*, 2001. **131**(6): p. 1839-43.
 190. Miller, S.J., *Cellular and physiological effects of short-chain fatty acids*. *Mini Rev Med Chem*, 2004. **4**(8): p. 839-45.
 191. Hague, A., B. Singh, and C. Paraskeva, *Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(3): p. 1036-40.
 192. Scheppach, W., et al., *Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1992. **16**(1): p. 43-8.
 193. Scheppach, W., *Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function*. *Gut*, 1994. **35**(1 Suppl): p. S35-8.
 194. Gillet, R., et al., *Piperazine derivatives of butyric acid as differentiating agents in human leukemic cells*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998. **41**(3): p. 252-5.
 195. Siavoshian, S., et al., *Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression*. *Gut*, 2000. **46**(4): p. 507-14.
 196. Li, C., et al., *Effect and comparison of sodium butyrate and trichostatin A on the proliferation/differentiation of K562*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2003. **23**(3): p. 249-53.
 197. Steinman, R.A., et al., *Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation*. *Oncogene*, 1994. **9**(11): p. 3389-96.
 198. Hodin, R.A., et al., *Cellular growth state differentially regulates enterocyte gene expression in butyrate-treated HT-29 cells*. *Cell Growth Differ*, 1996. **7**(5): p. 647-53.
 199. Nakano, K., et al., *Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(35): p. 22199-206.
-

-
200. Shao, Y., et al., *Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18030-5.
201. Boyle, G.M., A.C. Martyn, and P.G. Parsons, *Histone deacetylase inhibitors and malignant melanoma*. Pigment Cell Res, 2005. **18**(3): p. 160-6.
202. Nomura, K., et al., *Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor*. Biol Signals Recept, 2001. **10**(1-2): p. 81-92.
203. Herbette, S., P. Roeckel-Drevet, and J.R. Drevet, *Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers*. FEBS J, 2007. **274**(9): p. 2163-80.
204. Brigelius-Flohe, R., *Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors*. Biol Chem, 2006. **387**(10-11): p. 1329-35.
205. Ursini, F., et al., *Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides*. Biochim Biophys Acta, 1982. **710**(2): p. 197-211.
206. Conrad, M., et al., *Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals*. Biol Chem, 2007. **388**(10): p. 1019-25.
207. Arai, M., et al., *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4924-33.
208. Pfeifer, H., et al., *Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1236-8.
209. Conrad, M., *Etablierung von Mausstämmen defizient für die Selenoproteine mitochondriale Thioredoxin-Reduktase und Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx) und Charakterisierung einer Spermienkern-spezifischen Form der PHGPx*. Dissertation, 2001.
210. Borchert, A., *Kodierungsvielfalt der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase-Untersuchungen zur Expressionsregulation des Enzyms in tierischen Geweben*. Dissertation, 2003.
211. Ufer, C., *Untersuchungen zur Expressionsregulation der Phospholipid-Hydroperoxid Glutathion-Peroxidase*. Dissertation, 2006.
212. Hurst, R., et al., *Hyperresistance to cholesterol hydroperoxide-induced peroxidative injury and apoptotic death in a tumor cell line that overexpresses*
-

-
- glutathione peroxidase isotype-4*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(9): p. 1051-65.
213. Wang, H.P., et al., *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(8): p. 825-35.
214. Imai, H. and Y. Nakagawa, *Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(2): p. 145-69.
215. Brigelius-Flohe, R. and A. Kipp, *Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(11): p. 1555-68.
216. Nomura, K., et al., *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29294-302.
217. Brielmeier, M., et al., *Cloning of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an anti-apoptotic and growth promoting gene of Burkitt lymphoma cells*. Biofactors, 2001. **14**(1-4): p. 179-90.
218. Huang, H.S., W.C. Chang, and C.J. Chen, *Involvement of reactive oxygen species in arsenite-induced downregulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(6): p. 864-73.
219. Imai, H., et al., *Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 3): p. 799-809.
220. Kornberg, R.D., *The molecular basis of eukaryotic transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 12955-61.
221. Thomas, M.C. and C.M. Chiang, *The general transcription machinery and general cofactors*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2006. **41**(3): p. 105-78.
222. Kadonaga, J.T., *The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II*. Exp Mol Med, 2002. **34**(4): p. 259-64.
223. Deng, W. and S.G. Roberts, *Core promoter elements recognized by transcription factor IIB*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1051-3.
224. Potthoff, M.J. and E.N. Olson, *MEF2: a central regulator of diverse developmental programs*. Development, 2007. **134**(23): p. 4131-40.
-

-
225. Eychene, A., N. Rocques, and C. Pouponnot, *A new MAFia in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(9): p. 683-93.
226. Motohashi, H. and M. Yamamoto, *Carcinogenesis and transcriptional regulation through Maf recognition elements*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(2): p. 135-9.
227. Safe, S. and M. Abdelrahim, *Sp transcription factor family and its role in cancer*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(16): p. 2438-48.
228. Black, A.R., J.D. Black, and J. Azizkhan-Clifford, *Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer*. *J Cell Physiol*, 2001. **188**(2): p. 143-60.
229. Du, R., et al., *Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep (Ovis aries)*. *J Biochem Mol Biol*, 2007. **40**(4): p. 547-53.
230. Du, R., et al., *Functional analysis of the Myostatin gene promoter in sheep*. *Sci China C Life Sci*, 2007. **50**(5): p. 648-54.
231. Kriska, T., W. Korytowski, and A.W. Girotti, *Hyperresistance to photosensitized lipid peroxidation and apoptotic killing in 5-aminolevulinate-treated tumor cells overexpressing mitochondrial GPX4*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(10): p. 1389-402.
232. Zahnow, C.A., *CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases*. *Expert Rev Mol Med*, 2009. **11**: p. e12.
233. Prior, H.M. and M.A. Walter, *SOX genes: architects of development*. *Mol Med*, 1996. **2**(4): p. 405-12.
234. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2390-400.
235. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner, *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 25): p. 5965-73.
236. Mehta-Grigoriou, F., D. Gerald, and M. Yaniv, *The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2378-89.
237. Kataoka, K., M. Noda, and M. Nishizawa, *Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(1): p. 700-12.
238. Duan, Z. and M. Horwitz, *Gfi-1 oncoproteins in hematopoiesis*. *Hematology*, 2003. **8**(5): p. 339-44.
-

-
239. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson, *MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 40-7.
240. Yang, X.W., R. Zhong, and N. Heintz, *Granule cell specification in the developing mouse brain as defined by expression of the zinc finger transcription factor RU49*. Development, 1996. **122**(2): p. 555-66.
241. Gronostajski, R.M., *Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development*. Gene, 2000. **249**(1-2): p. 31-45.
242. Murtagh, J., F. Martin, and R.M. Gronostajski, *The Nuclear Factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003. **8**(2): p. 241-54.
243. Hromas, R., et al., *Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **211**: p. 159-64.
244. Jacob, J. and J. Briscoe, *Gli proteins and the control of spinal-cord patterning*. EMBO Rep, 2003. **4**(8): p. 761-5.
245. Koebernick, K. and T. Pieler, *Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling*. Differentiation, 2002. **70**(2-3): p. 69-76.
246. Du, X., R.L. Rosenfield, and K. Qin, *KLF15 Is a transcriptional regulator of the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 gene. A potential link between regulation of testosterone production and fat stores in women*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(7): p. 2594-601.
247. Wang, B., et al., *The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(2): p. 193-7.
248. Oh, I.H. and E.P. Reddy, *The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis*. Oncogene, 1999. **18**(19): p. 3017-33.
249. Flajollet, S., et al., *RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 6948-59.
250. Milon, B.C., et al., *Ras responsive element binding protein-1 (RREB-1) down-regulates hZIP1 expression in prostate cancer cells*. Prostate, 2009. **70**(3): p. 288-296.
251. Lu, S. and P.J. Davies, *Regulation of the expression of the tissue transglutaminase gene by DNA methylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4692-7.
-

-
252. Wang, H.P., et al., *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induces a delay in G1 of the cell cycle*. Free Radic Res, 2003. **37**(6): p. 621-30.
253. Moriguchi, T., et al., *MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5715-27.
254. Pauza, M.E., et al., *Variable effects of transgenic c-Maf on autoimmune diabetes*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 39-46.
255. MacLean, H.E., et al., *Absence of transcription factor c-maf causes abnormal terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development*. Dev Biol, 2003. **262**(1): p. 51-63.
256. Motohashi, H., et al., *Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors*. Gene, 2002. **294**(1-2): p. 1-12.
257. Kurokawa, H., et al., *Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(23): p. 6232-44.
258. Kataoka, K., et al., *Small Maf proteins heterodimerize with Fos and may act as competitive repressors of the NF-E2 transcription factor*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 2180-90.
259. Toki, T., et al., *Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif*. Oncogene, 1997. **14**(16): p. 1901-10.
260. Kobayashi, A., et al., *Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6443-52.
261. Igarashi, K. and J. Sun, *The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(1-2): p. 107-18.
262. Shimokawa, N., et al., *Extracellular acidification enhances DNA binding activity of MafG-FosB heterodimer*. J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 77-85.
263. Motohashi, H., et al., *The world according to Maf*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(15): p. 2953-59.
264. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
-

-
265. Maulik, N., et al., *Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors*. FEBS Lett, 2000. **485**(1): p. 7-12.
266. Surh, Y.J., et al., *Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals*. J Nutr, 2005. **135**(12 Suppl): p. 2993S-3001S.
267. Suzuki, T., et al., *Maf genes are involved in multiple stress response in human*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 4-8.
268. Nakae, K., et al., *ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun*. J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23795-800.
269. Biswas, S.K. and I. Rahman, *Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 60-76.
270. Safe, S. and K. Kim, *Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2004. **77**: p. 1-36.
271. Bouwman, P. and S. Philipsen, *Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **195**(1-2): p. 27-38.
272. Dennig, J., et al., *Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12737-44.
273. Tan, N.Y. and L.M. Khachigian, *Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(10): p. 2483-8.
274. Chu, S. and T.J. Ferro, *Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation*. Gene, 2005. **348**: p. 1-11.
275. Bandyopadhyay, S., et al., *Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 392-7.
276. Scholz, A., M. Truss, and M. Beato, *Hormone-induced recruitment of Sp1 mediates estrogen activation of the rabbit uteroglobin gene in endometrial epithelium*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4360-6.
277. Lu, J., et al., *Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4070-5.
278. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson, *Control of muscle development by dueling HATs and HDACs*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 497-504.
-

-
279. Khoury, G. and P. Gruss, *Enhancer elements*. Cell, 1983. **33**(2): p. 313-4.
280. Szutorisz, H., N. Dillon, and L. Tora, *The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 593-9.
281. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 794-8.
282. Toyokuni, S., et al., *Persistent oxidative stress in cancer*. FEBS Lett, 1995. **358**(1): p. 1-3.
283. Storz, P., *Reactive oxygen species in tumor progression*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 1881-96.
284. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81**(2): p. 807-69.
285. Collavin, L., et al., *Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8870-5.
286. Viger, R.S., et al., *Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(4): p. 781-98.
287. Mavrothalassitis, G. and J. Ghysdael, *Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6524-32.
288. Graves, B.J. and J.M. Petersen, *Specificity within the ets family of transcription factors*. Adv Cancer Res, 1998. **75**: p. 1-55.
289. Rice, J.C. and B.W. Futscher, *Transcriptional repression of BRCA1 by aberrant cytosine methylation, histone hypoacetylation and chromatin condensation of the BRCA1 promoter*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(17): p. 3233-9.
290. Rice, J.C., et al., *Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens*. Carcinogenesis, 2000. **21**(9): p. 1761-5.
291. Wilson, C.A., et al., *Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 236-40.
292. Thompson, M.E., et al., *Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression*. Nat Genet, 1995. **9**(4): p. 444-50.
-

-
293. Ross, J., *mRNA stability in mammalian cells*. Microbiol Rev, 1995. **59**(3): p. 423-50.
294. Januchowski, R. and P.P. Jagodzinski, *Trichostatin A down-regulates ZAP-70, LAT and SLP-76 content in Jurkat T cells*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(2): p. 198-204.
295. Nair, A.R., et al., *Paradoxical effects of trichostatin A: inhibition of NF-Y-associated histone acetyltransferase activity, phosphorylation of hGCN5 and downregulation of cyclin A and B1 mRNA*. Cancer Lett, 2001. **166**(1): p. 55-64.
296. Derrigo, M., et al., *RNA-protein interactions in the control of stability and localization of messenger RNA (review)*. Int J Mol Med, 2000. **5**(2): p. 111-23.
297. Nambiar, M.P., et al., *Effect of trichostatin A on human T cells resembles signaling abnormalities in T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a new mechanism for TCR zeta chain deficiency and abnormal signaling*. J Cell Biochem, 2002. **85**(3): p. 459-69.
298. Li, H. and X. Wu, *Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 860-7.

*[...] Nun gut' Nacht!
Dies Spiel zu enden,
begrüßt uns mit gewogenen Händen! [...]*

Der Kobold Puck
aus
„Ein Sommernachtstraum“

William Shakespeare